

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

Anselmo Alves de Oliveira

**ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS E RESPOSTAS MOLECULARES DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATÓIDE
SUBMETIDO AO EXERCÍCIO DE FORÇA**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Educação Física, área de concentração “Esporte e exercício” (linha de pesquisa: Exercício Físico, ajustes e adaptações neuromusculares, cardiorrespiratórias e endócrino-metabólicas), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Fábio Lera Orsatti

UBERABA

2014

ANSELMO ALVES DE OLIVEIRA

**ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS E RESPOSTAS MOLECULARES DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATÓIDE
SUBMETIDO AO EXERCÍCIO DE FORÇA**

UBERABA

2014

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

O45a Oliveira, Anselmo Alves de
Adaptações morfológicas e respostas moleculares do músculo esquelético em modelo experimental de artrite reumatóide submetido ao exercício de força / Anselmo Alves de Oliveira. -- 2014.
49 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2014
Orientador: Prof. Dr. Fábio Lera Orsatti

1. Artrite reumatóide. 2. Treinamento de resistência. 3. Hipertrofia. 4. Atrofia muscular. 5. Inflamação. I. Orsatti, Fábio Lera. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.72-002.77

Anselmo Alves de Oliveira

ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS E RESPOSTAS MOLECULARES DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATÓIDE
SUBMETIDO AO EXERCÍCIO DE FORÇA

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Educação Física, área de concentração “Esporte e exercício” (linha de pesquisa: Exercício Físico, ajustes e adaptações neuromusculares, cardiorrespiratórias e endócrino-metabólicas), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 11 de dezembro de 2014.

Banca Examinadora:

Dr. Fábio Lera Orsatti

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Márcia Antoniazi Michelin

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Renata Dellalibera-Joviliano

UNIFAFIBE- Centro Universitário

Dedico este trabalho aos meus amigos pelo apoio, a toda minha família em especial à minha mãe que nunca mediu esforços para me educar, à minha esposa Elaine companheira de todas as horas e à minha filha Maria Luisa, fonte de incentivo e inspiração.

AGRADECIMENTOS:

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho. Aos amigos do Laboratório de pesquisa em biologia do exercício (BioEx): Roberto, Fernanda, Paulo, Larissa, Cássio e Aletéia pelo companheirismo. Aos membros do Instituto de pesquisa em oncologia (IPON): Douglas, André, Letícia, Cláudio e principalmente à Prof. Dra. Márcia Michelin que nunca poupou esforços para nos amparar. Ao funcionário João Batista Pereira e ao aluno de doutorado César Augusto França Abrahão, que juntamente com o Prof. Dr. Javier Emilio Chica foram essenciais para parte significativa desta pesquisa. À Prof. Dra. Renata Dellalibera-Joviliano pelas contribuições e solicitude. E por último ao meu orientador Prof. Fábio Lera Orsatti, admirável mestre, exemplo de professor, incansável na tentativa de contribuir com o amadurecimento científico de seus alunos.

“Se um homem não descobriu nada pelo qual morreria,
não está pronto para viver”

Martin Luther King

RESUMO:

Introdução: durante a artrite reumatóide (AR) há perda significativa da massa muscular (caquexia reumatóide) resultante principalmente do processo inflamatório crônico e consequente aumento de proteínas catabólicas (MurF-1, atrogina e miostatina). O exercício de força (EF) é um conhecido promotor do crescimento muscular que ocorre em decorrência de sinalizações moleculares que estimulam a ativação das células satélites por meio de proteínas anabólicas (IGF-1, MyoD e miogenina). No entanto, as respostas moleculares do músculo esquelético induzidas pelo EF durante o processo inflamatório crônico não são totalmente conhecidas. **Objetivo:** avaliar as respostas moleculares envolvidas no anabolismo e catabolismo do músculo esquelético após estímulo agudo de EF em ratos induzidos à AR. **Metodologia:** participaram do estudo 32 ratos Wistar, fêmeas (8 semanas, 126 ± 24 g), divididas em quatro grupos: grupo controle (GCT, n=8); grupo exercício (GEx, n=8); grupo artrite (GAR, n=8) e grupo artrite + exercício (GAR+Ex, n=8). O protocolo de indução de AR foi realizado com duas injeções aplicadas subcutaneamente e uma nas articulações dos tornozelos das patas traseiras, separadas por intervalos de sete dias. Após 15 dias, os animais foram submetidos a uma sessão de EF (protocolo de escalada) e 6 horas após foram eutanasiados. As manifestações externas da doença (perimetria articular e escore de inflamação), assim como, o peso e a ingestão de ração foram avaliados continuamente nos grupos artrite (AR) e controle (CT). A área de secção transversa (AST) das fibras dos músculos gastrocnêmios foi analisada em 200 células pelo método hematoxilina e eosina. No músculo Gastrocnêmio foram analisadas as expressões de RNA mensageiro (RNAm) de IGF-1, MyoD, Miogenina, Miostatina, Murf-1, atrogina e GAPDH (controle endógeno) pelo método PCR quantitativo em tempo real e calculados pelo método de Livak ($\Delta\Delta C_T$). A comparação entre grupos foi feita por ANOVA *one-way* e test *t* independente. Os valores contínuos foram analisados por ANOVA de medidas repetidas (comparações intra grupos x momentos). Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (SEM). O nível de significância adotada foi $p \leq 0,05$. **Resultados:** o protocolo de indução gerou aumento nos indicadores externos da doença ($p < 0,001$) além de reduções na AST e peso úmido do músculo gastrocnêmio ($p \leq 0,05$). Foram observados aumentos nos níveis de RNAm de miostatina (4,5 vezes), atrogina (2,5 vezes), MyoD (3,7 vezes) e miogenina (5 vezes) no grupo GAR. O grupo GAR+Ex não apresentou alterações de miostatina e atrogina, e reduziu os níveis de Murf-1 (60%). A expressão de miogenina aumentou no grupo GEx (4 vezes). **Conclusão:** concluímos que a AR induziu atrofia muscular concomitantemente com aumentos nos níveis de RNAm de

Miogenina, MyoD, Miostatina e atrogina. Uma sessão de EF foi capaz de normalizar a expressão de RNAm de miostatina e atrogina e reduzir Murf-1 em ratas induzidas à AR.

PALAVRAS CHAVE: Exercício resistido. Hipertrofia muscular. Inflamação. Atrofia muscular.

ABSTRACT:

Introduction: During rheumatoid arthritis (RA) the loss of muscle mass (rheumatoid cachexia) occurs due to chronic inflammation and consequent increase in catabolic proteins (Murf-1, myostatin and atrogin). Resistance exercise (RE) is a well known intervention which promotes muscle mass gains that occurs as a result of molecular signal of satellite cells through proteins anabolic (IGF-1, MyoD and miogenin). However, skeletal muscle molecular response induced by RE in presence of RA are not well elucidated. **Objectives:** To analyze skeletal muscle anabolism and catabolism responses to an animal experimental model of RA submitted to an acute bout of RE. **Methods:** 32 females Wistar rats (8 weeks, 126 ± 24 g) were randomic allocated into four groups, control group (GCT, n=8), exercise group (GEx, n=8), control arthritis group (GAR, n=8) and arthritis plus exercise group (GAR+Ex, n=8). The RA induced protocols were conducted with two subcutaneous injections applications and one in the hind paws ankles, with intervals of seven days between applications. After 15 days the animals were submitted to an acute bout of RE (climb protocol) and six hours post protocol animals were euthanized. The external manifestations of RA (perimeter joint and inflammation score), as well as animal weight and feed intake were evaluated throughout the study in the arthritis (AR) and control (CT) groups. The cross-sectional area (CSA) fibers of the gastrocnêmio muscle were analyzed in 200 cells by hematoxylin and eosin method. The gastrocnemius muscle mRNA expression of IGF-1, MyoD, Myogenin, myostatin, Murf-1, atrogin and GAPDH (endogenous control) were analyzed by quantitative real time PCR followed by Livak method ($\Delta\Delta CT$). Data are present by mean and standard error mean (SEM), groups comparisons were performed by one-way ANOVA (Comparisons between groups), repeated measures ANOVA (Comparisons within groups x Moments) and test t independent. Alpha level was significant when $p \leq 0.05$. **Results:** The RA induction protocol increased external manifestations ($p < 0.001$) and reduced CSA and wet weight of gastrocnemiu muscle ($p \leq 0.05$). Increased mRNA levels of Myostatin (4.5 fold), atrogin (2.5 fold), MyoD (3.7-fold) and Myogenin (5 fold) were only observed in the GAR group. The GAR+Ex group reduced mRNA levels of Murf-1 (60%) and no changes were observed in myostatin and atrogin. The GEx group increased mRNA levels of myogenin (4 fold). **Conclusion:** We concluded that RA induced muscle atrophy and increased mRNA levels of Miogenin, MyoD, Miostatin and atrogin, although an acute bout of RE was efficient to normalize mRNA levels of Miostatin and atrogin and reduced Murf-1 in female rats RA induced.

Key words: Resistance exercise. Muscle hypertrophy. Inflammation. Muscle atrophy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura

1 - desenho experimental.....	25
2 - corte seriado do tecido muscular.....	29
3a - progressão da massa corporal.....	35
3b - ingestão de ração.....	35
3c - espessura da articulação.....	35
3d - escore de inflamação.....	35
4a - peso úmido do músculo gastrocnêmio.....	36
4b - AST do músculo gastrocnêmio.....	36
5a - expressão de RNAm de miostatina.....	37
5b - expressão de RNAm de atrogina.....	37
5c - expressão de RNAm de Murf.....	37
5d - expressão de RNAm de MyoD.....	38
5e - expressão de RNAm de miogenina.....	38
5f - expressão de RNAm de IGF.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela

1 -Desenho dos <i>primers</i>	32
-------------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS

$\Delta\Delta C_T$ - delta delta CT (*threshold cycle*)

Akt - proteína quinase B

AMPK - (*activated protein kinase*) proteína ativada quinase

AR - Artrite Reumatóide

AST - áreas de secção transversa

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CFA - Adjuvante Completo de Freud

CR - caquexia reumatóide

CT - (*threshold cycle*)

EDTA - Ácido diaminotetracético

EF - exercício de força

GAPDH - gliceraldeído3-fosfato-desidrogenase

GAR - Grupo Artrite Reumatóide

GAR+Ex - Grupo Artrite Reumatóide e Exercício

GCT - Grupo Controle

GEx - Grupo Exercício

IGF-1 - (*Insulin Like Growth Factor 1*) fator de crescimento semelhante à insulina

IL-1 β - interleucina-1beta

IL-6 - interleucina-6

IPON - Instituto de pesquisa em oncologia

MAF-bx - (*Muscle Atrophy F-box*)

MCC - massa celular corporal

Met-BSA - Albumina Bovina Metilada

MGF – (*mecano growth factor*)

MRF4 - (*MyogenicRegulatoryFactor4*) fator de regulação miogênica 4

MRFs - (*Muscle Regulatory Factors*) fatores de regulação miogênica

MuRF-1 - (*Muscle Ring Finger-1*)

Myf5 - (*myogenicfactor5*) fator miogênico 5

MyoD - (*Myogenic-Differentiation Factor*) fator de diferenciação miogênica

NF-κB - fator de transcrição nuclear kappa B

PC - peso corporal

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

SEM - erro padrão da média

Smad2 – (*small mothers against decapentalplegic2*)

Smad3 - (*small mothers against decapentalplegic3*)

SOCS3 – (*Supressor of Cytokine Signaling 3*) supressor da sinalização de citocina 3

STAT3 – (*Signal Transducer and activador of transcription 3*) tradutor de sinal e ativador de transcrição 3

TGF-β - (*Transforming growth factor-beta*) fator de transformação de crescimento Beta

TNF-α - fator de necrose tumoral alfa

UFTM - Universidade Federal do Triângulo Mineiro

UFU - Universidade Federal de Uberlândia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 CAQUEXIA REUMATÓIDE	16
1.1.1. Regulação do <i>Turnover</i> proteico muscular na AR	17
1.1.2. Mecanismos moleculares envolvidos na caquexia reumatóide	18
1.2. TERAPIAS DE INTERVENÇÃO SOBRE A CR	20
1.2.1. Exercício de Força	20
1.2.2. Regulações moleculares promovidas pelo EF	21
1.3. OBJETIVO GERAL	23
1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. MÉTODOS	23
2.1. ASPECTO ÉTICO.....	23
2.2. MATERIAIS	24
2.3. ANIMAIS	24
2.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
2.4.1. Modelo de Indução Experimental de Artrite Reumatóide em Ratos	26
2.4.2. Exercício de Força	26
2.4.2.1. Modelo de experimental de EF	26
2.4.2.2. Familiarização ao modelo de escalada	26
2.4.2.3. Sessão aguda de EF	27
2.5. PROTOCOLO DE EUTANÁSIA E COLETA SANGUÍNEA	27
2.6. COLETA MUSCULAR	27
2.7. ANÁLISES LABORATORIAIS.....	28
2.7.1. Análise Morfológica	28
2.7.2. Análise da Expressão Gênica	30
2.7.2.1. Extração de RNA com TRIzol	30
2.7.2.2. Tratamento do RNA com DNase.....	31
2.7.2.3. Reação em cadeia da polimerase em Tempo Real (qPCR)	31
2.7.2.4. Qubit	32
2.7.3. Perimetria articular	33
2.7.4. Escore de inflamação	33
2.7.5. Pesagem da ração	33

2.7.6. Pesagem dos animais	34
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
3. RESULTADOS	34
4. DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÃO.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
7. ANEXOS	50

1- INTRODUÇÃO

No conjunto das patologias reumáticas, a Artrite Reumatóide (AR) pode ser definida como uma doença inflamatória crônica, cujas alterações no tecido conjuntivo repercutem principalmente sobre o sistema articular, caracterizada por dores, inchaço e rigidez, que ocorrem em consequência de deformidades e destruição das articulações (SMITH; ARNETT, 1991; WALSMITH; ROUBENOFF, 2002). Embora a AR não tenha ainda sua origem conhecida, alguns parâmetros como idade, susceptibilidade genética, fatores hormonais, agentes infecciosos, dieta, tabagismo, fatores socioeconômicos e étnicos endossam os componentes etiológicos dessa patologia (ALAMANOS; DROSOS, 2005; BÉRTOLO et al., 2007).

