

ROBERTO FURLANETTO JÚNIOR

**EFEITOS DA PERDA DA FUNÇÃO OVARIANA E DO EXERCÍCIO DE
FORÇA AGUDO SOBRE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À
ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA PELA ARTRITE REUMATOIDE**

UBERABA

2016

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

Roberto Furlanetto Júnior

**EFEITOS DA PERDA DA FUNÇÃO OVARIANA E DO EXERCÍCIO DE
FORÇA AGUDO SOBRE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À
ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA PELA ARTRITE REUMATOIDE**

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

Orientador: Dr. Fábio Lera Orsatti

UBERABA

2016

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

F984e Furlanetto Júnior, Roberto
Efeitos da perda da função ovariana e do exercício de força agudo
sobre expressão de genes associados à atrofia muscular induzida
pela artrite reumatoide / Roberto Furlanetto Júnior. -- 2016.
157 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Educação Física) -- Universidade
Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2016
Orientador: Prof. Dr. Fábio Lera Orsatti

1. Artrite reumatoide. 2. Caquexia. 3. Ubiquitina-Proteína ligases.
4. Ovariectomia. 5. Exercício. 6. Força muscular. I. Orsatti, Fábio Lera.
II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 616.72-002.77

Roberto Furlanetto Júnior

**EFEITOS DA PERDA DA FUNÇÃO OVARIANA E DO EXERCÍCIO DE
FORÇA AGUDO SOBRE EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À
ATROFIA MUSCULAR INDUZIDA PELA ARTRITE REUMATOIDE**

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

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2016.

Banca Examinadora:

Dr. Fábio Lera Orsatti
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Guilherme Vannucchi Portari
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dr. Erick Prado De Oliveira
Universidade Federal de Uberlândia

Dedico este trabalho à minha esposa Vিকেle, companheira de todas as horas e momentos, sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando, aos meus pais, Roberto e Dionísia que nunca mediram esforços para me educar e me proporcionar condições de crescimento acadêmico e profissional, à minha irmã, aos meus irmãos de coração e aos meus amigos pelo apoio em todo o decorrer desta conquista.

AGRADECIMENTOS:

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. É Ele que sempre nos oferece, a cada dia, todas as oportunidades de crescimento espiritual e pessoal. É Ele que me guia e me ilumina por todos os caminhos que sigo, colocando nestes caminhos pessoas fundamentais para me ensinar e auxiliar a continuar caminhando, superando todas as dificuldades e desafios da minha vida.

Agradeço ao meu orientador Prof. Fábio Lera Orsatti, pela oportunidade, pelos ensinamentos e amadurecimento científico. Mestre, incansável na busca de novos conhecimentos e produção científica, procurando sempre o melhor de nós.

Agradeço aos membros da banca, professores Erick Prado de Oliveira e Guilherme Vannucchi Portari que se prontificaram de imediato e contribuíram com sugestões significativas para melhorar e abrilhantar ainda mais este trabalho.

Agradeço aos meus pais, Roberto Furlanetto e Dionísia Nunes de Lacerda Furlanetto, pelo amor incondicional..., pelo carinho, atenção, apoio, companheirismo e conforto em todos os momentos. Vocês são a base da minha formação humana, são meus exemplos de vida, de superação e persistência. Expressar a minha eterna gratidão por tudo o que fazem por mim é ainda muito pouco para representar o que realmente vocês merecem...!

Agradeço a minha irmã Mariana Lacerda Furlanetto, que apesar de todos os contratempos e desentendimentos, o amor de irmãos sempre fala mais alto. Fico feliz em poder compartilhar esse momento contigo e tenho certeza que lá no fundo você também fica feliz com mais esta conquista.

Agradeço a minha “mãe preta” Silvani Boaventura por todo o amor, carinho e dedicação para conosco desde a infância até nos dias de hoje. Sua humildade e perseverança é exemplo para mim e sempre te levarei no pensamento e no coração por onde for.

Agradeço à minha esposa Vিকেle Sobreira, anjo de luz, que sempre está presente com todo o seu amor, carinho e conforto em todo e qualquer momento. Você é minha inspiração, meu porto seguro, meu ombro amigo e seu amor... um bálsamo para os meus sentimentos. Por diversas vezes, quando me

sentia perdido... me chamou a atenção... me estendeu a mão e junto a mim, me fez regressar à caminhada. Você acreditou em mim até mesmo quando eu deixei de fazê-lo. Você é exemplo de persistência e responsabilidade quando busca algum objetivo! Seus valores, princípios, determinação, disciplina e conduta são modelos para mim e jamais serão esquecidos. Juntos, tenho a certeza que iremos muito mais longe, conquistando muito mais do que até nós mesmos possamos imaginar.

Agradeço aos meus sogros, Tadeu Sobreira e Izilda Márcia Ayres Sobreira por todo o amor, carinho e apoio. Vocês me acolheram como um filho...! Sempre estão presentes em cada conquista, até mesmo nas pequenas, mas vibram conosco como se fosse a conquista mais importante para nós. Seus valores, princípios e companheirismo são exemplos a serem seguidos. Tenho por vocês um grande amor, carinho, respeito, admiração e gratidão.

Agradeço a meu cunhado Victor Sobreira, pelo exemplo de determinação, dedicação e foco em tudo que faz.

Não poderia deixar de agradecer à Laika Sobreira... que sempre compartilhou sua presença e seu carinho incondicional com deliciosos *kisses* e fucinhas...!!!

Agradeço aos amigos do laboratório de pesquisa em Biologia do Exercício (BioEx): Anselmo Alves de Oliveira, Fernanda Maria Martins, Aletéia de Paula Sousa, Paulo Ricardo Prado Nunes, Cristiane Maria de Castro Franco, Gederson Kardec Gomes, Marcelo Augusto da Silva Carneiro, Larissa Corrêa Barcelos Batista, Cássio de Oliveira Souto e todos os demais pelo companheirismo e pelas ajudas como auxílio no treinamento, manuseio, preparo e cuidados dos animais, nas coletas de dados, nos auxílios com as análises estatísticas, interpretações dos resultados e pelos insights durante as longas discussões a respeito do estudo. Tudo isso foi fundamental para a execução desta pesquisa.

Agradeço a Prof^a. Dra. Márcia Antoniazi Michelin pelas contribuições significativas na qualificação e durante todo o processo da pesquisa, nunca poupando esforços para nos amparar. Sua prontidão em ajudar servirá de modelo ao longo da minha carreira profissional e pessoal.

Agradeço aos membros do Instituto de pesquisa em oncologia (IPON): Cláudio José Silva; Carolina Guissoni Compos, Letícia Montes Stark; Douglas

Reis Abdalla, André Adriano Aleixo Rocha, Thiago Mantello Bianco (Joe), Luan Andrade Silva, Andjara Thiane Cury Soares e demais por todo suporte provido durante este processo.

Agradeço ao funcionário João Batista Pereira e ao aluno de doutorado César Augusto França Abrahão, que juntamente com o Prof. Dr. Javier Emilio Lazo Chica foram essenciais para o aprendizado e desenvolvimento de parte significativa da construção desta pesquisa.

Agradeço aos meus irmãos de coração, sempre presente nos momentos de angústia e ansiedade: Carlo Igor de Oliveira (Cabelo); Anilton Magalhães Júnior (Junin); Jeovane Domingos Galvão, Keila Martins e aos amigos Maria Emília Langoni Mariotti; Pedro Paulo Langoni Mariotti, Dimas Garro, Soráya Garro, Renata Garro, Fernanda Nasciutti, Mariana Rocha, Robson Barbosa, Carolina Lage, Luciano Ferreira (Tuca), Paulo Henrique, Tatiane França..., sem vocês a caminhada teria sido mais difícil, triste e sem sentido... Aos amigos distantes, mas sempre presentes, Alessandra Serradourada, Daniel Serradourada, Melvira Motta, Peter Motta (in memorian), Alexandre Gonçalves, Juliana Costa... Muito obrigado pela companhia (mesmo estando longe), pela preocupação e por partilharem as minhas experiências por diversas vezes. Vocês são parte da minha família...!

Obrigado aos professores das disciplinas que fizeram parte desse processo! Todos os profissionais exemplares que souberam ser mais que professores, além de se comprometerem com a qualidade da educação, foram amigos e nos ensinaram mais que conteúdos, nos ensinaram ética, princípios e valores... Obrigado aos profissionais que se limitaram a serem professores, cumprindo com o compromisso de ensinar a sua disciplina... E obrigado àqueles que não souberam ser nem um, nem outro, mas que também me ensinaram, a saber, o que eu NÃO quero ser...!

Obrigado a todos os funcionários que trabalharam e se dedicaram, fazendo ser possível nossa presença no programa... Secretárias, técnicos, vigias, funcionários da limpeza. O trabalho de vocês é fundamental para que possamos nos sentir ao menos dignos de desfrutarmos de condições básicas para ingressarmos numa jornada como essa.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro, tornando possível parte dos desdobramentos e superação de obstáculos para que essa caminhada fosse concluída.

