

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NO ENVOLVIMENTO
MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

MANUELA DOS SANTOS

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D NO ENVOLVIMENTO
MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE LÚPUS ERITEMATOSO
SISTÊMICO**

MANUELA DOS SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier
Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção de Mestre em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2019

RESUMO

Introdução: O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica, de etiologia multifatorial. Dentre as alterações musculoesqueléticas, observa-se com frequência mialgias e miosite, o que causa perda de força muscular nos pacientes. Neste contexto, a suplementação de vitamina D demonstra ter efeitos benéficos na morfologia e função muscular.

Objetivos: Descrever as alterações histológicas e moleculares do músculo gastrocnêmio sem e com suplementação de vitamina D em modelo de lúpus induzido por pristane.

Metodologia: 28 camundongos Balb/c fêmeas de 8-12 semanas de vida foram randomizados em três grupos, sendo eles: LES (doente; n=10), LES + vitamina D (tratado; n=10) e controle (n=8). O modelo experimental de LES foi induzido, através de injeção intraperitoneal de 500µl de pristane. O grupo tratado recebeu vitamina D por via subcutânea, na concentração de 2µg/kg, em dias alternados. O tratamento iniciou após a indução da doença, e permaneceu até o final do período experimental de 180 dias. Os testes físicos de força (levantamento de peso), locomoção espontânea e fadiga (teste em esteira) foram realizados nos tempo 0, 60, 120 e 180 dias. Após eutanásia, o músculo tibial anterior foi utilizado para avaliação da área da miofibrila e o músculo gastrocnêmio para análise da expressão proteica de marcadores de regeneração (myod, miogenina), síntese (AKT) e degradação (murf, miostatina, P62, LC3) muscular, através da técnica de *Western blot*.

Resultados: O grupo PIL mostrou uma redução significativa na área de miofibrila em comparação aos grupos CO e VD (10%). A expressão de LC3 foi significativamente maior no grupo PIL do que nos grupos CO e VD. A expressão de miostatina foi maior no grupo VD em comparação ao grupo PIL. A expressão de Myod foi maior no grupo PIL do que no grupo VD. Não encontramos diferença estatística entre os grupos para a expressão de p62, miogenina e Akt ($p > 0,05$). Os grupos PIL e VD apresentaram maiores taxas de fadiga e menor força muscular em comparação ao grupo CO ao longo do tempo.

Conclusão: Nesse modelo de lúpus induzido por pristane, observou-se leve atrofia muscular (10%), sem impacto importante na função física. O aumento de LC3,

biomarcador de autofagia, indica potencial participação desse processo no desenvolvimento da atrofia, o qual foi atenuado com a suplementação de vitamina D. Mais estudos sobre o efeito da Vitamina D no processo de autofagia são necessários.

Palavras-chave: Atrofia muscular, lúpus, lúpus induzido por pristane, vitamina D

ABSTRACT

Introduction: Systemic lupus erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease of multifactorial etiology. Among musculoskeletal disorders, myalgia and myositis are frequently observed, which causes loss of muscle strength in patients. In this context, vitamin D supplementation has been shown to have beneficial effects on muscle morphology and function.

Objectives: To describe the histological and molecular changes of gastrocnemius muscle without and with vitamin D supplementation in a pristane-induced lupus model.

Methodology: 28 8-12 week old female Balb / c mice were randomized into three groups: SLE (sick; n = 10), SLE + vitamin D (treated; n = 10) and control (n = 8). The experimental model of SLE was induced by intraperitoneal injection of 500 μ l of pristane. The treated group received vitamin D subcutaneously at a concentration of 2 μ g / kg every other day. Treatment began after disease induction and continued until the end of the 180-day experimental period. Physical tests of strength (weightlifting), spontaneous locomotion and fatigue (treadmill test) were performed at time 0, 60, 120 and 180 days. After euthanasia, the anterior tibial muscle was used to evaluate the myofiber area and the gastrocnemius muscle to analyze the protein expression of muscle regeneration (myod, myogenin), synthesis (AKT) and muscle degradation (murf, myostatin, P62, LC3) markers. by Western blot technique.

Results: The PIL group showed a significant reduction in myofiber area compared to the CO and VD groups (10%). LC3 expression was significantly higher in the PIL group than in the CO and VD groups. Myostatin expression was higher in the VD group compared to the PIL group. Myod expression was higher in the PIL group than in the VD group. We did not find statistical difference among the groups for p62, myogenin and Akt expression ($p > 0.05$). The PIL and VD groups presented higher fatigue and lower muscle strength rates compared to the CO group over time.

Conclusion: In this pristane-induced lupus model, mild muscle atrophy (10%) was observed, with no significant impact on physical function. The increase in autophagy biomarker LC3 indicates potential participation of this process in the development of atrophy, which was attenuated with vitamin D supplementation. Further studies on the effect of Vitamin D on the autophagy process are needed.

Keywords: Muscle atrophy, lupus, pristane-induced lupus, vitamin D

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do design experimental.....	69
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Modelos animais de LES.....	17
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(oh)2D	1,25-dihidroxivitamina D
25(oh)D	Vitamina D
ActriiA	O receptor de activina tipo iiA
ActriiB	O receptor de activina tipo iiB
ANA	Anticorpos antinucleares
Anti-dsDNA	Anti-dna de dupla hélice
AR	Artrite reumatoide
FAN	Fator antinúcleo
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN	Interferon
IFN	Interferon
IGF1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGg	Imunoglobulina g
IGm	Imunoglobulina m
IL	Interleucina
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MHC	Cadeia pesada da miosina
mTOR	Alvo mecanístico da rapamicina
PCR	Proteína c reativa
PIL	Lúpus induzido por pristane
PKB	Proteína quinase b
SLEDAI	Índice de atividade da doença eritematosa lúpica sistêmica
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th2	Linfócito t auxiliar subtipo 2
TLR.	Receptores do tipo toll
TNF- α	Fatores de necrose tumoral alfa
UV	Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	REVISÃO DA LITERATURA	9
2.1	ESTRATÉGIAS PARA LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES.....	9
3	LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	9
3.1	EPIDEMIOLOGIA DO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	12
3.2	ENVOLVIMENTO MUSCULAR NO LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	13
4	MODELOS ANIMAIS DE LÚPUS	16
5	VITAMINA D	18
5.1	VITAMINA D E MÚSCULO	20
6	VIAS DE SINALIZAÇÃO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	21
6.1	VIAS DE SÍNTESE.....	22
6.2	VIAS DE DEGRADAÇÃO	22
6.3	VIAS DE REGENERAÇÃO	24
7	MARCO CONCEITUAL	25
8	JUSTIFICATIVA	26
9	OBJETIVOS.....	27
10	REFERÊNCIAS.....	28
11	ARTIGO	39
12	CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
13	PERSPECTIVAS.....	66
14	ANEXO 1 – METODOLOGIA EXPANDIDA.....	67

1 INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune sistêmica de etiologia multifatorial e desconhecida, com manifestações autoimunes. A doença é caracterizada pela produção de autoanticorpos, formação e deposição de imunocomplexos, inflamação e dano tecidual, afetando entre outros tecidos, o músculo esquelético. É estimada uma incidência de 1-22 casos para cada 100.000 pessoas por ano, acometendo mais mulheres na idade fértil [1]. Na tentativa de esclarecer a etiologia do LES, pesquisas indicam a participação de fatores ambientais, genéticos e imunológicos [2].

Dentre as alterações musculoesqueléticas no LES, observa-se com frequência dores (mialgias) e inflamação muscular (miosite) e perda de força [3]. A fraqueza muscular pode estar relacionada com a atrofia de fibras musculares [4]. Em geral, a perda muscular está associada a diferentes mecanismos de sinalização intracelular por distintas cascatas, tais como, proteases lisossomais, o sistema proteossomo, e a autofagia [5, 6]. Essas cascatas de sinalização intracelular podem levar ao aumento da degradação ou à redução da síntese protéica ou ainda à diminuição da ativação das células satélites responsáveis pela regeneração muscular [4].

Modelos experimentais murinos como o lúpus induzido por pristane (PIL) mimetizam o LES, sendo uma importante ferramenta para o estudo desta patologia. Esse modelo é amplamente usado por demonstrar semelhanças morfológicas com o lúpus humano, incluindo artrite, glomerulonefrite mediada por depósito de imunocomplexos e produção de autoanticorpos, bem como a exacerbação da citocinas pró-inflamatórias [7]. Entretanto, até o presente momento não temos evidências das vias moleculares que levam à perda muscular observada no LES. Da mesma forma, desconhecemos o potencial efeito da suplementação de vitamina D na prevenção da atrofia muscular..

O interesse em torno da síntese, metabolismo e ação da vitamina D é motivado pela associação da insuficiência nutricional da vitamina D com diversas doenças, sendo reconhecida como um problema de saúde pública, e as descobertas de suas ações não hormonais, endócrinas e parácrinas [8, 9]. A vitamina D, na sua forma ativa 1,25-dihidroxitamina D (1,25(OH)₂D), atua no músculo, através do mecanismo clássico de ligação a um receptor nuclear e também através de receptor de membrana, realizando ações sobre o músculo esquelético envolvendo o transporte de

cálcio e a síntese proteica [10, 11]. Diversos estudos mostraram que baixas concentrações séricas de vitamina D (25(OH)D) estão relacionadas com uma perda acelerada de massa magra, além de perda força e de potência muscular [12, 13]. Ainda, foram demonstradas propriedades anti-inflamatórias da vitamina D que também podem explicar potencial efeito protetor no músculo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura foca nos aspectos relacionados ao efeito da vitamina D nos marcadores de tecido muscular, tais como MyoD, miogenina, MuRF e miostatina, Akt, LC3, p62 e sua relação com inflamação crônica e a perda muscular do LES. A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed, SciELO e repositório digital LUME/UFRGS, através da seguinte estratégia de busca: “systemic lupus erythematosus”, “lupus”, “vitamin D”, “muscle loss”, “regeneration”, “degradation”, “MyoD”, “Myf5”, “myogenin”, “MuRF”, “myostatin”, “Akt”, “LC3”, “p62”, “PIL” cruzadas entre si, para melhor obtenção de resultados.

3 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada principalmente pela produção de autoanticorpos, formação e deposição de imunocomplexos, inflamação em diversos órgãos e dano tecidual [1]. As características clínicas associadas à doença são polimórficas e a evolução costuma ser crônica, com períodos de exacerbação e remissão. Devido a essas características, a doença pode cursar com sintomas de artrite, serosite, nefrite, vasculite, miosite, manifestações mucocutâneas, hemocitopenias imunológicas, quadro neuropsiquiátrico, pneumonite, fadiga, irritabilidade e humor depressivo [14–17].

A etiologia do LES é multifatorial e permanece pouco conhecida, porém sabe-se que participação de fatores genéticos e ambientais contribuem para o surgimento, desenvolvimento e progressão da doença [18]. Os estudos genéticos sugerem que há vários processos diferentes envolvidos na patogênese do LES, como sinalização celular alterada, depuração prejudicada de detritos celulares e desregulação no desenvolvimento, na função e na resposta das células do sistema imunológico. Além disso, os fatores ambientais como nutrição, infecção, exposição a radiação ultravioleta e a produtos químicos estão implicados no processo da autoimunidade [19, 20].

O LES apresenta um componente genético importante, com alta herdabilidade (> 66%) e taxas de concordância maiores entre gêmeos monozigóticos (> 35%) em

relação a gêmeos dizigóticos (2 –5%) [21]. Semelhante à maioria das doenças autoimunes, os genes do antígeno leucocitário humano (HLA) estão associados ao risco aumentado de LES, principalmente os alelos do HLA de classe II DR3, DR9 e DR15, sendo que DR3 e DR15 estão associados também ao desenvolvimento de nefrite lúpica [22–26]. Mutações em genes relacionados com a produção de IFN do tipo I e com a atividade de células B e T também tem sido associadas à suscetibilidade ao LES. Polimorfismos nos genes dos fatores reguladores do IFN (IRF) 5 e 7, como IRF5, IRF7/PHRF1, IRF8 e ETS1, foram associados ao aumento do IFN- α sérico nos pacientes [27, 28]. As variantes genéticas BLK, BANK1, LYN e ETS1, IKZF1, PRDM1, AFF1, TNFS4 foram associadas com desregulação na diferenciação, ativação e proliferação de células B e T no LES, respectivamente, favorecendo a autorreatividade [21, 27, 29–31].

Acredita-se que fatores genéticos interagem com as exposições ambientais durante toda a vida para influenciar a suscetibilidade ao desenvolvimento do LES. Entre os fatores ambientais descritos estão exposição à sílica cristalina, tabagismo, radiação ultravioleta (UV), solventes e pesticidas. Além disso, incluem-se fatores intrínsecos, como peso ao nascer, história reprodutiva (idade da menarca e menopausa), endometriose e infecções latentes como o vírus Epstein-Barr [32]. Entre os possíveis mecanismos pelos quais os fatores ambientais podem estar envolvidos na patogênese do LES é a regulação epigenética. Padrões diferenciais de metilação do DNA, aliados ao estresse oxidativo, contribuem para a patogênese do LES devido à regulação positiva dos genes imunes e à autorreatividade [32–34]. Além disso, raios UV podem induzir a apoptose dos queratinócitos via dano oxidativo mitocondrial, o que pode resultar na geração de espécies reativas de oxigênio e/ou expressão dos antígenos nucleares em sua superfície. Os efeitos pró-inflamatórios dos raios UV estão, provavelmente, relacionados à estimulação da IL-1 e IL-6 e à modificação da função linfocitária [35, 36].

Um dos conceitos-chave na patogênese do LES é um desequilíbrio entre a produção de células apoptóticas e o descarte de material apoptótico. Em indivíduos com LES esse processo é anormal, resultando em diminuição da remoção e, portanto, acúmulo de células apoptóticas, liberação de materiais intracelulares apoptóticos no ambiente circundante e ativação de respostas imunes contra auto-antígenos. Aumentos na carga celular apoptótica podem ser gerados pela exposição à luz ultravioleta, infecções e toxinas, conhecidas por estarem associadas ao LES [37].

Detritos apoptóticos persistentes contendo ácidos nucleicos podem estimular uma resposta inflamatória através da ativação de receptores do tipo Toll (TLR). As micropartículas apoptóticas em circulação também estimulam a extrusão de material nuclear dos neutrófilos, fornecendo ainda mais autoantígenos. Normalmente, os receptores TLR reconhecem vírus endógenos, bactérias intracelulares e estão fortemente associados à produção de interferon tipo I (IFN-I), o qual inclui o IFN- α e IFN- β [38]. O IFN- α , desempenha um papel importante na ativação do sistema imunológico inato e adaptativo. Uma expressão aumentada de genes regulados por IFN do tipo I, denominada assinatura de IFN, é relatada em pacientes com LES. [39] Os IFNs do tipo I e outras citocinas promovem diferenciação de células B, as quais podem responder aos ácidos nucleicos através do reconhecimento direto de antígenos e via IgM de superfície. Uma vez ativadas, essas células B amadurecem, expandem e começam a secretar mais anticorpos, aumentando a resposta imune adaptativa. Os autoanticorpos identificados no LES são, geralmente, IgGs de alta afinidade, o que sugere que eles são produzidos a partir de linfócitos B em centros germinais, onde as células T participam da troca de classe. [40].

O LES é uma doença predominantemente de perfil Th2, com a presença citocinas pró e anti-inflamatórias, incluindo TGF- β , IL-4, IL-6, IL-9, TNF- α , IL-10, IFN- α , IL-1 β , IL-17, IFN- γ , IL-12 e IL-23, que desempenham papéis patogênicos cruciais. O TGF- β possui propriedades imunorregulatórias e pró-inflamatórias dependentes de diferentes microambientes. Em um ambiente inflamatório, o TGF- β é produzido pelos macrófagos após a fagocitose das células apoptóticas e exerce um efeito anti-inflamatório, refletindo uma regulação negativa dos processos inflamatórios. Além de seu efeito inibitório na ativação de macrófagos, o TGF- β também pode suprimir outras células imunes inatas, como células NK, mastócitos e granulócitos, e regular o sistema imunológico adaptativo [40, 41].