A AR pode ser considerada uma síndrome clínica derivada de várias doenças que ativam uma cascata inflamatória tendo como agente central o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) produzido principalmente por macrófagos e monócitos além de outras células incluindo linfócitos T e B. Este processo aumenta a produção de outra citocina inflamatória, a interleucina-6 (IL-6), que implica em inflamação sistêmica crônica culminando com inflamação sinovial associada com danos da cartilagem articular e do osso subjacente como consequência da estimulação de fibroblastos sinoviais, condrócitos e osteoclastos (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010; WALSMITH; ROUBENOFF, 2002).

Vários estudos de prevalência populacional de AR foram realizados nas últimas décadas, demonstrando que a AR acomete principalmente mulheres (duas a três vezes mais) na faixa etária entre 30-60 anos (ALAMANOS, DROSOS, 2005) e sugerindo uma variação regional na ocorrência da doença. Por exemplo, na população geral dos Estados Unidos e países do norte europeu estima-se que a incidência de AR seja de 0,5-1,1%, enquanto que países em desenvolvimento, como o Brasil, possuem valores menores, entre 0,1-0,5% (ALAMANOS; DROSOS, 2005)(SENNA et al., 2004).

Outra constatação importante é que algumas etnias como a de nativos americanos apresentam alta prevalência (5,3-6%) da doença, enquanto moradores de algumas zonas rurais africanas apresentem taxas extremamente baixas (0-0,3%), o que pode ser explicado, pelo menos em parte (50%), pela importância dos fatores genéticos e ambientais sobre o aparecimento da doença (VAN DER WOUDE et al., 2009).

Uma recente meta-análise demonstrou que os níveis de mortalidade entre os pacientes com AR diminuíram nos últimos 50 anos. Entretanto, essa população ainda apresenta maus

prognósticos clínicos: índices de mortalidade maior do que a população geral (DADOUN et al., 2013); oitenta por cento dos pacientes apresentam alguma incapacidade após vinte anos da doença; expectativa de vida reduzida em 3-10 anos (ALAMANOS; DROSOS, 2005); maiores chances de apresentarem infarto fatal do miocárdio ou outras doenças cardiovasculares (HOLLAN et al., 2013; LEVY et al., 2008); vinte vezes mais chance de morte por infecção (WOLFE et al., 1994).

No que se refere à qualidade de vida dos indivíduos com AR, 54%-70% apresentam distúrbios de sono, o que se correlacionou com aumento na percepção de dor, fadiga e distúrbios de humor. Também tem sido demonstrado que maior depressão, fadiga e escore de dor estão associados à baixa capacidade funcional desses indivíduos (SARIYILDIZ et al., 2014). Além disso, pacientes com AR apresentam menores níveis de força absoluta, menor densidade e área de secção transversa muscular (AST) em comparação a indivíduos saudáveis (BAKER et al., 2014).

Tais achados são importantes preditores da saúde dos indivíduos, uma vez que os níveis de força estão correlacionados com o nível de atividade da doença, assim como, com incapacidade funcional na AR (OKEN et al., 2008). Consequentemente, a manutenção da quantidade e qualidade do músculo esquelético parece estar associada não somente aos níveis de aptidão física do indivíduo mais também à sua qualidade de vida.

No caso da AR, a manutenção de massa muscular é prejudicada tanto pelo perfil inflamatório quanto pelas limitações clínicas geradas pelos danos ósteo-articulares, o que contribui significativamente para desencadear um quadro conhecido como caquexia reumatóide (CR) que acomete dois em cada três pacientes com AR (WALSMITH; ROUBENOFF, 2002).

1.1. CAQUEXIA REUMATÓIDE

Frequentemente, pacientes com AR apresentam caquexia, termo derivado das palavras gregas *Kakòs* (ruim) e *Héxis* (condição). Embora a caquexia seja definida como uma síndrome multifatorial, caracterizada por perda de peso, gordura e massa celular corporal (MCC), na AR essa não está necessariamente relacionada ao emagrecimento. Em muitos pacientes a perda de MCC é acompanhada de aumento de massa gorda resultando em pequena

variação no peso, a chamada CR ou obesidade caquética (ROCHA, O.M. *et al.* 2009; MUSCARITOLI *et al.*, 2010)

O entendimento das alterações no conteúdo de MCC é importante pela razão que em todas as situações na qual tem sido estudada (privação de alimento, doença crônica e envelhecimento) a redução de 40% da MCC está associada à morte. Mesmo com redução de 5% há prejuízo na força muscular, no metabolismo energético e aumento na susceptibilidade para infecções. A perda de MCC entre pacientes com AR é de 15%, aproximadamente um terço da perda máxima para sobrevivência (40%). Assim, a AR deve ser vista como uma importante contribuidora para o aumento da morbidade e mortalidade precoce (RALL; ROUBENOFF, 2004).

MCC representa os componentes celulares do corpo que estão envolvidos nos processos metabólicos e bioquímicos. Portanto, a quantidade de MCC determina o gasto de energia, exigências proteicas e respostas metabólicas ao estresse. O músculo esquelético, o maior componente da MCC, é a parte mais instável, predizendo diretamente o estado de força e funcionalidade. Na AR o mecanismo fisiopatológico envolvido no processo de perda de massa muscular, conhecida como componente sarcopênico, é de etiologia multifatorial envolvendo: inatividade física, excessos de citocinas inflamatórias, alterações hormonais, reduzida ação periférica da insulina, perfil energético inadequado e disfunção do *turnover* proteico (ROCHA, O.M. *et al.* 2009; ROUBENOFF, 2004).

1.1.1. Regulação do *Turnover* proteico muscular na AR

Os mecanismos do metabolismo muscular dependem da homeostase entre a síntese (anabolismo) e a degradação (catabolismo) das suas proteínas (ROCHA *et al.*; 2009). No paciente com AR, o excesso de produção de algumas citocinas inflamatórias parece alterar o balanço entre a síntese e a degradação de proteínas levando a perda de massa muscular (MORLEY; THOMAS; WILSON, 2006; MUSCARITOLI *et al.*, 2010).

Desta forma, o *turnover* proteico muscular na AR, pode ser avaliado pela análise de proteínas envolvidas nas vias anabólicas e catabólicas. Os marcadores do anabolismo muscular envolvem a via de síntese proteica e/ou os fatores de regulação miogênica (*Muscle Regulatory Factors* (MRFs)), importantes marcadores do reparo celular e do aumento do conteúdo de mionúcleos. No caso das doenças inflamatórias crônicas como a AR, a via de

síntese proteica muscular parece não ser alterada, o que torna os MRFs críticos marcadores do anabolismo muscular (CASTILLERO et al., 2011).

Os MRFs são uma família de proteínas expressas pelas células satélites (CS) musculares em diferentes estágios de maturação. Dentre eles estão: *myogenic regulatory factor 4* (MRF4), miogenina, *myogenic-differentiation factor* (MyoD) e *myogenic factor 5* (Myf5). Neste cenário Myf5 está envolvido com a fase inicial de proliferação das CS, enquanto MyoD apresenta papel chave determinando a saída do ciclo celular (final da proliferação). A miogenina está relacionada com o início do estágio da diferenciação e posterior fusão das CS formando miotubos, que neste momento ainda apresenta núcleo central. A expressão de MRF4 permite a maturação do miotubo e a formação de novas miofibras com núcleos periféricos (característica da fibra muscular madura) (ZANOU; GAILLY, 2013)

Por outro lado, diferentes são as vias que atuam na degradação muscular. Entre elas podem ser citados o processo de autofagia, as proteases ativadas por cálcio, como a calpaína e as caspases e o sistema ubiquitina-proteossoma. Embora o nível de participação de cada uma das vias seja dependente da situação clínica envolvida, o sistema ubiquitina-proteossoma foi o principal responsável pela degradação muscular em estudos que avaliaram a participação destas vias sobre a proteólise em cultura de células (PURINTRAPIBAN; WANG; FORSBERG, 2003; TEIXEIRA; FILIPPIN; XAVIER, 2012).

Para que a via ubiquitina-proteossoma ocorra, a ubiquitina deve ser conjugada a substratos proteicos específicos em um processo que necessita de três componentes enzimáticos: E1, uma enzima ativadora de ubiquitina; E2, uma enzima conjugadora de ubiquitina; E3, uma enzima ligante de ubiquitina, responsável pela marcação específica da proteína a ser degradada pelo complexo proteossoma (20S ou 26S). No músculo esquelético foram identificadas duas E3 específicas relacionadas ao processo de atrofia: a atrogina-1 ou *Muscle Atrophy F-box* (MAF-bx) e *Muscle Ring Finger-1* (MuRF-1) (TEIXEIRA et al., 2012).

1.1.2. Mecanismos moleculares envolvidos na CR

Embora os mecanismos que explicam a CR ainda não estejam completamente elucidados, os aspectos nutricionais, a deficiência na absorção de alimentos, disfunções renais e hepáticas, somadas ao excesso de produção de citocinas pró inflamatórias e a inatividade

física são as principais causas apontadas. Nesse sentido, o excesso de produção de TNF- α é tido como o mediador central da degradação muscular. Sua ação, em conjunto com interleucina-1 beta (IL-1 β), exerce potentes alterações no *turnover* proteico muscular (WALSMITH; ROUBENOFF, 2002).

Estudos da década de 80 foram precursores em demonstrar que as altas taxas circulantes de citocinas (TNF- α) liberadas no plasma por leucócitos poderiam estimular a degradação muscular (CLOWES et al., 1983). Roubenoff et al. (1992) foram os primeiros a relatar associação entre a perda de MCC, além de aumento do gasto energético, com taxas elevadas de TNF- α e IL-1 β em indivíduos com AR (ROUBENOFF et al., 1994; ROUBENOFF et al., 1992).

Nos últimos anos, estudos moleculares contribuíram expressivamente com a evolução do entendimento acerca da perda de massa muscular e sua associação com algumas citocinas. Nesse sentido, Adams et al. (2008) utilizaram aplicações de TNF- α para demonstrar seus efeitos sobre a degradação muscular. Tanto *in vitro*, quanto *in vivo* o aumento de TNF- α induziu redução da força muscular e aumento na expressão muscular de RNAm (RNA mensageiro) de MuRF-1 e atrogina (ADAMS et al., 2008).

O TNF- α parece exercer papel central em uma extensa rede de sinalizações que elevam a expressão do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), que por sua vez pode ativar atrogina e MuRF-1, seja pelo sistema Ubiquitina-Proteossoma ou por via caspase 3, fato que gera a apoptose e/ou proteólise muscular, além de inibir a expressão de MyoD (RALL; ROUBENOFF, 2004).

Outra importante citocina envolvida no processo de degradação muscular, a IL-6 eleva-se durante o processo inflamatório crônico (RALL; ROUBENOFF, 2004). Em estudo que avaliou a ação da IL-6 sobre o *turnover* proteico muscular, o aumento nos níveis intramusculares de IL-6 em ratos normais ou transgênicos induzidos por eletroporação, reduziram o conteúdo de massa muscular e induziram aumentos na expressão de *Suppressor of Cytokine Signaling 3* (SOCS3), sugerindo uma cascata de sinalizações que culminaram com a atrofia muscular (LIESKOVSKA; GUO; DERMAN, 2003). Paradoxalmente, a elevação de IL-6 induzida pelo exercício de força relacionou-se com a ativação de CS musculares por meio da fosforilação de *Signal Transducer and activator of transcription 3* (STAT3). As CS são um grupo de células quiescentes, localizadas entre a lâmina basal e a membrana plasmática nas fibras musculares adultas. Elas são uma das principais responsáveis pelo

crescimento muscular (hipertrofia muscular), bem como pela regeneração dos micro traumas provocados pelo exercício e pelo reparo de lesão muscular (BEGUE et al., 2013; MUNOZ-CANOVES et al., 2013).

