

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

**ENVOLVIMENTO MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE**

JORDANA MIRANDA DE SOUZA SILVA

Porto Alegre

2015

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

**ENVOLVIMENTO MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE**

JORDANA MIRANDA DE SOUZA SILVA

Orientador: Dr. Ricardo Machado Xavier

Co-orientador: Dr. Rafael Mendonça da Silva Chakr

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Jordana Miranda de Souza
ENVOLVIMENTO MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE
OSTEOARTRITE / Jordana Miranda de Souza Silva. --
2015.
54 f.

Orientador: Ricardo Machado Xavier.
Coorientador: Rafael Mendonça da Silva Chakr.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Osteoartrite. 2. Perda muscular. 3.
Miostatina. 4. Miogenina. I. Xavier, Ricardo
Machado, orient. II. Chakr, Rafael Mendonça da Silva,
coorient. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Claiton Viegas Brenol

Profa. Dra. Lidiane Isabel Filippin

Prof. Dr. Odirlei André Monticielo

Profa. Dra. Priscila Schmidt Lora

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares pelo apoio e pelo incentivo desde o início da minha jornada acadêmica.

Agradeço aos colegas de laboratório pela convivência, amizade e ajuda durante todos esses anos, desde o período da minha iniciação científica. Agradeço, em especial, ao colega e amigo Paulo Alabarse por sua ajuda em todas as etapas do desenvolvimento do meu projeto de mestrado, pela sua paciência e disponibilidade.

Agradeço ao meu coorientador, Dr. Rafael Chakr, por ter estado tão próximo durante todo o período do mestrado, pela sua disponibilidade e por todo o seu estimado auxílio.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Ricardo Xavier, inicialmente, por ter me aceito no laboratório, pela oportunidade de desenvolver um projeto de pesquisa sob a sua orientação e por todo o conhecimento transmitido.

RESUMO

Base teórica: A osteoartrite é uma doença crônica cuja principal característica é a degradação progressiva da cartilagem articular. Além do acometimento articular, frequentemente, os pacientes com osteoartrite apresentam fraqueza e atrofia dos músculos periarticulares. Apesar disso, os mecanismos moleculares envolvidos na perda muscular relacionada à osteoartrite não são conhecidos. Os principais mecanismos já estudados, em outras condições, estão relacionados ao aumento da degradação e à redução da síntese de proteínas musculares e a déficits na ativação das células-satélite, responsáveis pela regeneração muscular. A miostatina, um importante regulador negativo do crescimento da massa muscular, estimula o aumento da degradação e a redução da síntese de proteínas musculares. Por outro lado, MyoD e miogenina, são marcadores de proliferação e de diferenciação de células-satélite, respectivamente. **Objetivos:** Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na perda muscular em um modelo animal de osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior em ratas. **Métodos:** Ratas Wistar fêmeas foram alocadas em dois grupos: OA (submetidas à cirurgia de transecção do ligamento cruzado anterior do joelho direito) e SHAM (submetidas à cirurgia fictícia do joelho direito). Durante o período experimental de 12 semanas foram avaliados, semanalmente, o peso corporal e a locomoção exploratória espontânea. Após a eutanásia, foram coletadas as articulações do joelho direito para confirmação do desenvolvimento da doença. Os músculos gastrocnêmio, tibial-anterior e sóleo, da pata posterior direita, foram dissecados, pesados e congelados. O músculo gastrocnêmio foi utilizado para a avaliação da atrofia muscular, através da análise da área seccional da miofibrila, e para análise da expressão proteica de miostatina, MyoD e miogenina. **Resultados:** A locomoção exploratória espontânea, o peso corporal e o peso dos músculos gastrocnêmio, tibial-anterior e sóleo não apresentaram diferença significativa entre os grupos OA e SHAM. A histopatologia da articulação do joelho confirmou o desenvolvimento da doença nos animais do grupo OA. A área do músculo gastrocnêmio demonstrou redução de aproximadamente 10% no grupo OA, em comparação com o grupo SHAM. O grupo OA apresentou aumento na expressão proteica de miostatina e redução na expressão proteica de miogenina. A expressão proteica de MyoD não apresentou diferença entre os grupos. **Conclusão:** A atrofia do

músculo gastrocnêmio presente na osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior envolve aumento na expressão de miostatina e redução na expressão de miogenina. Nesse modelo, a perda muscular pode estar relacionada à proteólise induzida pelos níveis aumentados de miostatina e ao déficit na diferenciação das células-satélite devido à redução na expressão de miogenina.

Palavras-chave: osteoartrite; perda muscular; miostatina; miogenina.

ABSTRACT

Background: Osteoarthritis is a chronic joint disease primarily characterized by cartilage loss. In addition to joint impairment, patients with osteoarthritis often suffer from weakness and atrophy of the periarticular muscles. However, the molecular mechanisms involved in osteoarthritis-related muscle wasting are not known. The main mechanisms studied, in other conditions, are related to increased degradation and reduced synthesis of muscle protein and to deficits in the activation of satellite-cells, which are responsible for muscle regeneration. Myostatin, an important negative regulator of muscle growth, stimulates the increase of degradation and the reduction of synthesis of muscle protein. Moreover, MyoD and myogenin are markers of proliferation and differentiation of satellite-cells, respectively. **Objective:** To investigate the pathways involved in muscle wasting in a model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection (ACL) in rats. **Methods:** Female Wistar rats were allocated into two groups: OA (submitted to the ACL transection) and SHAM (submitted to surgical procedures without ACL transection). The spontaneous exploratory locomotion and the body weight of animals were evaluated weekly. In the twelfth week after the induction of disease, animals were euthanized and the right knee joints were collected for further confirmation of the disease by histopathology. Gastrocnemius, tibialis-anterior and soleus muscles from right hind paw were dissected, weighed and frozen. Gastrocnemius was used for evaluation of muscle atrophy, by cross-sectional area measurement, and protein expression of myostatin, MyoD and myogenin. **Results:** Spontaneous exploratory locomotion, body weight and weight of muscles showed no difference between OA and SHAM groups. The histopathology of the knee joints confirmed the development of the disease in animals from OA group. Gastrocnemius area of animals from OA group had a reduction of about 10% compared to animals from SHAM group. Protein expression of myostatin was increased in animals from OA group, while myogenin expression was decreased. MyoD expression was similar in both OA and SHAM groups. **Conclusion:** Gastrocnemius atrophy in osteoarthritis induced by ACL transection involves increased protein expression of myostatin and decreased protein expression of myogenin. In this model, muscle wasting may be linked to myostatin-induced proteolysis and to deficits in satellite-cell differentiation due to decreased expression of myogenin.

Keywords: osteoarthritis; muscle wasting; myostatin; myogenin.

LISTA DE ABREVIATURAS

OA	Osteoartrite
MuRF-1	Muscle Ring Finger-1
MAFbx	Muscle Atrophy F-box
IGF-1/PI3K/Akt	Insulin-Like Growth Factor-1/ Phosphoinositide 3-kinase/ Akt
FoxO	Forkhead box O
ACL	Anterior cruciate ligament
SHAM	Cirurgia fictícia
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
HE	Hematoxylin-eosin
OARSI	Osteoarthritis Research Society International
CSA	Cross-sectional area
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
DTT	Dithiothreitol
PMSF	Phenylmethylsulfony fluoride
PVDF	Polyvinylidene difluoride
PBS-T	Phosphate-buffered saline with Tween
Pax7	Paired Box 7
Myf5	Myogenic factor 5
MyoD	Myogenic Differentiation
MRF4	Muscle Regulatory Factor 4

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismos de perda muscular	23
Figura 2 - Locomoção exploratória espontânea	40
Figura 3 - Peso corporal e peso dos músculos.....	41
Figura 4 - Histopatologia da articulação do joelho	42
Figura 5 - Área seccional do gastrocnêmio	42
Figura 6 - Expressão proteica de miostatina, MyoD e miogenina	43

INDICE

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES ...	15
2.2 ARTIGO 1: ENVOLVIMENTO MUSCULAR NA OSTEOARTRITE.....	15
RESUMO	16
INTRODUÇÃO.....	16
FORÇA MUSCULAR E OSTEOARTRITE	17
ATROFIA MUSCULAR E OSTEOARTRITE	18
DOR E PERDA MUSCULAR NA OSTEOARTRITE.....	19
PROPRIOCEPÇÃO E PERDA MUSCULAR NA OSTEOARTRITE	20
MECANISMOS MOLECULARES DE PERDA MUSCULAR	20
CONCLUSÕES	25
3 MARCO TEÓRICO.....	26
4 JUSTIFICATIVA.....	27
5 OBJETIVOS	28
5.1 OBJETIVO PRINCIPAL	28
5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	28
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	29
7 ARTIGO 2:	34
MUSCLE WASTING IN OSTEOARTHRITIS MODEL INDUCED BY ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT TRANSECTION	34
Introduction.....	36
Materials and methods.....	37
Results.....	40
Discussion	44
Conclusion	48
Financial support	48
Competing interests.....	48
References	48

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	54

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é forma mais comum de doença articular e uma das mais importantes causas de incapacidade funcional e perda de qualidade de vida. As alterações patológicas observadas nas articulações de pacientes com OA incluem, principalmente, degeneração progressiva da cartilagem, inflamação sinovial e alterações no osso subcondral (1). A OA afeta majoritariamente articulações dos joelhos, mãos, quadris e coluna vertebral e os principais sintomas clínicos incluem dor crônica, instabilidade articular, rigidez, deformidades articulares e estreitamento do espaço articular (2). Os fatores de risco mais comuns para OA incluem sexo, idade, obesidade, predisposição genética, lesão articular prévia e fatores mecânicos (3). Tradicionalmente, o tratamento da OA consiste de analgésicos e drogas modificadoras do curso da doença, com substituição cirúrgica da articulação na doença em estágio final (4).

Atualmente sabe-se que a OA não é simplesmente um processo de uso e desgaste, mas sim um processo de remodelação anormal de tecidos articulares, impulsionado por uma série de mediadores inflamatórios (1). Em pacientes com OA, os processos de reparação em resposta ao dano articular não são capazes de compensar suficientemente os mecanismos destrutivos, levando a lesões estruturais e sintomas clínicos. Os primeiros sinais da doença, a nível celular, são proliferação e remodelação da matriz cartilaginosa e óssea, que ocorrem na tentativa de manter a integridade e a homeostase desses tecidos. Os condrócitos articulares aumentam a síntese de matriz, bem como de moléculas que contribuem para sua própria destruição, como citocinas pró-inflamatórias (5). A remodelação se torna uma resposta deletéria quando o equilíbrio entre o anabolismo e o catabolismo é perdido (4). Em paralelo a essas alterações, a atividade celular aumentada no osso subjacente leva a esclerose do osso subcondral, com espessamento da placa cortical, extensa remodelação trabecular, e formação de osteófitos nas bordas exteriores das articulações (5).