Em relação as citocinas IL-4, IL-6, IL-9 e TNF- α produzidas pelas células T aumentam a produção de anticorpos anti-DNA de dupla hélice (anti-dsDNA) e anticorpos antinucleares.(ANA) A IL-10, é produzida principalmente pelas células Treg e regula a resposta imune; no entanto, a IL-10 melhora a proliferação de linfócitos B e a troca de classe Ig, aumentando a secreção de anticorpos. Embora a IL-10 seja considerada uma citocina reguladora, seu papel nas células B ainda não está totalmente esclarecido. Além disso, as citocinas IFN- γ , IL-12 e IL-23 estão associados

ao aprimoramento das respostas das células T, aumentando o processo inflamatório [41–44].

A ativação do inflamassoma induz a produção de IL-1 β , que, juntamente com IL-17, está associada à indução de netose. Além disso, o IFN- α tem sido associado a um número aumentado de linfócitos plasmáticos, produção de autoanticorpos, depuração defeituosa das células apoptóticas e promoção da inflamação dependente das células T [41–44].

Adicionalmente, o sistema complemento, o qual é primordial para a opsonização e depuração de complexos imunes contendo anticorpos e na eliminação de células apoptóticas, frequentemente está alterado no LES, apresentando atividade reduzida [45, 46]. Como consequência desta disponibilidade, os auto-anticorpos presentes no soro dos pacientes são direcionados contra componentes nucleares como DNA de cadeia dupla, ribonucleoproteínas e histonas (anti-proteína P ribossomal e perfil FAN) causando as manifestações associadas a doença. Dentre essas manifestações, destaca-se a lesão tecidual direta mediada pelos auto-anticorpos e pela deposição de complexos imunes [47].

Algumas lesões adicionais contribuem para o perfil da doença, incluindo lesões glomerulares, causando a nefrite lúpica, considerada a causa mais comum de morbimortalidade no LES. Considerando que o LES está associado a um amplo espectro de manifestações clínicas e imunológicas, essa doença destaca-se como uma importante causa da piora da qualidade de vida relacionada à saúde, afetando e impactando direta e negativamente na saúde física e mental do paciente [14–17].

3.1 Epidemiologia do lúpus eritematoso sistêmico

Dados recentes indicam que as taxas de incidência globais para o LES variam de cerca de 0,3 a 23,7 casos para cada 100.000 pessoas por ano [48, 49]. Enquanto as taxas de prevalência variam de 6,5 a 178 casos para cada 100.000 pessoas [2]. O LES é mais frequente em mulheres durante a idade reprodutiva, com uma razão de aproximadamente 9 mulheres para cada 1 homem. Em crianças, esta razão é de 3:1; em adultos jovens chega a 15:1 e nos indivíduos com maior idade, novamente tende a ser menor, em torno de 8:1. Este evento é atribuído especialmente a fatores hormonais [50].

No Brasil a taxa de mortalidade em pacientes com LES é de 4,76 óbitos/100.000 habitantes e há predominância de mulheres e brancos nesse grupo de pacientes. Entre as regiões brasileiras há enormes diferenças, os estados do sul e do sudeste apresentam a menor mortalidade, contudo a região norte apresenta a maior mortalidade. A região norte do Brasil demonstrou a menor média de idade ao óbito ($34,1 \pm 13,7$ anos) de todas as regiões brasileiras. Entretanto, a média de idade ao óbito na região sul foi de 44,7 anos [51].

É de suma importância ressaltar que estudos epidemiológicos envolvendo o LES são complexos devido à diversidade de aspectos clínicos da doença, dependência de critérios de classificação para definição do diagnóstico e baixa frequência na população. A variabilidade genética entre os povos e o local onde o estudo é realizado influenciam nos resultados epidemiológicos referentes à doença [52].

3.2 Envolvimento muscular no lúpus eritematoso sistêmico

Considerando os aspectos que medeiam a fisiopatogenia do LES, o envolvimento muscular é um aspecto fortemente presente [53]. Semelhante à artrite reumatoide (AR), o LES predispõe ao aumento da massa gorda, à diminuição da massa magra e à incapacidade física. Além disso, o LES é frequentemente associado a certas manifestações osteomusculares, como mialgia e miosite, as quais podem colocar os pacientes em risco adicional de incapacidade relacionada aos músculos [54].

Alterações na composição corporal foram relatadas em pacientes com LES devido à natureza inflamatória sistêmica da doença e à terapia prolongada com corticosteroides. Portanto, fenótipos anormais da composição corporal podem representar um risco adicional para desenvolver comorbidades associadas ao LES [55]. Demonstrou-se que os pacientes com LES apresentam significativamente menor massa magra, menor massa livre de gordura e menor índice de massa livre de gordura que indivíduos controles. Adicionalmente, a porcentagem de gordura abdominal, volume dos tecidos adiposos viscerais e massa de tecidos adiposos viscerais foi maior no grupo de pacientes com LES [56]. Além disso, o escore Z (usado para determinar

se a diferença entre a média da amostra e a da população geral) foi menor nos pacientes com LES ($-1,61 \pm 0,8$) quando comparado aos controles ($-1,26 \pm 0,71$) [57].

Com relação à função muscular, alguns estudos reportaram que os pacientes com LES apresentam redução na força muscular de extremidade inferior e superior em comparação com controles saudáveis pareados por idade e sexo [53, 58, 59]. A perda de força está, frequentemente, associada com a incapacidade funcional [53, 58, 59]. Em mulheres adultas com LES, a redução da força muscular da extremidade inferior foi associada a um aumento da incapacidade física autorreferida nas avaliações de funcionalidade física (SF-36) e *Valued Life Activities disability and accommodations scale (VLA)*, mesmo quando ajustadas pelas covariáveis. Possivelmente o uso de corticosteroides influencia na atrofia das fibras musculares, levando à diminuição da força e à exacerbação da fadiga [54, 58–60]. Além disso, em pacientes com LES, a redução de força muscular da extremidade superior e inferior está associada com níveis séricos mais altos de interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR). Esse achado é comum na população em geral e em indivíduos com condições inflamatórias crônicas, nos quais os níveis séricos de PCR e IL-6 estão inversamente associados a medidas de força muscular [53, 61, 62].

A fadiga é um dos aspectos mais difundidos e incapacitantes para os pacientes LES. Embora não exista um consenso claro sobre a definição de fadiga, Piper definiu a fadiga como "um cansaço corporal incomum, anormal ou extremo, desproporcional ou não relacionado à atividade ou ao esforço" [63]. Cerca de 85% dos pacientes com LES relatam níveis significativos de fadiga, prevalência superior à observada na população em geral e em pacientes com distúrbios reumáticos inflamatórios mais comuns. A fadiga no LES tem sido associada a inúmeras comorbidades como depressão, ansiedade, distúrbios do sono e anemia. Observou-se que a intensidade da fadiga está correlacionada com o aumento do estresse emocional e a também com redução da qualidade de vida relacionada à saúde no LES [64, 65]. Além disso, verificou-se que em pacientes fatigados com LES, o tempo de recuperação da PCR no músculo da panturrilha foi significativamente prolongado em comparação aos controles saudáveis que não apresentavam fadiga. A recuperação da PCR em meio período reflete a capacidade oxidativa muscular e é utilizada como marcador da função mitocondrial muscular. Sendo assim, o autor sugere uma maior disfunção mitocondrial do músculo esquelético em pacientes com LES em comparação com controles saudáveis [66]

Além das características inerentes ao LES, um estilo de vida sedentário também pode afetar negativamente a capacidade física, a função muscular e a qualidade de vida relacionada à saúde, em um círculo vicioso de inatividade física e desfechos clínicos desfavoráveis [53, 67]. Diante deste cenário destaca-se o importante papel da atividade física sobre a inflamação e sobre a perda muscular da doença. Em 2008 a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR) fez recomendações para o gerenciamento da doença, destacando a atividade física e o controle de peso como estratégias positivas de modificação do estilo de vida para os pacientes com LES, principalmente aos que apresentam risco aumentado de doença cardiovascular [68, 69].

A atividade física gera um aumento significativo nas células T reguladoras, diminui a secreção de imunoglobulina e produz um deslocamento no equilíbrio Th1/Th2 para uma produção reduzida de células Th1, gerando redução no IFN- α [60, 70]. Além disso, devido à atividade física, a IL-6, uma citocina pró-inflamatória e miocina anti-inflamatória, aumenta até 100 vezes o soro no sangue quando comparada ao *baseline* [71, 72]. Após a atividade física, foi demonstrado que a atividade de transcrição de mRNA da IL-6 no músculo esquelético aumenta sem sinais de dano muscular e não é precedido pela produção de TNF- α , como geralmente ocorre em condições inflamatórias [73] [74]. Atuando como uma miocina, a IL-6 induz a conseqüente liberação do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1RA) e da IL-10. O IL-1RA é um inibidor natural da IL-1 β , enquanto a IL-10 é um imunomodulador anti-inflamatório potente, que pode resultar em inibição de células T e redução da inflamação [75].

Os pacientes com LES, mesmo na condição estável da doença, sentem fadiga, diferentes graus de comportamento deprimido (de leve a grave), diminuição da qualidade de vida em todos os parâmetros, e ocorre redução da força mais rápida que a perda de massa muscular, sugerindo um declínio na qualidade muscular. Além disso do ponto de vista da saúde pública, a perda de massa muscular não apenas reduz a mobilidade e a capacidade funcional, mas também acelera o aparecimento de outras comorbidades associadas a doença. A implementação da atividade física prescrita, independentemente do tipo, leva a uma redução significativa da fadiga e do comportamento depressivo e à melhoria da qualidade de vida, sem piorar a atividade da doença de base. Desta forma, é evidente que melhorias na função e/ou morfologia muscular são benéficas para os pacientes [60, 70, 76–78].

4 MODELOS ANIMAIS DE LÚPUS

Nos últimos anos, os modelos animais forneceram informações valiosas sobre a investigação da patogênese do LES e de seu tratamento. Existem várias vantagens no uso de modelos experimentais para elucidar a patogênese da doença, bem como para examinar a utilidade, eficiência e eficácia dos agentes terapêuticos. Além disso, os modelos experimentais possibilitam a oportunidade de controlar fatores genéticos e ambientais que podem estar envolvidos no desenvolvimento do LES. Os modelos de LES podem ser divididos em quatro grupos: modelos espontâneos, modelos modificados, modelos congênitos e modelos induzidos. Os mais importantes e frequentemente utilizados são os modelos espontâneos e induzidos [79, 80].

Os modelos espontâneos de LES utilizam a prole F1, um híbrido entre as linhagens New Zealand Black e New Zealand White, NZM e Aeg2410 ou MRL/lpr e BXSB/Yaa. Essas linhagens desenvolvem uma doença autoimune, refletindo as comorbidades observadas no LES humano, apesar de diferirem entre si no viés hormonal, idade de início, envolvimento de órgãos e outras características da doença [81, 82].

No que diz respeito aos modelos congênitos, esses são geradas por um processo designado como “reprodução seletiva”, no qual duas linhagens consanguíneas, conhecidas como “linhagem receptora” e “linhagem doadora”, são acasaladas e a linhagem receptora é continuamente cruzada com a prole por 8 a 10 gerações. Geralmente, a linhagem propensa a doenças é a doadora, enquanto a linhagem livre de doença ou resistente serve como linhagem receptora, embora o inverso também possa ser feito [80, 81].

Sobre os modelos modificados de lúpus, técnicas avançadas de engenharia genética nos permitem nocautear um determinado gene em todos os tecidos ou apenas em tecidos específicos e células alvo [80, 83]. Esses modelos, envolvem principalmente proteínas que afetam a apoptose, o ciclo celular e a ativação de células T/B. Os fenótipos do tipo lúpus observados nesses modelos oferecem evidências diretas do papel específico de gene/proteína na patogênese do LES.

Os modelos de camundongos nocautes ou transgênicos podem não refletir a natureza poligênica do LES, pois um único gene é normalmente responsável pela doença nos modelos de camundongos modificados [80, 83]. Os modelos induzidos, por sua vez, incluem linhagens de camundongos suscetíveis à indução, corroborando a importância de fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento da doença. Os

principais modelos induzidos de lúpus incluem a doença do enxerto contra o hospedeiro (cGVHD) e o modelo induzido por pristane (PIL). Os modelos de cGVHD induzido requerem injeções de linfócitos do doador em um receptor semi-alogênico para induzir uma síndrome do tipo lúpus [84]. O modelo de PIL é induzido a partir do pristane, um óleo de hidrocarbonetos (2,6,10,14-tetrametilpentadecano, TMPD). Na natureza, esse óleo pode ser encontrado em pequenas quantidades em vegetais, no fígado de alguns tubarões e como subproduto da destilação de petróleo [85, 86]. Os camundongos recebem administração do pristane na cavidade abdominal (via intraperitoneal) e desenvolvem um líquido ascítico enriquecido com anticorpos monoclonais, inflamação crônica local (lipogranulomas) e artrite erosiva tipo reumatóide, glomerulonefrite, além da produção de vários autoanticorpos característicos da doença, incluindo anti-dsDNA e anti-Sm [7]. O modelo de PIL é um dos que mais se assemelha mais ao LES humano devido a quantidade de manifestações clínicas presentes (Tabela 1) [7].

No modelo de PIL, os animais não são geneticamente suscetíveis ao desenvolvimento da doença, embora o modelo seja útil para examinar o papel dos gatilhos ambientais envolvidos na doença [7, 87]. Além do mais, a superprodução de IFN-I, que é uma característica central da patogênese do LES, está presente neste modelo. Além do BALB/c, diversas outras linhagens de camundongos são suscetíveis à indução por pristane em extensões variadas, com produção de autoanticorpos e outras manifestações semelhantes às do LES humano [82, 88].

Tabela 1. Modelos animais de LES.

Modelo animal	Assinatura de IFN	Anti-DNA	Anti-Sm/RNP	Manifestações Clínicas	Critérios de LES*
NZB/W F1	Fraca	Sim	Não	ANAs, LN severa	3
MRL/lpr	Ausente	Sim	Sim	ANAs, LN severa, artrite, erupções cutâneas?	6
B6/lpr	Ausente	Não	Não	ANAs	1
BXSB male	N/A	Sim	Não	ANAs, LN severa	3

Pristane	Forte	Sim	Sim	ANAs, LN, artrite, DAH, anemia, serosite	8
----------	-------	-----	-----	--	---

N/A: Não disponível; ANAs: anticorpos antinucleares; LN: nefrite lúpica; DAH: hemorragia alveolar difusa.

*Número de critérios do SLICC para classificação do LES (em humanos são necessários quatro critérios para definir o lúpus com 95% de certeza, pelo menos um critério clínico e um laboratorial). Fonte: Tabela adaptada de Zhuang e colaboradores, 2015 [89].

5 VITAMINA D

A vitamina D, também conhecida como colecalciferol ou α -calcidol, compreende compostos lipossolúveis e existe em duas isoformas principais, de origem vegetal (vitamina D2 ou ergosterol) ou animal (vitamina D3 ou colecalciferol), responsáveis principalmente pela manutenção do equilíbrio do metabolismo ósseo [90, 91]. Ambas as vitaminas D2 e D3 são metabolizadas pela mesma via e produzem metabólitos ativos com efeitos biológicos equivalentes [92]. A vitamina D pode ser encontrada em alguns alimentos e suplementos alimentares, porém sua maior fonte é proveniente da síntese cutânea, a partir da adequada exposição à radiação UVB da luz solar. Apenas cerca de 20% das necessidades corporais diárias são supridas pela alimentação, fato que a torna diferente da maioria das demais vitaminas que geralmente precisam ser adquiridas através da dieta [93].