A miostatina é um membro na superfamília do fator de transformação de crescimento Beta (*Transformem growth factor-beta* (TGF- β)) e outro potente regulador negativo do crescimento muscular envolvido na degradação muscular induzido pelo processo inflamatório (RAMIREZ et al., 2011). A inativação de miostatina induz hipertrofia do músculo esquelético, enquanto superdosagens administradas sistemicamente causam pronunciada atrofia muscular. Tal ação ocorre porque a miostatina promove fosforilação de *small mothers against decapentalplegic2* e *3* (Smad2 e Smad3) que regula negativamente a atividade da proteína quinase B (PKB ou Akt), além de aumentar a atividade do sistema proteolítico Ubiquitina-proteassoma (RODRIGUEZ et al., 2014).

Adicionalmente, citocinas inflamatórias como IL-6, TNF- α e IL-1 afetam a sinalização de hormônios anabólicos no músculo esquelético, como o *Insulin Like Grown Factor 1* (IGF-1) e insulina, contribuindo para caquexia e afetando o desenvolvimento das capacidades físicas dos indivíduos (PAJAK et al., 2008).

1.2. TERAPIAS DE INTERVENÇÃO SOBRE A CR

As principais consequências funcionais envolvidas na CR são o aumento da morbidade e mortalidade. Desta forma, torna-se importante investigar terapias capazes de atenuar e/ou reverter a redução de MCC e que consigam aumentar a capacidade funcional dos indivíduos com AR. Três métodos são tidos como essenciais neste processo: intervenção dietética; intervenção medicamentosa; intervenção com exercícios. Neste contexto, o exercício de força (EF) (também conhecido como exercício contrarresistência, exercícios com pesos ou musculação) surge como uma terapia não medicamentosa que vem se mostrando segura, sem efeitos adversos sobre o sistema imune, que possibilita aumento significativo nos níveis de força, reduções na dor e fadiga e aumento na massa muscular (RALL; ROUBENOFF, 2004; ROCHA et al., 2009; WALSMITH; ROUBENOFF, 2002).

1.2.1. Exercício de Força

O músculo esquelético caracteriza-se por sua alta capacidade de adaptação cuja heterogeneidade mecânica e metabólica dos tipos de fibras permite uma variedade de demandas funcionais (CAMPOS et al., 2002). Essa plasticidade o permite alterar suas características estruturais, metabólicas e funcionais em consequência de estímulos metabólicos (hipóxia, Ca^{++} , AMP e estresse térmico), hormonais, nutricionais (fornecimento de substrato) e/ou mecânicos (tensão)(FLUCK; HOPPELER, 2003; PETTE; STARON, 2001). Nesta linha de investigação, o EF tem sido amplamente divulgado como um potente estímulo, capaz de promover a hipertrofia, mediante processos mecânicos, metabólicos e hormonais. Estes processos geram dois fenômenos primários envolvidos com a hipertrofia compensatória do músculo esquelético: o primeiro está relacionado a maior taxa de síntese protéica muscular, que promove um acréscimo de novos miofilamentos contráteis às fibras já existentes (BICKEL et al., 2005); o segundo envolve o processo de ativação, proliferação e diferenciação das células precursoras miogênicas, as CS, que fornecem mionúcleos para a regeneração da microlesão muscular, contribuindo para a hipertrofia da miofibra (CHARGE; RUDNICKI, 2004; CHARGÉ; RUDNICK, 2004; HAWKE; GARRY, 2001a;2001b)).

São encontrados poucos estudos que verificaram o efeito do EF no músculo esquelético de indivíduos com AR. Recentemente, estudos mostraram que o EF em pacientes com AR melhora a força e a resistência muscular, a composição corporal, promove redução na atividade da doença e, conseqüentemente, aumenta a capacidade funcional dessas pessoas. Especificamente, são observados bons índices de hipertrofia muscular coincidindo com uma elevação significativa dos níveis de IGF-1 muscular (LEMMEY et al., 2009; STRASSER et al., 2011).

Ainda que não exista consenso quanto às variáveis do treinamento, tais como intensidade, volume, carga e duração, bem como protocolos pré-definidos, os dados apontam para a aplicabilidade de programas com EF como atenuadores da CR, agindo nas vias de sinalização miogênica e proteolítica. Todavia, este processo depende de inúmeras vias de regulação e expressão que são responsáveis por manifestações metabólicas locais e sistêmicas.

1.2.2. Regulações moleculares promovidas pelo EF

Embora diferentes fatores exerçam influência sobre a capacidade adaptativa do músculo esquelético frente aos estímulos promovidos pelo EF ou à lesão tecidual induzida por um

trauma direto, os MRFs e o IGF-1 exercem um papel fundamental sobre o reparo e crescimento muscular (ZANOÛ; GAILLY, 2013). Desta forma, avaliar o comportamento destes marcadores após estímulos de EF denota a efetividade deste tipo de exercício em modular o tecido muscular esquelético.

Em relação às alterações promovidas pelo EF sobre os MRFs, vários estudos reportaram o aumento da atividade miogênica após estímulos agudos ou crônicos de EF realizados em diferentes intensidades tanto em humanos quanto em modelos experimentais (AGUIAR et al., 2013; BEGUE et al., 2013; HANSSSEN et al., 2013; KOSEK et al., 2006; PSILANDER; DAMSGAARD; PILEGAARD, 2003; WERNBOM et al., 2013).

A variação temporal dos MRFs após estímulo agudo, também tem sido objeto de investigação. Contudo, os diferentes métodos de estímulos e/ou avaliação acabaram gerando resultados conflitantes. Neste sentido, o estudo de Psilander, Damsgaard e Pilegaard (2003) apresentou picos de expressão de RNAm de MyoD, MRF4 e miogenina em 0Hr, 2Hrs e 6Hrs respectivamente. Após protocolo agudo de EF, Bickel et al. (2005) observaram picos de aumento de RNAm de MyoD e miogenina próximo a 12Hrs, muito embora não foram feitas avaliações precoces das alterações dos MRFs. Já Wernbom et al. (2013) observaram aumento dos MRFs uma e 24Hrs após protocolo de EF de baixa intensidade, sem avaliar especificamente cada um dos MRFs. Um trabalho com modelo animal utilizando-se de um simulador de agachamento verificou picos de elevação de RNAm de MyoD e miogenina entre 6 e 12Hrs após protocolos de baixa e alta intensidade de EF (DRUMMOND et al., 2010).

No que se refere à capacidade do EF em atenuar a expressão de marcadores da proteólise, um recente trabalho demonstrou que o EF de baixa intensidade, simulado por um modelo experimental de escalada com ratos machos, foi capaz de atenuar a expressão proteica de MuRF-1 e atrogina-1, em um modelo de atrofia induzido por dexametasona (MACEDO et al., 2014).

Outra importante resposta molecular ao EF é o aumento da expressão do hormônio IGF-1. Estas elevações tornam-se importantes na medida em que as duas isoformas estimuladas pelo EF de IGF-1 (IGF-1Ea e IGF-1Ec ou MGF) estão envolvidas na proliferação e diferenciação dos mioblastos (ZANOÛ; GAILLY, 2013). O IGF-1 também é um importante estimulador de Akt, proteína chave da síntese proteica muscular, além de um inibidor da estimulação de atrogina promovida por TNF- α e INF- γ (DEHOÛX et al., 2007). Embora a

ação autócrina e parácrina do IGF-1 sobre o músculo esteja bem evidente, as contribuições endócrinas sobre o anabolismo muscular são duvidosas (MATHENY et al., 2009).

Embora o EF reconhecidamente seja um promotor da atividade miogênica e um atenuador da atrofia, além de já ter sido relacionado ao aumento das capacidades funcionais e à melhora da condição de vida dos pacientes com AR, nenhum estudo avaliou a modulação exercida pelo EF sobre os reguladores moleculares do músculo na AR. Por conseguinte, existe a necessidade de melhor compreender as respostas moleculares do músculo esquelético em um ambiente de estado inflamatório elevado, assim como avaliar as repercussões advindas do EF sobre a AR.

Mediante ao acima exposto, a hipótese do estudo é que o protocolo experimental de EF, conseguirá estimular a expressão de RNAm dos marcadores envolvidos nos processos anabólicos, além de atenuar os marcadores envolvidos na degradação muscular, demonstrando assim, a importância do EF na alteração do *turnover* proteico promovido pela AR e seu potencial efeito terapêutico na CR.

1.3. OBJETIVO GERAL

Avaliar as respostas moleculares envolvidas no anabolismo e catabolismo do músculo esquelético após estímulo agudo de EF em ratos induzidos à AR.

1.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de expressão de RNAm dos marcadores anabólicos (IGF-1, MyoD e miogenina) no músculo gastrocnêmio;
- avaliar os níveis de expressão de RNAm dos marcadores catabólicos (MuRF-1, atrogina-1 e miostatina) no músculo gastrocnêmio;
- avaliar a área de secção transversa do músculo gastrocnêmio;
- avaliar o peso úmido do músculo gastrocnêmio;
- avaliar os níveis de ingestão de ração ao longo do estudo;
- avaliar a perimetria da articulação do tornozelo dos animais envolvidos no estudo;
- avaliar o escore de inflamação da articulação do tornozelo dos animais envolvidos no estudo.

2- MÉTODOS

2.1. ASPECTO ÉTICO

O presente estudo foi enviado à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e aprovado em reunião de 05 de julho de 2013 com protocolo número 275/2013 (Anexo 1).

2.2. MATERIAIS

- Ácido acético glacial (Neon Comercial, São Paulo, SP, Brasil)
- Ácido clorídrico (Proquímios, Bangu, RJ, Brasil)
- Adjuvante completo de Freud (CFA) (Sigma-Aldrich, Sto Louis, MO, USA)
- Albumina bovina metilada (Met-BSA) (Sigma-Aldrich, Sto Louis, MO, USA)
- Álcool 70% (Ciclo Farma, Serrana, SP, Brasil)
- Álcool 80% (diluição de álcool absoluto em água destilada)
- Álcool 95% (diluição de álcool absoluto em água destilada)
- Álcool absoluto (Itajá, Goianésia, GO, Brasil)
- Álcool metílico (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- Clorofórmio (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- Eosina (Inlab, Pinhais, PR, Brasil)
- Glicose 5% (FreseniusKabi, Aquiraz, CE, Brasil)
- Hematoxilina de Harris (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil)
- Isopropanol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- Quetamina (Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil)
- TRIzol (Sigma-Aldrich, Sto Louis, MO, USA)
- Xilasina (Vallée, São Paulo, SP, Brasil)
- Xilol (Vetec, Duque de Caxias, RJ)

2.3. ANIMAIS

Foram utilizados 32 ratos da linhagem Wistar, fêmeas, adultas, com peso de 126 ± 24 gramas, média de idade de oito semanas, provenientes do biotério da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Os animais foram acomodados no Biotério do Instituto de pesquisa em oncologia (IPON) e mantidos em gaiolas plásticas de poliuretano de 414mm x 344mm x

168mm (4 animais por caixa) a uma temperatura média de 22° C. A dieta ofertada foi previamente estipulada, e consistia em ração comercial de composição conhecida (Nuvilab-CR1, Curitiba, PR, Brasil), além de água esterilizada oferecidas *ad libitum*. A ração foi constantemente pesada para análise da quantidade ingerida. Além disso, os animais foram expostos a ciclos de claro/escuro de doze horas.

2.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais chegaram ao biotério do IPON com aproximadamente cinco semanas de idade e passaram por duas semanas de aclimação. Em seguida, foram aleatoriamente divididos em grupos controle e experimentais, conforme descrito a seguir:

- Grupo Controle (GCT) – composto por oito animais, sem indução de AR e sem EF;
- Grupo Exercício (GEx) - composto por oito animais, sem indução de AR submetidos a uma sessão de EF;
- Grupo Artrite Reumatóide (GAR) - composto por oito animais, com indução de AR e sem EF;
- Grupo Artrite Reumatóide e Exercício (GAR+Ex) - composto por oito animais, com indução de AR submetidos a uma sessão de EF;

Em seguida, todas as ratas passaram por uma semana de adaptação ao EF. Tal adaptação consistiu em 3 sessões, separadas por 1 dia, com 5 subidas consecutivas por sessão. Nas semanas seguintes, os grupos experimentais (GAR e GAR+Ex) receberam duas injeções sistêmicas (subcutâneas) e uma injeção nas articulações dos tornozelos, separadas por sete dias. Quinze dias após à última aplicação, os animais dos grupos GEx e GAR+Ex realizaram uma sessão de EF. Os animais foram eutanasiados 6 horas após à aplicação do EF (conforme figura 1).