As estimativas são de que em todo o mundo 9,6% dos homens e 18% das mulheres com idade igual ou superior aos 60 anos apresentem OA sintomática (6). A OA é mais prevalente em homens com até 50 anos, no entanto, a prevalência em

mulheres aumenta significativamente após a menopausa (5). O rápido aumento do número de idosos na população, nos últimos anos, torna a idade um fator particularmente importante (7). A alta prevalência de OA em idosos pode estar relacionada com a redução da capacidade regenerativa e com o acúmulo de outros fatores de risco. Da mesma maneira, a atual epidemia de obesidade pode contribuir com o aumento da susceptibilidade à OA, tanto por gerar um aumento de carga sobre as articulações quanto por propiciar a ação de adipocinas inflamatórias (4). Além disso, há um claro componente genético envolvido, uma vez que a taxa de herdabilidade estimada para OA está na faixa de 40-65%, dependendo da articulação (8). Adicionalmente, lesões aos tecidos articulares podem afetar negativamente a biomecânica da articulação, bem como causar danos ao osso ou à cartilagem, tornando a articulação mais suscetível a outros insultos (4).

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão bibliográfica deste trabalho consistirá de um artigo de revisão que será encaminhado para a Revista Brasileira de Reumatologia.

2.1 ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES

A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed e Web of Science e foram incluídos estudos publicados entre 2000 e 2015. Foram realizadas buscas através da lista de termos e suas combinações: “osteoarthritis”, “muscle”, “pain”, “muscle arthrogenic inhibition”, “proprioception”, “cachexia”, “sarcopenia”, “disuse”, “satellite-cell”, “myostatin”, “MyoD” e myogenin”.

2.2 ARTIGO 1: ENVOLVIMENTO MUSCULAR NA OSTEOARTRITE

Autores:

^{1, 3} Jordana Miranda de Souza Silva, ^{1, 3} Paulo Vinicius Gil Alabarse, ^{2, 3} Rafael Mendonça da Silva Chakr, ^{2, 3} Ricardo Machado Xavier

Filiação:

¹ Aluno no Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.

² Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

³ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/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@hcupa.ufrgs.br

Apoio Financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).

RESUMO

A osteoartrite é uma doença crônica de alta prevalência caracterizada, principalmente, por degradação da cartilagem articular. Os músculos periarticulares têm um papel importante na manutenção da estabilidade articular e, nesse contexto, há evidências de que a fraqueza e a atrofia musculares influenciam na gênese e no desenvolvimento da osteoartrite dos membros inferiores. Além disso, outros aspectos presentes na doença, como dor, padrões de ativação musculares alterados e déficits na acuidade proprioceptiva, agravam ainda mais a disfunção muscular que acompanha a doença. Apesar disso, não são conhecidas as vias de sinalização envolvidas na perda de massa muscular da osteoartrite. As principais vias já estudadas, em outras condições, incluem redução da síntese ou aumento na degradação de proteínas musculares e deficiência na regeneração muscular.

INTRODUÇÃO

A osteoartrite (OA) é a doença articular mais comum e uma das principais causas de dor e incapacidade funcional em adultos (4). As alterações patológicas observadas nas articulações de pacientes com OA incluem, principalmente, degeneração progressiva da cartilagem, inflamação sinovial e alterações no osso subcondral e nos tecidos periarticulares (9). A OA afeta majoritariamente as articulações dos joelhos e

dos quadris, uma vez que está presente em cerca de 3,8% e 0,85% da população mundial, respectivamente (2).

Há evidências crescentes de que o declínio de força muscular nos membros inferiores está associado com a OA de joelho e de quadril (10). Os músculos periarticulares funcionam para produzir o movimento e também para absorver a carga sobre o membro e proporcionar estabilidade articular (10, 11). Dessa maneira, a fraqueza muscular foi identificada não só como um fator de risco potencial para incidência de OA, mas também como uma condição que influencia na progressão e na severidade da doença. Além disso, a presença da OA tem um impacto negativo sobre a integridade da estrutura e da função dos músculos, podendo, potencialmente, afetar ainda mais o processo da doença (12).

Esta revisão tem por objetivo reunir as mais relevantes publicações que versam sobre a influência da perda muscular sobre incidência, progressão e severidade da OA dos membros inferiores.

FORÇA MUSCULAR E OSTEOARTRITE

Na OA dos membros inferiores, a fraqueza muscular é um achado comum. A função muscular prejudicada pode gerar sobrecarga e instabilidade articulares e, por conta disso, influenciar na gênese e no curso da doença.

Alguns estudos identificam o declínio de força muscular como um fenômeno precoce e, por vezes, precedente às lesões estruturais da doença (13, 14). Foi demonstrado que uma redução no desempenho funcional dos membros inferiores, bem como uma redução na força do quadríceps, precedem o surgimento de evidências radiográficas de OA de joelho (13, 14). Além disso, maior força no quadríceps atua como um fator de proteção contra a incidência de OA de joelho e de OA de quadril, principalmente entre mulheres (9, 15, 16). Hootman et al. reportaram que níveis mais altos de força no quadríceps reduzem em 55 a 64% o risco de doença, nos membros inferiores, em mulheres (16). Adicionalmente, maior força de quadríceps está associada a menores níveis de degradação da cartilagem, remodelamento ósseo e estreitamento do espaço articular em pacientes com OA de joelho (17, 18).

A fraqueza muscular também está relacionada com a progressão da OA, uma vez que o declínio na força muscular de membros inferiores está presente em pacientes com diversos graus de doença (19, 20). Quando comparados a controles saudáveis, pacientes com OA de joelho apresentam fraqueza no quadríceps e nos músculos do quadril (19-21). Similarmente, pacientes com OA bilateral de quadril apresentam menor força nos músculos responsáveis pela abdução, adução e flexão do quadril quando comparados a controles saudáveis, e pacientes com OA unilateral de quadril apresentam déficit de força no membro afetado em comparação ao membro contralateral saudável (22, 23). Ademais, a força muscular parece decrescer à medida que a gravidade da doença aumenta, uma vez que pacientes mulheres com OA de joelho severa apresentam menor força no quadríceps do que pacientes com OA leve (24).

Assim, além de um fator de risco identificável, a fraqueza muscular representa um indicativo de progressão da OA. Por conta disso, o fortalecimento muscular tem sido recomendado para o manejo clínico, tratamento e potencial prevenção da doença (25).

ATROFIA MUSCULAR E OSTEOARTRITE

Frequentemente, a fraqueza muscular em pacientes com OA está associada à atrofia de fibras musculares (22, 23). Na atrofia muscular há um desequilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas e um dos principais achados é a redução da área de secção transversal da fibra muscular.

Em pacientes com OA unilateral de quadril, além da redução de força, pode haver redução de até 19% na área seccional de músculos do quadril e da coxa no membro afetado, em comparação com o membro contralateral saudável (22, 23). Já na OA de joelho, essa redução é de cerca de 12% em pacientes idosas, quando comparadas a controles (26).

Além disso, a atrofia muscular presente na OA parece envolver principalmente fibras do tipo 2. Terracciano et al. demonstraram que a atrofia no quadríceps em pacientes com OA de joelho é homogênea entre os tipos de fibras (27). No entanto,

Fink et al. reportaram a ocorrência de atrofia de fibras musculares do tipo 2 em todos os pacientes avaliados com OA de joelho e atrofia de fibras do tipo 1 em apenas 32% dos pacientes. Visto que a área de fibras do tipo 2 coincide, sobretudo, com o estado de treinamento físico, a atrofia de fibras do tipo 2 pode estar relacionada com a redução da movimentação do membro afetado pela OA por conta da dor (11).

Esses resultados evidenciam, portanto, a presença de alterações estruturais no músculo de pacientes com OA. Por conta disso, a atrofia muscular pode contribuir para a diminuição ou perda da capacidade do músculo de proporcionar a estabilidade articular necessária (11).

DOR E PERDA MUSCULAR NA OSTEOARTRITE

Dor desencadeada ou agravada pelo uso da articulação, bem como rigidez por alguns minutos no início do movimento, são sintomas característicos da OA (4). Além disso, a percepção dolorosa associada à OA pode ser intensificada devido à sensibilização nociceptiva. Existem evidências de sensibilização nociceptiva central e periférica associadas à OA, o que reduz o limiar nociceptivo tanto no local da OA, quanto à distância. A alteração nesse mecanismo pode, ainda, servir de gatilho para a transição da dor aguda para a dor crônica (28, 29).

Além de ser um dos principais sintomas da OA, a dor pode acentuar a perda muscular tipicamente observada nos pacientes. A dor causa importantes prejuízos na mobilidade, uma vez que os pacientes com OA tendem a evitar a atividade física de modo a preveni-la (30, 31). Em longo prazo, essa inatividade pode contribuir para a deterioração da função muscular, pois se sabe que o desuso leva à perda significativa de massa e de força muscular (30-32).

Adicionalmente, o aumento na descarga de neurônios nociceptivos pode levar à inibição muscular artrogênica, quando descargas alteradas da articulação com OA resultam em defeitos na estimulação eferente do motoneurônio (33-35). Essa inibição neural contínua impede que os músculos sejam completamente ativados, levando à fraqueza muscular (34).

Assim, a intensificação da sensação dolorosa nos pacientes com OA é capaz de afetar negativamente a função muscular. Em conformidade com isso, foi demonstrado que o controle da dor, através do uso de anti-inflamatórios não esteroidais, possibilitou um aumento da força do quadríceps em pacientes com OA de joelho (36, 37).

PROPRIOCEPÇÃO E PERDA MUSCULAR NA OSTEOARTRITE

A propriocepção articular abrange o senso de posição articular e a sensação de movimento. Essa percepção depende de mecanorreceptores nas articulações, músculos, tendões e tecidos associados. A propriocepção é capaz de ativar e modular a função muscular a fim de promover estabilidade articular e produzir movimentos controlados (38, 39). Quando a acuidade proprioceptiva diminui, a capacidade funcional só pode ser mantida se houver força muscular suficiente para compensar a redução na precisão de modulação e ativação de músculos. Por conta disso, a capacidade funcional pode ser mais fortemente afetada na presença simultânea de propriocepção diminuída e de fraqueza muscular (40).

Estudos demonstram que a propriocepção é diminuída em pacientes com OA de joelho quando comparados a controles saudáveis (41, 42). Além disso, a associação entre força muscular e limitações funcionais é maior em pacientes com OA de joelho que apresentam propriocepção diminuída do que em pacientes com propriocepção normal. Sendo assim, na ausência de controle neuromuscular adequado, devido à propriocepção diminuída, a fraqueza muscular afeta os níveis de atividade dos pacientes com OA com maior intensidade (40).

Adicionalmente, sabe-se que a acuidade proprioceptiva declina com não só na presença da OA, mas também com o aumento da idade. Nesse sentido, foi demonstrado que a propriocepção é afetada de maneira ainda mais severa em pacientes idosos com OA do joelho (43).