A vitamina D se torna biologicamente ativa após um processo gradual de hidroxilação no fígado, convertendo primeiro em 25-hidroxivitamina D [25 (OH) D] e depois nos rins, onde, 1, 25-di-hidroxivitamina D [1, 25 (OH) 2D] é sintetizada. O excesso de 25 (OH) D é degradado sob a influência da luz solar, de modo que mesmo a exposição intensa à luz solar não leva à intoxicação por vitamina D. O status da vitamina D é determinado pela medição dos níveis séricos de 25 (OH) D, pois essa é a principal forma circulante de vitamina D (meia-vida de aproximadamente 3 semanas). Existem vários métodos para medir o nível sérico de 25 (OH) D, como ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), imunensaio quimioluminescente, radioensaio, ensaio imunoradiométrico e ensaio competitivo de ligação a proteínas [94].

Além dos efeitos no metabolismo do cálcio, a vitamina D está envolvida na regulação do magnésio, liberação de insulina pelo pâncreas, secreção de prolactina pela hipófise, inibição da síntese de renina, aumento da contratilidade miocárdica,

manutenção da musculatura esquelética e depuração de creatinina endógena [95–99]. A descoberta de que a maioria das células expressa o receptor de vitamina D (VDR) e de que algumas possuem também maquinaria enzimática para produzir formas ativas da vitamina D, gerou grande interesse nos seus potenciais efeitos biológicos, visto que há evidências da influência desta vitamina na patogenia de doenças autoimunes, neoplásicas, osteometabólicas, infecciosas, musculares e metabólicas [100]. A mais alta expressão do gene VDR é encontrada em tecidos como intestino, rins e ossos, mas níveis baixos a moderados do VDR podem ser observados em mais da metade dos cerca de 400 tecidos e tipos de células que formam o corpo humano [101]. Estudos sugerem que a vitamina D apresenta efeitos regulatórios em aproximadamente 900 genes [102].

A identificação do VDR nas células responsáveis pela resposta imune, como as células mononucleares, dendríticas e apresentadoras de antígeno, e também nos linfócitos B e T, demonstra que a vitamina D exerce atividade imunorregulatória [103, 104]. Além disso, a vitamina D pode estimular a síntese de peptídeos antimicrobianos, como as catelicidinas, que contribuem para a morte bacteriana [105]. No que diz respeito à imunidade adaptativa, a vitamina D parece ter efeitos diretos nas células T e B. Seletivamente, a vitamina D desregula a resposta Th1 por meio de citocinas inflamatórias, através de um efeito direto do complexo 1,25 (OH) 2D3/VDR na transcrição IL-2 e IFN γ [106]. Em pacientes com LES, a vitamina D aumenta a resposta de primeira linha contra diferentes patógenos, agindo nas células apresentadoras de antígeno, utilizando mecanismos autócrinos em monócitos, macrófagos, queratinócitos, como a ativação da 1-alfa-hidroxilase (CYP27B1). Além disso, no LES, a vitamina D induz aumento no número de células Treg e efeito antiproliferativo na diferenciação das células B e na produção de autoanticorpos [107].

Pacientes com LES apresentam múltiplos fatores de risco para a indução de deficiência de vitamina D que, por sua vez, parecem influenciar ainda mais a gravidade da doença. Particularmente, a exposição reduzida ao sol devido à fotossensibilidade, o uso de foto-proteção, a alteração do metabolismo renal da vitamina D, bem como a pele escura, são todas explicações adicionais para a insuficiência de vitamina D. De fato, a literatura reporta que 38-96% dos pacientes com LES apresentam insuficiência (entre 20 e 30 ng/ml) e 8-30% apresentam deficiência de vitamina D (inferior a 20 ng/ml) (28). Investigações recentes relataram também a relação entre as concentrações de vitamina D e a atividade da doença do LES, sugerindo que a

deficiência de vitamina D durante o inverno pode ser um fator de risco para surtos de doenças [107].

A tentativa de restabelecer os níveis séricos ideais de vitamina D em pacientes com LES é feita através de suplementação. Em um estudo no qual pacientes com LES foram randomizados para receber dose diária de 2000 UI de vitamina D oral ou placebo, durante 12 meses, os níveis de 25 (OH) D aumentaram. O grupo suplementado mostrou uma média significativamente maior ($37,8 \pm 16,3$ ng/mL) em comparação ao grupo placebo ($19,9 \pm 16,2$ ng/mL). Além disso, houve uma melhora significativa nos níveis de marcadores inflamatórios e hemostáticos, bem como, no escore de atividade da doença medido pelo SLEDAI (índice de atividade da doença eritematosa lúpica sistêmica), em que pacientes com deficiência de vitamina D apresentaram pior escore [108].

Adicionalmente, em pacientes norte-americanos com LES com baixos níveis de 25 (OH) D, a suplementação semanal com 50.000 UI de vitamina D2 e com 200 UI de Ca/D3, duas vezes ao dia, durante 128 semanas apresentou benefícios. Os pacientes obtiveram uma redução modesta, mas significativa, no risco de aumento da atividade da doença e também uma associação com o aumento de 25 (OH) D [109]. Além disso, foi reportado que a suplementação com vitamina D está relacionada com melhora da dor, da qualidade do sono, da mobilidade funcional e, conseqüentemente, com melhor qualidade de vida relacionada a saúde [110, 111].

5.1 Vitamina D e músculo

A associação entre a vitamina D e a função muscular já foi avaliada em alguns estudos sobre envelhecimento. Os valores séricos de 25 (OH) D diminuem com o aumento da idade e a deficiência de vitamina D é comum entre os idosos [112]. Concomitantemente com o envelhecimento, a função física diminui, em particular a função muscular, levando progressivamente à sarcopenia, e vários estudos demonstraram uma ligação entre a vitamina D e esses sintomas [112–115].

Um dos argumentos mais fortes que ligam a vitamina D ao metabolismo e função muscular é a presença de VDR nesse tecido, cuja expressão diminui à medida que envelhecemos [116, 117]. Portanto, quatro linhas de evidências sustentam o papel de vitamina D na saúde muscular. Primeiro, a fraqueza muscular proximal é uma característica proeminente da síndrome clínica da deficiência de vitamina D em crianças e adultos. Segundo, o VDR é expresso no tecido muscular humano e um

estudo preliminar mostrou que a ativação do VDR pode promover a síntese proteica *de novo* [118]. Terceiro, vários estudos epidemiológicos e observacionais sugerem uma associação positiva entre o status da vitamina D e a força muscular ou a função dos membros inferiores em idosos. Finalmente, ensaios clínicos randomizados duplo-cegos relataram que a suplementação de vitamina D aumenta força muscular e reduz o risco de queda em indivíduos da comunidade e institucionalizados. Além disso, em um estudo prospectivo recente foi evidenciado que baixas concentrações de 25 (OH) D estavam associadas a um declínio na força muscular em 1 ano em idosos de uma comunidade [114].

De acordo com análises observacionais, estudos de intervenção demonstraram e reafirmaram a importância da vitamina D na saúde muscular. A suplementação com vitamina D melhora a qualidade muscular e a morfologia das fibras, indicando ação específica da vitamina D na remodelação do músculo esquelético [119]. Em mulheres com deficiência de vitamina D, a suplementação diária com 1000 UI de colecalciferol ou 1 µg de α -calcidol durante seis meses foi capaz de promover aumento da força muscular [120]. Corroborando com os estudos anteriores, uma metanálise reportou que a suplementação de vitamina D tem um impacto pequeno, mas positivo, na força muscular global, mais especificamente nos membros inferiores.

Em pacientes com LES juvenil, foram avaliados os efeitos da suplementação com vitamina D sobre a fadiga. A suplementação oral com dose de 50.000 UI foi eficaz na redução na fadiga e na atividade da doença, em comparação com os pacientes que utilizaram placebo. Os escores de fadiga, incluindo fadiga de baixa intensidade, fadiga durante o exercício e fadiga com esforço médio, foram significativamente menores nos pacientes suplementados com vitamina D [121].

Sendo assim, dados descritivos de estudos epidemiológicos e investigações clínicas têm claramente demonstrado que baixos níveis de vitamina D estão intimamente associados à redução da função muscular, e que sua suplementação pode melhorar força muscular em pacientes com miopatia, fraqueza muscular e sarcopenia [99, 122].

6 VIAS DE SINALIZAÇÃO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Os mecanismos moleculares inerentes à manutenção do músculo esquelético envolvem a interação entre múltiplas vias de sinalização. Em homeostase, uma rede

de sinais interconectados controla e coordena mensagens hipertróficas e atróficas, resultando em um sutil equilíbrio entre a síntese de proteínas musculares e a proteólise. A perda de massa muscular esquelética é uma característica observada em situações como câncer e doenças inflamatórias crônicas onde esse equilíbrio é alterado com predomínio da proteólise [123].

6.1 Vias de síntese

A síntese proteica do músculo esquelético é afetada por diferentes fatores, dentre eles os fisiológicos [124]. Uma via fisiológica de sinalização altamente conservada envolve o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1) e uma cascata de componentes intracelulares que medeiam seus efeitos na regulação do crescimento do músculo esquelético. Um componente central dessa cascata é a quinase Akt, também chamada de proteína quinase B (PKB), que controla a síntese proteica, via alvo quinase de rapamicina (mTOR) e glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3 β) [125]. Entre outros mecanismos, a sinalização de IGF1 Akt permite a nucleação e o alongamento dos filamentos de actina, controlando o crescimento e a manutenção de miofibrilas [125]. Esta via, tem sua expressão induzida durante a diferenciação muscular e é essencial para a miogênese e manutenção da massa muscular [126, 127].

6.2 Vias de degradação

Uma das principais vias catabólicas envolvidas na indução da atrofia do músculo esquelético em muitas formas de doença é a via da miostatina. A miostatina é uma proteína da família TGF- β que regula de maneira negativa a massa muscular esquelética. Esta proteína é sintetizada, principalmente, pelo músculo na sua forma latente, sendo secretada em associação a um propeptídeo. O complexo propeptídeo-miostatina sofre clivagens proteolíticas e dissociações para a liberação do componente ativo. A proteína na sua forma ativa é capaz de interagir com seu receptores de membrana (Activina IIA e Activina IIB) e, assim exercer seu efeito supressor sobre o crescimento muscular [128, 129].

A ligação da miostatina ao complexo receptor ActRIIB na membrana das células musculares leva à ativação intracelular de vias como o sistema ubiquitina-proteassoma e a autofagia. Além disso, inibe a síntese de proteínas musculares,

suprimindo a sinalização de Akt e sinaliza a quiescência das células satélites e seus progenitores, os mioblastos [130, 131].

O sistema ubiquitina-proteassomo é responsável por processar e degradar proteínas celulares essenciais para a regulação do desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose, transdução de sinal, respostas imune e inflamatória, entre outros, governando, assim, processos celulares básicos [4, 132]. As proteínas celulares destinadas à degradação pelo proteassomo sofrem um processo chamado de ubiquitinação, que corresponde a uma reação de vários passos e requer três classes de enzimas: enzimas ativadoras de ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) e ubiquitina-proteína ligases (E3). A enzima ativadora da ubiquitina (proteína E1) ativa a ubiquitina, que é então transferida para uma proteína transportadora de ubiquitina (E2). A proteína E2 interage com uma ubiquitina ligada (E3) para catalisar a transferência da ubiquitina para um substrato de proteína, marcando o substrato para a degradação proteasomal à medida que a ubiquitina se acumula. A especificidade do sistema é atribuída principalmente a proteína E3 que visa identificar proteínas específicas para a degradação [133]. MuRF-1 e MAFbx são enzimas E3s específicas do músculo esquelético [134].

A autofagia caracteriza-se como um processo catabólico de digestão intracelular de organelas e de estruturas da própria célula. Assim, podem ser eliminados componentes que deixaram de ser essenciais à atividade celular por sequestro nos autofagossomos e degradação por fusão com lisossomos [135]. No sistema de autofagia-lisossomo, as proteínas LC3, p62 e BNIP3 são críticas para comprometimento da membrana, entrega de carga e remoção seletiva de mitocôndrias danificadas, respectivamente. Para elucidar suas funções, essas proteínas são aprisionadas no autofagossomo quando a vesícula é formada e, assim, são destruídas com a fusão do autofagossomo com o lisossomo [136]. Mais especificamente proteínas ubiquitinadas são entregues aos autofagossomos através das proteínas p62/SQSTM1 e NBR1 que ligam as cadeias de polubiquitina e LC3 associada ao microtúbulo da proteína semelhante à ubiquitina. A conversão da LC3-I citosólica na isoforma LC3-II associada à membrana, que permanece no autofagossomo após a fusão com os lisossomos, representa a quantidade de autofagossomo e é utilizada como marcador de autofagia. No entanto, a quantificação simples de autofagossomos é insuficiente para uma estimativa geral da atividade autofágica, e o fluxo autofágico pode ser monitorado usando níveis de outros

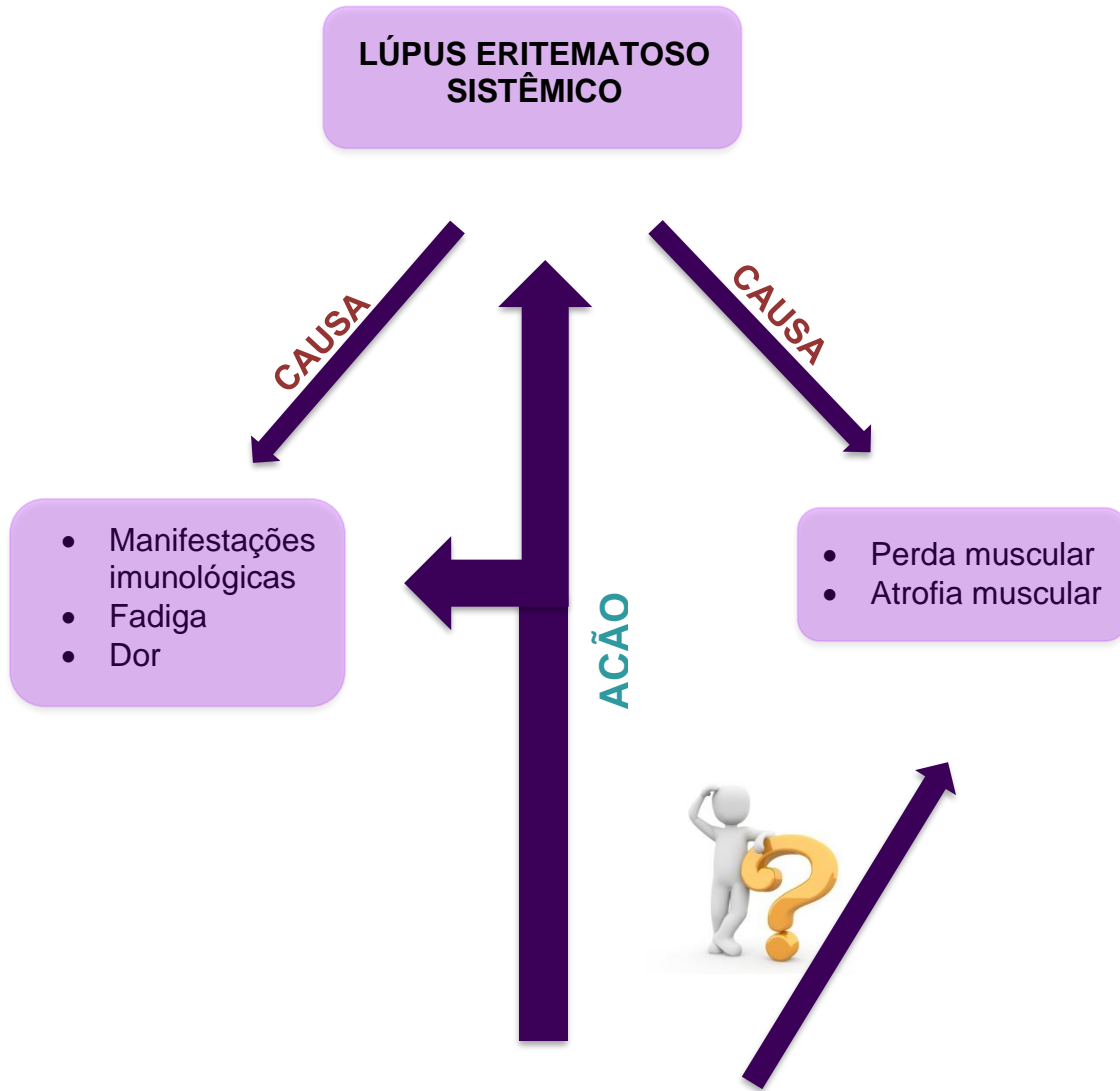
substratos de autofagia, como p62, que é incorporado nos autofagossomos através da ligação direta a LC3 [137–139].