Figura 1- Desenho experimental

2.4.1. Modelo de Indução Experimental de AR em Ratos

Para a indução da AR, os animais foram submetidos à anestesia intraperitoneal transitória por meio da solução de Xilasina (10mg/kg) e Quetamina (70mg/kg). Inicialmente, sob ação anestésica, os animais foram imunizados com duas injeções subcutâneas na base da cauda com volume de 50µL de Albumina Bovina Metilada (Met-BSA) (40 mg/mL), diluída em 1mL de solução contendo glicose 5% emulsificada com Adjuvante Completo de Freud (CFA) (contendo 1mg/ml de bactéria *Tuberculosis* inativada). Após sete dias, o mesmo procedimento foi repetido; no 14º dia a indução da AR foi realizada por injeção intra-articular de 25µL da solução formada por Met-BSA, CFA e glicose 5% aplicada bilateralmente nas articulações dos tornozelos (BAR et al., 2004). Este modelo tem sido amplamente utilizado como modelo experimental de AR.

2.4.2. Exercício de Força

2.4.2.1. Modelo experimental de EF (escalada)

O EF foi reproduzido por um protocolo de escalada previamente referenciado na literatura (MATHENY et al, 2009). Tal modelo consistiu em escalar (subir) uma escada (1,1 x 0,18m, com 2 cm de espaçamento entre os degraus da grade, 80º de inclinação) com uma carga fixada na cauda. O tamanho da escada obrigava os animais a realizarem de 8 a 12 movimentos (em cada pata) por escalada. O aparato que foi fixado na parte proximal da cauda dos animais por uma fita auto-adesiva (1,5cm, 3M Tartan), era constituído de tubos cilíndricos contendo pesos esféricos de chumbo em seu interior.

2.4.2.2. Familiarização ao modelo de escalada

Durante 3 sessões de EF as ratas foram adaptadas com o ato de escalar. Para tanto, os animais foram colocados na parte inferior da escada e motivados a escalar aplicando-se em sua cauda um estímulo manual para iniciar ou a cada vez que interrompiam o movimento. Tão logo completassem a subida, as ratas eram estimuladas a entrar em uma gaiola (20 x 20 x 20 cm) que se localizava na parte superior da escada. Foram realizadas cinco escaladas consecutivas por sessão de EF, durante uma semana.

2.4.2.3. Sessão aguda de EF

O protocolo progressivo de cargas proposto por Matheny et al. (2009) foi adaptado às necessidades e condições da pesquisa. Desta forma, os animais iniciaram a sessão de EF executando as subidas sem nenhuma carga adicional fixada em sua cauda com ajustes progressivos a cada três subidas, da seguinte maneira: três séries sem carga adicional; três séries com 25% do peso corporal (PC) adicionado ao aparato; três séries com 50% do PC; três séries com 75% do PC; três séries com 100% do PC; totalizando quinze subidas com intervalo de noventa a cento e vinte segundos entre elas. Quando o animal não conseguiu completar uma subida com a carga estipulada a carga foi reajustada até completar o total de quinze séries (MATHENY et al., 2009). Para a reprodução do estresse causado pelos estímulos manuais às ratas que fizeram exercício (grupos GEx e GAR+Ex), a média aritmética de estímulos manuais foi calculada e reproduzida de forma pareada nos animais que não fizeram exercício (grupos GCT e GAR). Tanto o EF quanto os estímulos manuais foram realizados no período da manhã.

2.5. PROTOCOLO DE EUTANÁSIA E COLETA SANGUÍNEA

Seis horas após à sessão de EF (GEx e GAR+Ex) ou à aplicação dos estímulos manuais (GAR e GCT), os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Xilasina (10mg/kg) e Quetamina (70mg/kg). A eutanásia foi feita por punção cardíaca e choque hipovolêmico. O sangue foi coletado das câmaras cardíacas em sistema fechado a vácuo (Vacutainer®, Inglaterra) por meio de tubos de 4ml (Labor Import, São Paulo, Brasil) contendo Ácido diaminotetracético (EDTA). Ao final de cada coleta, as amostras permaneceram em temperatura ambiente por 30 minutos (min) para retração do coágulo e logo após foram centrifugadas por 15 min à 3.000 rpm (Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O plasma foi separado em alíquotas de 500µL e armazenado à -80°C até as análises.

2.6. COLETA MUSCULAR

Os músculos gastrocnêmios foram removidos em suas respectivas origens e inserções. Os músculos da perna direita foram pesados e embebidos em líquido fixador para análises morfológicas, enquanto que dos músculos da perna esquerda foram retiradas as fáscias e os

tendões, assim, os músculos “limpos” foram armazenados em tubos contendo 1ml de TRIzol a -80° para análises da expressão muscular de RNAm dos genes de interesse.

2.7. ANÁLISES LABORATORIAIS

2.7.1. Análise Morfológica

Todos os procedimentos envolvidos no processamento, inclusão, cortes, coloração e análise do tecido muscular aqui informados, foram previamente testados em estudo piloto. Assim, os músculos gastrocnêmios logo que removidos foram armazenados em cassetes identificados e embebidos por 24 horas em potes de 80ml contendo substância fixadora (Methacarn: 60% de álcool metílico, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético). Após 24 horas, os cassetes foram transferidos para potes de 80ml contendo álcool 70% até o dia do processamento do tecido. Segue abaixo o protocolo de processamento dos músculos:

- 15 min em álcool 80%;
- 15 min em álcool 95% (I);
- 15 min em álcool 95% (II);
- 15 min em álcool 95% (III);
- 15 min em álcool Absoluto (I);
- 15 min em álcool Absoluto (II);
- 25 min em álcool Absoluto (III);
- 50 min e 15 min em Xilol (I) para o gastrocnêmio e sóleo, respectivamente;
- 50 min e 15 min em Xilol (II) para o gastrocnêmio e sóleo, respectivamente;
- 15 min em parafina I;
- 15 min em parafina II;

Após processamento o tecido foi incluído em parafina utilizando-se o equipamento Leica EG1150H (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha). Para tanto, os músculos gastrocnêmios foram previamente cortados na maior AST e inseridos verticalmente no centro de um bloco de alumínio (2cm x 2cm de largura e 3cm de altura) preenchido com parafina. O tecido embocado foi primeiramente desgastado até que os cortes apresentassem formato regular e então seccionado em cortes de 6µm de espessura em micrótomo Leica RM2245

(Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha), levados por aproximadamente 10 segundos em água morna a 30°C. Após, cada corte foi removido da água e aderido à lâmina (método de “pesca de cortes”). Um total de 16 cortes foram utilizados para as análises morfométricas, seguindo o método de corte seriado representado pelo esquema abaixo (figura 2).

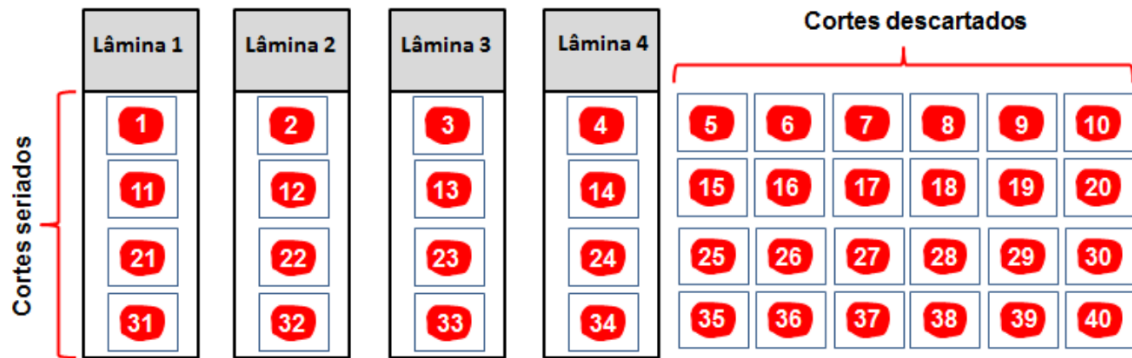


Figura 2- Corte seriado do tecido muscular

O método de corte seriado do tecido garantiu que cada lâmina representasse porções diferentes do músculo analisado. As lâminas permaneceram por 12 horas em estufa (FANEM 002 CB, FANEM Ltda, SP, Brasil) a 60° e logo após foram coradas usando-se o método Hematoxilina e Eosina (HE) de acordo com os seguintes procedimentos:

- 3 min em xilol (I)
- 2 min em xilol (II)
- 2 min em xilol (III)
- Álcool absoluto (I): 6 mergulhos
- Álcool absoluto (II): 6 mergulhos
- Álcool 70%: 6 mergulhos
- Água de torneira: 6 mergulhos
- 5 min em Hematoxilina de Harris
- Água de torneira: 6 mergulhos
- Álcool ácido (99% de álcool absoluto e 1% de ácido clorídrico): 1 mergulho rápido
- Álcool 70%: 6 mergulhos
- 2 min em Eosina
- Álcool 70%: 6 mergulhos
- Álcool absoluto I: 6 mergulhos

- Álcool absoluto II: 6 mergulhos
- Álcool absoluto III: 6 mergulhos
- Álcool absoluto IV: 6 mergulhos
- Xilol I: 6 mergulhos
- Xilol II: 6 mergulhos
- Xilol III: 6 mergulhos

Depois de coradas as lâminas foram protegidas com lamínulas e levadas ao microscópio (Nikon Evolucion MP 5.0). A captura de imagens foi realizada na objetiva de 20X usando-se o programa Image-Pro 3DS versão 5.1. A partir das imagens, 200 fibras por músculo tiveram mensuradas suas AST (Imagem J 1.46r). As análises das imagens foram feitas por um mesmo avaliador que possuía experiência prévia adquirida no estudo piloto.

2.7.2. Análise da Expressão Gênica

2.7.2.1. Extração de RNA com TRIzol

As amostras do músculo gastrocnêmio foram descongeladas e alíquotas de 50-70mg foram cortadas exclusivamente sobre a porção branca deste músculo. Cada alíquota foi então homogeneizada em 1ml de TRIzol. Conforme orientações do fabricante de TRIzol (SIGMA-ALDRICH, Sto Louis MO, USA), o material insolúvel resultante da homogeneização foi retirado por centrifugação (Microcentrífuga Eppendorf 5415R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a 12.000g por 10 min a 4°C. Essa solução foi coletada e transferida para um tubo de 1,5mL e incubada durante 5 min à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos núcleo-proteicos. Após esse período, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio, por mL de TRIzol utilizado, homogeneizando vigorosamente e incubando novamente, desta vez, por 3 min a temperatura ambiente. Após essa segunda incubação o material foi centrifugado a 12.000g por 15 min a 4°C.

Para a precipitação do RNA, a fase aquosa formada, após a centrifugação do material, foi separada e precipitada por intermédio da incubação com 0,5 mL de isopropanol (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) por 10 min à temperatura ambiente. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 12.000g por 10 min a 4°C. O sedimento formado foi lavado com 1mL de etanol 75% (por mL de TRIzol utilizado inicialmente) e centrifugado a

7.500g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e após a retirada do excesso de líquido do fundo do tubo o *pellet* foi seco à temperatura ambiente.

2.7.2.2. Tratamento do RNA com DNase

O pellet seco aderido ao fundo do tubo foi dissolvido em 40µl de água destilada e autoclavada (tratada com Dietilpirocarbonato-Sigma- DEPC, a 0,01%). Conforme as instruções do protocolo DNase I - *Amplification Grade* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), 8 µl do RNA total foi transferido para microtubo estéril, acrescido de 1µL de RQI RNase Free DNase 10x *reaction buffer* e 1µl de RQI RNase Free DNase. No termociclador (Veriti, Carlsbad, CA, EUA) essa solução foi incubada a 37°C por 30 min, adicionada de 1 µl de *Stop Solution* e devolvida ao termociclador para mais um ciclo de 65°C por 10 minutos com estágio final de redução de temperatura até 4°C.