MECANISMOS MOLECULARES DE PERDA MUSCULAR

Grande parte dos estudos que abordam o acometimento do músculo na OA tem como objetivo o estudo da força. No entanto, outros aspectos da função muscular afetados

pelo processo da doença, como os mecanismos moleculares envolvidos na redução da massa muscular, são pouco estudados. As principais vias moleculares são conhecidas graças a estudos que avaliam a perda muscular observada em doenças crônicas (caquexia), devido à inatividade física ou imobilização (desuso) e decorrente do processo normal de envelhecimento (sarcopenia) (44). Por conta disso, sabe-se que os mecanismos são distintos de acordo com a condição incitante.

A perda muscular está relacionada à redução no conteúdo proteico das fibras musculares. A síntese e a degradação de proteínas do músculo esquelético são reguladas por uma rede de vias de sinalização que transmitem os estímulos externos aos fatores intracelulares que regulam a transcrição gênica (45). Dessa maneira, os principais meios que levam à perda muscular são a redução da síntese ou o aumento da degradação proteica e, também, déficits na capacidade de regeneração muscular mediada pelas células-satélite (44).

Uma das principais vias que regula a degradação de proteínas no músculo é o sistema ubiquitina-proteossomo. Três componentes enzimáticos são necessários para a degradação muscular por esse sistema: a enzima E1 ativa a ubiquitina, as enzimas E2 são responsáveis por transferir a ubiquitina ativada para a molécula de proteína que é alvo de degradação, e as enzimas E3 regulam a transferência de ubiquitina para a proteína, marcando-a para ser degradada (Figura 1) (46). MuRF-1 (Muscle Ring Finger-1) e MAFbx (Muscle Atrophy F-box) são duas ligases E3 específicas do músculo esquelético e seus níveis encontram-se aumentados em muitos tipos diferentes de caquexia (caquexia do câncer, insuficiência cardíaca, doença pulmonar obstrutiva crônica) e em resposta ao desuso (47-49). No entanto, na sarcopenia não há grandes alterações nos mediadores do sistema ubiquitina-proteossomo (47).

Analogamente, a miostatina é um regulador negativo do crescimento da massa muscular e pode inibir o crescimento muscular através de diversas vias. A miostatina pode restringir a síntese de proteínas ao inibir a via IGF-1/PI3K/Akt (Insulin-Like Growth Factor-1/ Phosphoinositide 3-kinase/ Akt), bem como promover maior degradação proteica ao estimular a atividade do sistema ubiquitina-proteossomo através da via FoxO (Forkhead box O) (50). Além disso, a miostatina pode, ainda,

interferir na ativação das células-satélite ao reduzir a sua capacidade de diferenciação (Figura 1) (51). Os níveis de miostatina normalmente se encontram elevados na caquexia, e reduzidos ou não alterados no desuso, porém, a sua expressão na atrofia muscular relacionada à idade não é clara (48, 52-57). Alguns autores descrevem que não há nenhuma alteração da expressão de miostatina na sarcopenia, enquanto outros descrevem uma significativa elevação ou, até mesmo, diminuição nos seus níveis de expressão (56, 58).

Em contrapartida às vias que levam à perda de massa muscular, as células-tronco musculares, chamadas de células-satélite, comandam o crescimento e a regeneração do músculo esquelético. Em condições normais, as células-satélite permanecem em estado de quiescência e são caracterizadas pela expressão de Pax7 (Paired Box 7) e Myf5 (Myogenic factor 5). Em resposta a estímulos como crescimento e regeneração, as células-satélite ativadas, então chamadas de mioblastos, expressam os fatores de transcrição MyoD (Myogenic Differentiation) e Myf5 e proliferam massivamente para gerar os progenitores miogênicos necessários para a regeneração muscular. Em seguida, os mioblastos regulam negativamente a expressão de Pax7 e aumentam a expressão de fatores tais como miogenina e MRF4 (Muscle Regulatory Factor 4) para sofrer diferenciação e fundir às fibras musculares já existentes (Figura 1) (59). Em resposta ao dano muscular resultante de fatores circulantes relacionados à caquexia, as células-satélite são ativadas, mas as fibras musculares danificadas não são reparadas, uma vez que a diferenciação miogênica é prematuramente interrompida devido à expressão sustentada de Pax7 (60, 61). Na atrofia muscular decorrente do desuso não há alteração no conteúdo total de células-satélite e os marcadores de proliferação e de diferenciação, como MyoD e miogenina, normalmente, estão diminuídos ou não apresentam alteração (56, 62-64). Os potenciais mecanismos envolvidos na redução da massa muscular esquelética durante a sarcopenia apontam para uma redução no conteúdo de células-satélite, bem como na sua falha em substituir e reparar fibras musculares lesadas (59, 65).

Apesar do esclarecimento a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos em condições como caquexia, desuso e sarcopenia, na perda muscular que acompanha a OA estes mecanismos ainda não foram elucidados. A OA é uma doença crônica caracterizada por inflamação de baixo grau, com elevação dos níveis de

marcadores inflamatórios no soro e no músculo e, além disso, é uma doença que, frequentemente, leva seus pacientes a certo grau de limitação funcional e consequente restrição nos níveis de atividade física (30, 66, 67). Sendo assim, é possível que as vias de perda muscular associadas à OA se assemelhem às vias associadas à caquexia ou ao desuso. Ademais, a prevalência de OA na população idosa é bastante alta e, embora devam existir outros mecanismos que contribuam para o agravamento da perda muscular, é possível que nos pacientes com OA o declínio muscular tenha algum componente associado à idade (68, 69).

De fato, a sarcopenia pode ser considerada primária quando nenhuma outra causa além do envelhecimento é evidente, no entanto, essa condição também pode ser definida como sarcopenia secundária, quando associada a outras patologias (70). Sendo assim, a perda muscular da OA poderia ser classificada como sarcopenia secundária. Nesse sentido, já foi revisado o papel clínico da sarcopenia em pacientes afetados por OA e, embora haja variação nas medidas e ferramentas utilizadas nos estudos para a comparação entre sarcopenia e OA, a perda muscular nesses pacientes é incontestável (71).

Apesar de diversos autores já terem investigado a relação entre OA e perda muscular, a literatura carece de estudos básicos sobre os padrões moleculares envolvidos nesse acometimento muscular.

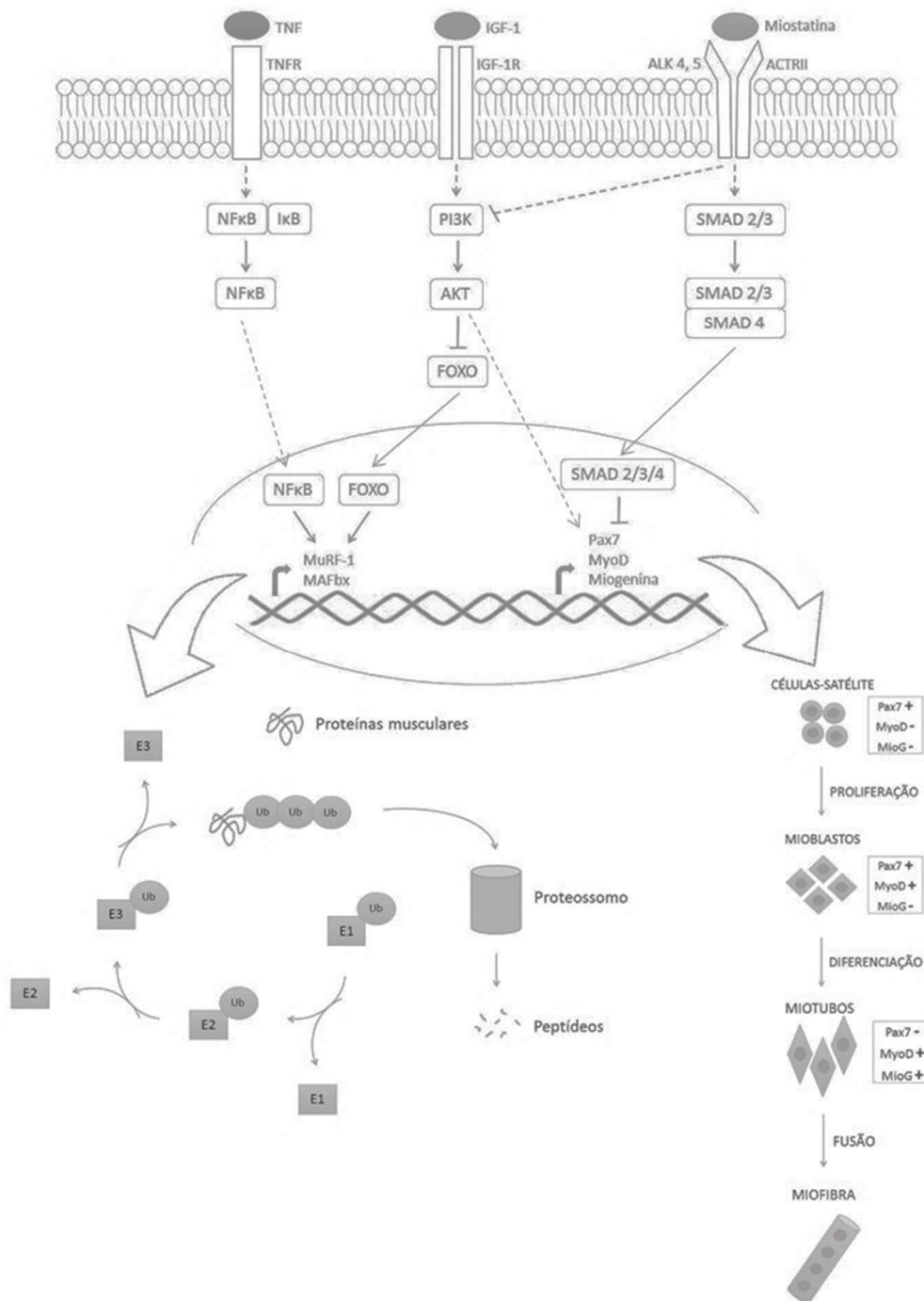


Figura 1: Vias moleculares que envolvem sinalização de miostatina, MuRF-1, MyoD e miogenina no músculo esquelético. A miostatina aumenta a degradação e diminui a síntese proteica através da ativação do complexo SMAD e da inibição da via IGF-1/PI3K/Akt, resultando, assim, na ativação de atrogenes e na inibição da miogênese. Citocinas inflamatórias podem também promover a ativação de atrogenes. A degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteossomo requer a participação de três enzimas distintas (E1, E2 e E3), sendo que E3 confere especificidade às proteínas que serão degradadas. MuRF-1 e MAFbx são enzimas E3 específicas do músculo. As células-satélite são precursores miogênicos quiescentes encontrados no

músculo que, quando ativadas, entram no ciclo celular, sofrem proliferação, diferenciação e então fundem-se às fibras musculares já existentes, em resposta a estímulos como crescimento e regeneração. Fonte: própria autora.