Obrigado a todos vocês, por fazerem parte desta conquista...! Somente aqueles que presenciaram ou passaram por momentos como este é que entenderá como é difícil e desafiador viver cada um destes dias. Para muitos, este é o fim...! Mas eu prefiro pensar como Eduardo Galeano ao deflagrar os dizeres sobre a Utopia “A utopia está lá no horizonte. Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos. Por mais que eu caminhe, jamais alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso: para que eu não deixe de caminhar.” Eu apenas dei mais um passo em direção ao horizonte no caminho da grande jornada da vida!

"Se quer ir rápido, vá sozinho. Se quer ir longe,
vá em grupo."

Provérbio Africano

RESUMO:

Objetivo: avaliar o efeito do exercício de força (EF) após a perda da função ovariana (ovariectomia) sobre a massa muscular do gastrocnêmio e os níveis de RNAm de IGF-1, atrogina-1, MuRF-1, e miostatina em modelo experimental de artrite em ratos. **Métodos:** 36 ratos fêmeas Wistar (9 semanas, $195,3 \pm 17,4$ gramas) foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos: controle (CT-Sham, n = 6); grupo com artrite reumatoide (AR, n = 6); grupo com artrite reumatoide submetido a EF (AREX; n = 6); ovariectomia sem artrite reumatoide (OV; n = 6); ovariectomia com artrite reumatoide (AROV; n = 6); grupo ovariectomia com artrite reumatoide submetido a EF (AROVEX; n = 6). Os procedimentos de ovariectomia (OV e AROV) ou Sham (CT-Sham ou AR) foram realizados ao mesmo tempo, quinze dias antes da indução da artrite reumatoide. Os grupos AR e AROV foram imunizados e, em seguida, foram injetados com Met-BSA na articulação tibiotársica. Após 15 dias das injeções intra-articulares com Met-BSA os animais dos grupos AREX e AROVEX foram submetidos ao EF e após seis horas do treino foram sacrificados. **Resultados:** a artrite reumatoide induziu redução na área de secção transversa (AST) das fibras do músculo gastrocnêmio. O grupo AROV mostrou menor AST nas fibras do músculo gastrocnêmio em comparação com os grupos AR e CT-Sham. O RNAm do IGF-1 e atrogina-1 do músculo esquelético foram aumentados nos animais artríticos e ovariectomizados. O aumento do RNAm de IGF-1 foi maior no grupo OV do que nos grupos AR e AROV, mas o nível de atrogina-1 foi mais elevado no grupo AROV quando comparado com outros grupos artríticos. O RNAm da atrogina-1 também foi aumentado no músculo gastrocnêmio de ratos artríticos e ovariectomizados. No entanto, o aumento do RNAm da atrogina-1 foi maior nos grupos AROV do que nos grupos AR e OV. O RNAm da MuRF-1 do músculo do gastrocnêmio foi aumentado nos grupos OV e AROV, mas não nos grupos AR e CT-Sham. No entanto, o grupo AROV apresentaram maior RNAm de MuRF-1 do que o grupo OV. O nível aumentado de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1 foi menor no grupo AROVEX do que no grupo AROV quando comparado com outros grupos. A expressão do gene da miostatina foi semelhante em todos os grupos exceto para AROVEX, que foi inferior quando comparado com outros grupos. **Conclusão:** a perda da função ovariana resulta

em maior perda de músculo esquelético relacionados à ubiquitina-ligase (atrogina-1 e MuRF-1) em ratos artríticos. No entanto, o EF agudo reduz os níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1 e miostatina no músculo de ratas artríticas afetadas por perda da função ovariana.

Palavras-chave: Caquexia. Artrite reumatoide. E₃ ubiquitina ligase. Ovariectomia. Exercício de força.

ABSTRACT:

Objective: evaluate the effect of resistance exercise (RE) after loss of ovarian function (ovariectomy) on muscle mass of gastrocnemius and the mRNA levels of IGF-1, atrogin-1, MuRF-1, and myostatin in an experimental model of rheumatoid arthritis in rats. **Methods:** 36 female Wistar rats (9 weeks, 195.3 ± 17.4 grams) were randomly allocated into six groups: control (CT-Sham; n = 6); group with rheumatoid arthritis (RA; n = 6); group with rheumatoid arthritis subjected to RE (RAEX; n = 6); ovariectomy without rheumatoid arthritis (OV; n = 6); ovariectomy with rheumatoid arthritis (RAOV; n = 6); ovariectomy group with rheumatoid arthritis subjected to RE (RAOVEX; n = 6). The ovariectomy (OV and RAOV) or Sham (CT-Sham or RA) procedures were performed at the same time, fifteen days before the rheumatoid arthritis induction. The RA and RAOV groups were immunized and then were injected with Met-BSA in the tibiotarsal joint. After 15 days of intra-articular injections with Met-BSA the animals of groups RAEX and RAOVEX were subjected to the RE and after six hours from workout were euthanized. **Results:** The rheumatoid arthritis induced reduction in cross-sectional areas (CSA) of gastrocnemius muscle fibers. The RAOV group showed a lower CSA of gastrocnemius muscle fibers compared to RA and CT-Sham groups. Skeletal muscle IGF-1 and atrogin-1 mRNA was increased in arthritics and ovariectomized rats. The increased IGF-1 mRNA was higher in OV group than in the RA and RAOV groups, but the atrogin-1 level was higher in RAOV group when compared to other arthritic groups. Atrogin-1 mRNA was also increased in the gastrocnemius muscle of arthritic and ovariectomized rats. However, the increased atrogin-1 mRNA was higher in RAOV groups than in the RA and OV groups. Gastrocnemius muscle MuRF-1 mRNA was increased in the OV and RAOV groups, but not in the RA and Sham groups. However, the RAOV group showed higher MuRF-1 mRNA than the OV group. The increased atrogin-1 and MuRF-1 mRNA level was lower in RAOVEX group than RAOV group when compared to other groups. The myostatin gene expression was similar in all groups except to RAOVEX, which was lower when compared to other groups. **Conclusion:** Loss of ovarian function results in increased loss of skeletal muscle-related ubiquitin ligases (atrogin-1 and MuRF-1) in arthritic rats.

However, the acute RE reduces the atrogen-1, MuRF-1 and myostatin mRNA levels in muscle of arthritic rats affected by loss of ovarian function.

Keywords: Cachexia. Rheumatoid arthritis. E₃ ubiquitin ligase. Ovariectomy. Resistance exercise.

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

Figura

- 1 - Manifestações externas da artrite reumatoide..... 39
- 2 - Área de secção transversa do gastrocnêmio..... 40
- 3 - RNAm dos genes alvo..... 41

Artigo 2

Figura

- 1 - Concentração de estradiol..... 65
- 2 - Área de secção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio..... 66
- 3 - Volume de treino nos grupos que realizaram sessão aguda de exercício de força..... 67
- 4 - Correlações dos genes alvos com o volume de treino..... 68

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela

1 - Desenho dos <i>Primers</i> para qPCR.....	37
2 - Característica da amostra.....	38

Artigo 2

Tabela

1 - Desenho dos <i>Primers</i> para qPCR.....	61
2 - RNAm dos genes alvos e citocinas.....	62
3 - Característica da amostra.....	63

LISTA DE SIGLAS

- $\Delta\Delta C_T$ – Delta delta CT (*thresholdcycle*)
- Akt – Proteína quinase B
- AMP – Adenosina monofosfato
- AR – Artrite Reumatoide
- AREX – Grupo Artrite Reumatoide e Exercício
- AROV – Grupo Artrite Reumatoide e Ovariectomizado
- AROVEX – Grupo Artrite Reumatoide, Ovariectomizado e Exercício
- AST – Áreas de secção transversa
- Ca⁺⁺ – Cálcio
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CFA – Adjuvante Completo de Freud
- CT – (*thresholdcycle*)
- CT-Sham – Grupo Controle Sham
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- DEPC – Dietilpirocarbonato
- DMO – Densidade mineral óssea
- E₁ – Enzima ativadora de Ubiquitina
- E₂ – Enzima conjugadora de Ubiquitina
- E2 – Estradiol
- E₃ – Enzima ligante de Ubiquitina
- EDTA – Ácido diaminotetracético
- EF – Exercício de força
- F/F – Fina/Fina
- FOXO – (*forkhead box O*)
- GAPDH – Gliceraldeído3-fosfato-desidrogenase
- Grupo AR – Grupo Artrite Reumatoide
- H&E – Hematoxilina e Eosina
- IGF-1 – (*Insulin Like Growth Factor 1*) Fator de crescimento semelhante à insulina
- PME – Perda de músculo esquelético
- PFO – Perda da função ovariana
- IL-6 – Interleucina-6