2.7.2.3. Reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR)

qPCR foi realizada usando-se o kit *Quantifast SYBR Green RT-PCR one-step* (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Assim, alíquotas de 1µl de RNA tratado com DNase foram adicionadas a uma mistura contendo, 10µl de 2 x *Quantifast SYBR GREEN RT-PCR Master Mix*, 0,2 µl de *Quant Fast*, 0,6 µl de primers “sense” e “anti-sense” e o volume completado para 20µl com água DNase FREE, em cada amostra. O desenho da sequência dos *primers* (tabela 1) para os genes analisados foram previamente referenciados na literatura (AGUIAR et al., 2013; CASTILLERO et al., 2009) e construídos a partir de seqüências publicadas no GenBank (www.pubmed.com) para garantir a especificidade das seqüências-alvo, evitar a formação de estruturas secundárias dos *primers* e a dimerização dentro de cada *primer* e entre os *primers* sense e anti-sense. A temperatura e curva de anelamento foram usadas como aferidoras da qualidade do material usado nas reações. As condições e ciclos de reação do qPCR realizadas no aparelho 7900HT *Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram as seguintes: 50°C por 10', 95°C por 5 min para desnaturação inicial e amplificação de 40 ciclos (95°C por 10segundos para desnaturação, 60°C por 30segundos para anelamento e extensão). Os dados de fluorescência foram coletados durante os passos de anelamento/extensão e o número de *thresholdcycle* (CT) foi determinado usando ABI PRISM® 7900 *Sequence Detector* (Applied Biosystems, USA) e *Software SDS version 1.2.3* (“*Sequence Detection Systems*” 1.2.3- 7900 *Real Time PCR System* – Applied

Biosystems, USA). Os valores de expressão de RNAm dos genes MyoD, IGF-1, miogenina, Murf-1, atrogina e miostatina foram normalizados para os valores de GAPDH (controle endógeno) e calculados pelo método de Livak ($\Delta\Delta C_T$).

Tabela 1- Desenho dos *primers*

Genes	Número (<i>GenBank</i>)	Sequência (5'-3')
IGF-1	NM_178866	S: GCTATGGCTCCAGCATDCG
		A: TCCGGAAGCAACACTCATCC
MyoD	NM_176079	S: CCTACTACAGTGAGGCGTCCA
		A: GTGGAGATGCGCTCCACTAT
Miogenina	NM_017115	S: AGTGAATGCAACTCCCACA
		A: CGTAAGGGAGTGCAGGTTGT
MuRF-1	NM_080903.1	S: TGACCAAGGAAAACAGCCAC CAG
		A: TCACT CCTTCTTCTCGTCCAGGATGG
Atrogina-1	NM_133521.1	S: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT
		A: GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT
Miostatina	NM_019151.1	S: CTACCACGGAAACAATCATTACCA
		A: AGCAAC ATTTGGGCTTTCCAT
GAPDH	NM_001034034	S: AGATGGTGAAGGTCGGAGTG
		A: GAAGGTCAATGAAGGGGTCA

Fonte: Aguiar et al. (2013); Castillero et al. (2009)

2.7.2.4. Qubit

Para quantificar a concentração de RNA das amostras utilizou-se o fluorímetro de alta precisão QUBIT 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e o kit RNA BR Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) com todas as instruções contidas no manual do fabricante respeitadas. Para a montagem da solução de trabalho adicionou-se 199µl de *buffer* mais 1µl do reagente RNA para cada padrão. Após, adicionou-se 190µl da solução de trabalho a 10µl de padrão 1 e 2 (10µl para cada, montados separadamente) e encubou-se no escuro por 2 min. Após a determinação da curva, 1µl de amostra foi misturado a 199 µl da solução de trabalho para determinar a concentração de RNAm. Todas as amostras testadas apresentaram concentrações entre 20-100 ng/µl.

2.7.3. Perimetria articular

Para se avaliar as manifestações externas da AR a perimetria articular foi medida em diferentes momentos da pesquisa. Para tanto, um paquímetro analógico (Starfer, São Paulo, SP, Brasil) com precisão de 0,1mm era posicionado com suas hastes abertas próximo à articulação do tornozelo e suas hastes eram fechadas até o contato com os maléolos medial e lateral. Após a realização da leitura as hastes eram novamente abertas e removidas. Todas as medidas foram realizadas por um mesmo avaliador para evitar diferenças inter avaliadores. Para os cálculos de perimetria articular e escore de inflamação foi utilizado o valor médio mensurado (média aritmética) nas duas patas traseiras para cada animal.

2.7.4. Escore de inflamação

Outra medida realizada com o objetivo de avaliar as alterações causadas pela AR foi a inspeção visual do nível de inflamação. Como referenciado anteriormente por Castillero et al. (2009) o escore de inflamação de cada uma das patas foi avaliado por um mesmo avaliador em diferentes pontos da pesquisa e classificados de acordo com os seguintes critérios: 0- sem evidências de eritema (vermelhidão) ou edema; 1- ligeiro eritema e edema restrito ao tarso ou articulação do tornozelo; 2- eritema e leve edema que se estende desde o tornozelo até o tarso; 3- eritema e edema moderado, que se estende desde o tornozelo até as articulações do metatarso; 4- eritema e edema grave envolvendo a articulação do tornozelo, pé e dedos, ou anquilose (perda de movimento) do membro (CASTILLERO et al., 2009).

2.7.5. Pesagem da ração

Com o objetivo de monitorar a quantidade de ração ingerida por animal, semanalmente antes da reposição, a quantidade de ração remanescente na grade da gaiola era pesada. As adições de ração foram feitas de modo que não menos que 1,5kg de ração ficasse à disposição dos animais e observações diárias foram realizadas para garantir a oferta irrestrita de alimento. Os valores semanais de ingestão de ração foram calculados para todos os animais dividindo-se o peso de ração consumida pelo número de animais da gaiola. Posteriormente, foi calculada a ingestão diária de ração por animal dividindo-se o valor semanal por 7.

2.7.6. Pesagem dos animais

Todos os animais envolvidos na pesquisa foram pesados semanalmente em uma balança digital (0,001g de precisão) a fim de determinar alterações do peso corporal durante o experimento.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o *software* MedCalc (versão 11.1.1.0). Para determinar as diferenças existentes nos valores de expressão de RNAm foi feita comparação entre os grupos por ANOVA *one-way*. Quando observada alguma diferença, o teste *post hoc* de *Student Newman Keuls* foi aplicado. Para análise dos dados não influenciados pelo EF (peso muscular, escore de inflamação, perimetria articular, ingestão de ração e AST) os animais foram divididos em um grupo artrite (AR=16) (GAR e GAR+Ex) e grupo controle (CT=16) (GCT e GEx). Os valores contínuos foram comparados intra grupos nos diversos momentos, por análise de variância de medidas repetidas, seguido do teste de esfericidade de Greenhouse-Geisser. Para comparação entre grupos em um mesmo momento, aplicou-se o teste t de *Student* independente. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (SEM) e o nível de significância estatística adotada foi $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS

O peso dos animais aumentou progressivamente e não apresentou diferença entre os grupos estudados (Fig. 3a). Concomitantemente, a ingestão de ração elevou-se durante as últimas quatro semanas, exceto após a segunda semana em AR e na última semana em CT (fig. 3b). A indução da AR provocou aumentos expressivos nos indicadores externos de manifestação da doença (espessura da articulação do tornozelo e escore de inflamação) um dia após a injeção local de albumina (Fig. 3c e 3d). Houve redução progressiva desses indicadores a partir do oitavo dia pós indução local, mas os valores permaneceram superiores comparados ao grupo sem AR até o momento da eutanásia (décimo quinto dia) (Fig. 3c e 3d).

Figura 3- Progressão da massa corporal (a), ingestão de ração (b), espessura da articulação (c) e escore de inflamação (d) nos grupos com (AR) e sem AR (CT) durante o experimento.

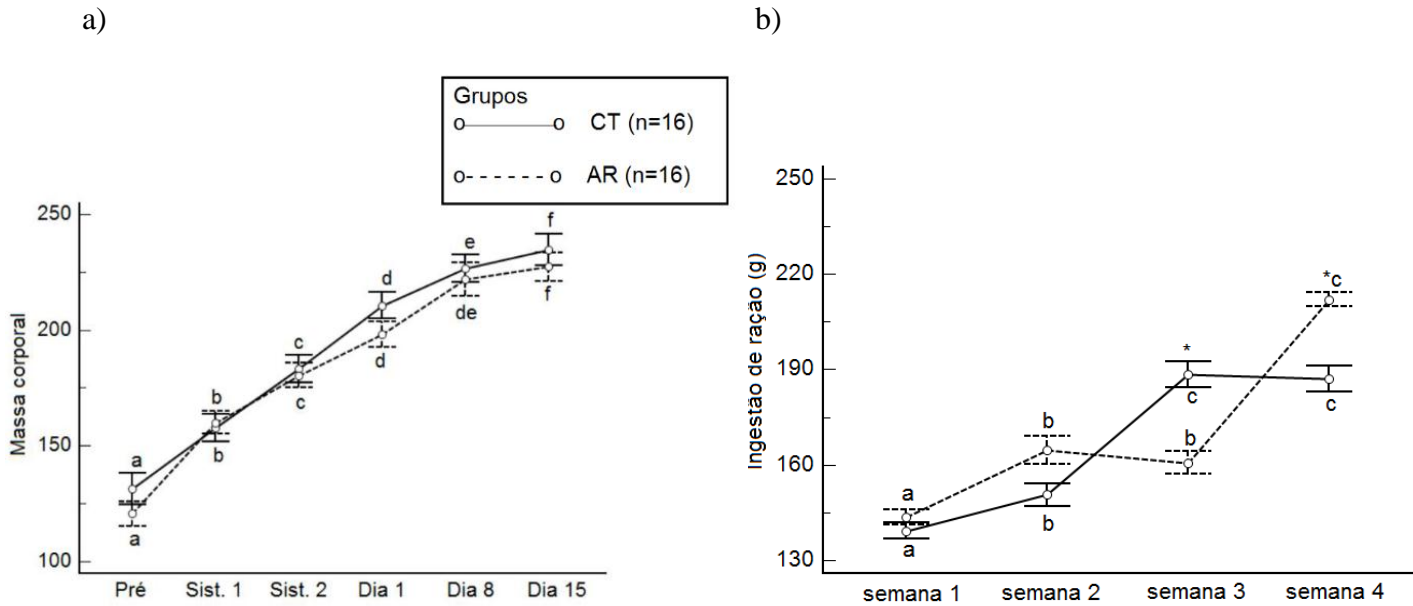


Figura 3a e 3b- Progressão da massa corporal (a) nos momentos: Pré(pré protocolo de indução); Sist.1(após a primeira indução sistêmica); Sist. 2(após a segunda indução sistêmica); Dia 1(1 dia após indução local); Dia 8(8 dias após indução local) e Dia 15(15 dias após indução local). Progressão da ingestão de ração (b) nos momentos Sist. 2; Dia 1; Dia 8 e Dia 15 nos grupos CT(controle) e AR (artrite). Letras diferentes indicam diferença $p < 0,01$ entre os momentos. * indica diferença $p < 0,001$ entre as condições CT e AR.