CONCLUSÕES

Os músculos dos membros inferiores, principalmente o quadríceps, exercem influência no controle de carga sobre a articulação. Prejuízos na função muscular, incluindo fraqueza muscular, padrões de ativação muscular alterados e déficits na acuidade proprioceptiva são comumente encontrados em associação com a OA. Além disso, há evidências de que a fraqueza muscular pode predispor ao surgimento e, potencialmente, à progressão da doença. Assim, há a formação de um círculo vicioso envolvendo perda muscular e degradação articular na OA. Porém, em contrapartida, não são conhecidos os mecanismos moleculares envolvidos na disfunção muscular que acompanha a OA.

3 MARCO TEÓRICO

A base teórica relatada demonstra que os pacientes com OA apresentam perda muscular, por vezes precedente às lesões estruturais da doença. O comprometimento da função muscular causa excesso de carga sobre a articulação e tem como consequência a instabilidade articular, agravando, assim, o curso da doença. Embora esteja clara a relação entre OA e perda muscular, não são conhecidas as vias moleculares envolvidas nesse processo.

4 JUSTIFICATIVA

A OA é uma doença prevalente e que envolve não apenas a cartilagem, a sinóvia e o osso subcondral, mas também o músculo periarticular. Do envolvimento muscular na OA sabemos, através de outros estudos, que há aumento de citocinas inflamatórias, fraqueza e atrofia muscular, mas não conhecemos as alterações moleculares envolvidas neste processo. Dentre os diferentes mecanismos de redução da massa muscular, alguns estão associados a estado inflamatório sistêmico e outros a desuso. Não temos até o presente momento evidências das vias moleculares que levam à perda muscular observada na OA.

Sendo assim, o conhecimento dos alvos moleculares envolvidos nesse processo pode promover a descoberta de biomarcadores e, como consequência, oferecer base para futuros estudos diagnósticos e terapêuticos, à semelhança do que vem ocorrendo com outras doenças musculoesqueléticas.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO PRINCIPAL

- Descrever as alterações histológicas e moleculares do músculo gastrocnêmio em um modelo experimental de osteoartrite.

5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Confirmar o desenvolvimento da osteoartrite através da avaliação histopatológica da articulação do joelho.
- Avaliar a locomoção exploratória espontânea dos animais;
- Avaliar o peso corporal e peso dos músculos gastrocnêmio, tibial-anterior e sóleo dos animais;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

1. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1697-707.
2. Xia B, Di Chen, Zhang J, Hu S, Jin H, Tong P. Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif Tissue Int.* 2014;95(6):495-505.
3. Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, Jordan KP. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18(1):24-33.
4. Glyn-Jones S, Palmer AJ, Agricola R, Price AJ, Vincent TL, Weinans H, et al. Osteoarthritis. *Lancet.* 2015;386(9991):376-87.
5. Musumeci G, Aiello FC, Szychlińska MA, Di Rosa M, Castrogiovanni P, Mobasher A. Osteoarthritis in the XXIst century: risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):6093-112.
6. Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ.* 2003;81(9):646-56.
7. Loeser RF. Aging and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23(5):492-6.
8. Evangelou E, Kerkhof HJ, Stykarsdottir U, Ntzani EE, Bos SD, Esko T, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies identifies novel variants associated with osteoarthritis of the hip. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(12):2130-6.
9. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(8):1077-89.
10. De Ceuninck F, Fradin A, Pastoureau P. Bearing arms against osteoarthritis and sarcopenia: when cartilage and skeletal muscle find common interest in talking together. *Drug Discov Today.* 2014;19(3):305-11.
11. 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.
12. Bennell KL, Wrigley TV, Hunt MA, Lim BW, Hinman RS. Update on the role of muscle in the genesis and management of knee osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013;39(1):145-76.
13. Thorstensson CA, Petersson IF, Jacobsson LT, Boegård TL, Roos EM. Reduced functional performance in the lower extremity predicted radiographic knee osteoarthritis five years later. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(4):402-7.
14. Slemenda C, Heilman DK, Brandt KD, Katz BP, Mazucca SA, Braunstein EM, et al. Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis Rheum.* 1998;41(11):1951-9.
15. Segal NA, Torner JC, Felson D, Niu J, Sharma L, Lewis CE, et al. Effect of thigh strength on incident radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in a longitudinal cohort. *Arthritis Rheum.* 2009;61(9):1210-7.
16. M. HJ, J. FS, A. MC, N. BS. Lower Extremity Muscle Strength and Risk of Self Reported Hip or Knee Osteoarthritis. 2004;1(4):321-30.
17. Amin S, Baker K, Niu J, Clancy M, Goggins J, Guermazi A, et al. Quadriceps strength and the risk of cartilage loss and symptom progression in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;60(1):189-98.

18. Segal NA, Glass NA, Torner J, Yang M, Felson DT, Sharma L, et al. Quadriceps weakness predicts risk for knee joint space narrowing in women in the MOST cohort. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(6):769-75.
19. Palmieri-Smith RM, Thomas AC, Karvonen-Gutierrez C, Sowers MF. Isometric quadriceps strength in women with mild, moderate, and severe knee osteoarthritis. *Am J Phys Med Rehabil*. 2010;89(7):541-8.
20. Liikavainio T, Lyytinen T, Tyrväinen E, Sipilä S, Arokoski JP. Physical function and properties of quadriceps femoris muscle in men with knee osteoarthritis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008;89(11):2185-94.
21. Costa RA, Oliveira LM, Watanabe SH, Jones A, Natour J. Isokinetic assessment of the hip muscles in patients with osteoarthritis of the knee. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(12):1253-9.
22. Arokoski MH, Arokoski JP, Haara M, Kankaanpää M, Vesterinen M, Niemitukia LH, et al. Hip muscle strength and muscle cross sectional area in men with and without hip osteoarthritis. *J Rheumatol*. 2002;29(10):2185-95.
23. Rasch A, Byström AH, Dalen N, Berg HE. Reduced muscle radiological density, cross-sectional area, and strength of major hip and knee muscles in 22 patients with hip osteoarthritis. *Acta Orthop*. 2007;78(4):505-10.
24. Taniguchi M, Fukumoto Y, Kobayashi M, Kawasaki T, Maegawa S, Ibuki S, et al. Quantity and Quality of the Lower Extremity Muscles in Women with Knee Osteoarthritis. *Ultrasound Med Biol*. 2015;41(10):2567-74.
25. Zhang W, Moskowitz RW, Nuki G, Abramson S, Altman RD, Arden N, et al. OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis, Part II: OARSI evidence-based, expert consensus guidelines. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(2):137-62.
26. Ikeda S, Tsumura H, Torisu T. Age-related quadriceps-dominant muscle atrophy and incident radiographic knee osteoarthritis. *J Orthop Sci*. 2005;10(2):121-6.
27. Terracciano C, Celi M, Lecce D, Baldi J, Rastelli E, Lena E, et al. Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos Int*. 2013;24(3):1095-100.
28. Fingleton C, Smart K, Moloney N, Fullen BM, Doody C. Pain sensitization in people with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2015;23(7):1043-56.
29. Courtney CA, O'Hearn MA, Hornby TG. Neuromuscular function in painful knee osteoarthritis. *Curr Pain Headache Rep*. 2012;16(6):518-24.
30. Pisters MF, Veenhof C, van Dijk GM, Dekker J, Study Group C. Avoidance of activity and limitations in activities in patients with osteoarthritis of the hip or knee: a 5 year follow-up study on the mediating role of reduced muscle strength. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(2):171-7.
31. Holla JF, van der Leeden M, Knol DL, Peter WF, Roorda LD, Lems WF, et al. Avoidance of activities in early symptomatic knee osteoarthritis: results from the CHECK cohort. *Ann Behav Med*. 2012;44(1):33-42.
32. Suetta C, Aagaard P, Magnusson SP, Andersen LL, Sipilä S, Rosted A, et al. Muscle size, neuromuscular activation, and rapid force characteristics in elderly men and women: effects of unilateral long-term disuse due to hip-osteoarthritis. *J Appl Physiol (1985)*. 2007;102(3):942-8.
33. Rice DA, McNair PJ, Lewis GN. Mechanisms of quadriceps muscle weakness in knee joint osteoarthritis: the effects of prolonged vibration on torque and muscle

- activation in osteoarthritic and healthy control subjects. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R151.
34. Rice DA, McNair PJ. Quadriceps arthrogenic muscle inhibition: neural mechanisms and treatment perspectives. *Semin Arthritis Rheum.* 2010;40(3):250-66.
 35. Hart JM, Pietrosimone B, Hertel J, Ingersoll CD. Quadriceps activation following knee injuries: a systematic review. *J Athl Train.* 2010;45(1):87-97.
 36. Hassan BS, Doherty SA, Mockett S, Doherty M. Effect of pain reduction on postural sway, proprioception, and quadriceps strength in subjects with knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 2002;61(5):422-8.
 37. Petersen SG, Beyer N, Hansen M, Holm L, Aagaard P, Mackey AL, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug or glucosamine reduced pain and improved muscle strength with resistance training in a randomized controlled trial of knee osteoarthritis patients. *Arch Phys Med Rehabil.* 2011;92(8):1185-93.
 38. Sharma L. The role of proprioceptive deficits, ligamentous laxity, and malalignment in development and progression of knee osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl.* 2004;70:87-92.
 39. Knoop J, Steultjens MP, van der Leeden M, van der Esch M, Thorstensson CA, Roorda LD, et al. Proprioception in knee osteoarthritis: a narrative review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2011;19(4):381-8.
 40. van der Esch M, Steultjens M, Harlaar J, Knol D, Lems W, Dekker J. Joint proprioception, muscle strength, and functional ability in patients with osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum.* 2007;57(5):787-93.
 41. Bayramoglu M, Toprak R, Sozay S. Effects of osteoarthritis and fatigue on proprioception of the knee joint. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007;88(3):346-50.
 42. Felson DT, Gross KD, Nevitt MC, Yang M, Lane NE, Torner JC, et al. The effects of impaired joint position sense on the development and progression of pain and structural damage in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2009;61(8):1070-6.
 43. Pai YC, Rymer WZ, Chang RW, Sharma L. Effect of age and osteoarthritis on knee proprioception. *Arthritis Rheum.* 1997;40(12):2260-5.
 44. Palus S, von Haehling S, Springer J. Muscle wasting: an overview of recent developments in basic research. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2014;5(3):193-8.
 45. Bowen TS, Schuler G, Adams V. Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2015;6(3):197-207.
 46. Teixeira VeO, Filippin LI, Xavier RM. Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(2):252-9.
 47. Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2012;3(2):77-94.
 48. Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J.* 2004;18(9):1025-7.
 49. Abadi A, Glover EI, Isfort RJ, Raha S, Safdar A, Yasuda N, et al. Limb immobilization induces a coordinate down-regulation of mitochondrial and other metabolic pathways in men and women. *PLoS One.* 2009;4(8):e6518.
 50. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 2006;209(2):501-14.

51. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49831-40.
52. Chacon-Cabrera A, Fermoselle C, Urtreger AJ, Mateu-Jimenez M, Diament MJ, de Kier Joffé ED, et al. Pharmacological strategies in lung cancer-induced cachexia: effects on muscle proteolysis, autophagy, structure, and weakness. *J Cell Physiol.* 2014;229(11):1660-72.
53. Aversa Z, Bonetto A, Penna F, Costelli P, Di Rienzo G, Lacitignola A, et al. Changes in myostatin signaling in non-weight-losing cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(4):1350-6.
54. Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):14938-43.
55. Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, Penna F, Reffo P, Bossola M, et al. Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest.* 2008;38(7):531-8.
56. Snijders T, Wall BT, Dirks ML, Senden JM, Hartgens F, Dolmans J, et al. Muscle disuse atrophy is not accompanied by changes in skeletal muscle satellite cell content. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(8):557-66.
57. Wall BT, Dirks ML, Snijders T, Senden JM, Dolmans J, van Loon LJ. Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta Physiol (Oxf).* 2014;210(3):600-11.
58. Dirks ML, Wall BT, Snijders T, Ottenbros CL, Verdijk LB, van Loon LJ. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle disuse atrophy during leg immobilization in humans. *Acta Physiol (Oxf).* 2014;210(3):628-41.
59. Alway SE, Myers MJ, Mohamed JS. Regulation of satellite cell function in sarcopenia. *Front Aging Neurosci.* 2014;6:246.
60. He WA, Berardi E, Cardillo VM, Acharyya S, Aulino P, Thomas-Ahner J, et al. NF- κ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia. *J Clin Invest.* 2013;123(11):4821-35.
61. Talbert EE, Metzger GA, He WA, Guttridge DC. Modeling human cancer cachexia in colon 26 tumor-bearing adult mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2014;5(4):321-8.
62. de Oliveira Nunes Teixeira V, Filippin LI, Viacava PR, de Oliveira PG, Xavier RM. Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(12):1421-30.
63. Crul T, Spruit MA, Gayan-Ramirez G, Quarck R, Gosselink R, Troosters T, et al. Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur J Clin Invest.* 2007;37(11):897-904.
64. Slimani L, Vazeille E, Deval C, Meunier B, Polge C, Dardevet D, et al. The delayed recovery of the remobilized rat tibialis anterior muscle reflects a defect in proliferative and terminal differentiation that impairs early regenerative processes. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2015;6(1):73-83.
65. Verdijk LB, Koopman R, Schaart G, Meijer K, Savelberg HH, van Loon LJ. Satellite cell content is specifically reduced in type II skeletal muscle fibers in the elderly. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(1):E151-7.
66. Sanchez-Ramirez DC, van der Leeden M, van der Esch M, Roorda LD, Verschueren S, van Dieën JH, et al. Elevated C-reactive protein is associated with

lower increase in knee muscle strength in patients with knee osteoarthritis: a 2-year follow-up study in the Amsterdam Osteoarthritis (AMS-OA) cohort. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(3):R123.

67. Levinger I, Levinger P, Trenerry MK, Feller JA, Bartlett JR, Bergman N, et al. Increased inflammatory cytokine expression in the vastus lateralis of patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1343-8.

68. Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20(1):3-25.

69. Shane Anderson A, Loeser RF. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2010;24(1):15-26.

70. Papalia R, Zampogna B, Torre G, Lanotte A, Vasta S, Albo E, et al. Sarcopenia and its relationship with osteoarthritis: risk factor or direct consequence? *Musculoskelet Surg.* 2014;98(1):9-14.

71. Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing.* 2010;39(4):412-23.

7 ARTIGO 2:

O artigo original dessa dissertação será encaminhado para a revista Osteoarthritis and Cartilage.

MUSCLE WASTING IN OSTEOARTHRITIS MODEL INDUCED BY ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT TRANSECTION**Authors:**

Jordana Miranda de Souza Silva^{1, 2}; Paulo Vinicius Gil Alabarse^{1, 2}; Vivian de Oliveira Nunes Teixeira^{1, 2}; Eduarda Correa Freitas^{1, 2}; Francine Hehn de Oliveira⁴; Rafael Mendonça da Silva Chakr³; Ricardo Machado Xavier^{2, 3}

Affiliations:

¹Post-graduate Program in Medical Science, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

²Laboratory of Autoimmune Disease, Experimental Clinical Research, Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

³Associated Professor, Reumatology Division, Internal Medicine, UFRGS.

⁴Clinical Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Corresponding author: Ricardo Machado Xavier MD, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rheumatology Division

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-003

Bairro Rio Branco – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Phone (+55 51) 3359
8340
Email: rmaxavier@hcupa.ufrgs.brAbstract

Abstract

Objective: The aim of this study was to investigate the pathways involved in muscle wasting in an animal model of osteoarthritis (OA) induced by anterior cruciate ligament (ACL) transection in rats.

Design: Female Wistar rats were allocated into two groups: OA (submitted to the ACL transection) and SHAM (submitted to surgical procedures without ACL transection). The spontaneous exploratory locomotion and the body weight of animals were evaluated weekly. In the twelfth week after the induction of disease, animals were euthanized and the knee joints were collected for further confirmation of the disease by histopathology. Gastrocnemius, tibialis-anterior and soleus muscles were dissected and weighed. Gastrocnemius was used for evaluation of muscle atrophy, by cross-sectional area measurement, and protein expression of myostatin, MyoD and myogenin.

Results: The histopathology of the knee joints confirmed the development of the disease in animals from OA group. Gastrocnemius area of animals from OA group had a reduction of about 10% compared to animals from SHAM group. Protein expression of myostatin was increased in animals from OA group, while myogenin expression was decreased. MyoD expression was similar in both OA and SHAM groups. Spontaneous exploratory locomotion, body weight and weight of muscles showed no difference between OA and SHAM groups.

Conclusion: Gastrocnemius atrophy in OA induced by ACL transection involves increased protein expression of myostatin and decreased protein expression of myogenin. In this model, muscle wasting may be linked to myostatin-induced proteolysis and to deficits in satellite-cell differentiation due to decreased expression of myogenin.

Key words: osteoarthritis; muscle wasting; myostatin; myogenin.

Introduction

Osteoarthritis (OA) is a chronic disease characterized primarily by articular cartilage loss. Changes in muscles surrounding the affected joint can also be present (1). Since, periarticular muscles function not only to produce movement, but also to provide joint stability, muscle impairment may influence the onset, progression and severity of OA (2). Additionally, the presence of OA may have a negative impact on muscle function, further affecting the disease process, and establishing a vicious circle of joint degradation and muscle wasting (3).

In OA that affects lower limbs, muscle weakness is a common feature. Studies have identified the decline in muscle strength as an early phenomenon, and sometimes preceding structural lesions of the disease (4, 5). Muscle weakness is also related with the progression of OA, since the muscle strength in the lower limbs seems to decrease as the severity of the disease increases (6-8). Furthermore, muscle weakness in patients with OA is often associated with atrophy of muscle fibers (8, 9). In this context studies report that there is a reduction of 12-19% in the cross-sectional area (CSA) of the muscles from the affected limb in patients with hip and knee OA (9-11).

In general, the main known molecular pathways leading to muscle loss are related to reduction of protein syntheses, increased proteolysis and impaired muscle regeneration by satellite-cells (12). Myostatin is recognized as a negative regulator of muscle mass growth and may limit the protein synthesis by inhibiting IGF-1/PI3K/Akt (insuline like growth factor-1/phosphoinositide 3-kinase/Akt) pathway. Myostatin can also promote protein degradation by stimulating the activity of ubiquitin-proteasome system through FoxO (forkhead box O) pathway (13). Additionally, through the canonical or MAPK (mitogen activated protein kinase) pathways, myostatin can impair the activation of satellite-cells reducing their capacity of proliferation and differentiation (14). Satellite-cells are muscle stem cells responsible for muscle growth and repair. During muscle regeneration, activated satellite-cells proliferate, differentiate and then fuse to the existing myofibers. MyoD and myogenin are markers of satellite-cell proliferation and differentiation, respectively (15).

Despite the knowledge about muscle weakness and atrophy in patients with OA of lower limbs, literature lacks basic science studies concerning the molecular processes involved in OA muscle wasting. Our aim was to identify which pathways are associated with muscle wasting in an animal model of OA induced by anterior cruciate ligament (ACL) transection.

Materials and methods

Animals and experimental design

Three-month-old female Wistar rats weighing about 250g were studied. Animals were housed in plastic cages under controlled environmental conditions with free access to water and food. 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.

Eighteen rats were randomly distributed in two experimental groups of nine animals each: OA (submitted to the ACL transection) and SHAM (submitted to surgical procedures without ACL transection).

ACL transection surgery

OA was induced by surgical transection of the right anterior cruciate ligament. Animals were initially anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamine (0.50mg/kg) and xylazine (0.25mg/kg). During the surgical procedures, anesthesia was maintained with inhaled isoflurane (3%). Under anesthesia, the right knee was shaved and prepared using an iodine solution and a 3cm incision was made medial to the patellar tendon. The subcutaneous tissue and muscle were then incised and the patella laterally subluxed; the joint capsule was opened with the limb hyperextended. With the limb in full flexion, the anterior cruciate ligament was visualized by blunt dissection, and sectioned by a latero-medial cut parallel to the tibial plateau, using a scalpel blade. Transection was confirmed with the anterior drawer test. The patella was then replaced, and the limb extended. The joint capsule and muscle layers were closed with 5.0 Vicryl sutures and 50µL of tramadol was then injected into the joint capsule to provide local analgesia. Skin was closed with 4.0 nylon sutures. Sham surgery

consisted of all the steps mentioned the above except for ligament transection. After surgery, the animals were returned to their cages and received intraperitoneal injection of tramadol (5mg/kg). Twelve and 24 hours after the surgery, the animals received tramadol intraperitoneally (5mg/kg) as postoperative systemic analgesia.

Experimental period

The experimental period lasted 12 weeks. In the first two weeks after surgery, the animals were kept at rest. After the third week post-surgery, animals were weighed and had their spontaneous exploratory locomotion evaluated weekly. At the end of experimental period, at the twelfth week, animals were anesthetized and then killed by decapitation. The right knee joint was removed to confirm the development of OA through histological analysis. Gastrocnemius, tibialis-anterior and soleus muscles, from the right hind paw, were isolated, dissected and weighed. The muscles were stored at -80°C and gastrocnemius was used for Western blot and histopathological analysis.

Animal locomotion

The locomotion of animals was evaluated before the surgery and after the third week post-surgery until the end of the experimental period. In this procedure, the rats were placed individually into an acrylic box, with sensors capable of detecting the motion of animals (Monitor de Atividade IR, Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brazil). In each evaluation, spontaneous exploratory locomotion of the animals was detected for 5 minutes after an adaptation period of 30 seconds (adapted from Ref. 15). The data from the motion detection were sent to and evaluated by a software (Insight Equipamentos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brazil) using the following parameters: walked distance and velocity, and number of times that animals jumped, rested or stood.

Knee joint histopathology

The joints from the right knee were excised and fixed in 10% buffered formalin for five days. The joints were decalcified with 10% nitric acid for 24h and paraffin mounted. The joints were sectioned into 4 mm slices and stained with hematoxylin-eosin (HE). Two different scoring systems developed by OARSI (Osteoarthritis

Research Society International) were used to evaluate the animal joints and to measure the experimental OA severity by a blinded pathologist: OARSI histopathology grading system and OARSI cartilage degeneration score.