IPON – Instituto de pesquisa em oncologia
MAF-bx – (*Muscle Atrophy F-box*)
MC – Massa corporal
Met-BSA – Albumina Bovina Metilada
MuRF-1 – (*Muscle Ring Finger-1*)
NF- κ B – Fator de transcrição nuclear kappa B
°C – Grau célsius
OV – Grupo Ovariectomizado
PC – Peso corporal
PCR – Reação em cadeia de polimerase
PPGEF – Programa de Pós-Graduação em Educação Física
qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantitativa
R/R – Romba/Romba
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
RPM – Rotações por minuto
SMAD – (*Small Mothers Against Decapentalplegic*) proteína homóloga mãe contra decapentaplégico
TGF- β – (*Transforming growth factor-beta*) fator de crescimento transformante Beta
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro
UFU – Universidade Federal de Uberlândia
US\$ – Dólar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 ARTRITE REUMATOIDE E MASSA MUSCULAR	20
1.2 ARTRITE REUMATOIDE E MECANISMOS DE REDUÇÃO DE MASSA MUSCULAR	21
1.3 RESPOSTAS DO EXERCÍCIO DE FORÇA NOS MECANISMOS ASSOCIADOS À REDUÇÃO DA MASSA MUSCULAR.....	23
1.4 PAPEL DO ESTROGÊNIO NAS ADAPTAÇÕES DO MÚSCULO ESQUELÉTICO E EXERCÍCIO.....	25
2 ARTIGOS PRODUZIDOS	27
2.1 ARTIGO1: PERDA DA FUNÇÃO OVARIANA RESULTA EM PERDA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO AUMENTADA EM RATOS ARTRÍTICOS	27
2.2 ARTIGO 2: EXERCÍCIO DE FORÇA AGUDO REDUZ A EXPRESSÃO DE GENES QUE INDUZEM A ATROFIA MUSCULAR DE RATAS ARTRÍTICAS OVARIETOMIZADAS	50
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICES	91
APÊNDICE A: METODOLOGIA EXPANDIDA	91
APÊNDICE B: MATERIAIS	108
ANEXOS	110
ANEXO A: ARTIGO 1 – LOSS OF OVARIAN FUNCTION RESULTS IN INCREASE OF SKELETAL MUSCLE IN ARTHRITIC RAST (Normas da revista - RBGO).....	110
ANEXO B: ARTIGO 2 - ACUTE RESISTANCE EXERCISE REDUCES INCREASED GENE EXPRESSIONS IN MUSCLE ATROPHY OF OVARIETOMIZED ARTHRITIC RAT (Normas da revista – RBR).....	131
ANEXO C: PROTOCOLO CEUA	156
ANEXO D: ACEITE DO PEDIDO DE EXTENSÃO DO PROTOCOLO CEUA	157

1 INTRODUÇÃO

No contexto das doenças reumáticas, a artrite reumatoide (AR) é caracterizada como uma doença inflamatória crônica, autoimune, progressiva e de etiologia desconhecida, levando à incapacidade grave e mortalidade prematura (ALETAHA et al., 2010; KOURILOVITCH et al., 2014). A AR apresenta alto custo financeiro (US\$ 2.423,51/paciente/ano), afetando de 0,1-0,5% dos brasileiros, predominantemente mulheres entre 30 e 50 anos (ALAMANOS, YANNIS; DROSOS, 2005a; AZEVEDO et al., 2008; MOTA et al., 2012; SENNA et al., 2004; VAN DER WOUDE et al., 2009).

Um dos sintomas da AR é a dor articular, levando o indivíduo a uma condição forçada de inatividade física (desuso) que tem como consequência a perda da massa muscular (BROOKS; MYBURGH, 2014; GOLDBERG et al., 1975; NARICI; DE BOER, 2011). A quantidade de massa muscular é dependente da relação entre a síntese (anabolismo) e a degradação (catabolismo) de suas proteínas. O desuso promove desequilíbrio nos mecanismos miogênicos e proteolíticos que regulam o remodelamento muscular, favorecendo a degradação e, conseqüentemente, a perda de massa muscular (ROCHA et al., 2009). Dentre as vias de degradação proteica, o sistema ubiquitina-proteossoma (representado parcialmente pelas enzimas MAFbx e MuRF-1) é tido como o principal caminho de degradação de proteínas miofibrilares (CIECHANOVER, 1998).

A alta plasticidade do músculo permite alterar suas características estruturais e funcionais em consequência de estímulos metabólicos (ex. hipóxia, influxo de Ca^{++} , AMP e estresse térmico), hormonais (ex. IGF-1 e miocinas), nutricionais (ex. fornecimento de substrato) e/ou mecânicos (ex. tensão) (FLÜCK; HOPPELER, 2003; PEDERSEN, 2013; PETTE; STARON, 2001). Neste contexto, exercício de força (EF), conhecido também como exercício contrarresistência, exercício com pesos ou musculação, é um potente estímulo capaz de promover o aumento da massa muscular (hipertrofia) compensatória mediante processos mecânicos e metabólicos (PEDERSEN, 2013; SPIERING et al., 2008). Poucos estudos verificaram o efeito do EF no músculo esquelético de indivíduos com AR.

Recentemente, alguns pesquisadores mostraram que o EF pode aumentar a massa, força e resistência musculares em pessoas com artrite reumatoide (LEMMEY et al., 2009; STRASSER et al., 2011). Todavia, este processo depende de inúmeras vias de regulação da proteólise muscular e da miogênese.

Diversos fatores controlam o processo de hipertrofia compensatória. O estrogênio é considerado elemento importante na hipertrofia compensatória do músculo esquelético (DIELI-CONWRIGHT, CHRISTINA M et al., 2009b; ELIAKIM; NEMET, 2010; FRYSTYK, 2010; MANGAN et al., 2014; TIIDUS, PETER M et al., 2013b), principalmente, na recuperação após desuso (MCCLUNG et al., 2006; TIIDUS, PETER M et al., 2013b). Pesquisadores mostram que o estrogênio parece potencializar vias de sinalização que induzem a síntese e atenuam a degradação de proteínas musculares (DIELI-CONWRIGHT, CHRISTINA M et al., 2009b; MANGAN et al., 2014; OLIVIERI et al., 2014). Nesse sentido, a falta desse hormônio (menopausa ou ovariectomia) pode ser um fator determinante no processo de hipertrofia dependente do EF. Assim, compreender o papel do EF sobre marcadores moleculares da progressão da perda da massa muscular durante a AR associada com o hipogonadismo pode favorecer a elaboração de novas intervenções terapêuticas para melhorar o desempenho físico e a qualidade de vida geral da mulher.

Com isso, o objetivo geral deste estudo foi verificar o efeito da perda da função ovariana e do exercício de força agudo sobre a expressão dos genes MAFbx, MuRF-1 e Miostatina no músculo esquelético de ratas artríticas.

Assim, este estudo teve como hipótese geral que a perda da função ovariana acentua a perda da massa muscular por meio do aumento do sistema ubiquitina-proteosoma e que uma sessão de EF é capaz de normalizar a expressão gênica de MAFbx, MuRF-1 e Miostatina em ratas menopausadas induzidas à AR.

1.1 ARTRITE REUMATOIDE E MASSA MUSCULAR

A AR é considerada uma doença inflamatória crônica, cujas alterações no tecido conjuntivo refletem principalmente sobre o sistema articular, caracterizada por dores, inchaço e rigidez, que ocorrem em consequência de deformidade e destruição das articulações (SMITH; ARNETT JR, 1991). De acordo com Alamanos e Drosos (2005), a artrite reumatoide é de duas a três vezes mais prevalentes em mulheres na faixa etária entre 30-60 anos. Mulheres com artrite reumatoide apresentam: incapacidade física após vinte anos do surgimento da doença; redução da expectativa de vida entre três a 10 anos (ALAMANOS, YANNIS; DROSOS, 2005a; CHALLAL et al., 2015); chances maiores de infarto do miocárdio e outras doenças cardiovasculares como isquemia e aterosclerose (HOLLAN et al., 2013; METSIOS et al., 2014; METSIOS et al., 2008); chances maiores (20 vezes) de morte por infecção (WOLFE et al., 1994), culminando em índices de morbimortalidade elevados comparados à população geral (CHALLAL et al., 2015; DADOUN et al., 2013; SOUBRIER et al., 2014).

A alta atividade da doença (dor e inflamação) e, conseqüentemente, a imobilidade física (desuso) estão associados com a redução na massa e força musculares. Por exemplo, Yamada et al. (2015) mostraram reduções de 42% e 35% na força específica e na massa do sóleo de ratos artríticos, respectivamente, comparados aos controles sem AR (HELLIWELL; JACKSON, 1994; YAMADA et al., 2015). Estes resultados são também observados em humanos (BREEN et al., 2013; BROOKS et al., 2008; GLOVER et al., 2008; PHILLIPS, SM et al., 2009). Porém, esta redução parece ser mais acentuada em mulheres. Häkkinen et al. (2006) mostraram que mulheres artríticas apresentaram força de preensão (48%), força de extensão do joelho (46%), força de extensão de tronco (54%), e força de flexão do tronco (43%) mais baixa que em homens artríticos.