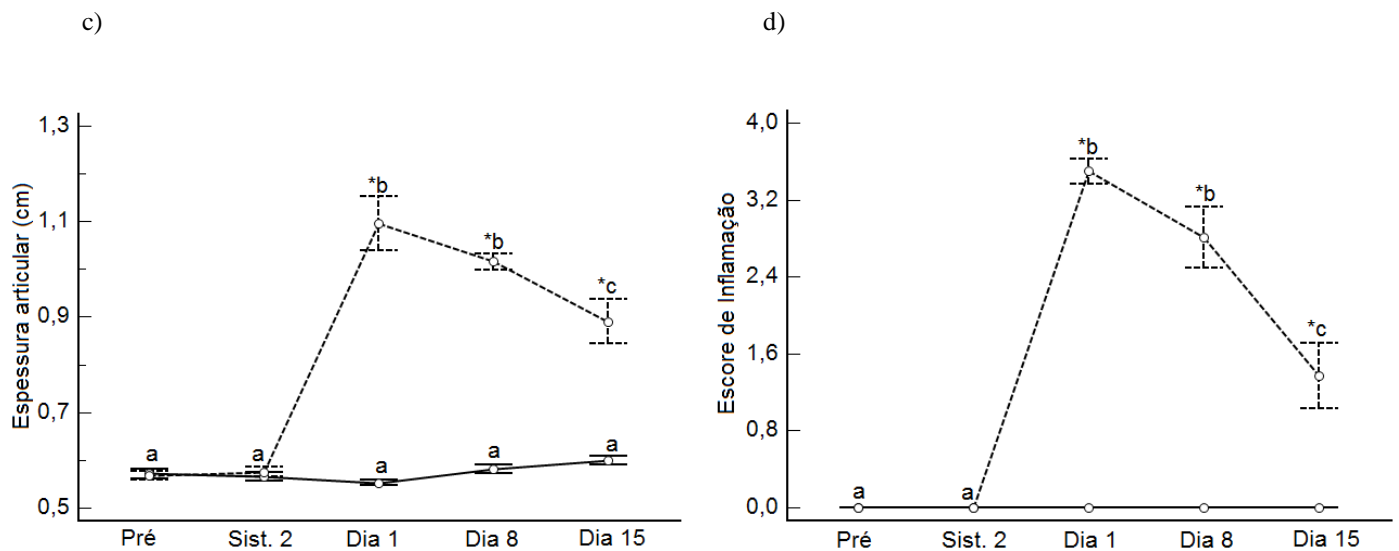
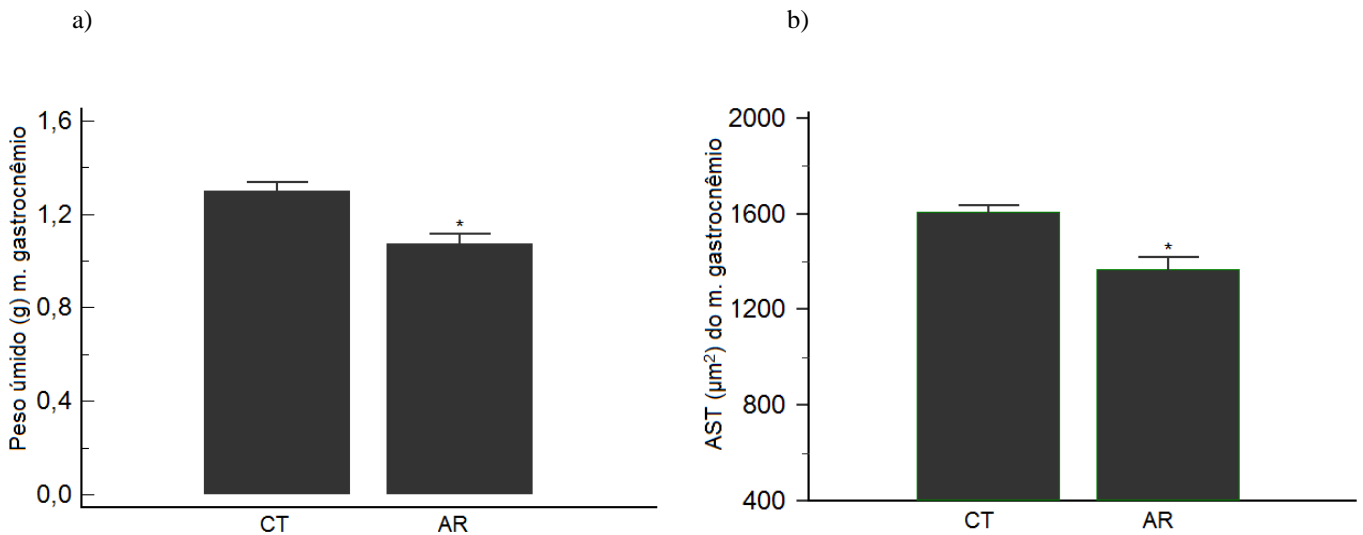


Figura 3c e 3d- Progressão dos indicadores externos de manifestação da doença. Progressão da espessura articular (3c) e do escore de inflamação (3d) nos momentos:Pré (pré protocolo de indução); Sist. 2(após a segunda indução sistêmica); Dia 1(1 dia após indução local); Dia 8(8 dias após indução local) e Dia 15(15 dias após indução local) nos grupos CT(controle) e AR (artrite). Letras diferentes indicam diferença $p < 0,01$ entre os momentos. * indica diferença $p < 0,001$ entre as condições CT e AR.

A AR induziu atrofia no músculo gastrocnêmio, representada pelos menores valores do peso úmido (Fig. 4a) e da AST (Fig. 4b) nos grupo AR comparados ao grupo sem AR (CT), sendo que o gastrocnêmio apresentou reduções de 17,3% e 14,85%, no peso úmido e AST respectivamente.

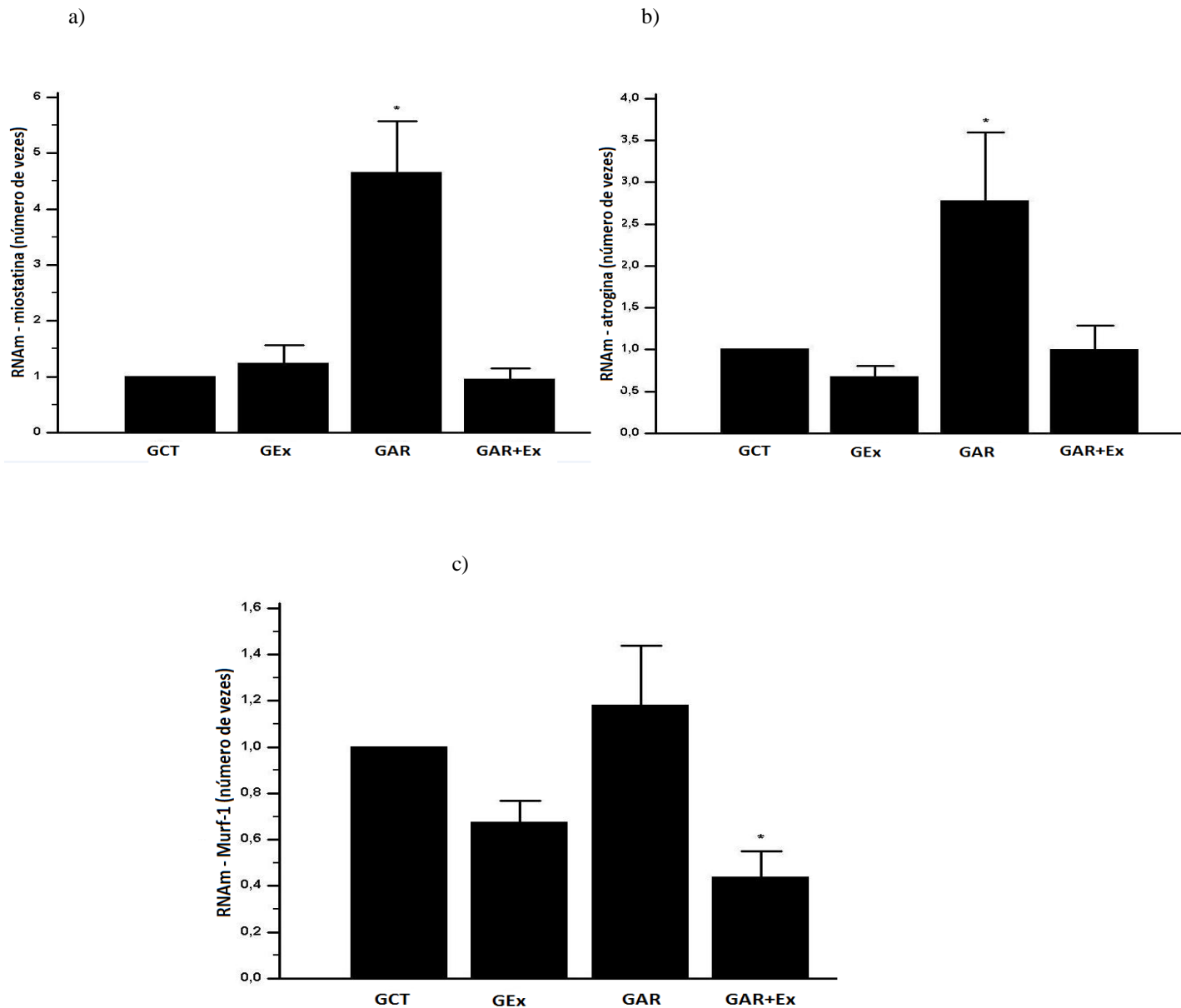
Figura 4- Resultados de peso úmido (a) e AST (b) do músculo gastrocnêmio



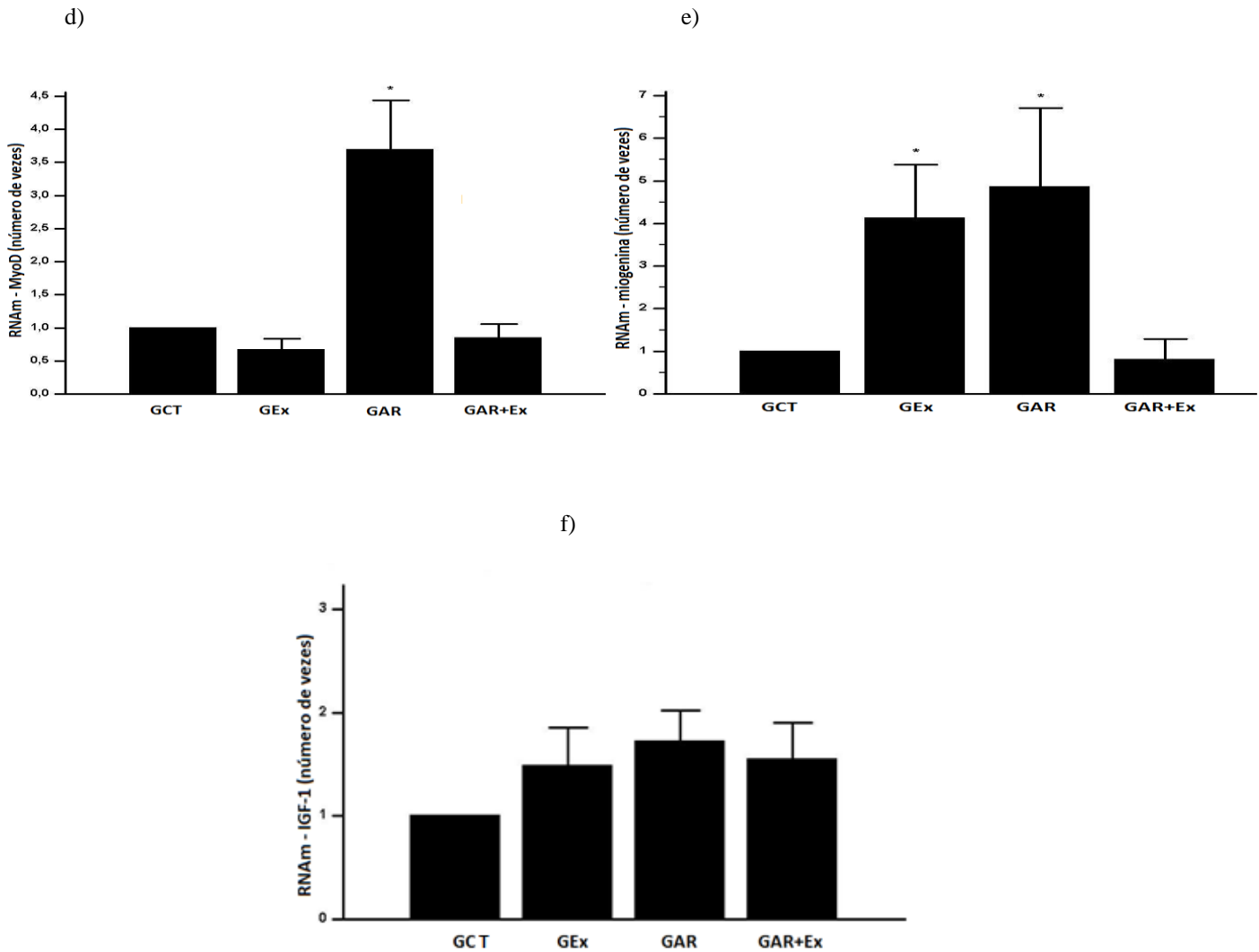
Peso úmido (3a) e AST (área de secção transversa) (3b) do M. gastrocnêmio nos grupos: GCT (grupo controle); GEx (grupo exercício); GAR (grupo artrite); GAR+Ex (grupo artrite mais exercício). * indica diferença $p \leq 0,05$ em relação a GCT.

Concomitantemente, a AR induziu aumento de RNAm de miostatina e atrogina (4,5 e 2,5 vezes, respectivamente) somente em GAR, que não realizou exercício, indicando um possível efeito agudo do exercício sobre estes indicadores de atrofia durante a AR (Fig. 5a e 5b). Interessantemente, a AR não influenciou a expressão de RNAm de Murf-1, mas o exercício agudo induziu uma redução na expressão desta ubiquitina (Fig. 5c).

Figura 5- Expressão de RNAm de miostatina (a), atrogina (b), Murf-1 (c), MyoD (d), miogenina (e) e IGF-1 (f).



Expressão de RNAm dos marcadores catabólicos: miostatina(a), atrogina(b) e MuRF-1(c) nos grupos: GCT (grupo controle); GEx (grupo exercício); GAR (grupo artrite); GAR+Ex (grupo artrite mais exercício). * indica diferença $p \leq 0,05$ em relação a GCT.



Expressão de RNAm dos marcadores anabólicos: MyoD(d), miogenina(e) e IGF-1(f) nos grupos: GCT (grupo controle); GEx (grupo exercício); GAR (grupo artrite); GAR+Ex (grupo artrite mais exercício). *indica diferença $p \leq 0,05$ em relação a GCT.