The OARSI histopathology grading system consists of OA cartilage pathology assessment system based on six grades, which reflect depth of the lesion, and four stages reflecting extent of OA over the joint surface. The recommended score is an index of combined grade and stage. The simple formula: score = grade x stage is recommended. This method produces an OA score with a range of 0-24 based on the most advanced grade and most extensive stage present (16).

The OARSI cartilage degeneration score is an evaluation of overall cartilage pathology. For this score, the medial tibial cartilage plateau is divided into three zones in order to evaluate pathology of different load-bearing areas. Cartilage degeneration in each zone is scored 0-5, according to the percentage of affected cartilage (17).

Myofiber cross-sectional area

Myofiber cross-sectional area measurement was used to evaluate muscle atrophy. The gastrocnemius muscles from the right hind limbs were excised and fixed in 10% buffered formalin for 1 day and paraffin mounted. The muscles were sectioned into 6mm slices and stained with HE. To determine the myofiber area, the muscle fiber diameter was measured, and the myofiber 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 measured myofibers (18).

Western blot

Western blot was performed in order to identify the protein expression of myostatin, MyoD and myogenin. The muscle samples were homogenized with a lysis buffer (10mM Tris-HCl, 250mM saccharose, 5mM EDTA, 50mM sodium chloride, 30mM anhydrous sodium phosphate, 50mM sodium fluoride, 100µM sodium orthovanadate, 10mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100mM Dithiothreitol (DTT), and protease inhibitor cocktail in MiliQ water). Homogenates were centrifuged at 12.000 g for 10 minutes at 4°C and the supernatant was used. Protein concentration

was determined by Bradford assay. Muscle proteins (100µg) were separated on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. The membranes were stained with Ponceau solution to confirm the protein transfer and then rinsed with phosphate-buffered saline with Tween (PBS-T). The membranes were incubated under low agitation overnight at 4°C with the primary antibodies against myostatin (1:250, Santa Cruz, sc-28910), MyoD (1:500, Sigma, SAB2501587) and myogenin (1:250, Sigma, SAB2501587) diluted in milk/PBS-T (1% powdered skimmed milk). After the primary antibody incubation period, the membranes were washed for 30 minutes in PBS-T, incubated with secondary antibody against rabbit immunoglobulin G (1:5000, Sigma, A9169) or against goat immunoglobulin G (1:5000, Sigma, A5420) diluted in milk/PBS-T (1% powdered skimmed milk) for 2 hours at room temperature and then washed again for 30 minutes in PBS-T. Detection of the labeled protein was done using the enhanced chemiluminescence system (Millipore, WBKLS0500). These protein expressions were normalized by GAPDH expression.

Statistical analyses

The results are expressed as mean values with standard error of the mean (SEM) for symmetric variables and as medians and percentiles (25% and 75%) for the asymmetric variables. The data were compared by Student's t test or ANOVA followed by Tukey's test or ANOVA followed by Mann–Whitney's *U*-test. Significance was accepted at $P < 0.05$.

Results

Animal locomotion

After the third week post-surgery, none of the parameters evaluated in animal locomotion (walked distance and velocity, and number of times that animals jumped, rested or stood) showed a significant difference between OA and SHAM groups (Figure 1).

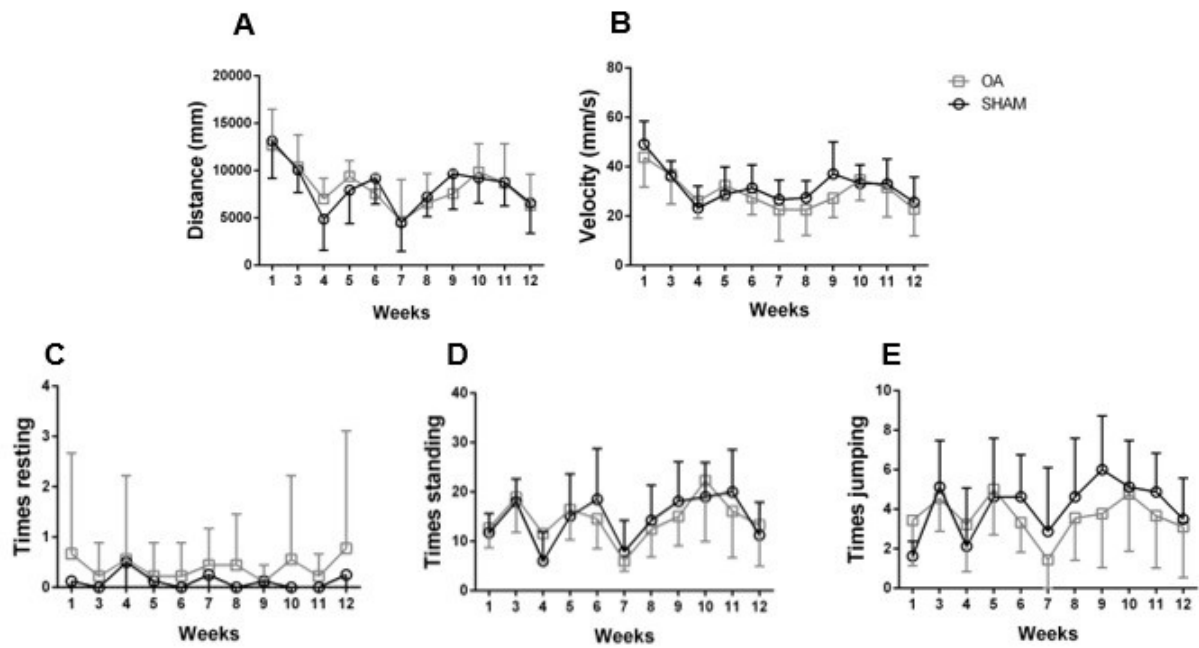


Fig. 1. Walking distance (A) and velocity (B) and times resting (C), standing (D) and jumping (E) of OA and SHAM animals. Data are expressed as mean and SEM.

Animal and muscle weight and

Body weight of the animals in both groups increased equally over the experimental period, therefore there was no statistical difference in body weight between OA ($257,79 \pm 27,38g$) and SHAM ($262,47 \pm 17,74g$) groups, at the end of the experimental period. Regarding the weight of the right hind paw muscles, the average weight of gastrocnemius, tibialis-anterior and soleus muscles tended to be lower in animals from OA group ($1,40 \pm 0,31g$; $0,45 \pm 0,06g$; $0,10 \pm 0,01g$) compared to SHAM group ($1,59 \pm 0,16g$; $0,48 \pm 0,04g$; $0,10 \pm 0,01g$), but not significantly different (Figure 2).

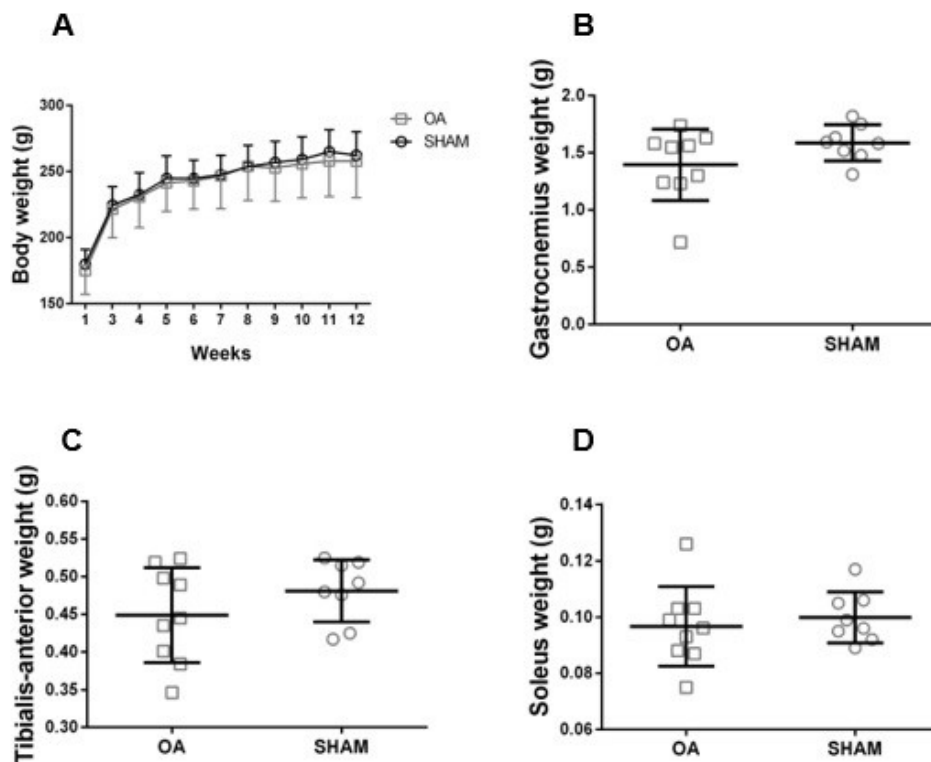


Fig. 2. Body weight of OA and SHAM animals during the experimental period (A). Gastrocnemius muscle weight (B), tibialis-anterior muscle weight (C) and soleus weight (D) of OA and SHAM animals at the end of the experimental period. Data are expressed as mean and SEM.

Knee joint histopathology

At 12 weeks after ACL transection, in knee joint of animals from OA group, most of the remaining cartilage was degraded and undergoing remodeling. There was cartilage replacement by fibrous connective tissue in animals from OA group, compromising cartilage original function. Moreover, severe synovitis was also detected. Both OARSI grading system and OARSI cartilage degeneration score demonstrated statistical difference between OA and SHAM groups. Data were analyzed by ANOVA followed by Mann–Whitney's *U*-test (Figure 3).