A redução da massa muscular promove conseqüências sérias à saúde, tais como quedas, baixa densidade mineral óssea (DMO) e, conseqüentemente, fraturas (BAKER et al., 2013; BAKER et al., 2014; HOOYMAN et al., 1984; ORSATTI et al., 2011; VIS et al., 2013). Hooyman et al. (1984) mostraram que

pacientes artríticos com idade acima de 40 anos têm o risco de fratura óssea aumentado em 150%. No entanto, especificamente para as vértebras, o risco de chance de fratura é aumentado de 1,7 (ØRSTAVIK et al., 2004) a 2,3 (DE NIJS et al., 2001; SPECTOR et al., 1993), podendo chegar até 6,2 vezes (PEEL et al., 1995). Além disso, 30% dos pacientes idosos com AR apresentam fraturas vertebrais no primeiro ano da doença (URSUM et al., 2009).

Sendo assim, o músculo esquelético desempenha papel significativo na qualidade de vida e é essencial para a saúde e sobrevivência do indivíduo com AR. Portanto, é importante investigar condições que estejam associadas à manutenção da massa muscular em pessoas com AR.

1.2 ARTRITE REUMATOIDE E MECANISMOS DE REDUÇÃO DE MASSA MUSCULAR

São três as principais vias de degradação de proteína muscular, a autofágica, as proteases ativadas por cálcio (calpaína e caspases), e a ubiquitina-proteossoma. Este último é a principal via de degradação das proteínas miofibrilares (BODINE; LATRES; et al., 2001; BROOKS; MYBURGH, 2014; CIECHANOVER, 1998; PURINTRAPIBAN et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2012).

Para que a via ubiquitina-proteossoma seja desencadeada, 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. Duas enzimas ligantes de ubiquitina (E₃) foram identificadas no músculo esquelético, as quais estão relacionadas ao processo de atrofia, são elas: a atrogina-1 ou *Muscle Atrophy F-box* (MAF-bx) e *Muscle Ring Finger-1* (MuRF-1) (TEIXEIRA et al., 2012).

MAFbx e MuRF-1 são expressas principalmente no músculo esquelético e reguladas positivamente em vários modelos de perda de massa muscular (BODINE; LATRES; et al., 2001; GOMES et al., 2001). MAFbx e MuRF-1 foram

primeiramente identificadas na atrofia de camundongos após jejum ou imobilização em experimentos publicados por Bodine et al. (2001) e Gomes et al. (2001). Já camundongos nocauteados para MAFbx e MuRF-1 apresentam massa muscular preservada em 56% e 36%, respectivamente, após 14 dias de denervação comparados à camundongos selvagens (BODINE; LATRES; et al., 2001). Além disso, a expressão de MuRF-1 e MAFbx aumentam rapidamente em diversos modelos de atrofia (FOLETTA et al., 2011), sugerindo que MAFbx e MuRF-1 são marcadores precoces de atrofia por desuso.

MuRF-1 e MAFbx compartilham um fator de transcrição denominado de *forkhead box O* (FOXO). Quando FOXO é desfosforilado, este entra no núcleo e atua regulando positivamente a expressão gênica de MuRF-1 e MAFbx (CARLSSON; MAHLAPUU, 2002; RAMASWAMY et al., 2002; SANDRI et al., 2004). Sandri e colaboradores mostraram que animais modificados geneticamente para superexpressarem FOXO tiveram reduções acima de 40% na massa muscular (SANDRI et al., 2006). Contudo, o fator nuclear kappa B (NF- κ B), a proteína homóloga mãe contra decapentaplégico (SMAD) e proteína quinase b ou Akt também regulam os genes de MuRF-1 e MAFbx. Enquanto o NF- κ B atua diretamente na transcrição dos genes de MuRF-1 e MAFbx, a Akt inibe as funções de transcrição do FOXO, fosforilando-o e impedindo sua entrada no núcleo celular. Já SMAD inibe Akt que por sua vez não fosforila FOXO, permitindo a entrada de FOXO no núcleo e promovendo a transcrição de MuRF-1 e MAFbx.

No processo de atrofia dependente da AR podemos indicar três caminhos pelos quais a MuRF-1 e MAFbx podem ser aumentada. (1) Pelo aumento do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), (2) pelo aumento da miostatina e (3) pela inibição de Akt. (1) A inflamação na AR tem como agente central o TNF- α produzido, principalmente, por macrófagos, monócitos e linfócito T (RALL, L.; ROUBENOFF, 2004a; SCOTT et al., 2010). O TNF- α desencadeia a ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), aumentando a expressão gênica de MuRF-1 e MAFbx, promovendo atrofia no músculo esquelético (LLOVERA et al., 1997; LONDHE; GUTTRIDGE, 2015; MACHIDA; BOOTH, 2004). (2) Aumento no nível de miostatina muscular é observado após indução de inflamação nas articulações.

A miostatina, um membro da família do fator de crescimento transformante (TGF) - β que regula negativamente o crescimento do músculo esquelético (MCCROSKERY et al., 2003; MCFARLANE et al., 2006), é associada com a ativação de genes de ubiquitina ligases E₃ no músculo via a ativação de SMAD (MCFARLANE et al., 2006; RODRIGUEZ et al., 2014). (3) Como já é bem postulado na literatura, o exercício aumenta a ativação da Akt (BAAR; ESSER, 1999; BODINE; STITT; et al., 2001; DREYER et al., 2006; KUMAR; ATHERTON; et al., 2009). Assim, durante o desuso na AR a Akt está diminuída. Portanto, o desuso pode promover aumento das ubiquitinas MuRF-1 e MAFbx por intermédio da inibição da Akt e, conseqüentemente, ativação de FOXO (FAVIER et al., 2008). Em seres humanos, após 5 dias de imobilização os níveis de transcrição de MAFbx e MuRF-1 são aumentados em 48% e 56% respectivamente (DIRKS et al., 2014).

1.3 RESPOSTAS DO EXERCÍCIO DE FORÇA NOS MECANISMOS ASSOCIADOS À REDUÇÃO DA MASSA MUSCULAR

Dentre as capacidades de adaptação do músculo esquelético, estímulos como: hipóxia, influxo de Ca⁺⁺, estresse térmico, fornecimento de substrato, respostas hormonais, atividade contrátil (exercício de endurance, estimulação elétrica e denervação) e/ou mecânicos (treinamento de força e tensão) (FLÜCK; HOPPELER, 2003; PETTE; STARON, 2001) afetam a síntese e degradação de proteína do músculo esquelético. O desequilíbrio da relação entre síntese e degradação determina a atrofia ou hipertrofia (FLÜCK; HOPPELER, 2003; ROCHA et al., 2009). Por exemplo, Dirks et al. (2014) mostraram que desuso muscular por imobilização do membro resultou em perda de AST de 3,5%, com conseqüente aumento das atroginas MAFbx, MuRF-1 e Miostatina. Porém, não foram observadas alterações significativas na AST do grupo submetido à estimulação elétrica neuromuscular, chegando a apresentar redução nos níveis das atroginas MAFbx, MuRF-1 e Miostatina. Portanto, enquanto o desuso parece desequilibrar a relação (síntese/degradação) a favor da degradação (via sistema

ubiquitina-proteossoma), induzindo a atrofia, a atividade contrátil e/ou mecânica parece recuperar o equilíbrio entre a relação, diminuindo a degradação e mantendo a massa muscular.

Embora o exercício seja considerado um promotor do crescimento muscular por meio de aumentos na síntese de proteínas em indivíduos saudáveis (BODINE; STITT; et al., 2001; KUMAR; ATHERTON; et al., 2009; SPIERING et al., 2008; YE et al., 2013), em indivíduos doentes, onde a degradação está acentuada, a manutenção da massa muscular ocorre, principalmente, pela atenuação da via catabólicas (BODINE; LATRES; et al., 2001; DIRKS et al., 2014; SANDRI et al., 2006; TANNER et al., 2015; TIDBALL, 2005; TINTIGNAC, LIONEL A et al., 2005b).

Como já descrito anteriormente o bloqueio das ubiquitinas leva a atenuação da perda de massa muscular. Um estudo realizado com miotubos induzidos à atrofia por dexametasona (redução de 40% no diâmetro dos miotubos) e privação de nutrientes (redução de 60% no diâmetro dos miotubos) mostrou que houve maior ativação da FOXO, juntamente com um aumento de duas vezes e meia na expressão gênica da MAFbx (SANDRI et al., 2004). No entanto, quando realizado tratamento destes miotubos com superexpressão de Akt ou IGF-1 houve inibição tanto da FOXO quanto da expressão gênica da MAFbx. Como o EF é um potente estímulo de Akt via IGF-1 (ATHERTON et al., 2005; KUMAR; SELBY; et al., 2009; LÉGER et al., 2006; MAYHEW et al., 2009; VOLPI et al., 2008), este é um dos mecanismos propostos pelo qual o exercício inibe FOXO e conseqüentemente MAFbx e MuRF-1, podendo atenuar a perda ou mesmo manter a massa muscular em condições que favorecem a atrofia muscular (ex. desuso e desnutrição).