Para os indicadores da miogênese, a expressão de RNAm de MyoD e Miogenina aumentou (4,5 e 3,5 vezes, respectivamente) no GAR sem exercício, mas não no GAR+Ex, reforçando um possível papel agudo do exercício (Fig. 5d e 5e). A expressão de RNAm de IGF-1 não se alterou com a AR ou com o exercício (Fig. 5f).

4. DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou novas informações sobre como a AR pode afetar a AST e a expressão de genes que atuam na miogênese e no catabolismo muscular e também o papel agudo do EF sobre a expressão desses genes em ratas. As manifestações externas da doença, avaliadas pelo escore de inflamação (Figura 3d) e pela espessura articular (Figura 3c),

demonstram sucesso na indução da AR por até 15 dias no presente experimento. Esses resultados corroboram com outros estudos, os quais apresentaram resultados semelhantes aos aqui encontrados (CASTILLERO et al., 2009; FILIPPIN et al., 2013). Desta forma, a AR induziu atrofia muscular concomitantemente com aumentos nos níveis de mRNA de miogenina, MyoD, miostatina e atrogina. Uma sessão de EF foi capaz de normalizar essas alterações moleculares e reduzir Murf-1 em ratas induzidas à AR.

Mostrou-se no presente estudo que a AR induziu atrofia muscular, demonstrada pela redução do peso úmido e da AST no músculo gastrocnêmio. Essas alterações (\downarrow 15-17%), para ambas as medidas, são semelhantes a outros modelos experimentais de AR e refletem o valor médio da perda de massa muscular dos pacientes com AR (LOPEZ-MENDUINA et al., 2010; RALL; ROUBENOFF, 2004). Interessantemente, a atrofia muscular não refletiu em alteração do peso corporal na última semana, sugerindo uma provável alteração da constituição corporal dos animais submetidos à AR (ROCHA et al., 2009). Tem-se mostrado que o desequilíbrio energético proporcionado pela diminuição da atividade física induzida pela AR (ROUBENOFF et al., 1994) e/ou o aumento do consumo de energia pode resultar em aumento de gordura corporal, mascarando a redução do peso corporal (RALL; ROUBENOFF, 2004). Embora podemos apenas especular esta hipótese, observou-se no presente estudo uma redução (na terceira semana) e posterior aumento na ingestão de ração no grupo com AR na última semana de experimento (figura 3b). Essa “compensação” entre as duas semanas resultou em um aumento do consumo de ração, da primeira para última semana (AR = 48% vs CT = 34%), aproximadamente 14% maior no grupo AR, o que pode fortalecer essa hipótese.

Neste contexto, observamos que a atrofia muscular foi acompanhada por aumento da expressão de RNAm de dois mediadores do catabolismo muscular, a atrogina e a miostatina. A atrogina é uma ubiquitina-ligase responsável pela marcação específica de proteínas a serem degradadas pelo complexo proteossoma (20S ou 26S). Outros estudos mostraram elevações de atrogina associadas com atrofia muscular em diversas situações catabólicas, tais como imobilização ou utilização de dexametasona, evidenciado um importante papel desta ubiquitina-ligase E₃ em situações catabólicas (FAPPI et al., 2014; GRANADO et al., 2007; SENF; DODD; JUDGE, 2010). A miostatina é um membro da família do TGF- β que limita o crescimento muscular via inibição da proliferação de CS e/ou ativação do catabolismo muscular pela ativação de ubiquitinas-ligase E₃ (RODRIGUEZ et al., 2014). Nosso resultado contraria os achados de Castillero et al. (2011), que utilizando um modelo de indução com uma única aplicação de Adjuvante de Freud na palma de uma das patas não encontraram

elevações na expressão muscular de miostatina 15 dias após a indução. Em outra direção, Ramires et al. (2011) encontraram elevações de miostatina com pico de expressão dois dias após indução de inflamação na articulação do tornozelo realizada com iodo-carreginina. Neste contexto, a miostatina parece elevar-se precocemente nos primeiros dias após a inflamação local, e retornar aos valores de repouso após aproximadamente sete dias. Uma importante constatação é que ambos os estudos citados acima utilizaram animais machos em seus experimentos. Isto pode explicar a diferença encontrada entre eles e o presente estudo. Tal afirmação baseia-se em resultados de estudo recente, que avaliou respostas moleculares frente a administração de testosterona ou estrogênio em modelo de atrofia induzido por privação androgênica. Os resultados indicaram que a testosterona conseguiu regular as elevações de miostatina precocemente (sete dias), enquanto a administração de estrogênio só conseguiu os mesmos resultados em 30 dias (DE NAEYER et al., 2014). Tais achados demonstram que a testosterona parece ter um importante papel no restabelecimento precoce dos níveis de miostatina e consequentemente na redução e/ou reversão da atrofia muscular, uma vez que reduções dos níveis de miostatina estão associadas à hipertrofia do músculo esquelético (RODRIGUEZ et al., 2014).

Entre os mediadores da miogênese analisados, a AR aumentou a expressão de MyoD e miogenina 15 dias após a indução local da AR. Em relação aos MRFs, os nossos resultados são convergentes com achados da literatura. Estudos que utilizaram modelos artrite-induzida apontaram picos de elevação de MyoD e miogenina 15 dias após a indução da AR, sendo que a miogenina, um marcador tardio da divisão celular, apresentou aumentos mais pronunciados (CASTILLERO et al., 2009; CASTILLERO et al., 2011; LOPEZ-MENDUINA et al., 2010). Tais elevações podem ser consideradas como uma ação protetiva do músculo esquelético contra a atrofia muscular exacerbada. Paradoxalmente, modelos de atrofia induzidas por imobilização ou por dexametasona, não demonstraram aumento da atividade regenerativa do músculo esquelético (DE OLIVEIRA NUNES TEIXEIRA et al., 2013; FAPPI et al., 2014). Assim, a ação dos mediadores inflamatórios parece exercer um importante papel na ativação dos indicadores da miogênese, o que pode explicar a diferença entre os distintos modelos de atrofia (artrite-induzida vs. imobilização ou dexametasona) em relação a este mecanismo. Fortalecendo esta hipótese, Begue et al. (2013) ao investigarem a ação da RNAm de IL-6 sobre o reparo muscular após estímulo de EF em ratos, encontraram aumento da fosforilação de STAT3 induzidos pela ativação de *Janus Tyrosine Kinase* (JNKs). A fosforilação de STAT3 (pSTAT3) induz uma cascata de eventos envolvidos em várias funções biológicas

incluindo a proliferação celular, diferenciação e sobrevivência de mioblastos (BEGUE et al., 2013). Nesse sentido, Yang et al. (2009) reportaram que STAT3 pode interagir com MyoD, e o eixo STAT3-MyoD pode explicar a ação de STAT3 na diferenciação miogênica (YANG et al., 2009).

Diversas drogas vêm sendo utilizadas na tentativa de modificar as respostas moleculares envolvidas na degradação muscular na AR (CASTILLERO et al., 2011; GRANADO et al., 2007; GRANADO et al., 2005; LOPEZ-MENDUINA et al., 2010). Neste contexto, este é o primeiro estudo a avaliar a ação do EF sobre os marcadores de regulação do *turnover* proteico muscular na AR. Interessantemente, no presente estudo o EF esteve associado à diminuição da expressão de MuRF-1 (60%) e à normalização das respostas de atrogina e miostatina (figuras 5a, 5b e 5c). Semelhantemente, reduções de atrogina (30%) e miostatina (45%) foram observadas após um primeiro estímulo de EF aplicado em homens saudáveis não treinados (MASCHER et al., 2008). Somados, estes achados demonstram uma interação na expressão de miostatina e as E₃ ubiquitinas ligases independentemente do ambiente inflamatório após EF. Esta relação se justifica porque a sinalização de miostatina ativa dois receptores de activina (ActRIIA e ActRIIB) que ligam-se aos receptores tipo I de activina (ALK4 e ALK5) e que levam a fosforilação e consequente transcrição de SMAD2 e 3 (RODRIGUEZ et al., 2014). SMAD3 desfosforilada leva isoladamente a um aumento de atrogina (GOODMAN et al., 2013) e em sinergismo com FOXO induz aumento de MuRF-1 (BOLLINGER et al., 2014).

O EF é um conhecido promotor da atividade miogênica e hormonal (AGUIAR et al., 2013; HANSSEN et al., 2013; MATHENY et al., 2009; WERNBOM et al., 2013). Os resultados do presente estudo demonstram aumentos dos níveis de RNAm de miogenina em GEx, mas não de MyoD (figuras 5d e 5e), seis horas após a realização do protocolo de EF. Nesta direção, um trabalho prévio que avaliou a cinética das respostas miogênicas após a realização de EF em indivíduos saudáveis, apontou uma resposta rápida de MyoD (imediatamente após o EF), e uma resposta tardia da miogenina (após seis horas) (PSILANDER et al., 2003). MyoD é um marcador precoce de divisão celular, sua função está relacionada à proliferação, permitindo o início da fase de diferenciação dos mioblastos, enquanto a miogenina é um marcador tardio, envolvido no processo de diferenciação dos mioblastos em miotubos (ZANOU; GAILLY, 2013). Desta forma, a não elevação de MyoD, concomitante aos níveis pronunciados de miogenina, no presente estudo, indicam que a atividade miogênica encontrava-se em estado avançado seis horas após o EF.

Interessantemente, miogenina não esteve aumentada em GAR+Ex seis horas após o EF. Depois de ativada as CS expressam Pax7 e MyoD durante a fase de proliferação. Para que os mioblastos iniciem a fase de diferenciação são necessárias reduções de Pax7. Em situações em que Pax7 mantém-se elevado ocorrem prejuízos na cinética miogênica ocasionando diminuição de MyoD, inviabilizando a continuidade do processo e aumentando o número de CS no estado de quiescência (BEGUE, et al., 2013). Especulamos que o EF em um ambiente inflamado possa ter mantido elevado fatores locais (como por exemplo Pax7), e esta persistente elevação induziu diminuições de MyoD e conseqüentemente de miogenina. Contudo, estudos futuros são necessários para o entendimento das respostas miogênicas promovidas pelo EF em ambiente inflamado.

Outro importante regulador do crescimento muscular, o IGF-1 está envolvido tanto na estimulação da miogênese quanto da síntese proteica (ZANOU; GAILLY, 2013). No presente estudo, não foram verificadas alterações na expressão da isoforma muscular de IGF-1 (IGF1Ec ou MGF) (figura 5f) induzidas pelo EF ou pela AR. Em relação à AR, nossos achados estão em concordância com trabalho prévio que não observou alterações promovidas por artrite induzida na expressão muscular de IGF-1 (CASTILLERO et al., 2009). No que se refere ao EF, a literatura apresenta resultados conflitantes em relação à resposta de IGF-1. Neste contexto, protocolos agudos de EF não se mostraram efetivos em aumentar a expressão de RNAm de IGF-1 em humanos (BICKEL et al., 2005; PSILANDER et al., 2003), enquanto que protocolos crônicos de EF, aplicados tanto em modelo animal (AGUIAR et al., 2013) quanto em humanos (HANSSEN et al., 2013) apresentaram aumento. Assim, o aumento na expressão muscular de IGF-1 parece ser uma adaptação a sucessivos estímulos de EF.

Em suma, o modelo de indução de AR utilizado no presente trabalho, foi capaz de aumentar os indicadores externos da doença, além de induzir atrofia no músculo gastrocnêmio. A atrofia muscular esteve associada à elevações da expressão de RNAm de atrogina e miostatina (marcadores catabólicos), assim como, de MyoD e miogenina (marcadores anabólicos). Estes achados indicam que a atrofia muscular induzida pela AR, está mais associada a uma maior ação dos mecanismos catabólicos do que a uma ação reduzida dos mecanismos anabólicos. Em contrapartida, a atrofia muscular não esteve associada às alterações de peso, ingestão de ração e expressão de IGF-1 e MuRF-1. O EF mostrou-se eficaz como possível terapia capaz de atenuar e/ou reverter a atrofia muscular na AR, ao regular a expressão de atrogina e miostatina, além de diminuir Murf-1. Pelo que se

sabe, este foi o primeiro estudo a mostrar o potencial do EF como terapia capaz de promover alterações moleculares favoráveis ao crescimento muscular na AR.

Estudos crônicos, capazes de avaliar a efetividade das alterações moleculares em criar adaptações morfológicas e funcionais promovidas pelo EF, são necessários para o entendimento do real benefício do EF sobre a CR em pacientes com AR.