6.3 Vias de regeneração

A capacidade de regeneração do músculo esquelético adulto é conferida pela presença de células satélites, as quais atuam como células-tronco desse tecido [134, 140] [141]. No músculo adulto, as células-satélite estão em estado de quiescência e podem ser ativadas em resposta a vários estímulos, como lesão, desnervação, exercício ou alongamento [142]. Em todas essas situações, o processo de regeneração (ou mesmo hipertrofia) muscular requer que as células células satélites (mioblastos) quiescentes sejam ativadas, e sofram proliferação e diferenciação [143].

Na etapa de diferenciação os mioblastos mudam para uma forma alongada e são chamados de miócitos. Os miócitos, então se fundem com células vizinhas, originando os miotubos multinucleados. Os miotubos multinucleados expressam as proteínas específicas do músculo, MHC (cadeia pesada da miosina), creatina quinase muscular (MCK) e α -actina. Essa forma madura do miotubo funde-se com as fibras musculares existentes, regenerando ou hipertrofiando a fibra [144]. Este processo é regulado, dentre outros, pela expressão de MyoD, Myf5, miogenina e MRF4. Primeiro ocorre o aumento de expressão de MyoD e Myf5, cuja função é a mesma: ativar a proliferação das células precursoras e a sua diferenciação em mioblastos. Posteriormente esses mioblastos param seu ciclo de proliferação para passar por diferenciação terminal e maturação da fibra muscular e se tornarem miócitos. Para isso é necessário que ocorra a expressão dos fatores de transcrição miogênicos “tardios”, miogenina e MRF4, e, em sequência, os genes músculo-específicos. [145, 146].

7 MARCO CONCEITUAL



8 JUSTIFICATIVA

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia multifatorial e com manifestações autoimunes. A doença é caracterizada pela produção de autoanticorpos, formação e deposição de imunocomplexos, inflamação e dano tecidual, afetando entre outros tecidos o músculo esquelético. Dentre as alterações musculoesqueléticas no LES, observa-se com frequência fraqueza e perda de força, as quais podem estar relacionada com a atrofia de fibras musculares. Todos esses sintomas resultam em uma redução na qualidade de vida do paciente. Uma vez que a suplementação de vitamina D demonstrou ter efeitos benéficos na morfologia e na função muscular, esse fator pode representar a abordagem ideal para otimizar a função muscular no LES. 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.

9 OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o efeito da vitamina D sobre a atrofia muscular de animais com lúpus induzido por pristane.

Objetivos específicos

Avaliar a força muscular

Avaliar a fadiga

Medir o diâmetro das fibras musculares do músculo tibial-anterior;

Avaliar a expressão protéica de diversas proteínas relacionadas com a regeneração muscular (MyoD, miogenina), síntese (Akt) proteólise (miostatina, MuRF-1, LC3, p62) através da técnica de Western blot.

Delineamento da pesquisa

Este estudo tem caráter experimental comparativo.

Questão de pesquisa

O tratamento com vitamina D, consegue reduzir a perda muscular em camundongos no modelo de experimental de lúpus induzido por pristane?

Variáveis em estudo

A: Fator em estudo: vitamina D

B: Desfecho: perda muscular

10 REFERÊNCIAS

1. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS (2010) Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 39:257–68
2. Pons-Estel GJ, Ugarte-Gil MF, Alarcón GS (2017) Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol* 13:799–814
3. LABOWITZ R, SCHUMACHER HR (1971) Articular Manifestations of Systemic Lupus Erythematosus. *Ann Intern Med* 74:911
4. Teixeira V de ON, Filippin LI, Xavier RM (2012) Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. *Rev Bras Reumatol* 52:252–259
5. Jackman RW, Kandarian SC (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Physiol* 287:C834–C843
6. Reggiori F, Komatsu M, Finley K, Simonsen A (2012) Autophagy: more than a nonselective pathway. *Int J Cell Biol* 2012:219625
7. Freitas EC, de Oliveira MS, Monticielo OA (2017) Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model. *Clin Rheumatol* 36:2403–2414
8. Birge SJ, Haddad JG (1975) 25-hydroxycholecalciferol stimulation of muscle metabolism. *J Clin Invest* 56:1100–7
9. Ceglia L (2009) Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12:628–633
10. CURRY OB, BASTEN JF, FRANCIS MJO, SMITH R (1974) Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum of muscle from vitamin D-deficient rabbits. *Nature* 249:83–84
11. Boland R, de Boland AR, Ritz E, Hasselbach W (1983) Effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on sarcoplasmic reticulum calcium transport in strontium-fed chicks. *Calcif Tissue Int* 35:190–194
12. Daly RM (2010) Independent and Combined Effects of Exercise and Vitamin D on Muscle Morphology, Function and Falls in the Elderly. *Nutrients* 2:1005–1017
13. Pittas AG, Laskowski U, Kos L, Saltzman E (2010) Role of vitamin D in adults requiring nutrition support. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 34:70–8
14. Hochberg MC (1997) Updating the American college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:1725–1725
15. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, Mcshane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ (1982) The 1982 revised criteria for the

- classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271–1277
16. Raymond WD, Eilertsen GØ, Shanmugakumar S, Nossent JC (2019) The Impact of Cytokines on the Health-Related Quality of Life in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Clin Med*. doi: 10.3390/JCM8060857
 17. Gorette Dos Reis M, Pereira Da Costa I (2010) Qualidade de vida relacionada à saúde em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico no Centro-Oeste do Brasil.
 18. Rivas-Larrauri F, Yamazaki-Nakashimada MA (2016) Systemic lupus erythematosus: Is it one disease? *Reumatol Clínica* 12:274–281
 19. James JA (2014) Clinical perspectives on lupus genetics: advances and opportunities. *Rheum Dis Clin North Am* 40:413–32, vii
 20. Herrmann M, Voll RE, Kalden JR (2000) Etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol Today* 21:424–426
 21. Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB (2009) Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun* 10:373–9
 22. Nies KM, Brown JC, Dubois EL, Quismorio FP, Friou GJ, Terasaki PI (1974) Histocompatibility (HL-A) antigens and lymphocytotoxic antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 17:397–402
 23. Reinertsen JL, Klippel JH, Johnson AH, Steinberg AD, Decker JL, Mann DL (1978) B-lymphocyte alloantigens associated with systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 299:515–8
 24. Barcellos LF, May SL, Ramsay PP, et al (2009) High-density SNP screening of the major histocompatibility complex in systemic lupus erythematosus demonstrates strong evidence for independent susceptibility regions. *PLoS Genet* 5:e1000696
 25. Bentham J, Morris DL, Graham DSC, et al (2015) Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 47:1457–1464
 26. Niu Z, Zhang P, Tong Y (2015) Value of HLA-DR genotype in systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Int J Rheum Dis* 18:17–28
 27. Costa-Reis P, Sullivan KE (2013) Genetics and Epigenetics of Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 15:369
 28. Salloum R, Niewold TB (2011) Interferon regulatory factors in human lupus pathogenesis. *Transl Res* 157:326–31
 29. Harley ITW, Kaufman KM, Langefeld CD, Harley JB, Kelly JA (2009) Genetic susceptibility to SLE: new insights from fine mapping and genome-wide association studies. *Nat Rev Genet* 10:285–290

30. Kelly JA, Moser KL, Harley JB (2002) The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together. *Genes Immun* 3:S71–S85
31. Ahmed YM, Erfan DM, Hafez SF, Shehata IH, Morshedy NA (2017) The association of single nucleotide polymorphism of interleukin-21 gene and serum interleukin-21 levels with systemic lupus erythematosus. *Egypt J Med Hum Genet* 18:129–136
32. Parks CG, de Souza Espindola Santos A, Barbhaiya M, Costenbader KH (2017) Understanding the role of environmental factors in the development of systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 31:306–320
33. Barbhaiya M, Costenbader KH (2016) Environmental exposures and the development of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 28:497–505
34. Cooper GS, Parks CG (2004) Occupational and environmental exposures as risk factors for systemic lupus erythematosus. *Curr Rheumatol Rep* 6:367–374
35. Kuhn A, Wenzel J, Weyd H (2014) Photosensitivity, apoptosis, and cytokines in the pathogenesis of lupus erythematosus: a critical review. *Clin Rev Allergy Immunol* 47:148–62
36. Barbhaiya M, Costenbader K (2014) Ultraviolet radiation and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 23:588–595
37. Tsokos GC, Lo MS, Reis PC, Sullivan KE (2016) New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol* 12:716–730
38. Crow MK (2014) Type I Interferon in the Pathogenesis of Lupus. *J Immunol* 192:5459–5468
39. Shira Bezalel MD, Keren Mahlab Guri MD, Daniel Elbirt MD IAM and ZMSM Type I Interferon Signature in Systemic Lupus Erythematosus. In: *Isr. Med. Assoc. J.*
<https://www.ima.org.il/Medicine/IMAJ/viewarticle.aspx?year=2014&month=04&page=246>. Accessed 21 Oct 2019
40. Guimarães PM, Scavuzzi BM, Stadtlober NP, et al (2017) Cytokines in systemic lupus erythematosus: far beyond Th1/Th2 dualism lupus: cytokine profiles. *Immunol Cell Biol* 95:824–831
41. Su DL, Lu ZM, Shen MN, Li X, Sun LY (2012) Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE. *J Biomed Biotechnol*. doi: 10.1155/2012/347141
42. Cytokines and Inflammatory Mediators in Systemic Lupus Erythematosus - *European Medical Journal*.
<https://www.emjreviews.com/rheumatology/article/cytokines-and-inflammatory-mediators-in-systemic-lupus-erythematosus/>. Accessed 21 Oct 2019

43. Robak E, Sysa-Jedrzejowska A, Robak T (1996) Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Przegl Lek* 53:623–6
44. Ohl K, Tenbrock K (2011) Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. doi: 10.1155/2011/432595
45. Ghodke-Puranik Y, Niewold TB (2015) Immunogenetics of systemic lupus erythematosus: A comprehensive review. *J Autoimmun* 64:125–36
46. Lourenço E V, La Cava A (2009) Cytokines in systemic lupus erythematosus. *Curr Mol Med* 9:242–54
47. Herrada AA, Escobedo N, Iruretagoyena M, Valenzuela RA, Burgos PI, Cuitino L, Llanos C (2019) Innate Immune Cells' Contribution to Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 10:772
48. Nasonov E, Soloviev S, Davidson JE, et al (2014) The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus (SLE) in selected cities from three Commonwealth of Independent States countries (the Russian Federation, Ukraine and Kazakhstan). *Lupus* 23:213–9
49. Feldman CH, Hiraki LT, Liu J, Fischer MA, Solomon DH, Alarcón GS, Winkelmayer WC, Costenbader KH (2013) Epidemiology and sociodemographics of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis among US adults with Medicaid coverage, 2000-2004. *Arthritis Rheum* 65:753–63
50. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St. Clair EW, Parks CG, Gilkeson GS (1998) Hormonal, environmental, and infectious risk factors for developing systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 41:1714–1724
51. Ribeiro Costi L, Miyashiro Iwamoto H, Costa de Oliveira Neves Cezar Augusto Muniz Caldas D (2017) Mortalidade por lúpus eritematoso sistêmico no Brasil: avaliação das causas de acordo com o banco de dados de saúde do governo. doi: 10.1016/j.rbr.2017.05.007
52. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, et al (1998) Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 41:778–799
53. Andrews JS, Trupin L, Hough CL, Daikh DI, Yelin EH, Katz PP (2017) Serum biomarkers of inflammation and muscle strength among women with systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 90:109–112
54. Andrews JS, Trupin L, Schmajuk G, Barton J, Margaretten M, Yazdany J, Yelin EH, Katz PP (2015) Muscle strength, muscle mass, and physical disability in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 67:120–7
55. Shamekhi Z, Habibagahi Z, Ekramzadeh M, Ghadiri A, Namjoyan F, Saki Malehi A, Amani R (2017) Body composition and basal metabolic rate in systemic lupus erythematosus patients. *Egypt Rheumatol* 39:99–102

56. Li Z, Shang J, Zeng S, Wu H, Zhou Y, Xu H (2019) Altered body composition and increased visceral adipose tissue in premenopausal and late postmenopausal patients with SLE. *Clin Rheumatol* 1–11
57. Santos MJ, Vinagre F, Canas da Silva J, Gil V, Fonseca JE Body composition phenotypes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: a comparative study of Caucasian female patients. *Clin Exp Rheumatol* 29:470–6
58. Cezarino RS, Cardoso JR, Rodrigues KN, et al (2017) Chronic low back pain in patients with systemic lupus erythematosus: prevalence and predictors of back muscle strength and its correlation with disability. *Rev Bras Reumatol (English Ed)* 57:438–444
59. Balsamo S, da Mota LMH, de Carvalho JF, Nascimento D da C, Tibana RA, de Santana FS, Moreno RL, Gualano B, dos Santos-Neto L (2013) Low dynamic muscle strength and its associations with fatigue, functional performance, and quality of life in premenopausal patients with systemic lupus erythematosus and low disease activity: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord* 14:263
60. Balsamo S, Santos-Neto L dos (2011) Fatigue in systemic lupus erythematosus: An association with reduced physical fitness. *Autoimmun Rev* 10:514–518
61. Yende S, Waterer GW, Tolley EA, et al (2005) Inflammatory markers are associated with ventilatory limitation and muscle dysfunction in obstructive lung disease in well functioning elderly subjects. *Thorax* 61:10–16
62. Santos MLAS, Gomes WF, Pereira DS, Oliveira DMG, Dias JMD, Ferrioli E, Pereira LSM (2011) Muscle strength, muscle balance, physical function and plasma interleukin-6 (IL-6) levels in elderly women with knee osteoarthritis (OA). *Arch Gerontol Geriatr* 52:322–326
63. Piper BF. (1993) *Pathophysiological Phenomena in Nursing: Human Responses to Illness*. PA, USA WB Saunders 279–302.
64. Pettersson S, Boström C, Eriksson K, Svenungsson E, Gunnarsson I, Henriksson EW (2015) Lifestyle habits and fatigue among people with systemic lupus erythematosus and matched population controls. *Lupus* 24:955–965
65. Yilmaz-Oner S, Ilhan B, Can M, Alibaz-Oner F, Polat-Korkmaz O, Ozen G, Mumcu G, Kremers HM, Tuğlular S, Direskeneli H (2017) Fatigue in systemic lupus erythematosus. *Z Rheumatol* 76:913–919
66. Cheung SM, Keenan K, Senn N, et al (2019) Metabolic and structural skeletal muscle health in systemic lupus erythematosus related fatigue: a multi-modal magnetic resonance imaging study. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. doi: 10.1002/acr.23833
67. Pinto AJ, Benatti FB, Roschel H, de Sá Pinto AL, Silva CA, Sallum AME, Gualano B (2016) Poor muscle strength and function in physically inactive