Outro caminho de inativação de MAFbx e MuRF-1 pelo exercício resistido é a redução dos níveis de miostatina. Por exemplo, uma sessão de exercício resistido foi capaz de reduzir a expressão gênica da miostatina em até 56%, independentemente do gênero e idade (KIM et al., 2005). Roth e colaboradores mostraram que após nove semanas de treinamento resistido a expressão gênica da miostatina reduziu 73% na musculatura exercitada (ROTH et al., 2003). Dessa forma, o EF parece regular negativamente a expressão gênica da miostatina no

músculo esquelético, se mostrando uma boa intervenção para condições de atrofia dependentes de miostatina elevada.

Contudo, são encontrados poucos estudos que verificaram o efeito do EF sobre os mecanismos de degradação do músculo esquelético em indivíduos com AR. Este fato nos instiga a buscar novos conhecimentos que possibilite melhor compreensão do papel do exercício para indivíduos com AR.

1.4 PAPEL DO ESTROGÊNIO NAS ADAPTAÇÕES DO MÚSCULO ESQUELÉTICO E EXERCÍCIO

Uma série de estudos tem mostrado que a menopausa está associada com perda acelerada de massa e força musculares (KALLMAN et al., 1990; PHILLIPS, SK et al., 1993; SAMSON et al., 2000). Por exemplo, um estudo realizado por McClung e colaboradores (2006) mostrou que a ovariectomia reduziu 44% da massa muscular comparado ao controle. Phillips e colaboradores (1993) mostraram reduções na força de 30% em mulheres idosas quando comparadas a mulheres adultas jovens. Além disso, outros estudos têm indicado que a falta de estrogênio influencia negativamente a força e massa musculares (AUBERTIN-LEHEUDRE et al., 2005; KENNY et al., 2003; MADDALOZZO et al., 2004; TAAFFE et al., 2005).

Essas reduções têm sido relacionadas diretamente com o papel dos hormônios ovarianos sobre os mecanismos de catabolismo muscular. Além disso, Raue e colaboradores (2007) mostraram que mulheres idosas expressaram níveis mais elevados de RNAm para FOXO (56%) e MuRF-1 (42%) em repouso comparado a mulheres jovens. Bergen e colaboradores (2015) mostraram que mulheres mais velhas apresentaram níveis de miostatina 23% mais elevados do que as mulheres jovens. Embora esses estudos não excluam os efeitos do envelhecimento sobre a expressão dos genes associados ao catabolismo muscular, Dieli-Conwright e colaboradores mostraram maiores níveis de expressão de RNAm de miostatina muscular e ubiquitina ligases E₃ (atrofina-1 / MAFbx e MuRF-1) em mulheres pós-menopausadas em relação às mulheres pós-

menopausadas que fizeram reposição hormonal (DIELI-CONWRIGHT, CHRISTINA M et al., 2009b). Além disso, a falta dos hormônios ovarianos pode ter um impacto significativo sobre a recuperação do músculo após o desuso. Sitnick e colaboradores mostraram que a ovariectomia impediu a recuperação (por sobrecarga) da massa muscular após desuso. Este fenômeno foi associado com a falta de ativação de Akt (SITNICK et al., 2006). Portanto, estes estudos estabelecem o papel da falta dos hormônios ovarianos na ativação de vias de degradação ubiquitina-proteossoma levando a perda da massa muscular.

Interessantemente, o EF é uma potente intervenção para aumentar a massa e força musculares em mulheres com hipoestrogenismo (MAESTA et al., 2007; ORSATTI et al., 2008). Dezesesseis semanas de EF promove aumento de 10% na massa muscular em mulheres na pós-menopausa (MAESTA et al., 2007; ORSATTI et al., 2008).

Como a quantidade de massa muscular é determinada pela relação síntese/catabolismo proteico, sugere-se que o estado hipoestrogênico pode interferir nessa relação, acentuando o catabolismo e, conseqüentemente, afetando a quantidade de massa muscular. Portanto, baseado nesta revisão de literatura, parece razoável supor que o estado hipoestrogênico maximiza a expressão gênica da miostatina e E₃ ubiquitina-ligases (Atrogina-1 / MAFbx e MuRF-1) na artrite reumatoide e também interfere com o efeito do EF nas expressões gênicas durante a artrite reumatoide.

Na necessidade de melhor compreensão do processo hipertrófico no músculo esquelético em estados inflamatórios elevados e hipoestrogênico, estudos específicos e mais aprofundados são necessários para avaliar as repercussões advindas do EF em pacientes pós-menopausadas com artrite reumatoide.

2 ARTIGOS PRODUZIDOS

2.1 ARTIGO1: PERDA DA FUNÇÃO OVARIANA RESULTA EM PERDA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO AUMENTADA EM RATOS ARTRÍTICOS¹

RESUMO

Objetivo: foram estudados os efeitos da perda da função ovariana (ovariectomia) sobre áreas de secção transversa (AST) do músculo esquelético e os níveis de RNAm de IGF-1, atrogina-1, MuRF-1, e de miostatina em modelo experimental de artrite reumatoide em ratos. **Métodos:** 24 ratos Wistar (9 semanas, $195,3 \pm 17,4$ gramas) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: controle (CT-Sham, n = 6); artrite reumatoide (AR, n = 6); ovariectomia sem artrite reumatoide (OV; n = 6); ovariectomia com artrite reumatoide (AROV; n = 6). Os procedimentos da ovariectomia (OV e AROV) ou simulação da ovariectomia (CT-Sham ou RA) foram realizados ao mesmo tempo, quinze dias antes da indução da artrite reumatoide. Os grupos RA e AROV foram imunizados e, em seguida, foram injetados com Met-BSA na articulação tibiotársica. Após 15 dias das injeções intra-articulares, os animais foram eutanasiados. Foram avaliadas as manifestações externas da artrite reumatoide (perimetria articular), bem como o peso dos animais e a ingestão de alimentos ao longo do estudo. Além disso, as AST do músculo gastrocnêmio foram analisadas em 200 fibras (método H & E). No músculo gastrocnêmio, a expressão de RNAm foi analisada por PCR quantitativo em tempo real, seguido pelo método Livak ($\Delta\Delta CT$). **Resultados:** a artrite reumatoide reduziu a AST das fibras do músculo gastrocnêmio. O grupo AROV mostrou AST menor nas fibras do músculo gastrocnêmio em comparação com os grupos AR e CT-Sham. O RNAm do IGF-1 do músculo esquelético aumentou nos ratos artríticos e ovariectomizados. O RNAm do IGF-1 foi maior nos grupos OV do que nos grupos AR e AROV. A

¹ O artigo PERDA DA FUNÇÃO OVARIANA RESULTA EM PERDA DE MÚSCULO ESQUELÉTICO AUMENTADA EM RATOS ARTRÍTICOS foi publicado na Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia – RBGO (Anexo A).

expressão de atrogina-1 também aumentou no músculo gastrocnêmio dos ratos artríticos e ovariectomizados. No entanto, o aumento do RNAm da atrogina-1 foi maior no grupo AROV do que nos grupos AR e OV. O RNAm da MuRF-1 aumentou nos grupos OV e AROV, mas não nos grupos AR e CT-Sham. Porém, o grupo AROV apresentou maior expressão gênica de MuRF-1 do que o grupo OV. A expressão do gene da miostatina foi semelhante em todos os grupos. **Conclusão:** a perda de função ovariana resulta em perda de músculo esquelético relacionado às atrogina-1 e MuRF-1 em ratos artríticos.

Palavras-chave: caquexia, artrite reumatoide, E3 ubiquitina-ligase, ovariectomia, desuso.

ABSTRACT

Objective: We studied the effects of loss of ovarian function (ovariectomy) on muscle mass of gastrocnemius and the mRNA levels of IGF-1, atrogin-1, MuRF-1, and myostatin in an experimental model of rheumatoid arthritis in rats. **Methods:** 24 female Wistar rats (9 weeks, 195.3 ± 17.4 grams) were randomly allocated into four groups: control (CT-Sham; n = 6); rheumatoid arthritis (RA; n = 6); ovariectomy without rheumatoid arthritis (OV; n = 6); ovariectomy with rheumatoid arthritis (RAOV; n = 6). The ovariectomy (OV and RAOV) or Sham (CT-Sham or RA) procedures were performed at the same time, fifteen days before the rheumatoid arthritis induction. The RA and RAOV groups were immunized and then were injected with Met-BSA in the tibiotarsal joint. After 15 days of intra-articular injections the animals were euthanized. We evaluated the external manifestations of rheumatoid arthritis (perimeter joint) as well as animal weight, food intake throughout the study. Also, the cross-sectional areas (CSA) of gastrocnemius muscle fibers were analyzed in 200 fibers (H&E method). In the gastrocnemius muscle, mRNA expression was analyzed by quantitative real time PCR followed by Livak method ($\Delta\Delta CT$). **Results:** The rheumatoid arthritis induced reduction in CSA of gastrocnemius muscle fibers. The RAOV group showed a lower CSA of gastrocnemius muscle fibers compared to RA and CT-Sham groups.