5. CONCLUSÃO

Desta forma, concluímos que a AR induziu atrofia muscular concomitante com aumentos nos níveis de RNAm de Miogenina, MyoD, Miostatina e atrogina. Além disso, uma sessão de EF foi capaz de normalizar a expressão de RNAm de miostatina e atrogina e reduzir Murf-1 em ratas induzidas à AR. Estes resultados sugerem que o EF pode evitar a degradação muscular mais por reduzir a expressão dos indicadores catabólicos do que ao aumentar os indicadores anabólicos na AR. Assim o EF demonstrou que pode ser uma efetiva terapia de intervenção para a CR na AR. Estes achados prestam informações relevantes sobre como a AR pode afetar a AST e a expressão de genes que atuam na miogênese e no catabolismo muscular e o efeito agudo do EF sobre a regulação na expressão desses genes em ratas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EDUCAÇÃO FÍSICA

Anselmo Alves de Oliveira

**ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS E RESPOSTAS MOLECULARES DO MÚSCULO
ESQUELÉTICO EM MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATÓIDE
SUBMETIDO AO EXERCÍCIO DE FORÇA**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Educação Física, área de concentração “Esporte e exercício” (linha de pesquisa: Exercício Físico, ajustes e adaptações neuromusculares, cardiorrespiratórias e endócrino-metabólicas), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Fábio Lera Orsatti

UBERABA

2014

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, V. et al. Induction of MuRF1 is essential for TNF-alpha-induced loss of muscle function in mice. **J Mol Biol**, v. 384, n. 1, p. 48-59, Dec 5 2008.

AGUIAR, A. F. et al. Myogenin, MyoD and IGF-I regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats. **Int J Sports Med**, v. 34, n. 4, p. 293-301, Apr 2013.

ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 3, p. 130-6, Mar 2005.

BAKER, J. F. et al. Deficits in muscle mass, muscle density, and modified associations with fat in rheumatoid arthritis. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, Mar 24 2014.

BAR, K. J. et al. The proportion of TRPV1 protein-positive lumbar DRG neurones does not increase in the course of acute and chronic antigen-induced arthritis in the knee joint of the rat. **Neurosci Lett**, v. 361, n. 1-3, p. 172-5, May 6 2004.

BEGUE, G. et al. Early activation of rat skeletal muscle IL-6/STAT1/STAT3 dependent gene expression in resistance exercise linked to hypertrophy. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57141, 2013.

BÉRTOLO, M. B. et al. Atualização do Consenso Brasileiro no Diagnóstico e Tratamento da Artrite Reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 3, p. 8, maio/junho 2007.

BICKEL, C. S. et al. Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. **J Appl Physiol (1985)**, v. 98, n. 2, p. 482-8, Feb 2005.

BOLLINGER, L. M. et al. SMAD3 augments FoxO3-induced MuRF-1 promoter activity in a DNA-binding-dependent manner. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 307, n. 3, p. C278-87, Aug 1 2014.

CAMPOS, G. E. et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. **Eur J Appl Physiol**, v. 88, n. 1-2, p. 50-60, Nov 2002.

CASTILLERO, E. et al. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. **Mol Cell Endocrinol**, v. 309, n. 1-2, p. 8-16, Oct 15 2009.

CASTILLERO, E. et al. Fenofibrate, a PPAR{alpha} agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 300, n. 5, p. E790-9, May 2011.

CHARGE, S. B.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 209-38, Jan 2004.

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICK, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiol Rev**, v. 84, p. 209-238, 2004.

CLOWES, G. H., JR. et al. Muscle proteolysis induced by a circulating peptide in patients with sepsis or trauma. **N Engl J Med**, v. 308, n. 10, p. 545-52, Mar 10 1983.

DADOUN, S. et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 1, p. 29-33, Jan 2013.

DE NAEYER, H. et al. Androgenic and estrogenic regulation of Atrogin-1, MuRF1 and myostatin expression in different muscle types of male mice. **Eur J Appl Physiol**, v. 114, n. 4, p. 751-61, Apr 2014.

DE OLIVEIRA NUNES TEIXEIRA, V. et al. Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 238, n. 12, p. 1421-30, Dec 2013.

DEHOUX, M. et al. IGF-I does not prevent myotube atrophy caused by proinflammatory cytokines despite activation of Akt/Foxo and GSK-3beta pathways and inhibition of atrogin-1 mRNA. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, n. 1, p. E145-50, Jan 2007.

DRUMMOND, M. J. et al. Myogenic regulatory factor response to resistance exercise volume in skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, n. 4, p. 771-8, Mar 2010.

FAPPI, A. et al. The effects of omega-3 fatty acid supplementation on dexamethasone-induced muscle atrophy. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 961438, 2014.

FILIPPIN, L. I. et al. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 4, n. 3, p. 231-8, Sep 2013.

FLUCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 146, p. 159-216, 2003.

GOODMAN, C. A. et al. Smad3 induces atrogen-1, inhibits mTOR and protein synthesis, and promotes muscle atrophy in vivo. **Mol Endocrinol**, v. 27, n. 11, p. 1946-57, Nov 2013.

GRANADO, M. et al. Experimental arthritis inhibits the insulin-like growth factor-I axis and induces muscle wasting through cyclooxygenase-2 activation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 292, n. 6, p. E1656-65, Jun 2007.

GRANADO, M. et al. Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 3, p. E486-92, Mar 2005.

HANSEN, K. E. et al. The effect of strength training volume on satellite cells, myogenic regulatory factors, and growth factors. **Scand J Med Sci Sports**, v. 23, n. 6, p. 728-39, Dec 2013.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol (1985)**, v. 91, n. 2, p. 534-51, Aug 2001a.

_____. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **J Appl Physiol**, v. 91, n. 2, p. 534-51, Aug 2001b.

HOLLAN, I. et al. Cardiovascular disease in autoimmune rheumatic diseases. **Autoimmun Rev**, v. 12, n. 10, p. 1004-15, Aug 2013.

KOSEK, D. J. et al. Efficacy of 3 days/wk resistance training on myofiber hypertrophy and myogenic mechanisms in young vs. older adults. **J Appl Physiol (1985)**, v. 101, n. 2, p. 531-44, Aug 2006.

LEMMEY, A. B. et al. Effects of high-intensity resistance training in patients with rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. **Arthritis Rheum**, v. 61, n. 12, p. 1726-34, Dec 15 2009.

LEVY, L. et al. Incidence and risk of fatal myocardial infarction and stroke events in rheumatoid arthritis patients. A systematic review of the literature. **Clin Exp Rheumatol**, v. 26, n. 4, p. 673-9, Jul-Aug 2008.

LIESKOVSKA, J.; GUO, D.; DERMAN, E. Growth impairment in IL-6-overexpressing transgenic mice is associated with induction of SOCS3 mRNA. **Growth Horm IGF Res**, v. 13, n. 1, p. 26-35, Feb 2003.

LOPEZ-MENDUINA, M. et al. Systemic IGF-I administration attenuates the inhibitory effect of chronic arthritis on gastrocnemius mass and decreases atrogen-1 and IGFBP-3. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 2, p. R541-51, Aug 2010.

MACEDO, A. G. et al. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 143, p. 357-64, Sep 2014.

MASCHER, H. et al. Repeated resistance exercise training induces different changes in mRNA expression of MAFbx and MuRF-1 in human skeletal muscle. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 1, p. E43-51, Jan 2008.

MATHENY, R. W. et al. Serum IGF-I-deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 234, n. 2, p. 164-70, Feb 2009.

MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M. M. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 4, p. 735-43, Apr 2006.

MUNOZ-CANOVES, P. et al. Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword? **FEBS J**, v. 280, n. 17, p. 4131-48, Sep 2013.

MUSCARITOLI, M. et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". **Clin Nutr**, v. 29, n. 2, p. 154-9, Apr 2010.

OKEN, O. et al. Factors associated with functional disability in patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int**, v. 29, n. 2, p. 163-6, Dec 2008.

PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochem Cell Biol**, v. 115, n. 5, p. 359-72, May 2001.

PSILANDER, N.; DAMSGAARD, R.; PILEGAARD, H. Resistance exercise alters MRF and IGF-I mRNA content in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 95, n. 3, p. 1038-44, Sep 2003.

PURINTRAPIBAN, J.; WANG, M. C.; FORSBERG, N. E. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 136, n. 3, p. 393-401, Nov 2003.

RALL, L. C.; ROUBENOFF, R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. **Rheumatology (Oxford)**, v. 43, n. 10, p. 1219-23, Oct 2004.

RAMIREZ, C. et al. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 90, n. 11, p. 930-9, Nov 2011.

ROCHA, O. M. et al. Sarcopenia da caquexia reumatoide: conceituação, mecanismos, consequências clínicas e tratamentos possíveis. **Rev Bras Reumatol**, v. 49, n. 3, p. 288-301, 2009.

RODRIGUEZ, J. et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. **Cell Mol Life Sci**, Jul 31 2014.

ROUBENOFF, R. et al. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. **J Clin Invest**, v. 93, n. 6, p. 2379-86, Jun 1994.

ROUBENOFF, R. et al. Rheumatoid cachexia: depletion of lean body mass in rheumatoid arthritis. Possible association with tumor necrosis factor. **J Rheumatol**, v. 19, n. 10, p. 1505-10, Oct 1992.

SARIYILDIZ, M. A. et al. Sleep quality in rheumatoid arthritis: relationship between the disease severity, depression, functional status and the quality of life. **J Clin Med Res**, v. 6, n. 1, p. 44-52, Feb 2014.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094-108, Sep 25 2010.

SENF, S. M.; DODD, S. L.; JUDGE, A. R. FOXO signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 298, n. 1, p. C38-45, Jan 2010.

SENNA, E. R. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **J Rheumatol**, v. 31, n. 3, p. 594-7, Mar 2004.

SMITH, C. A.; ARNETT, F. C., JR. Diagnosing rheumatoid arthritis: current criteria. **Am Fam Physician**, v. 44, n. 3, p. 863-70, Sep 1991.

STRASSER, B. et al. The effects of strength and endurance training in patients with rheumatoid arthritis. **Clin Rheumatol**, v. 30, n. 5, p. 623-32, May 2011.

TEIXEIRA, V. O. N.; FILIPPIN, L. I.; XAVIER, R. M. Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 2, p. 252-9, Mar-Apr 2012.

VAN DER WOUDE, D. et al. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 60, n. 4, p. 916-23, Apr 2009.

WALSMITH, J.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. **Int J Cardiol**, v. 85, n. 1, p. 89-99, Sep 2002.

WERNBOM, M. et al. Acute low-load resistance exercise with and without blood flow restriction increased protein signalling and number of satellite cells in human skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v. 113, n. 12, p. 2953-65, Dec 2013.

WOLFE, F. et al. The mortality of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 37, n. 4, p. 481-94, Apr 1994.

YANG, Y. et al. STAT3 induces muscle stem cell differentiation by interaction with myoD. **Cytokine**, v. 46, n. 1, p. 137-41, Apr 2009.

ZANOUE, N.; GAILLY, P. Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 21, p. 4117-30, Nov 2013.

7. ANEXOS

ANEXO 1: PROTOCOLO CEUA



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

Parecer Consubstanciado
PROTOCOLO DE PROJETO COM ENVOLVIMENTO DE ANIMAIS

IDENTIFICAÇÃO

TÍTULO DO PROJETO: Adaptações morfofuncionais e respostas moleculares do músculo esquelético em modelo experimental de artrite reumatóide submetido ao treinamento resistido
PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: Fábio Lera Osati
INSTITUIÇÃO ONDE SE REALIZARÁ A PESQUISA: UFTM - Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) – Av. Guilherme Ferreira, 490 – Uberaba - MG
DATA DE ENTRADA NO CEUA UFTM: 24/05/13
PROTOCOLO CEUA/UFTM: 274

5. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA OS ANIMAIS E DESCRIÇÃO DAS RESPECTIVAS MEDIDAS PREVENTIVAS E CURATIVAS QUANDO NECESSÁRIO

Os desconfortos e riscos estão na aplicação da substância para indução da artrite. O animal poderá, agudamente, apresentar edemas e dor na articulação induzida. No período agudo da indução da artrite os ficarão em repouso para evitar a dor.

6. DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS PARA AS PESSOAS ENVOLVIDAS NA PESQUISA

No manuseio com os animais, serão utilizados Equipamentos de Proteção Individual (luvas, jaleco de manga comprida, sapato fechado, óculos e máscara) evitando os riscos de possíveis atos de defesa do animal, evitando-se acidentes com membros do grupo de pesquisa.

7. COMENTÁRIOS DO RELATOR QUANTO À ESTRUTURA DO PROTOCOLO

Este protocolo obedece nos princípios éticos para a experimentação animal.

PARECER DA CEUA: Aprovado em 05/07/2013

(O relatório anual ou final deverá ser encaminhado pelo Pesquisador um ano após o início do processo).


Prof. Guilherme Vannucchi Portari
Coordenador da CEUA