- childhood-onset systemic lupus erythematosus despite very mild disease. *Rev Bras Reumatol (English Ed)* 56:509–514
68. Bertsias G, Ioannidis JPA, Boletis J, et al (2008) EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann Rheum Dis* 67:195–205
 69. del Pino-Sedeño T, Trujillo-Martín MM, Ruiz-Irastorza G, Cuellar-Pompa L, de Pascual-Medina AM, Serrano-Aguilar P, Spanish Systemic Lupus Erythematosus CPG Development Group (2016) Effectiveness of Nonpharmacologic Interventions for Decreasing Fatigue in Adults With Systemic Lupus Erythematosus: A Systematic Review. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 68:141–148
 70. Sharif K, Watad A, Bragazzi NL, Lichtbroun M, Amital H, Shoenfeld Y (2018) Physical activity and autoimmune diseases: Get moving and manage the disease. *Autoimmun Rev* 17:53–72
 71. Northoff H, Berg A (1991) Immunologic mediators as parameters of the reaction to strenuous exercise. *Int J Sports Med* 12 Suppl 1:S9-15
 72. Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA, Pedersen BK (1997) Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol* 499:833–841
 73. Muñoz-Cánoves P, Scheele C, Pedersen BK, Serrano AL (2013) Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? *FEBS J* 280:4131–48
 74. Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Henson DA, Utter A, Davis JM, Williams F, Butterworth DE (1998) Influence of mode and carbohydrate on the cytokine response to heavy exertion. *Med Sci Sports Exerc* 30:671–678
 75. De Vries JE (1995) Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 27:537–541
 76. Bogdanovic G, Stojanovich L, Djokovic A, Stanisavljevic N (2015) Physical Activity Program Is Helpful for Improving Quality of Life in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Tohoku J Exp Med* 237:193–199
 77. Cartee GD, Hepple RT, Bamman MM, Zierath JR (2016) Exercise Promotes Healthy Aging of Skeletal Muscle. *Cell Metab* 23:1034–1047
 78. Pelosi L, Berardinelli MG, De Pasquale L, et al (2015) Functional and Morphological Improvement of Dystrophic Muscle by Interleukin 6 Receptor Blockade. *EBioMedicine* 2:285–293
 79. Celhar T, Fairhurst A-M (2017) Modelling clinical systemic lupus erythematosus: similarities, differences and success stories. *Rheumatology (Oxford)* 56:i88–i99

80. Du Y, Sanam S, Kate K, Mohan C (2015) Animal Models of Lupus and Lupus Nephritis. *Curr Pharm Des* 21:2320–2349
81. Li W, Titov AA, Morel L (2017) An update on lupus animal models. *Curr Opin Rheumatol* 29:434–441
82. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng Y-Y, Morel L (2011) Murine models of systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol* 2011:271694
83. Richard ML, Gilkeson G (2018) Mouse models of lupus: what they tell us and what they don't. *Lupus Sci Med* 5:e000199
84. Han L, Shen L, Zhu Y, Qiu Y (2017) A monoclonal antibody against CD86 and its protection in a murine lupus nephritis model of chronic graft-versus-host disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 39:285–291
85. Avigan J, Blumer M (1968) On the origin of pristane in marine organisms. *J Lipid Res* 9:350–2
86. Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L (2009) Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol* 30:455–464
87. Liu C, Kanamaru Y, Watanabe T, Tada N, Horikoshi S, Suzuki Y, Liu Z, Tomino Y (2015) Targeted IgA Fc receptor I (FcαRI) therapy in the early intervention and treatment of pristane-induced lupus nephritis in mice. *Clin Exp Immunol* 181:407
88. Dema B, Lamri Y, Pellefigues C, Pacreau E, Saidoune F, Bidault C, Karasuyama H, Sacré K, Daugas E, Charles N (2017) Basophils contribute to pristane-induced Lupus-like nephritis model. *Sci Rep* 7:7969
89. Zhuang H, Szeto C, Han S, Yang L, Reeves WH (2015) Animal Models of Interferon Signature Positive Lupus. *Front Immunol* 6:291
90. Anderson PH (2017) Vitamin D Activity and Metabolism in Bone. *Curr Osteoporos Rep* 15:443–449
91. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G (2016) Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev* 96:365–408
92. de Castro LCG (2011) O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq Bras Endocrinol Metab* 55:566–75
93. Wacker M, Holick MF (2013) Sunlight and Vitamin D: A global perspective for health. *Dermatoendocrinol* 5:51–108
94. Islam MA, Khandker SS, Alam SS, Kotyla P, Hassan R (2019) Vitamin D status in patients with systemic lupus erythematosus (SLE): A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 102392

95. Fonseca V, Mohiuddin J, Weerakoon J, Boss M, Mikhailidis DP, Dandona P (1984) Plasma creatinine and creatinine clearance in nutritional osteomalacia. *Lancet* 1:1093–5
96. Walters MR (1992) Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 13:719–64
97. Li YC (2003) Vitamin D regulation of the renin-angiotensin system. *J Cell Biochem* 88:327–31
98. Chiu KC, Chu A, Go VLW, Saad MF (2004) Hypovitaminosis D is associated with insulin resistance and beta cell dysfunction. *Am J Clin Nutr* 79:820–5
99. Pfeifer M, Begerow B, Minne HW (2002) Vitamin D and muscle function. *Osteoporos Int* 13:187–94
100. Bouillon R, Carmeliet G (2018) Vitamin D insufficiency: Definition, diagnosis and management. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 32:669–684
101. Carlberg C (2018) Vitamin D Genomics: From In Vitro to In Vivo. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:250
102. Wang T-T, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, et al (2005) Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1,25-dihydroxyvitamin D3 target genes. *Mol Endocrinol* 19:2685–95
103. Colotta F, Jansson B, Bonelli F (2017) Modulation of inflammatory and immune responses by vitamin D. *J Autoimmun* 85:78–97
104. Sassi F, Tamone C, D’Amelio P (2018) Vitamin D: Nutrient, Hormone, and Immunomodulator. *Nutrients* 10:1656
105. Iruretagoyena M, Hirigoyen D, Naves R, Burgos PI (2015) Immune Response Modulation by Vitamin D: Role in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol* 6:513
106. Hewison M (2010) Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:365–79, table of contents
107. Dall’Ara F, Cutolo M, Andreoli L, Tincani A, Paolino S Vitamin D and systemic lupus erythematosus: a review of immunological and clinical aspects. *Clin Exp Rheumatol* 36:153–162
108. ABOU-RAYA A, ABOU-RAYA S, HELMII M (2013) The Effect of Vitamin D Supplementation on Inflammatory and Hemostatic Markers and Disease Activity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Randomized Placebo-controlled Trial. *J Rheumatol* 40:265–272
109. Petri M, Bello KJ, Fang H, Magder LS (2013) Vitamin D in Systemic Lupus Erythematosus: Modest Association With Disease Activity and the Urine Protein-to-Creatinine Ratio. *Arthritis Rheum* 65:1865–1871

110. Tepper S, Dabush Y, Shahar DR, Endevelt R, Geva D, Ish-Shalom S (2016) Vitamin D Status and Quality of Life in Healthy Male High-Tech Employees. *Nutrients*. doi: 10.3390/nu8060366
111. Hoffmann MR, Senior PA, Mager DR (2015) Vitamin D Supplementation and Health-Related Quality of Life: A Systematic Review of the Literature. *J Acad Nutr Diet* 115:406–418
112. Vitale G, Cesari M, Mari D (2016) Aging of the endocrine system and its potential impact on sarcopenia. *Eur J Intern Med* 35:10–15
113. McCabe PS, Pye SR, Beth JM, et al (2016) Low vitamin D and the risk of developing chronic widespread pain: results from the European male ageing study. *BMC Musculoskelet Disord* 17:32
114. Salminen M, Saaristo P, Salonoja M, Vaapio S, Vahlberg T, Lamberg-Allardt C, Aarnio P, Kivelä S-L (2015) Vitamin D status and physical function in older Finnish people: A one-year follow-up study. *Arch Gerontol Geriatr* 61:419–424
115. Almurdhhi MM, Reeves ND, Bowling FL, Boulton AJM, Jeziorska M, Malik RA (2017) Distal lower limb strength is reduced in subjects with impaired glucose tolerance and is related to elevated intramuscular fat level and vitamin D deficiency. *Diabet Med* 34:356–363
116. Olsson K, Saini A, Strömberg A, Alam S, Lilja M, Rullman E, Gustafsson T (2016) Evidence for Vitamin D Receptor Expression and Direct Effects of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Human Skeletal Muscle Precursor Cells. *Endocrinology* 157:98–111
117. Ryan ZC, Craig TA, Folmes CD, et al (2016) $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ Regulates Mitochondrial Oxygen Consumption and Dynamics in Human Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem* 291:1514–1528
118. Salles J, Chanet A, Giraudet C, et al (2013) $1,25(\text{OH})_2$ -vitamin D₃ enhances the stimulating effect of leucine and insulin on protein synthesis rate through Akt/PKB and mTOR mediated pathways in murine C2C12 skeletal myotubes. *Mol Nutr Food Res* 57:2137–2146
119. Agergaard J, Trøstrup J, Uth J, Iversen JV, Boesen A, Andersen JL, Schjerling P, Langberg H (2015) Does vitamin-D intake during resistance training improve the skeletal muscle hypertrophic and strength response in young and elderly men? – a randomized controlled trial. *Nutr Metab (Lond)* 12:32
120. Capatina C, Caragheorgheopol A, Berteanu M, Poiana C (2016) Short-term Administration of Alphacalcidol is Associated with More Significant Improvement of Muscular Performance in Women with Vitamin D Deficiency Compared to Native Vitamin D. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 124:461–465
121. Lima GL, Paupitz J, Aikawa NE, Takayama L, Bonfa E, Pereira RMR (2016) Vitamin D Supplementation in Adolescents and Young Adults With Juvenile Systemic Lupus Erythematosus for Improvement in Disease Activity and Fatigue Scores: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.

- Arthritis Care Res (Hoboken) 68:91–98
122. Gunton JE, Girgis CM (2018) Vitamin D and muscle. *Bone reports* 8:163–167
 123. Egerman MA, Glass DJ (2014) Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49:59–68
 124. Cai X, Zhu C, Xu Y, et al (2016) Alpha-ketoglutarate promotes skeletal muscle hypertrophy and protein synthesis through Akt/mTOR signaling pathways. *Sci Rep* 6:26802
 125. Schiaffino S, Mammucari C (2011) Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle* 1:4
 126. Guttridge DC (2004) Signaling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7:443–50
 127. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, Gonzalez M, Yancopoulos GD, Glass DJ (2004) The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 14:395–403
 128. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R (2006) Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF- κ B-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 209:501–514
 129. Pirruccello-Straub M, Jackson J, Wawersik S, et al (2018) Blocking extracellular activation of myostatin as a strategy for treating muscle wasting. *Sci Rep*. doi: 10.1038/s41598-018-20524-9
 130. Han HQ, Zhou X, Mitch WE, Goldberg AL (2013) Myostatin/activin pathway antagonism: Molecular basis and therapeutic potential. *Int J Biochem Cell Biol* 45:2333–2347
 131. Bonnieu A, Carnac G, Vernus B (2009) Myostatin in the Pathophysiology of Skeletal Muscle. *Curr Genomics* 8:415–422
 132. Naujokat C, Hoffmann S (2002) Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* 82:965–80
 133. Li Y-P, Chen Y, Li AS, Reid MB (2003) Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *Am J Physiol Physiol* 285:C806–C812
 134. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R (2002) Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 277:49831–40
 135. Wang D-T, Yang Y-J, Huang R-H, Zhang Z-H, Lin X (2015) Myostatin Activates the Ubiquitin-Proteasome and Autophagy-Lysosome Systems Contributing to Muscle Wasting in Chronic Kidney Disease. *Oxid Med Cell Longev*

2015:684965

136. Sandri M (2013) Protein breakdown in muscle wasting: Role of autophagy-lysosome and ubiquitin-proteasome. *Int J Biochem Cell Biol* 45:2121–2129
137. Fanin M, Nascimbeni AC, Angelini C (2014) Muscle atrophy, ubiquitin-proteasome, and autophagic pathways in dysferlinopathy. *Muscle Nerve* 50:340–347
138. Sandri M (2010) Autophagy in skeletal muscle. *FEBS Lett* 584:1411–1416
139. Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I (2013) Ubiquitination and selective autophagy. *Cell Death Differ* 20:21–30
140. Zanou N, Gailly P (2013) Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci* 70:4117–4130
141. Boldrin L, Zammit PS, Morgan JE (2015) Satellite cells from dystrophic muscle retain regenerative capacity. *Stem Cell Res* 14:20–29
142. Motohashi N, Asakura Y, Asakura A (2014) Isolation, culture, and transplantation of muscle satellite cells. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/50846
143. Snijders T, Nederveen JP, McKay BR, Joannisse S, Verdijk LB, van Loon LJC, Parise G (2015) Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Front Physiol*. doi: 10.3389/fphys.2015.00283
144. Grounds MD, White JD, Rosenthal N, Bogoyevitch MA (2002) The Role of Stem Cells in Skeletal and Cardiac Muscle Repair. *J Histochem Cytochem* 50:589–610
145. Simões RM, Foschini A, Ramalho FS, Bicas HEA (2004) Myogenic satellite cells Células satélites musculares. *Arq Bras Oftalmol* 67:681–7
146. Silva MDP, Carvalho RF (2007) Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *Rev Bras Zootec* 36:21–31
147. Lemire JM, Ince A, Takashima M (1992) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 12:143–148
148. Alabarse PVG, Lora PS, Silva JMS, et al (2018) Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. doi: 10.1002/jcsm.12280

11 ARTIGO

Artigo original a ser submetido à revista *Arthritis & Rheumatology*

Running head: Vitamin D treatment in lupus model

Title: Vitamin D treatment attenuates muscle atrophy in pristane-induced lupus model

Manuela dos Santos^{1,2,3}; MSc Jordana Miranda de Souza Silva^{1,2,3}; PhD Eduarda Correa Freitas^{1,3}; Amanda Busatto^{1, 3}; PhD Rafaela Cavalheiro do Espirito Santo ^{1,3}, PhD Odirlei Monticielo^{1,3}; PhD Ricardo Machado Xavier^{1,3};

¹ Laboratório de Doenças Autoimunes, Divisão de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

³ Divisão de Reumatologia, Departamento de Medicina Interna, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Correspondence: Rua Ramiro Barcelos, 2350, Centro de Pesquisas Experimentais, sala 12109, Porto Alegre 90035-003, Brasil

Corresponding author: Manuela dos Santos, manuelasanttos@gmail.com

Telephone number: +55 51 3359 8837

Financial support:

This study was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE/HCPA) under Grant (nº 170011); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Universal MCTI/CNPQ under Grant (nº 14/2014 and nº 28/2018) and Research Support Fund of Sociedade de Reumatologia do Rio Grande do Sul. We acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, for a scholarship offered to Manuela dos Santos.

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Abstract:

Objective: Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disease that can lead to decreased lean mass and physical function. Vitamin D supplementation has shown beneficial effects on muscle morphology and function. Our aim was to evaluate changes in skeletal muscle after vitamin D supplementation in the pristane-induced lupus model.

Methods: Twenty-eight female Balb/c mice, with 8-12 weeks, were randomized in pristane induced lupus (PIL), PIL + vitamin D (VD) and healthy control (CO). Physical function was evaluated at days 0, 60, 120 and 180. After euthanasia, tibialis anterior and gastrocnemius muscles were collected for the evaluation of the myofiber area and the protein expression of muscle regeneration, synthesis and degradation markers.