Skeletal muscle IGF-1 mRNA was increased in arthritics and ovariectomized rats. The increased IGF-1 mRNA was higher in OV groups than in the RA and RAOV groups. Atrogin-1 mRNA was also increased in the gastrocnemius muscle of arthritic and ovariectomized rats. However, the increased atrogin-1 mRNA was higher in RAOV groups than in the RA and OV groups. Gastrocnemius muscle MuRF-1 mRNA was increased in the OV and RAOV groups, but not in the RA and Sham groups. However, the RAOV group showed higher MuRF-1 mRNA than the OV group. The myostatin gene expression was similar in all groups. **Conclusion:** Loss of ovarian function results in increased loss of skeletal muscle-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF-1 in arthritic rats.

Key words: Cachexia, rheumatoid arthritis, E3 ubiquitin ligase, ovariectomy, desuse.

INTRODUÇÃO

A perda de músculo esquelético (PME) é postulada um importante contribuinte para o aumento da morbidade e mortalidade (VON HAEHLING; ANKER, 2014). Portanto, a PME é uma consequência grave da artrite reumatoide (VON HAEHLING; ANKER, 2014), especialmente em mulheres (ALAMANOS; DROSOS, 2005). A natureza complexa da PME induzida pela artrite reumatoide está associada com a inflamação crônica, resistência à insulina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) -1 e baixos níveis de atividade física (RALL; ROUBENOFF, 2004). Embora esses distúrbios tenham sido amplamente investigados, ainda existem lacunas na compreensão do papel regulador da perda da função ovariana (PFO) na progressão da PME durante a artrite reumatoide. A PFO pode contribuir diretamente para a PME e também através da interação com a inflamação (TIIDUS; LOWE; BROWN, 2013). Embora estudos anteriores tenham demonstrado o papel potencialmente nocivo da PFO na PME, eles ficam aquém em replicar o ambiente sistêmico criado pela artrite reumatoide. Desde que as mulheres progridem naturalmente para a menopausa ou podem ser submetidas à ovariectomia, uma melhor compreensão dos efeitos da PFO na PME durante a

artrite reumatoide e suas vias regulatórias poderiam identificar novos alvos terapêuticos.

O tratamento com estrogênio tem sido descrito aumentar a recuperação de massa muscular após a lesão ou a atrofia em roedores e também manter a massa muscular em mulheres na pós-menopausa (TIIDUS et al., 2013). Quanto aos mecanismos no músculo esquelético que são influenciados pelo estrogênio, Dieli-Conwright et al. relataram maiores níveis de expressão de RNAm de miostatina e ubiquitina-ligase E3 (atrogina-1 / MAFbx e MuRF1) em mulheres pós-menopausadas quando comparadas às mulheres pós-menopausadas que fizeram reposição hormonal (DIELI-CONWRIGHT et al., 2009b;2012). A miostatina é um membro da família do fator de crescimento transformante (TGF) β que regula negativamente o crescimento do músculo esquelético através da inibição da ativação de células satélite (MCCROSKERY et al., 2003). A miostatina é associada com a ativação de genes da ubiquitina-ligase E3 no músculo esquelético (MCFARLANE et al., 2006). As ubiquitina-ligases E3 provocam a degradação de proteínas pelo proteossoma 26S e tem sido descritas como indutoras de atrofia no músculo esquelético (BODINE et al., 2001). Estes resultados evidenciam o papel benéfico do estrogênio sobre o músculo esquelético, o que sugere que a PFO pode induzir aumento de miostatina, atrogina-1 e MuRF-1, causando a atrofia muscular. Neste contexto, parece razoável supor que a PFO é extremamente prejudicial para o músculo esquelético na artrite reumatoide.

A PME na artrite reumatoide também tem sido associada com o aumento da expressão do gene IGF-1 no músculo (CASTILLERO et al., 2009; LOPEZ-MENDUINA et al., 2010;2012). Como o IGF-1 é bem conhecido por ser um estimulador importante do crescimento do músculo esquelético, o aumento de IGF-1 durante a artrite reumatoide pode ser uma tentativa de mitigar a atrofia muscular (TIDBALL, 2005; YE et al., 2013). Um link entre estrogênio e regulação positiva da sinalização de IGF-1 associado à manutenção da massa muscular tem sido estabelecido na PFO. Tratamentos com agonistas do receptor de estrogênio em roedores ovariectomizados (VELDERS et al., 2012) e reposição de estrógeno

em mulheres pós-menopausadas (AHTIAINEN et al., 2012) foram descritos aumentar e manter massa muscular dependente do aumento do IGF-1, respectivamente. No entanto, embora estes estudos sugiram que a PFO pareça estar associada com a regulação negativa do IGF-1, foi relatada que a ovariectomia em ratos aumenta a expressão do IGF-1 e a massa muscular e estas alterações foram revertidas pela reposição de estrogênio (TSAI et al., 2007). Além disso, um estudo recente relatou que a suplementação de estrogênio reduz os níveis musculares de IGF-1 em ratos ovariectomizados (MANGAN et al., 2014). Portanto, a PFO ligada à atrofia muscular via diminuição de IGF-1 ainda permanece pouco esclarecida.

Embora a PFO foi amplamente referida com promotora de um ambiente molecular catabólico no músculo esquelético, o papel da PFO durante a progressão da artrite reumatoide não foi estabelecido. Assim, para resolver este problema, foram estudados os efeitos da ovariectomia sobre a massa muscular do gastrocnêmio e os níveis de RNAm do IGF-1, atrogina-1, Murf-1, e miostatina em modelo experimental de artrite reumatoide (artrite induzida por adjuvante) em ratos. Este artigo esclarece as respostas moleculares do músculo esquelético para a PFO durante a artrite reumatoide.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo experimental estava em conformidade com o Guia Nacional de Cuidados e Uso de Animais [Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)] e obteve a aprovação do Comitê de Ética da Universidade (nº 274/2014). Todos os procedimentos foram realizados no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Ratos Wistar fêmeas ($195,3 \pm 17,4$ gramas), com nove semanas de idade foram utilizados no presente estudo. Os ratos foram alojados em gaiolas de plástico em condições normais a 22°C, ciclo de 12 horas claro/escuro, e tiveram acesso livre (ad libitum) para água e comida padrão (Nuvilab-CR1, Curitiba, PR, Brasil). Quatro grupos experimentais foram usados neste estudo: controle (CT-

Sham; n = 6); grupo com artrite reumatoide (AR, n = 6); ovariectomia sem artrite reumatoide (OV; n = 6); ovariectomia com artrite reumatoide (AROV; n = 6). Todos os ratos foram tratados de modo semelhante, em termos de manipulação diária. Os procedimentos de ovariectomia (OV e AROV) ou simulação (CT-Sham ou AR) foram realizados ao mesmo tempo, quinze dias antes da indução da artrite reumatoide. Os grupos AR e AROV foram imunizados e, em seguida, foram injetados com albumina bovina metilada (Met-BSA) na articulação tibiotarsal. Quinze dias após a injeção intra-articular, todos os animais foram eutanasiados no mesmo período do dia e hora. As amostras de músculo gastrocnêmio da pata traseira esquerda foram removidas, limpas, pesadas, e a sua porção branca foi obtida e armazenada em TRIzol a -80°C para análise molecular. Nós investigamos a parte branca do gastrocnêmio porque possui mais fibras de contração rápida.

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal contendo solução de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para os procedimentos de ovariectomia. A ovariectomia foi realizada por uma única incisão ventral transversal de 0,4-0,6 cm na região abdominal média de acordo com o método descrito por Khajuria et al. (KHAJURIA; RAZDAN; MAHAPATRA, 2012).

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal contendo solução de quetamina (40 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) para os procedimentos de indução da artrite reumatoide. Inicialmente, os ratos foram imunizados com duas injeções subcutâneas de 50 µL. Met-BSA (40 mg/mL) diluída em glicose a 5% emulsificada com adjuvante completo de Freund (CFA) (contendo 1mg/mL de bactéria *Tuberculosis inativada*) na base da cauda, com intervalo de sete dias entre as injeções. Depois de sete dias a partir da última injeção na base da cauda, uma injeção intra-articular de 25 µL de Met-BSA, CFA e glicose a 5% foi aplicada nas articulações tibiotarsais (BAR et al., 2004).

O edema articular, o peso corporal e a ingestão de alimentos foram examinados semanalmente após a segunda injeção subcutânea. A avaliação da gravidade da artrite foi realizada através da medição do edema articular de cada animal. O edema articular foi avaliado pelo tamanho de espessura látero-lateral da articulação do tarso com paquímetro analógico (Starfer, São Paulo, SP, Brasil)

(FILIPPIN et al., 2013). O edema articular foi calculado como a média aritmética das duas patas traseiras.

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal contendo solução de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A eutanásia foi realizada por punção cardíaca e choque hipovolêmico.