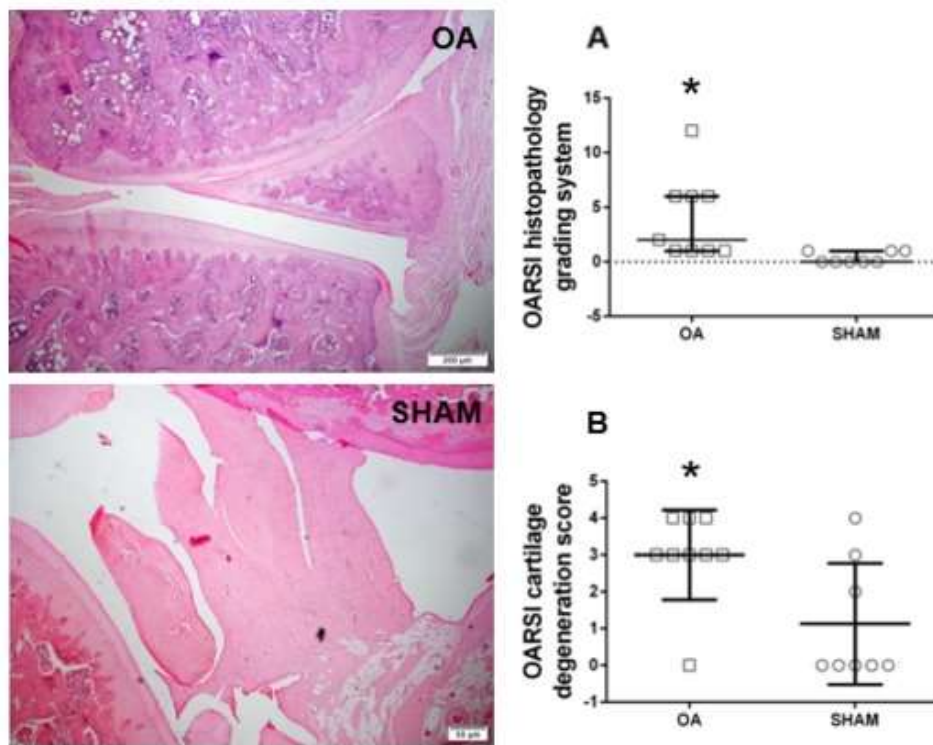


Fig. 3. Representative samples of HE stained knee joint cartilage of OA and SHAM animals at the end of the experimental period (A). OARS grading system scores (B) and OARS cartilage degeneration scores (C) of OA and SHAM animals. Data are expressed as mean and SEM. * $P < 0.05$ OA vs SHAM.

Muscle cross-sectional area

OA group showed a significant reduction ($p < 0.05$) in gastrocnemius muscle CSA at the end of the experimental period compared to SHAM group. The reduction in muscle CSA was around 10% (Figure 4).

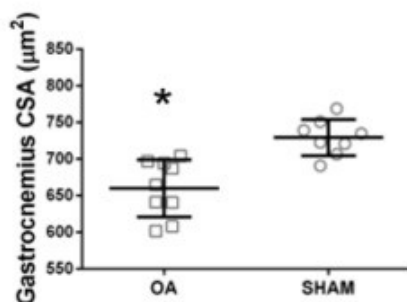


Fig. 4. Gastrocnemius muscle CSA from animals of OA and SHAM animals at the end of experimental period. Data are expressed as mean and SEM. * $P < 0.05$ OA vs SHAM.

Western blot

After twelve weeks of disease, increased expression of myostatin (negative regulator of muscle mass) protein (52kDa; larger myostatin propeptide) was found in gastrocnemius muscles from OA group (0.3 fold, $P < 0.05$). Mature myostatin peptide (26kDa) was not detected. The primary antibody used was supposed to detect both 52 and 26kDa proteins, but only 52kDa protein was detected.

The expression of MyoD (satellite-cell proliferation marker) did not differ between groups, however, the expression of myogenin (satellite-cell differentiation marker) displayed significantly lower levels in OA group (0.4 fold, $P < 0.05$) (Figure 5).

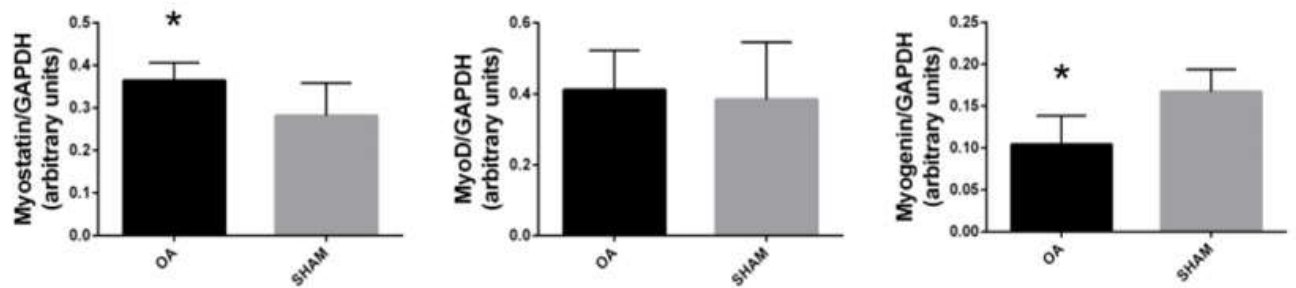


Fig. 5. Western blot membranes showing the expression of myostatin (A), MyoD (B), myogenin (C) in gastrocnemius muscle of OA animals and SHAM animal at the end of the experimental period (B). Data are expressed as mean and SEM. * $P < 0.05$ OA vs SHAM.

Discussion

The results of this study provide new information about the molecular pathways involved in muscle wasting in a rat model of OA induced by ACL transection. The muscle atrophy found in animals from OA group is in agreement with what occurs in seems to be representative of what occurs in patients with OA. Additionally, the increase in myostatin expression and the decrease in myogenin expression may at least partially explain the mechanisms involved in this atrophy.

An experimental period of 12 weeks was established, since, at this time, ACL transection model is able to promote a significant joint cartilage damage (19). Additionally, after 12 weeks of disease, muscle atrophy was also expected to be present, allowing the evaluation of pathways involved in muscle wasting (20). A study

reported that both ACL transection surgery and sham surgery are able to cause muscle atrophy in rats, however, 15 days after the surgeries, only rats that underwent ACL transection remained with atrophy (20). Thus, in addition to joint impairment, 12 weeks of disease may be appropriate time to allow the operated animals to recover from the effects of trauma caused by the surgery and, this way, only disease intrinsic atrophy would remain. To verify the occurrence and the severity of the disease, two different scoring systems developed by OARSI were used to evaluate joint histopathology: OARSI histopathology grading system and OARSI cartilage degeneration score. The first system is a combined score based on qualitative assignment of numbers as OA histologic features, while the second one is a measurement of cartilage degeneration percentage. The two scores complement each other and both showed significant difference between OA and SHAM groups. According to OARSI grading system, most animals from OA group developed a mild disease, while according to OARSI cartilage degeneration score, animals from OA group had severe cartilage degeneration, but the animals from SHAM group also had a small degree of joint involvement, probably due to sham surgery.

Patients with OA typically suffer from articular pain and its consequences such as avoidance of physical activity. In the long-term, the avoidance of activities, in order to prevent pain, leads to muscle strength deterioration (21, 22). In our study, the animals from OA group had the same pattern of movement than the animals from SHAM group in the spontaneous exploratory locomotion test. This way, the reduction in activity levels may not be related to muscle wasting in our model. However, it is known that patients with knee OA, especially those ones with advanced OA, have altered gait patterns, because of the abnormal knee joint loading (23, 24). So, although we have not found differences in animal locomotion, perhaps we could have found changes in gait pattern in animals from OA group, if we had evaluated this parameter.

Regarding body weight, the animals from both groups gained weight at the same rate throughout the experimental period. The weight of gastrocnemius, tibialis-anterior and soleus muscles also showed no significant difference between groups. These results demonstrate that OA induced by ACL transection is unable to promote a marked loss of lean body mass in animals from OA group. Differently, in other models in which animals develop muscle atrophy, such as models of immobilization or chronic

inflammation, there is a significant loss of body weight and loss of muscle weight (25, 26). However, in patients with knee OA, changes in muscle volume may not occur. A study, in which patients with knee OA were followed for two years, reported that there is a decrease of 2.1% in quadriceps muscle mass and an increase of 2.9% in intermuscular fat (27). This way, despite the loss of muscle mass, muscle volume does not undergo large changes, probably because of the increased muscle fat infiltration (27). Otherwise, the intermuscular fat gain in patients with OA may also be related with aging, and not only with OA progress. In our model, the lack of loss of muscle mass in animals from OA group comparing to SHAM group is in agreement with the mild atrophy that OA animals developed.

At the end of the experimental period, the gastrocnemius area of animals from OA group had a reduction of about 10% compared to animals from SHAM group. The atrophy that occurred in these animals was mild, but it demonstrates that OA induced by ACL transection is able to promote muscle impairment. The absence of reduction in levels of locomotion in animals from OA group, in spite of the possibility of altered gait in these animals, shows that muscle atrophy may be related to other factors and not solely to disuse. As the immobility does not seem to be the cause of muscle atrophy in our model, muscle wasting may be associated with the chronic inflammatory process of the disease. It is noteworthy that OA is considered a low grade inflammation disease, mainly because of synovitis (28). Serum concentration of several inflammatory markers is elevated in patients with OA of the lower limbs, and it is correlated with decreased physical function and lower muscle strength (29, 30). Levels of inflammatory mediators are also increased in muscles of patients with knee OA, when compared to healthy individuals, and are also related with physical disability and reduced muscle strength (3, 31). These studies evaluated muscle strength only, but it is known that reduction of muscle strength is usually associated with muscle atrophy in patients with OA of lower limbs, as some studies report (9, 10).

Although there are studies that assessed the expression of inflammatory markers in muscle of patients with OA and its relation with muscle weakness (3, 31), the pathways directly involved in controlling the synthesis and degradation of muscle proteins, as well as satellite-cell activation patterns, are not known. In order to identify the pathways leading to muscle wasting, protein expression of myostatin (a negative

regulator of muscle mass), MyoD (satellite-cell proliferation marker) and myogenin (satellite-cell differentiation marker) were evaluated.

Myostatin protein is produced in muscle and adipose tissue and then is released and circulates in the blood in a latent form as a full-length precursor, which is cleaved into an amino-terminal pro-peptide and a carboxy-terminal mature region: the active form of the molecule (32). After twelve weeks of disease, increased levels of myostatin protein (52kDa; larger myostatin propeptide) were found in animals from OA group. Mature myostatin peptide (26kDa) was not detected. Findings from several groups indicate that myostatin expression is usually increased during conditions such as cachexia (33-36). In disease conditions, however, levels of myostatin are usually decreased or not changed (37-39). Moreover, myostatin inhibition is able to increase muscle mass and prevent loss of muscle mass in several pathological conditions in mice (40, 41). So, the elevation of myostatin expression in animals from OA group may be a contributing factor to the atrophy that was found in these animals. The only study that evaluated the expression of myostatin in patients with hip OA reported increased levels of myostatin gene expression, which is in accordance with our results (42).

Myostatin also plays a negative role in the control of satellite-cell proliferation and differentiation and MyoD and myogenin are implicated to participate in myostatin-induced differentiation suppression (14, 43). Our results show a decrease in myogenin protein expression in animals from OA group, although MyoD levels remained the same in both OA and SHAM groups. It is noteworthy that no other study has ever reported on markers of satellite-cell activation in OA-related muscle wasting. According to the literature, gene and protein expression of these markers are usually decreased in disease atrophy (25, 44, 45). On the other hand, and similar to our results, protein expression of MyoD and myogenin are found to be lower in patients with inflammatory diseases (33, 44, 46, 47). In animals from OA group, higher levels of myostatin might be related to the repression of the satellite-cell differentiation program. Myogenin is necessary for efficient activation of target genes required for terminal differentiation of myoblasts, and further fusion of myoblasts to the existing myofibers for muscle repair (48). Furthermore, in the absence of myogenin, other muscle regulatory factors, such as MyoD, cannot promote muscle formation, since the differentiation of satellite-cells is impaired (49).