Results: The PIL group showed a significant reduction in myofiber area compared to the CO and VD groups (10%). LC3 expression was significantly higher in the PIL group than in the CO and VD groups. Myostatin expression was higher in the VD group compared to the PIL group. Myod expression was higher in the PIL group than in the VD group. We did not find statistical difference among the groups for p62, myogenin and Akt expression ($p > 0.05$). The PIL and VD groups presented higher fatigue and lower muscle strength rates compared to the CO group over time.

Conclusion: Pristane-induced lupus model may cause muscle atrophy due to increased autophagy, which is attenuated by vitamin D supplementation. The absence of changes in the physical function of sick animals, at the end of the experiment, is possibly related to mild atrophy.

Keywords: vitamin D, pristane- induce lupus model, muscle atrophy;

Background

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an inflammatory systemic disease of multifactorial and unknown etiology, with autoimmune manifestations. The disease is characterized by autoantibody production, deposition of immune complexes, inflammation and tissue damage, affecting among other tissues the skeletal muscle. It is estimated an incidence of 1-22 cases per 100,000 people per year, affecting more women of childbearing age[1].

Considering the aspects that mediate the pathophysiology of SLE, muscle involvement is a strongly present aspect [2]. Similar to rheumatoid arthritis (RA), SLE predisposes to increased fat mass, decreased lean mass and physical disability. In addition, SLE is often associated with certain musculoskeletal manifestations, such as myalgia and myositis, which may put patients at additional risk for muscle-related disability due to muscle atrophy [3].

Muscle loss may result from conditions such as disuse, advanced age, malnutrition, inflammatory, infectious and autoimmune diseases. Different intracellular signaling cascades are involved in muscle loss, leading to decreased protein synthesis and/or increased proteolysis [4, 5]. Some of the factors involved in muscle anabolism are the Akt pathway, which activation leads to protein synthesis, as well as satellite cells responsible for the muscle regeneration. After activation, satellite cells undergo proliferation and differentiation, upregulating the myogenic markers MyoD and myogenin, respectively [6]. Regarding protein degradation, a known negative regulator of muscle mass growth is myostatin, which stimulates a variety of atrophy-related pathways, such as autophagy and proteasome. The increased protein breakdown due to autophagy is characterized by expression changes in components such as p62 and LC3, while muscle proteasome pathway comprises MuRF-1 [7].

The interest in vitamin D synthesis, metabolism and action is motivated by the association of vitamin D nutritional insufficiency with several diseases, being recognized as a public health

problem, and the discoveries of its non-hormonal, endocrine and paracrine actions [8, 9]. Vitamin D, in its active form 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25 (OH) 2D), acts on muscle through the classical mechanism of binding to a nuclear receptor and also through membrane receptor, performing actions on the skeletal muscle involving calcium transport and protein synthesis [10, 11]. Several studies have shown that low serum vitamin D (25 (OH) D) concentrations are related to accelerated loss of lean muscle mass, strength and power [12, 13].

Experimental models such as pristane-induced lupus (PIL) mimic SLE, being an important tool for the study of this pathology. This model is widely used for demonstrating morphological similarities with human lupus, including arthritis, immune complex deposit-mediated glomerulonephritis and autoantibody production, as well as exacerbation of pro-inflammatory cytokines [14]. However, to date we have no evidence of the molecular pathways that lead to muscle loss observed in SLE, especially regarding the impact caused by vitamin D supplementation in preventing muscle atrophy.

Materials and methods

Animals

Female wild-type BALB/c mice that were 8 weeks-old were obtained from the Universidade Federal de Pelotas (Pelotas, RS, Brazil). All mice were housed in the Animal Experimentation Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and maintained in standard 12 h light/dark cycle, with controlled temperature (22 ± 2 C) and given water and food ad libitum. Mice were adapted to the new environmental conditions for 2 weeks. The present study was approved by the Animal Ethics Committee of HCPA (number 17-0011) and was conducted in accordance with National Institute of Health guideline.

Experimental design

Twenty-eight female BALB/c mice were randomly divided into the following three groups: control group (CO; n =8); pristane-induced lupus group (PIL; n =10); and pristane-induced lupus treated with vitamin D group (VD; n= 10). CO group received a single intraperitoneal injection of 0,9% saline solution and the PIL and VD groups received a single intraperitoneal injection of pristane oil (2,6,10,14-tetramethylpentadecane; SigmaAldrich, MO, USA), according to Satoh et al [15]. During the procedures, mice were anesthetized with isoflurane 10% (Abbott Laboratório do Brasil Ltda., Brazil) and 90% of oxygen. Vitamin D supplementation was administrated from the day of disease induction until the euthanasia. VD group mice received a subcutaneous injection of Calcijex (Abbott Labs, Chicago, Ill) containing 2 mg/kg/day of calcitriol (1,25- [OH]₂-D₃) in PBS-Tween 20 buffer every two days [16]. CO and PIL groups received subcutaneous injections with PBS-Tween 20 buffer on the same days. Six months after pristane induction, animals were euthanized and specimens including kidney, tibialis anterior and gastrocnemius muscles were collected.

Physical performance

Physical performance was assessed by fatigue, muscle strength and mobility. Regarding the fatigue test, this was performed at time 0, 60, 120 and 180. The mice were placed on the treadmill for 5 min for setting before the start of the test. The treadmill started at a speed of 8.5 m/min and after 9 minutes the speed increased 2.5 m/min every 3 minutes reaching a maximum of 45 m/min. Each animal was removed from the treadmill and returned to its crate when exhausted (fatigue). Exhaustion occurred when the researcher observed that the animal could not maintain the running gait and remained about 10 seconds on the final portion of the treadmill, near the lower wall at the treadmill limit, unable to recover the distance.

The strength test was performed at time 0, 60, 120 and 180. Weights were used with 5, 20, 35, 50, 65, 80 and 95 grams. The protocol was adapted as previously described (REF).

Regarding the spontaneous exploratory locomotion of the animals, it was detected at times 0, 60, 120 and 180 on activity monitor (Insight Equipamentos Ltda® IR). The mice were placed individually in the acrylic box and 5 minutes of movement were recorded, where the distance traveled and the average speed were determined [17].

Tissues

The animals received an anesthetic overdose with isoflurane at a concentration of 5% or greater. Clinical signs consistent with death (absence of respiratory movement, absence of heartbeat, absence of pulsation, pale mucosae and loss of corneal reflex) were monitored for an additional 10 minutes after respiratory arrest. Only after confirmation of death tissues of interest (kidney and muscles) were collected by dissection and properly stored for further analysis.

Kidney histopathological evaluation

After euthanasia, one kidney from each animal was removed and fixed for 24 hours in 10% buffered formalin prior to paraffin embedding and sectioned at 3 μm thickness in the transversal plane containing the renal long axis. Slides were hematoxylin-eosin (HE) stained, according to standard procedures. HE stained sections were observed with a light microscopy (Olympus, Germany) at a final magnification of 400x. The glomerular cellularity was quantified by counting the total cell nuclei per glomerulus on HE-stained slides. At least 30 glomeruli/slides were assessed, and the results were expressed as number of nuclei per glomerulus. All measurements and analyses were performed in a blind fashion and using an image analyzer (Image Pro Premier 9.1, Media Cybernetics Inc., Rockville, USA).

Muscle histological evaluation

After anatomical dissection of the tibialis anterior muscle, it was placed separately in 10% buffered formalin containers for 1 to 3 days and then 6 μ m sections and hematoxylin-eosin (HE) stainings were made. For quantification, in sections of the anterior tibialis anterior stained with HE, two perpendicular straight lines were drawn in the direction of the longest and shortest fiber length for diameter measurement. For this, 10 images were captured from each histological slide with QImaging Digital Camera (Media Cybernetics) and from each field the diameters of 20 myofibers will be measured with the aid of Image-Pro Express software (version 5.1.0.12, Media Cybernetics). Finally, the geometric average of the diameters was made and the cross-sectional area of the fiber was calculated [18].

Protein Expression

The gastrocnemius muscle was used to quantify protein expression by Western blot technique, individually evaluating each protein. First, protein extracts were separated by 14-16% polyacrylamide gel electrophoresis in electrophoresis buffer. Second, the proteins separated by electrophoresis will be transferred to a PVDF membrane where, after blocking nonspecific sites, they will be incubated overnight at 4°C with the specific primary antibodies, MyoD (satellite cell proliferation marker; SIGMA SAB4300397; dilution 1:1000), myogenin (satellite cell differentiation marker; SIGMA SAB2501587; dilution 1:2000), myostatin (negative muscle regulator; ABCAM AB203076; dilution 1:1000), MuRF-1 (ubiquitin-proteasome marker; ABCAM AB172479; dilution 1:1000), LC3B (autophagy marker; Cell Signaling Technology #2775; dilution 1:500) p62 (autophagy marker; Cell Signaling Technology #5114; dilution 1:500) . Third, primary antibodies were detected with a secondary IgG rabbit, mouse or goat (SIGMA) anti-mouse secondary antibody by the chemiluminescence system [18].

Sample size

The sample size calculation was made considering 80% sample power, alpha error 5% and to detect a 30% reduction in the mononuclear cell infiltrate in the kidney.

Statistical analysis

Cross-sectional analyses. The Kolmogorov–Smirnov method was used to test for normality. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD), median (interquartile range) and number (%) as appropriate. Independent-Samples Kruskal-Wallis test, one-way ANOVA test and Tukey test post-hoc analysis as appropriate to comparison between groups.

Longitudinal analyses. Generalized estimating equations (GEE) were performed using a linear or poisson loglinear model, as appropriate, for comparison among groups during experimental period. Results are expressed as estimated mean and standard error (SE). The significance level was set at $p \leq 0.05$ for all analyses. Statistical analyses were performed in PASW 18.0 Statistics for Windows.

Results

Confirmation of disease

The development of the disease was confirmed in mice with pristine-induced lupus by the presence of immune complex deposits in the glomeruli, the primary cause of lupus nephritis. Histopathological evaluation indicated the presence of IgG and IgM in kidney tissue [19].

Muscle atrophy

PIL group presented a significant reduction in the myofiber area (225.67 ± 11.26), compared to CO (250.95 ± 8.10 ; $p < 0.05$) and VD groups (247.43 ± 17.17 ; $p < 0.05$). The reduction of the area for PIL group was approximately 10%, in comparison with the CO group (Figure 1).

Degradation Markers

LC3 expression was significantly higher in the PIL group (0.98 ± 0.22) compared to CO (0.60 ± 0.11 ; $p < 0.05$) and VD (0.56 ± 0.28 ; $p < 0.05$) groups. Myostatin expression was statistically higher in the VD group (1.12 ± 0.31) compared to PIL group (0.69 ± 0.18 ; $p < 0.05$). Regarding the expression of p62 and MuRF-1, both showed no statistical difference among the analyzed groups (Figure 2).

Synthesis and regeneration markers

Regarding Akt expression, there was no statistical difference among the groups studied. MyoD expression was higher in PIL group (1.06 ± 0.93) than in VD group (0.85 ± 0.18 ; $p < 0.05$), while myogenin expression was not statistically different among any of the groups evaluated (Figure 3).

Physical performance

The presence of disease was associated with muscle strength and fatigue however, mobility assessment was not associated with the disease over time.

At day 60, VD group showed lower muscle strength compared to CO and PIL groups over time. During of experimental period, we found decreased of muscle strength at days 0 and 60, but we found increase of muscle strength between days 60 and 120 on VD group. There was no difference in muscle strength among groups at day 180 (Figure 4).

Regarding fatigue, PIL and VD groups showed higher rates of fatigue compared to CO group at day 60, but we found no statistical difference between PIL and VD groups. At day 120, we found statistical difference on fatigue between CO and PIL groups. At day180, PIL and VD groups

showed higher of fatigue compared to CO group, but we no find statistical difference between PIL and VD groups (Figure 4).

DISCUSSÃO

Considering SLE pathophysiology, muscle involvement is a strongly present aspect, since SLE patients have muscle loss and reduced physical function [2, 20]. In addition to its classic effects, vitamin D has been shown immunomodulatory role and beneficial effects on muscle function [21–23]. In this study, we found that vitamin D supplementation attenuated muscle atrophy in the pristane-induced lupus (PIL) model. The disease induced increased autophagy, which consequently caused muscle atrophy. The supplementation with vitamin D, in diseased animals, prevented the increase of autophagy, leading the LC3 levels similar to healthy control animals. To our knowledge, this is the first study to verify the effect of vitamin D on muscle atrophy mechanisms and, furthermore, we show that the PIL model has muscle atrophy.

The muscle area in PIL mice had a reduction of approximately 10%, in comparison with CO. Although PIL model induces strong inflammation, the atrophy level is not as high as in collagen-induced arthritis model, since it was reported that arthritic mice present around 30-41% of reduction in muscle area [24, 25]. Additionally, in a previous study, our group found that PIL model has high levels of circulating pro-inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- α and IFN- γ [19], as other studies in the literature have already demonstrated [26–28]. Regarding skeletal muscle, the elevation of pro-inflammatory cytokines causes potentially deleterious effects, as several chronic inflammatory diseases present show some degree of muscle loss [29–31]. The reduction in muscle area found in PIL animals may be related, at some point with, the inflammatory character of the disease.

In homeostasis, a network of interconnected signals controls and coordinates hypertrophic and atrophic messages, resulting in a subtle balance between muscle protein synthesis and

proteolysis [32]. There are no studies in the literature that demonstrate the mechanisms involved in muscle loss in a PIL model. Among the main factors involved in myogenesis are Akt, MyoD and myogenin [6]. Regarding protein degradation, the proteasome and autophagy pathways are the most discussed [7].

In this study, we observed that LC3 expression was increased in PIL group compared to the CO and VD group, suggesting that PIL induces autophagy increasing. There was no difference in p62 expression among groups. Autophagy is a self-degrading process that plays a cleansing role in removing damaged proteins and organelles and eliminating intracellular pathogens [33]. In adjuvant-induced arthritis (AIA) model, increased p62 and LC3 levels were observed, in the extensor muscles of the long fingers, indicating decreased clearance and increased autophagosome production [34].

Corroborating this data, in the study by Sakuma K et al in sarcopenic muscle of aged mice, it was observed that the autophagy markers p62/SQSTM1 and Beclin-1 have increased protein expression in muscle of aged mice. In addition, this same study evaluated, the immunofluorescence labeling. This indicated that older mice more often had p62 / SQSTM1 positive fibers in the quadriceps muscle cytosol than young mice (age: 14% vs. young: 1%) [35]. It is well established that Th1 cytokines, including IFN- γ , TNF- α and IL-6, are able to promote autophagy inducement, while the classical Th2 cytokines IL-4, IL-10 and IL-13 cause autophagy inhibition [36]. In our study, it is likely that the systemic inflammation present in PIL is stimulating the autophagy of muscle proteins and leading to atrophy.

Importantly, vitamin D supplementation was able to restore autophagy to physiological levels, since VD mice presented LC3 expression similar to CO mice. As we know, there are no studies reporting association between vitamin D and autophagy in skeletal muscle tissue, however, it has been shown that vitamin D receptor negatively regulates the signaling and activity of important inflammatory transcription factors. Higher CD4⁺ T cells counts were observed in SLE patients

with severe vitamin D deficiency (<10 ng/ml), compared to vitamin D insufficiency (10-30 ng/ml). Otherwise, the lower the vitamin D serum levels, the lower the mRNA expression of LC3 in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) [37]. This is probably because vitamin D may regulate autophagy at different levels, since a report showed that 1,25(OH)₂D₃ decreased the number of autophagosomes and the protein expression of LC3-II and p62 in experimental autoimmune myocarditis. The general benefits of vitamin D over skeletal muscle tissue were demonstrated by some studies, mainly regarding the improvement of muscle mitochondrial function [38] [39]. In addition, eradication of vitamin D deficiency has been reported to be associated with an improvement in symptoms of myopathy and fatigue [40].