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca em sistema a vácuo (Vacutainer®, Inglaterra) dentro de um tubo seco com gel separador. O sangue foi centrifugado durante 10 minutos (3.000 rpm) e as amostras foram separadas e armazenadas (-20°C) para análises futuras. O estradiol sérico (MyBiosource, San Diego, CA, EUA) foi analisado por imunoenensaio enzimático ELISA. Todos os ensaios foram realizados em conformidade com o protocolo do fabricante.

As amostras do músculo gastrocnêmio (50-70 mg) foram extraídas da porção branca. A extração do RNA total foi realizada utilizando TRIzol (Sigma-Aldrich, Sto Louis MO, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Depois da extração, o sedimento seco foi ressuspense em água livre de RNase, tratada com DNase I (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para remover qualquer possível presença de DNA na amostra. O RNA total foi quantificado utilizando fluorímetro de alta precisão, Qubit 2,0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e kit RNA BR Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Todas as amostras tinham concentrações de RNA entre 20-100 ng/mL. Quando valores mais altos de RNA foram encontrados, as amostras foram diluídas em água livre de RNase.

A quantificação de RNAm foi obtida pelo aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) usando kits Quantifast SYBR Green RT-PCR one-step (QIAGEN, Hilden, Germany). Assim, 1µl das amostras de RNA tratadas com DNase foram adicionadas a uma mistura que continha, 10µl de 2 x Quantifast SYBR GREEN RT-PCR Master Mix, 0,2µl de Quant Fast, 0,6µl de *primer "sense"* e *"anti-sense"* e completadas com água livre de RNase para alcançar o volume de 20µL.

A temperatura e a curva de anelamento foram usadas como medidas de qualidade. As condições de reação do qPCR e ciclos executados no aparelho

7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram as seguintes: 50°C por 10 min, 95°C por 5 min para desnaturação inicial e amplificação de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos para desnaturação e 60°C por 30 segundos para emparelhamento e extensão.

Valores de fluorescência foram obtidos entre os estágios de anelamento / extensão e números de *thresholdcycle* (CT) foram determinados por meio do *Software* SDS versão 1.2.3 (Applied Biosystems, EUA). O RNAm do IGF-1, MuRF1, atrogina-1 e da miostatina foram normalizados para os valores de GAPDH (gene de referência) e calculados pelo método Livak ($\Delta\Delta CT$). Os *primers* para todos os genes (Tabela 1) foram obtidos a partir de estudos anteriores (AGUIAR et al., 2013; CASTILLERO et al., 2009) e construído a partir de sequências publicadas no *GenBank* (www.pubmed.com) para garantir a especificidade das sequências alvo, evitar a geração de estruturas secundárias dos *primers* e a dimerização em cada *primer* e entre *primer sense* e *anti-sense*.

As análises morfológicas foram realizadas a partir de cortes histológicos do gastrocnêmio (espessura 6µm). Os cortes histológicos do gastrocnêmio foram obtidos em um micrótomo (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha) e corados pelo método hematoxilina e eosina (H&E). Os cortes corados foram usados para documentação fotográfica de seis campos histológicos aleatórios (objetiva de 20X) (Nikon Evolucion MP 5,0). Um *software* de análise de imagem (ImageJ 1.46r) foi usado para determinar a área de secção transversa (AST) de 200 fibras por músculo.

Análise Estatística

Os dados foram testados para a distribuição normal utilizando o teste de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância, utilizando o teste de Levene. As variáveis foram comparadas por Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Quando apropriado ($p < 0,05$), o teste *post-hoc* de *rank* dos subgrupos foi feito. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (percentil 25 e 75). Os procedimentos estatísticos foram realizados com *software* estatístico. A significância foi estabelecida em $P < 0,05$.

RESULTADOS

O estradiol circulante foi determinado no fim do estudo, após a eutanásia (i.e. dia 15 após a injeção intra-articular), para assegurar a ovariectomia. As ratas ovariectomizadas apresentaram redução do estradiol. Além disso, o grupo AR também exibiu diminuição de estradiol em relação ao grupo controle (Tabela 2).

No início do estudo (i.e. antes da ovariectomia) o peso corporal não diferiu entre os grupos. No entanto, no meio do estudo (i.e. após a ovariectomia e antes da injeção intra-articular) o peso dos ratos ovariectomizados aumentou em comparação com CT-Sham, enquanto que o peso do grupo AR não aumentou (Tabela 2).

Alterações na espessura articular, no consumo alimentar e no peso corporal foram medidos ao longo da progressão da artrite reumatoide. A espessura articular das ratas artríticas (AR e AROV) aumentou sete dias após injeção intra-articular de Met-BSA em comparação com os grupos OV e CT-Sham (Ht = 19,9; $P < 0,01$). Este aumento na espessura articular foi mantido até o final estudo (no dia 15). Embora a ovariectomia não afetou a magnitude da espessura articular, o grupo AROV apresentou valores de espessura articular mais elevados do que o grupo AR 15 dias após injeção intra-articular (Ht = 20,9; $P < 0,01$) (Figura 1 A). A alteração da ingestão alimentar foi semelhante nos grupos AR e CT-Sham no dia sete (Ht = 14,5; $P < 0,01$). Houve aumento na ingestão alimentar para o grupo OV e redução para o grupo AROV comparado ao grupo CT-Sham. No dia 15, houve redução na ingestão alimentar para o grupo AR em comparação com os grupos CT-Sham, OV e AROV (Ht = 16,5; $P < 0,01$). A alteração na ingestão alimentar do grupo OV foi semelhante ao grupo CT-Sham e o ganho da ingestão alimentar foi mantida no grupo OV (Figura 1 B). No que diz respeito à variação de peso, a artrite reumatoide induziu redução no peso corporal relacionado aos grupos controles (CT-Sham e OV) ($P < 0,01$). Quando os ratos foram divididos em suas condições específicas, não houve diferença entre os grupos no dia sete (Ht = 8,2; $P < 0,01$). No entanto, o grupo AROV mostrou peso corporal mais baixo em

comparação com o grupo controle no dia 15. Além disso, o grupo AR apresentou peso corporal mais baixo em comparação com o grupo OV (Figura 1 C).

Para determinar a atrofia muscular nós avaliamos a área de secção transversa (AST) das fibras do músculo gastrocnêmio (absoluta) em todos os grupos. Quando os grupos foram reunidos (AR + AROV vs CT-Sham + OV), o grupo com artrite reumatoide induziu redução na condição absoluta ($P < 0,01$) e na relativa (AST das fibras corrigido pelo peso corporal) ($P < 0,01$) da AST das fibras musculares do gastrocnêmio (Figura 2; A e B). Quando os grupos foram separados, os ratos artríticos ovariectomizados (AROV) mostraram menor AST absoluta (Ht = 18,7; $P < 0,01$) e relativa (Ht = 18,9; $P < 0,01$), de fibras do músculo gastrocnêmio em comparação com ratos artríticos sem ovariectomia (AR). O grupo OV mostrou AST relativa menor em comparação com o grupo CT-Sham (Figura 2; A e B).

O RNAm do IGF-1 do músculo esquelético aumentou nos ratos artríticos e ovariectomizados (Ht = 14,6; $P < 0,01$). O aumento do RNAm do IGF-1 foi maior no grupo OV do que nos grupos AR e AROV (Figura 3A). A expressão gênica da Atrogina-1 também aumentou no músculo gastrocnêmio de ratos artríticos e ovariectomizados (Ht = 15,9; $P < 0,01$). No entanto, o aumento do RNAm da atrogina-1 foi maior no grupo AROV do que nos grupos AR e OV (Figura 3D). O RNAm de MuRF-1 foi maior nos ratos ovariectomizados, mas não nos ratos artríticos (Ht = 15,9; $P < 0,01$). No entanto, o grupo AROV mostrou valores de RNAm de MuRF-1 maiores que o grupo OV (Figura 3C). A expressão do gene da miostatina foi semelhante em todos os grupos (Ht = 1,9; $P = 0,5$) (Figura 3B).

Tabela 1 – Desenho dos *Primers* para qPCR

Genes	Número (<i>GenBank</i>)	Sequência (5'-3')
IGF-1	NM_178866	S: GCTATGGCTCCAGCATDCG A: TCCGGAAGCAACACTCATCC
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

Tabela 1 – Desenho dos *Primers* usado para mensurar a reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR).

S = *Sense*; A = *Antisense*

Fonte: FURLANETTO JÚNIOR et al., 2016.