According to our results, the increased levels of myostatin promote a reduction of satellite-cell differentiation by down-regulating myogenin expression. Additionally, as far as myostatin is able to stimulate protein degradation by activating FoxO pathway, muscle proteolysis by ubiquitin-proteasome system may be enhanced. As the regenerative potential of satellite-cells is impaired, because of the inhibition of myogenin, and unable to counterbalance the degradation of muscle proteins, the muscle atrophy is established. Furthermore, as muscle atrophy in both disuse and inflammatory diseases have decreased expression of satellite-cell activation markers, but only inflammatory diseases have increased expression of myostatin, it can be said that our results are closer to the inflammation pattern of muscle wasting.

Conclusion

This study provides new insights on the molecular mechanisms involved in muscle wasting in OA induced by ACL transection. The pathways involved could be partially identified and, from now, it is known that myostatin and myogenin play a significant role in OA-related muscle wasting. This knowledge can be useful for assessing the effects of rehabilitation interventions and also for prevention strategies against disease development.

Financial support

The study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Evento (FIPE-HCPA).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Loeser RF, Goldring SR, Scanzello CR, Goldring MB. Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* 2012;64(6):1697-707.
2. Bennell KL, Wrigley TV, Hunt MA, Lim BW, Hinman RS. Update on the role of muscle in the genesis and management of knee osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2013;39(1):145-76.

3. Levinger I, Levinger P, Trenerry MK, Feller JA, Bartlett JR, Bergman N, et al. Increased inflammatory cytokine expression in the vastus lateralis of patients with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2011;63(5):1343-8.
4. Thorstensson CA, Petersson IF, Jacobsson LT, Boegård TL, Roos EM. Reduced functional performance in the lower extremity predicted radiographic knee osteoarthritis five years later. *Ann Rheum Dis.* 2004;63(4):402-7.
5. Slemenda C, Heilman DK, Brandt KD, Katz BP, Mazucca SA, Braunstein EM, et al. Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis Rheum.* 1998;41(11):1951-9.
6. Palmieri-Smith RM, Thomas AC, Karvonen-Gutierrez C, Sowers MF. Isometric quadriceps strength in women with mild, moderate, and severe knee osteoarthritis. *Am J Phys Med Rehabil.* 2010;89(7):541-8.
7. Liikavainio T, Lyytinen T, Tyrväinen E, Sipilä S, Arokoski JP. Physical function and properties of quadriceps femoris muscle in men with knee osteoarthritis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2008;89(11):2185-94.
8. Taniguchi M, Fukumoto Y, Kobayashi M, Kawasaki T, Maegawa S, Ibuki S, et al. Quantity and Quality of the Lower Extremity Muscles in Women with Knee Osteoarthritis. *Ultrasound Med Biol.* 2015;41(10):2567-74.
9. Arokoski MH, Arokoski JP, Haara M, Kankaanpää M, Vesterinen M, Niemitukia LH, et al. Hip muscle strength and muscle cross sectional area in men with and without hip osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2002;29(10):2185-95.
10. Rasch A, Byström AH, Dalen N, Berg HE. Reduced muscle radiological density, cross-sectional area, and strength of major hip and knee muscles in 22 patients with hip osteoarthritis. *Acta Orthop.* 2007;78(4):505-10.
11. Ikeda S, Tsumura H, Torisu T. Age-related quadriceps-dominant muscle atrophy and incident radiographic knee osteoarthritis. *J Orthop Sci.* 2005;10(2):121-6.
12. Teixeira VeO, Filippin LI, Xavier RM. Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(2):252-9.
13. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 2006;209(2):501-14.
14. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49831-40.
15. Dumont NA, Wang YX, Rudnicki MA. Intrinsic and extrinsic mechanisms regulating satellite cell function. *Development.* 2015;142(9):1572-81.
16. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(1):13-29.
17. Gerwin N, Bendele AM, Glasson S, Carlson CS. The OARSI histopathology initiative - recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthritis and Cartilage.* 2010;18:S24-S34.
18. Filippin LI, Teixeira VN, Viacava PR, Lora PS, Xavier LL, Xavier RM. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle.* 2013;4(3):231-8.
19. Ruan MZ, Patel RM, Dawson BC, Jiang MM, Lee BH. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013;21(9):1355-64.

20. Delfino GB, Peviani SM, Durigan JL, Russo TL, Baptista IL, Ferretti M, et al. Quadriceps muscle atrophy after anterior cruciate ligament transection involves increased mRNA levels of atrogen-1, muscle ring finger 1, and myostatin. *Am J Phys Med Rehabil.* 2013;92(5):411-9.
21. Pisters MF, Veenhof C, van Dijk GM, Dekker J, Study Group C. Avoidance of activity and limitations in activities in patients with osteoarthritis of the hip or knee: a 5 year follow-up study on the mediating role of reduced muscle strength. *Osteoarthritis Cartilage.* 2014;22(2):171-7.
22. Holla JF, van der Leeden M, Knol DL, Peter WF, Roorda LD, Lems WF, et al. Avoidance of activities in early symptomatic knee osteoarthritis: results from the CHECK cohort. *Ann Behav Med.* 2012;44(1):33-42.
23. Baert IA, Jonkers I, Staes F, Luyten FP, Truijen S, Verschueren SM. Gait characteristics and lower limb muscle strength in women with early and established knee osteoarthritis. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2013;28(1):40-7.
24. Astephen JL, Deluzio KJ, Caldwell GE, Dunbar MJ. Biomechanical changes at the hip, knee, and ankle joints during gait are associated with knee osteoarthritis severity. *J Orthop Res.* 2008;26(3):332-41.
25. de Oliveira Nunes Teixeira V, Filippin LI, Viacava PR, de Oliveira PG, Xavier RM. Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(12):1421-30.
26. Kunz RI, Coradini JG, Silva LI, Bertolini GR, Brancalhão RM, Ribeiro LF. Effects of immobilization and remobilization on the ankle joint in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2014;47(10):842-9.
27. Beattie KA, MacIntyre NJ, Ramadan K, Inglis D, Maly MR. Longitudinal changes in intermuscular fat volume and quadriceps muscle volume in the thighs of women with knee osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2012;64(1):22-9.
28. Pearle AD, Scanzello CR, George S, Mandl LA, DiCarlo EF, Peterson M, et al. Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007;15(5):516-23.
29. Penninx BW, Abbas H, Ambrosius W, Nicklas BJ, Davis C, Messier SP, et al. Inflammatory markers and physical function among older adults with knee osteoarthritis. *J Rheumatol.* 2004;31(10):2027-31.
30. Sanchez-Ramirez DC, van der Leeden M, van der Esch M, Gerritsen M, Roorda LD, Verschueren S, et al. Association of serum C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate with muscle strength in patients with knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2013;52(4):727-32.
31. Levinger P, Caldow MK, Feller JA, Bartlett JR, Bergman NR, McKenna MJ, et al. Association between skeletal muscle inflammatory markers and walking pattern in people with knee osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2011;63(12):1715-21.
32. Argilés JM, Orpí M, Busquets S, López-Soriano FJ. Myostatin: more than just a regulator of muscle mass. *Drug Discov Today.* 2012;17(13-14):702-9.
33. Chacon-Cabrera A, Femoselle C, Urtreger AJ, Mateu-Jimenez M, Diament MJ, de Kier Joffé ED, et al. Pharmacological strategies in lung cancer-induced cachexia: effects on muscle proteolysis, autophagy, structure, and weakness. *J Cell Physiol.* 2014;229(11):1660-72.
34. Aversa Z, Bonetto A, Penna F, Costelli P, Di Rienzo G, Lacitignola A, et al. Changes in myostatin signaling in non-weight-losing cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(4):1350-6.

35. Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(25):14938-43.
36. Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, Penna F, Reffo P, Bossola M, et al. Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest*. 2008;38(7):531-8.
37. Snijders T, Wall BT, Dirks ML, Senden JM, Hartgens F, Dolmans J, et al. Muscle disuse atrophy is not accompanied by changes in skeletal muscle satellite cell content. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126(8):557-66.
38. Wall BT, Dirks ML, Snijders T, Senden JM, Dolmans J, van Loon LJ. Substantial skeletal muscle loss occurs during only 5 days of disuse. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;210(3):600-11.
39. Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J*. 2004;18(9):1025-7.
40. Latres E, Pangilinan J, Miloscio L, Bauerlein R, Na E, Potocky TB, et al. Myostatin blockade with a fully human monoclonal antibody induces muscle hypertrophy and reverses muscle atrophy in young and aged mice. *Skelet Muscle*. 2015;5:34.
41. Benny Klimek ME, Aydogdu T, Link MJ, Pons M, Koniaris LG, Zimmers TA. Acute inhibition of myostatin-family proteins preserves skeletal muscle in mouse models of cancer cachexia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(3):1548-54.
42. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. Myostatin, insulin-like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve*. 2001;24(7):893-9.
43. Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N, Zhu D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res*. 2006;66(3):1320-6.
44. Crul T, Spruit MA, Gayan-Ramirez G, Quarck R, Gosselink R, Troosters T, et al. Markers of inflammation and disuse in vastus lateralis of chronic obstructive pulmonary disease patients. *Eur J Clin Invest*. 2007;37(11):897-904.
45. Slimani L, Vazeille E, Deval C, Meunier B, Polge C, Dardevet D, et al. The delayed recovery of the remobilized rat tibialis anterior muscle reflects a defect in proliferative and terminal differentiation that impairs early regenerative processes. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015;6(1):73-83.
46. Ramamoorthy S, Donohue M, Buck M. Decreased Jun-D and myogenin expression in muscle wasting of human cachexia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;297(2):E392-401.
47. Toledo M, Busquets S, Ametller E, López-Soriano FJ, Argilés JM. Sirtuin 1 in skeletal muscle of cachectic tumour-bearing rats: a role in impaired regeneration? *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2011;2(1):57-62.
48. Meadows E, Cho JH, Flynn JM, Klein WH. Myogenin regulates a distinct genetic program in adult muscle stem cells. *Dev Biol*. 2008;322(2):406-14.
49. Myer A, Olson EN, Klein WH. MyoD cannot compensate for the absence of myogenin during skeletal muscle differentiation in murine embryonic stem cells. *Dev Biol*. 2001;229(2):340-50.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou que a perda muscular associada à osteoartrite, em um modelo de osteoartrite induzida por transecção do ligamento cruzado anterior, resulta de alterações na expressão proteica de miostatina e de miogenina. Assim, a perda muscular pode estar relacionada tanto ao aumento da proteólise, induzido pelos níveis aumentados de miostatina, quanto ao déficit na diferenciação das células-satélite, responsáveis pela regeneração muscular, por conta da redução na expressão de miogenina.

9 PESPECTIVAS FUTURAS

Os conhecimentos adquiridos por meio deste trabalho fornecem embasamento para estudos terapêuticos futuros. Visto que a osteoartrite representa uma condição deveras incapacitante, a identificação das vias envolvidas na perda muscular associada a essa doença viabiliza o surgimento de novos potenciais alvos moleculares para o seu tratamento.