Regarding myostatin expression, PIL group had lower expression than VD group. It is known that myostatin signals not only by stimulation of autophagy and/or proteasome pathways, but also through blockade of satellite cell activation, as myostatin knockout leads to larger number of satellite cells activation *in vivo* [41]. Our results indicate no difference in MuRF-1 expression among groups, indicating no alteration on proteasome activity. However, MyoD expression was higher in PIL group, compared to VD group, while the expression of myogenin was not statistically different among groups. These results suggest that both myostatin and MyoD performed compensatory signaling against muscle atrophy present in PIL, and it was not successful due to the absence of myogenin activation. It is likely that satellite cells proliferated (MyoD increase) but did not differentiate (absence of myogenin) into myoblasts. If differentiation had occurred the myoblasts would come together to form multinucleated myotubes that would fuse with the injured muscle fibers to repair or form new myofilaments [42]. The compensatory mechanism against muscle loss was suggested in arthritis animal model, where gastrocnemius muscle showed reduced myostatin and increased MyoD and myogenin expression, in comparison with control animals [43]

As physical function is often impaired in SLE the patients, we also aimed to evaluate some physical parameters in PIL model throughout the experimental period and evaluate possible

associations with protein expression. Mobility assessment was not associated with the disease over time. Differently, another study with pristane-induced lupus model described significant reduction in spontaneous locomotion of lupus mice compared to healthy control [44]. According to a study performed in UK, about 29% of SLE patients evaluated presented mobility limitations, which contributes to a persons' ability to remain in work [45]. Thus, mobility impairing is an important SLE feature that could not be reproduced by our experiment, probably due to the experimental time.

Vitamin D was not able to beneficially modulate the strength and fatigue at the beginning of the experiment, where the disease was acute. But from day 60 to day 120, when the disease was already established vitamin D supplementation increased the strength of the treated animals. However, vitamin D supplementation was not able to reduce the impact caused by anabolic and catabolic pathway imbalances on the physical function of the animals when the disease was chronic, at the end of 180 days of experimentation. Our results corroborate with features that SLE patients clinically demonstrate regarding the reduction of strength and fatigue generated by the disease. SLE patients have reduced upper and lower extremity muscle strength compared to age- and sex-matched healthy controls and loss of strength is often associated with functional disability [2, 46, 47]. Additionally, about 85% of SLE patients report significant levels of fatigue, higher than prevalence observed in general population and in patients with the most common inflammatory rheumatic disorders. The intensity of fatigue was found to be correlated with increased emotional stress and also with reduced health-related quality of life in SLE [48, 49].

One limitation of this study was the lack of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines evaluation in muscle tissue. This would enable us to assess locally how disease and vitamin D are modulating the cytokine profile.

This is the first study related to muscle atrophy in PIL. The PIL model is likely to promote muscle atrophy due to increased autophagy, which can be counterbalanced by vitamin D

supplementation. The absence of changes in the physical function of diseased animals, at the end of the experiment, is possibly related to the mild atrophy (about 10%) that animals developed. Although it is known now that vitamin D is beneficial to muscle in PIL model, further studies may help to verify other pathways involved in the disease muscle loss and how vitamin D interact with them.

References

1. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS (2010) Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum* 39:257–68
2. Andrews JS, Trupin L, Hough CL, Daikh DI, Yelin EH, Katz PP (2017) Serum biomarkers of inflammation and muscle strength among women with systemic lupus erythematosus. *Cytokine* 90:109–112
3. Andrews JS, Trupin L, Schmajuk G, Barton J, Margaretten M, Yazdany J, Yelin EH, Katz PP (2015) Muscle strength, muscle mass, and physical disability in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 67:120–7
4. Jackman RW, Kandarian SC (2004) The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Physiol* 287:C834–C843
5. Reggiori F, Komatsu M, Finley K, Simonsen A (2012) Autophagy: more than a nonselective pathway. *Int J Cell Biol* 2012:219625

6. Zhu M, Zheng R, Guo Y, Zhang Y, Zuo B (2017) NDRG4 promotes myogenesis via Akt/CREB activation. *Oncotarget* 8:101720–101734
7. Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M (2013) Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J* 280:4294–4314
8. Birge SJ, Haddad JG (1975) 25-hydroxycholecalciferol stimulation of muscle metabolism. *J Clin Invest* 56:1100–7
9. Ceglia L (2009) Vitamin D and its role in skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12:628–633
10. CURRY OB, BASTEN JF, FRANCIS MJO, SMITH R (1974) Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum of muscle from vitamin D-deficient rabbits. *Nature* 249:83–84
11. Boland R, de Boland AR, Ritz E, Hasselbach W (1983) Effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on sarcoplasmic reticulum calcium transport in strontium-fed chicks. *Calcif Tissue Int* 35:190–194
12. Daly RM (2010) Independent and Combined Effects of Exercise and Vitamin D on Muscle Morphology, Function and Falls in the Elderly. *Nutrients* 2:1005–1017
13. Pittas AG, Laskowski U, Kos L, Saltzman E (2010) Role of vitamin D in adults requiring nutrition support. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 34:70–8
14. Freitas EC, de Oliveira MS, Monticielo OA (2017) Pristane-induced lupus: considerations on this experimental model. *Clin Rheumatol* 36:2403–2414
15. Lemire JM, Ince A, Takashima M (1992) 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ attenuates the expression of experimental murine lupus of MRL/l mice. *Autoimmunity* 12:143–148
16. Vaisberg MW, Kaneno R, Franco MF, Mendes NF (2000) Influence of cholecalciferol (vitamin D₃) on the course of experimental systemic lupus erythematosus in F1 (NZBxW)

mice. *J Clin Lab Anal* 14:91–6

17. Alabarse PVG, Lora PS, Silva JMS, et al (2018) Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. doi: 10.1002/jcsm.12280
18. Silva JM de S, Alabarse PVG, Teixeira V de ON, Freitas EC, de Oliveira FH, Chakr RM da S, Xavier RM (2018) Muscle wasting in osteoarthritis model induced by anterior cruciate ligament transection. *PLoS One* 13:e0196682
19. Correa Freitas E, Evelyn Karnopp T, de Souza Silva JM, Cavalheiro do Espírito Santo R, da Rosa TH, de Oliveira MS, da Costa Gonçalves F, de Oliveira FH, Guilherme Schaefer P, André Monticielo O (2019) Vitamin D supplementation ameliorates arthritis but does not alleviate renal injury in pristane-induced lupus model. *Autoimmunity* 52:69–77
20. Balsamo S, Santos-Neto L dos (2011) Fatigue in systemic lupus erythematosus: An association with reduced physical fitness. *Autoimmun Rev* 10:514–518
21. Aranow C (2011) Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med* 59:881–886
22. Książek A, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M (2019) Vitamin D, Skeletal Muscle Function and Athletic Performance in Athletes—A Narrative Review. *Nutrients* 11:1800
23. Umar M, Sastry K, Chouchane A (2018) Role of Vitamin D Beyond the Skeletal Function: A Review of the Molecular and Clinical Studies. *Int J Mol Sci* 19:1618
24. de Oliveira Nunes Teixeira V, Filippin LI, Viacava PR, de Oliveira PG, Xavier RM (2013) Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Exp Biol Med* 238:1421–1430
25. Alabarse PVG, Lora PS, Silva JMS, et al (2018) Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 9:603–612
26. Wei W, Zhou LL, Si JF, Yuan DP (2010) Regulatory effect of melatonin on cytokine

disturbances in the pristane-induced lupus mice. *Mediators Inflamm*. doi:
10.1155/2010/951210

27. Khorasani S, Mahmoudi M, Kalantari MR, Lavi Arab F, Esmaeili SA, Mardani F, Tabasi N, Rastin M (2019) Amelioration of regulatory T cells by *Lactobacillus delbrueckii* and *Lactobacillus rhamnosus* in pristane-induced lupus mice model. *J Cell Physiol* 234:9778–9786
28. Mardani F, Mahmoudi M, Esmaeili SA, Khorasani S, Tabasi N, Rastin M (2018) In vivo study: Th1–Th17 reduction in pristane-induced systemic lupus erythematosus mice after treatment with tolerogenic *Lactobacillus* probiotics. *J Cell Physiol* 234:642–649
29. Strassmann G, Fong M, Kenney JS, Jacob CO (1992) Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia. *J Clin Invest* 89:1681–1684
30. Tsujinaka T, Fujita J, Ebisui C, et al (1996) Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest* 97:244–249
31. Scott HR, McMillan DC, Crilly A, McArdle CS, Milroy R (1996) The relationship between weight loss and interleukin 6 in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 73:1560–1562
32. Egerman MA, Glass DJ (2014) Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49:59–68
33. Parzych KR, Klionsky DJ (2014) An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants Redox Signal* 20:460–473
34. Himori K, Tatebayashi D, Kanzaki K, Wada M, Westerblad H, Lanner JT, Yamada T (2017) Neuromuscular electrical stimulation prevents skeletal muscle dysfunction in adjuvant-induced arthritis rat. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0179925

35. Sakuma K, Kinoshita M, Ito Y, Aizawa M, Aoi W, Yamaguchi A (2016) p62/SQSTM1 but not LC3 is accumulated in sarcopenic muscle of mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 7:204–212
36. Qian M, Fang X, Wang X (2017) Autophagy and inflammation. *Clin Transl Med*. doi: 10.1186/s40169-017-0154-5
37. Zhao M, Duan X-H, Wu Z-Z, Gao C-C, Wang N, Zheng Z-H (2017) Severe vitamin D deficiency affects the expression of autophagy related genes in PBMCs and T-cell subsets in active systemic lupus erythematosus. *Am J Clin Exp Immunol* 6:43–51
38. Ryan ZC, Craig TA, Folmes CD, et al (2016) $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D3 Regulates Mitochondrial Oxygen Consumption and Dynamics in Human Skeletal Muscle Cells. *J Biol Chem* 291:1514–1528
39. Dzik K, Skrobot W, Flis DJ, Karnia M, Libionka W, Kloc W, Kaczor JJ (2018) Vitamin D supplementation attenuates oxidative stress in paraspinal skeletal muscles in patients with low back pain. *Eur J Appl Physiol* 118:143–151
40. Sinha A, Hollingsworth KG, Ball S, Cheetham T (2013) Improving the vitamin D status of vitamin D deficient adults is associated with improved mitochondrial oxidative function in skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab*. doi: 10.1210/jc.2012-3592
41. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R (2003) Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 162:1135–1147
42. Kaiser De Souza D, Reis De Oliveira J, Rodrigues H, Cota NB, Carvalho MM, Prestes J, Luiz J, Durigan Q, Cristina E, Pereira L Regulação e ativação das células satélites durante a regeneração muscular Regulation and activation of satellite cells during musculoskeletal regeneration.
43. Little RD, Prieto-Potin I, Pérez-Baos S, Villalvilla A, Gratal P, Cicuttini F, Largo R, Herrero-

- Beaumont G (2017) Compensatory anabolic signaling in the sarcopenia of experimental chronic arthritis. *Sci Rep* 7:6311
44. He YY, Yan Y, Zhang HF, Lin YH, Chen YC, Yan Y, Wu P, Fang JS, Yang SH, Du GH (2016) Methyl salicylate 2-O- β -D-lactoside alleviates the pathological progression of pristane-induced systemic lupus erythematosus-like disease in mice via suppression of inflammatory response and signal transduction. *Drug Des Devel Ther* 10:3183–3196
45. Stevens MJ, Walker-Bone K, Culliford DJ, et al (2019) Work participation, mobility and foot symptoms in people with systemic lupus erythematosus: findings of a UK national survey. *J Foot Ankle Res* 12:26
46. Cezarino RS, Cardoso JR, Rodrigues KN, et al (2017) Chronic low back pain in patients with systemic lupus erythematosus: prevalence and predictors of back muscle strength and its correlation with disability. *Rev Bras Reumatol (English Ed)* 57:438–444
47. Balsamo S, da Mota LMH, de Carvalho JF, Nascimento D da C, Tibana RA, de Santana FS, Moreno RL, Gualano B, dos Santos-Neto L (2013) Low dynamic muscle strength and its associations with fatigue, functional performance, and quality of life in premenopausal patients with systemic lupus erythematosus and low disease activity: a case-control study. *BMC Musculoskelet Disord* 14:263
48. Pettersson S, Boström C, Eriksson K, Svenungsson E, Gunnarsson I, Henriksson EW (2015) Lifestyle habits and fatigue among people with systemic lupus erythematosus and matched population controls. *Lupus* 24:955–965
49. Yilmaz-Oner S, Ilhan B, Can M, Alibaz-Oner F, Polat-Korkmaz O, Ozen G, Mumcu G, Kremers HM, Tuglular S, Direskeneli H (2017) Fatigue in systemic lupus erythematosus. *Z Rheumatol* 76:913–919

Figure legends

Figure 1: Myofiber area in CO group, PIL group and PIL + VD group. Data represented by mean \pm SD. * $p > 0.05$ CO vs PIL; # $p > 0.05$ PIL vs PIL+VD

Figure 2: Protein expression of degradation markers in CO group, PIL group and PIL + VD group. Data in Figure 1 A, B and C represented by mean \pm SD and data in Figure 1 D represented as median (interquartile range). (A) * $p < 0.05$ CO vs PIL; # $p < 0.05$ PIL vs PIL+VD. (B) \square * $p < 0.05$ PIL vs PIL+VD. (C) $p > 0.05$. (D) $P > 0.05$.

Figure 3: Protein expression of synthesis and regeneration markers in CO group, PIL group and PIL + VD group. Data in Figure 1 A and B represented by mean \pm SD and data in Figure 1 C represented as median (interquartile range). (A) $p > 0.05$ (B) * $p < 0.05$ PIL vs PIL+VD. (C) $p > 0.05$.

Figure 4: Time of fatigue in CO group, PIL group and PIL + VD group over time. Data represents mean values. (A) * $p < .05$ CO vs PIL+VITD ; # $p < 0.05$ PIL vs PIL+VITD (B) * $p < 0.05$ CO vs PIL; # $p < 0.05$ CO vs PIL + VD; θ $p < 0.05$ CO vs PIL; δ $p < 0.05$ CO vs PIL; Σ $p < 0.05$ CO vs PIL + VD;

Figures

Figure 1

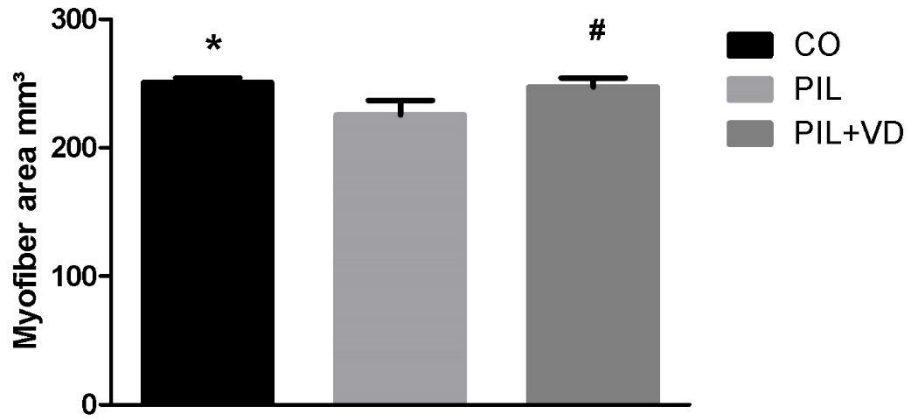


Figure 2

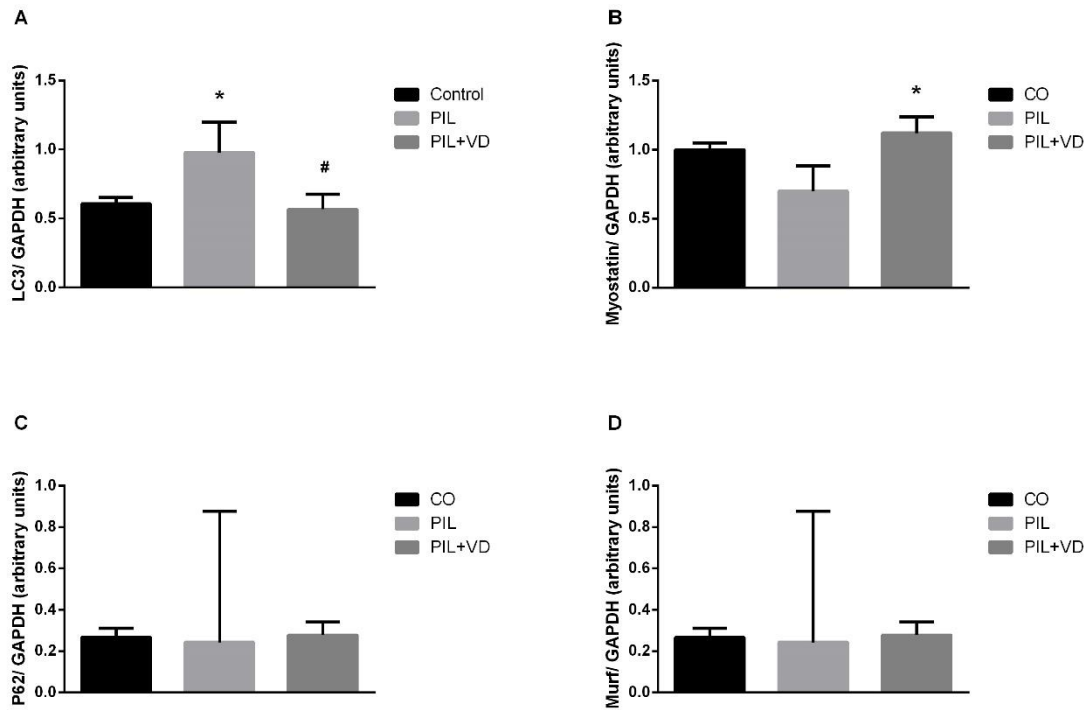


Figure 3

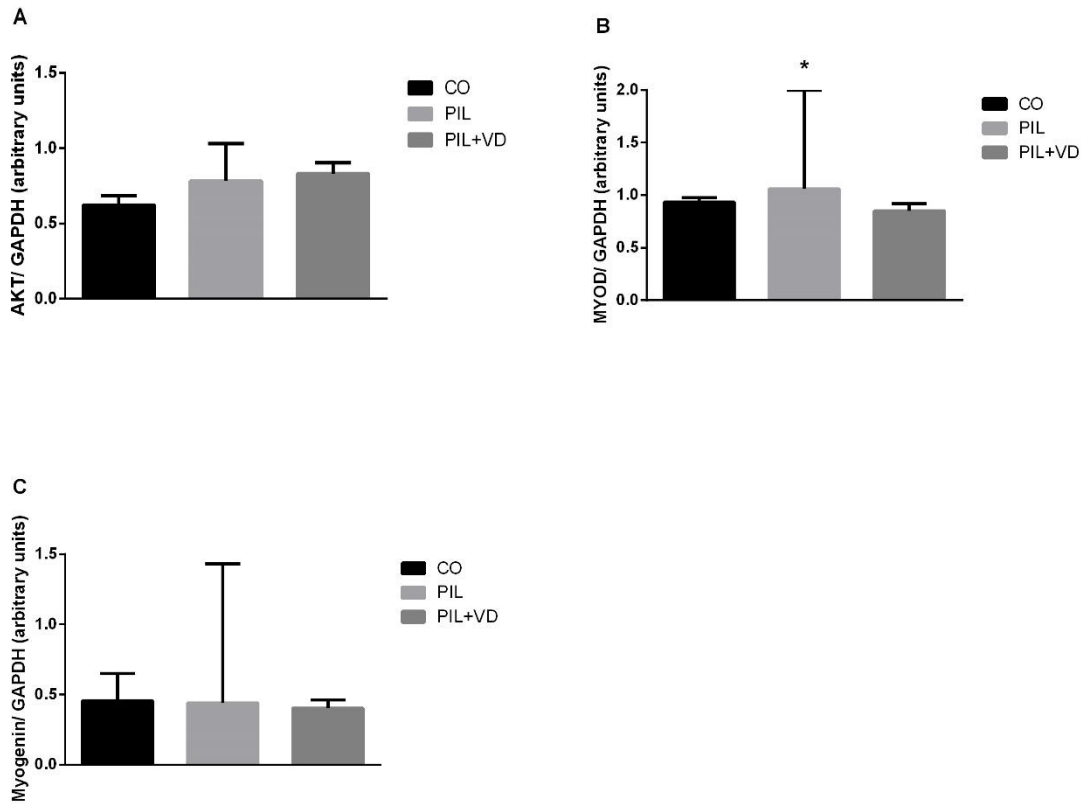
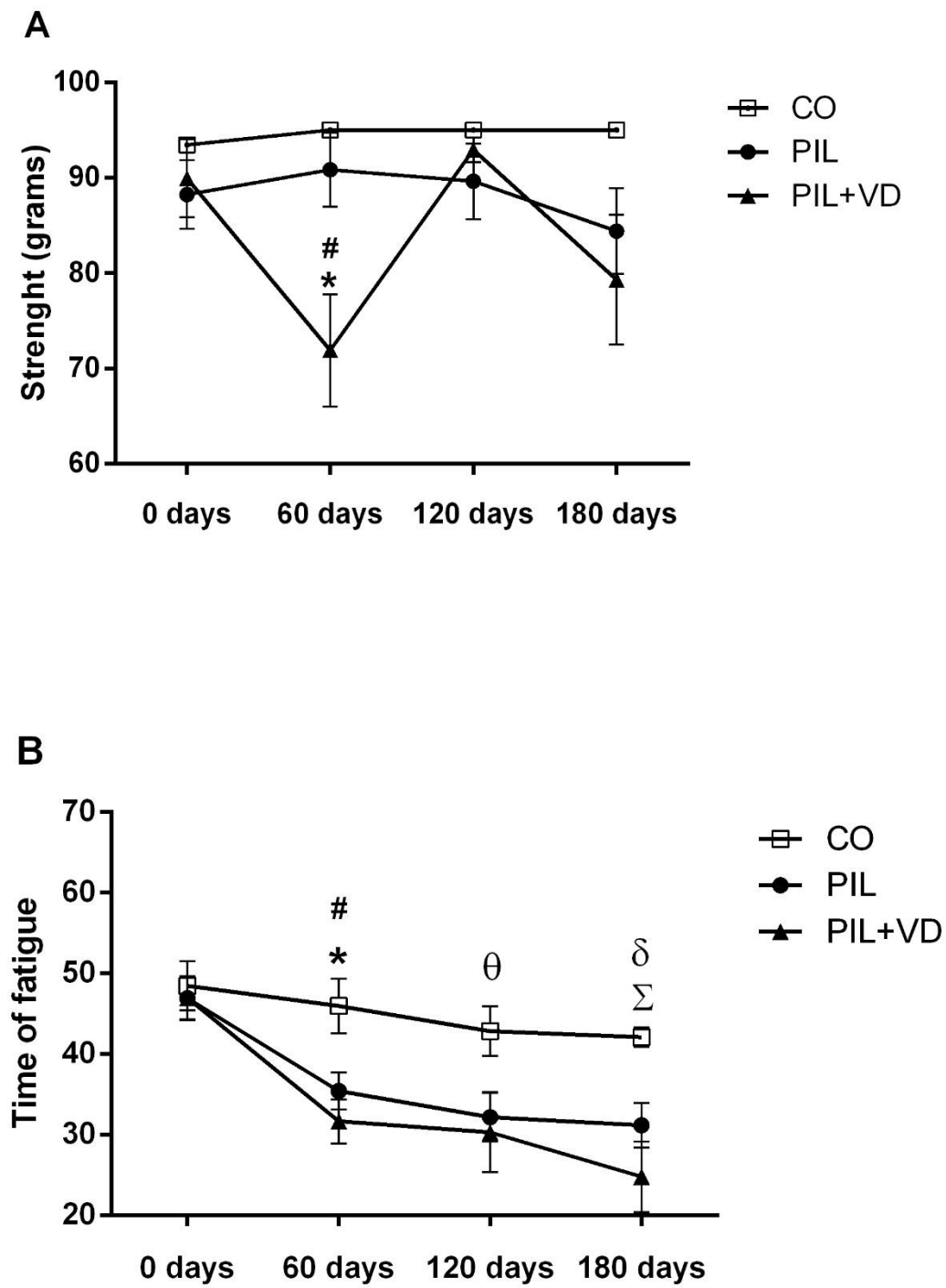


Figure 4



12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na presente dissertação foi investigado o efeito da vitamina D sobre a perda muscular de animais com lúpus induzido por pristane. Esse estudo demonstrou que o tratamento com vitamina D foi capaz de atenuar a atrofia muscular no modelo estudado.

Neste estudo, sugerimos que o lúpus induzido por pristane (PIL) promoveu o aumento da autofagia, que conseqüentemente levou à atrofia muscular. Por sua vez, a vitamina D impediu o aumento da autofagia, levando a expressão proteica de LC3 dos animais a níveis próximos aos controles saudáveis.

Além disso, verificou-se neste estudo que a expressão da miostatina estava diminuída no grupo PIL quando comparado ao grupo VD. Também foi observado que a expressão de MyoD foi maior no grupo PIL do que no grupo VD, no entanto, a expressão de miogenina não foi estatisticamente diferente entre os grupos avaliados. Esses resultados sugerem que tanto a miostatina quanto a MyoD realizavam sinalização compensatória contra atrofia muscular presente na PIL, no entanto, não houve sucesso devido à ausência de ativação da miogenina.

A vitamina D não foi capaz de modular de forma benéfica os parâmetros físicos no início do experimento, onde a doença estava se tornando mais aguda. Porém, do dia 60 para o dia 120, quando a doença já está estabelecida, a suplementação de vitamina D aumentou a força dos animais. No entanto, a suplementação de vitamina D não foi capaz de reduzir o impacto causado pelos desequilíbrios das vias anabólicas e catabólicas na função física dos animais quando a doença era crônica no final dos 180 dias de experimentação. A avaliação da mobilidade não se associou à doença ao longo do tempo.

O modelo de PIL causa atrofia muscular devido ao aumento da autofagia. A suplementação de vitamina D atenua a atrofia muscular, reduzindo a autofagia. A ausência de alterações na função física de animais doentes, no final do experimento, está possivelmente relacionada à atrofia leve (cerca de 10%) que os animais desenvolveram. Embora se saiba agora que a vitamina D é benéfica para os músculos

no modelo PIL, novos estudos podem ajudar a verificar outras vias envolvidas na perda muscular da doença e como a vitamina D interage com elas.

13 PERSPECTIVAS

Na continuidade desse trabalho, pretendemos investigar no nosso grupo de pesquisa:

- Avaliação da citocinas pró e anti-inflamatórias, no tecido muscular e no soro, após suplementação de vitamina D em modelo de lúpus induzido por pristane;
- Avaliação composição corporal (massa magra e massa gorda) por densitometria por dupla emissão de raios-X (DEXA) em indivíduos com lúpus eritematoso sistêmico (LES) após suplementação com vitamina D. Avaliação dos níveis séricos de miostatina desses pacientes, visto que a miostatina é um marcador secretado para a circulação e observamos na sua expressão tecidual nos animais doentes.
- No Laboratório de Doenças Autoimunes (LABDAI) do Centro de Pesquisa Experimental (CPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), existe um trabalho em andamento o qual realiza biópsia muscular de pacientes com artrite reumatoide no intuito de avaliar parâmetros funcionais, morfológicos e moleculares no músculo esquelético desses pacientes e compará-los com os de pacientes controles. Assim como na artrite reumatoide, o LES possui um comprometimento muscular significativo que pode levar à incapacidade funcional e à redução da qualidade de vida. Por esta razão é necessário maior conhecimento sobre o grau de atrofia, a morfologia das fibras musculares e as vias de sinalização de perda muscular em pacientes com LES. Portanto, uma avaliação mais acurada das alterações funcionais, morfológicas e moleculares do músculo esquelético desses pacientes, através de biópsia muscular, seria importante no intuito de buscar maior conhecimento sobre a fisiopatologia da doença, bem como um melhor manejo clínico.

14 ANEXO 1 – METODOLOGIA EXPANDIDA

Ética

Este estudo obedece à Legislação Brasileira de Proteção aos Animais nº 11.794/ 2008 e a resoluções normativas 30, de 02 de fevereiro de 2016 do Conselho Nacional no Controle de Experimentação Animal (CONCEA), a Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBAC), bem como as políticas locais no cuidado e uso de animais. Tendo em vista que os animais serão anestesiados para a indução do lúpus e na eutanásia, reduzindo estresse e dor desnecessários para os animais.

Animais

Foram utilizados camundongos Balb/c, 8-12 semanas de vida, fêmeas, com aproximadamente 20 gramas. Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA-HCPA) durante o experimento, em caixas plásticas transparentes 30x20x12cm forradas com maravalha e ficaram alojados em 5 animais/caixa, em ciclo de 12 horas claro/escuro, temperatura entre 22° +/- 2°C, umidade relativa do ar entre 40-60% e exaustão de ar. A água e a ração foram administradas *ad libitum*. Os animais passaram por um período de quarentena e aclimação de 14 dias antes da indução da doença.

Modelo experimental de lúpus induzido por pristane

O modelo experimental de lúpus foi induzido em 20 camundongos fêmeas Balb/C através de uma única injeção intraperitoneal (IP) de 500µl de pristane (2,6,10,14 tetramethylpentadecane; Sigma- Aldrich) previamente filtrado em membrana 0,22 µm. O procedimento foi realizada anestesia inalatória com isoflurano a 5% para indução e 2-3% para manutenção com 0,5 L/min de O₂. Os animais do grupo controle receberam 500µl de solução salina 0,9% pela mesma via [147]. Após a injeção intraperitoneal com pristane foi administrado Tramadol, de 12 em 12 horas, no período de até 48 horas, na concentração de 10mg/kg com o volume final de 200ul.

Os animais foram divididos em 3 grupos:

Grupos experimentais

Grupo 1: camundongos Balb/c controles saudáveis (n=8);

Grupo 2: camundongos Balb/c com lúpus induzido por pristane (PIL);

Grupo 3: camundongos Balb/c com lúpus induzido por pristane (PIL+VITD) + suplementação de 1,25-dihidroxitamina D.

Teste de força

O teste de força foi realizado no tempo 0, 60, 120 e 180. Foram utilizados pesos com 5, 20, 35, 50, 65, 80 e 95 g. O protocolo será adaptado como descrito previamente [148]. Brevemente, o camundongo será segurado pelo terço inicial da base da cauda e suspenso até que ele segure o primeiro peso que estará na bancada. O animal deve agarrar-se à malha de aço e ser suspenso junto com o peso total por 3 segundos. Se o animal é capaz de segurar o peso por este tempo, este permanece em repouso por pelo menos 30 segundos e é testado para o peso seguinte. Se o animal não é capaz de segurar o peso pelo tempo de 3 segundos, deve-se repetir o procedimento até 3 vezes, deixando um intervalo de 10 segundos entre os testes. Se o animal falhar em todas as 3 vezes, o tempo máximo que ele foi capaz de segurar o peso deve ser utilizado para o cálculo de força. Para o cálculo de força máxima do animal, segue-se a seguinte fórmula matemática:

$$F = P_{3\text{seg}} + (5 \cdot t_{<3\text{seg}})$$

Em que “F” representa a força máxima do animal, “P3seg” representa o maior peso que o animal foi capaz de erguer por 3 segundos e “t<3seg” representa o tempo inferior a 3 segundos, que é o tempo que o animal conseguiu suspender o último peso testado sem alcançar a marca de 3 segundos.

Figura 1. Ilustração do design experimental