Tabela 2 – Característica da amostra

	CT-Sham	OV	AR	AROV	P
Estradiol (pg.mL⁻¹)	53,5 (42,6 - 67,3)	20,4* (16,8 - 23,3)	31,8* (26,6 - 41,8)	35,8* (31,3 - 38,4)	0,003
Peso corporal antes da ovariectomia (g)	185,0 (172,0 - 208,0)	204,5 (192,0 - 220,0)	190,0 (179,0 - 210,0)	198,5 (196,0 - 220,0)	0,227
Peso corporal antes da injeção intra-articular (g)	221,5 (217,0 - 242,0)	269,0* (251,0 - 286,0)	237,0 (230,0 - 256,0)	271,0* (264,0 - 284,0)	0,012
Peso do gastrocnêmio (g)	1,45 (1,33 - 1,55)	1,71* (1,61 - 1,86)	1,10* (0,93 - 1,28)	1,21 (0,96 - 1,42)	0,002
Peso do gastrocnêmio (g) / Peso corporal (g) x 100	0,56 (0,53 - 0,64)	0,60 (0,56 - 0,64)	0,49 (0,45 - 0,55)	0,44* (0,40 - 0,50)	0,013

Tabela 2 - Concentração de estradiol; Peso corporal; Peso do gastrocnêmio (absoluto e relativo) do grupo controle (CT-Sham); Grupo ovariectomizado (OV); Grupo artrítico (AR) e Grupo artrítico com ovariectomia (AROV); n=6 ratos por grupo; os dados são expressos em mediana e intervalo interquartil (25 - 75 percentis), * P <0,05 vs. CT-Sham.

Fonte: FURLANETTO JÚNIOR et al., 2016.

Figura 1 – Manifestações externas da artrite reumatoide

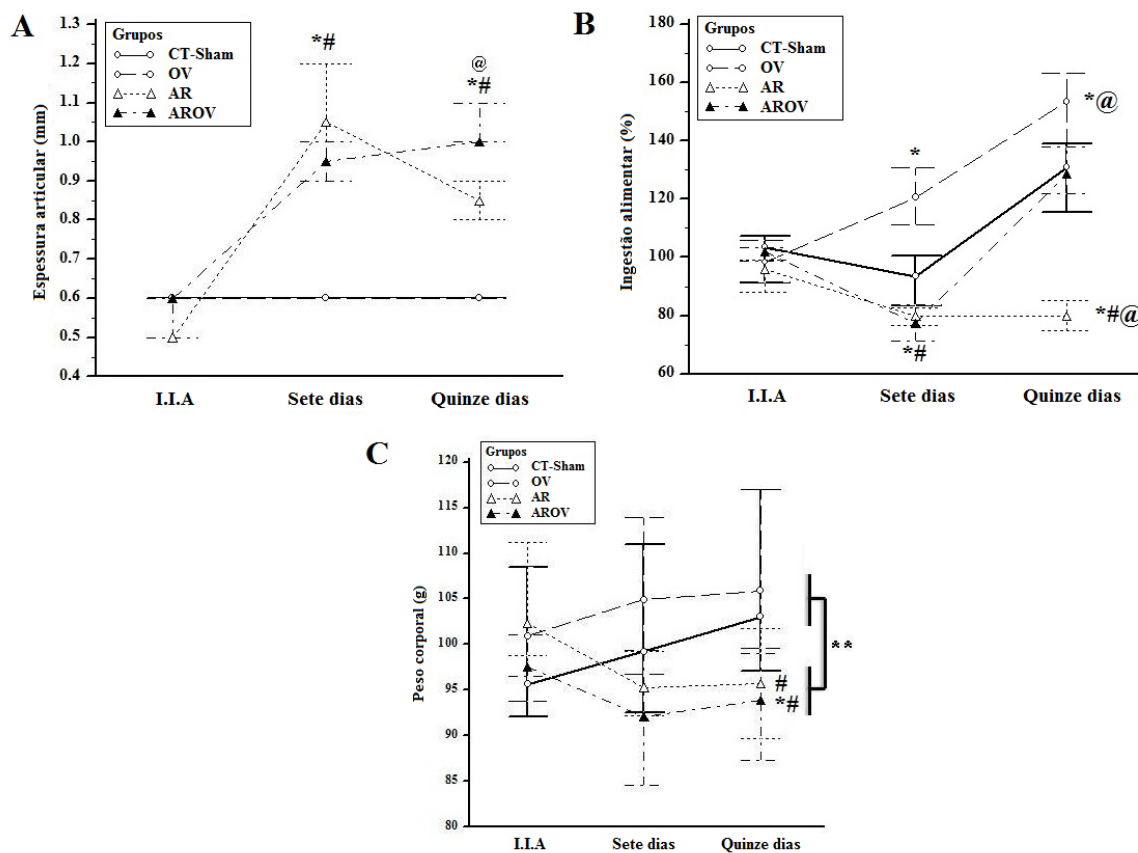


Figura 1 - (A) espessura articular, (B) mudança na ingestão alimentar (%) e (C) mudança do peso corporal (%) no grupo controle (CT-Sham); Grupo ovariectomizado (OV); Grupo artrítico (AR) e Grupo artrítico com ovariectomia (AROV); Imediatamente antes da injeção intra-articular (I.I.A); Sete dias após a injeção intra-articular (sete dias) e quinze dias após a injeção intra-articular (quinze dias). n = 6 ratos por grupo. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 - 75 percentis) * P <0,05 versus CT-Sham, ** P <0,05 vs. grupos AR agrupados, # P <0,05 vs. OV e @ P <0,05 vs. RA.

Fonte: FURLANETTO JÚNIOR et al., 2016.

Figura 2 – Área de secção transversa do gastrocnêmio

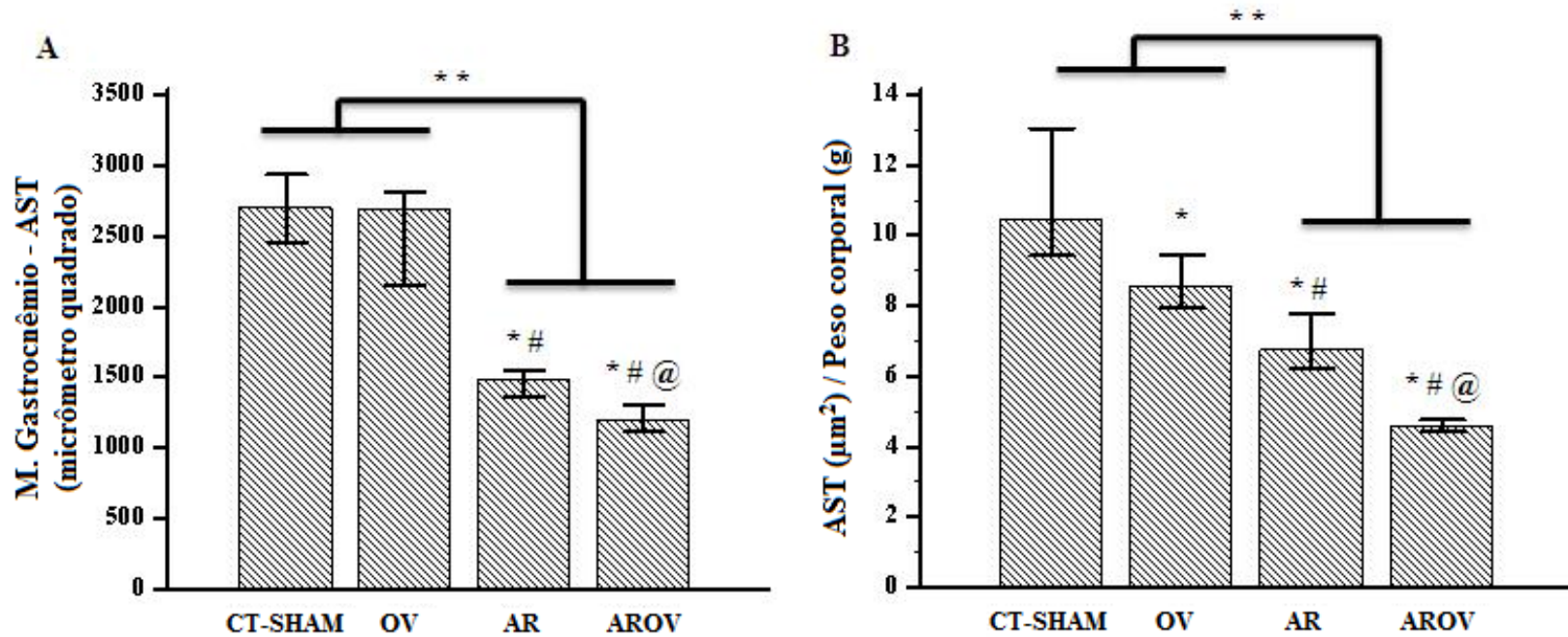


Figura 2 - (A) área de secção transversa (AST) da fibra do músculo gastrocnêmio e (B) AST corrigida pelo peso corporal no grupo controle (CT-Sham); Grupo ovariectomizado (OV); Grupo artrítico (AR) e Grupo artrítico com ovariectomia (AROV); Micrômetro quadrado (μm^2); n = 6 ratos por grupo. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 - 75 percentis); * P <0,05 versus CT-Sham; # P <0,05 vs. OV @ P <0,05 versus AR; ** P <0,05 vs. grupos AR agrupados.

Fonte: FURLANETTO JÚNIOR et al., 2016.

Figura 3 – RNAm dos genes alvos

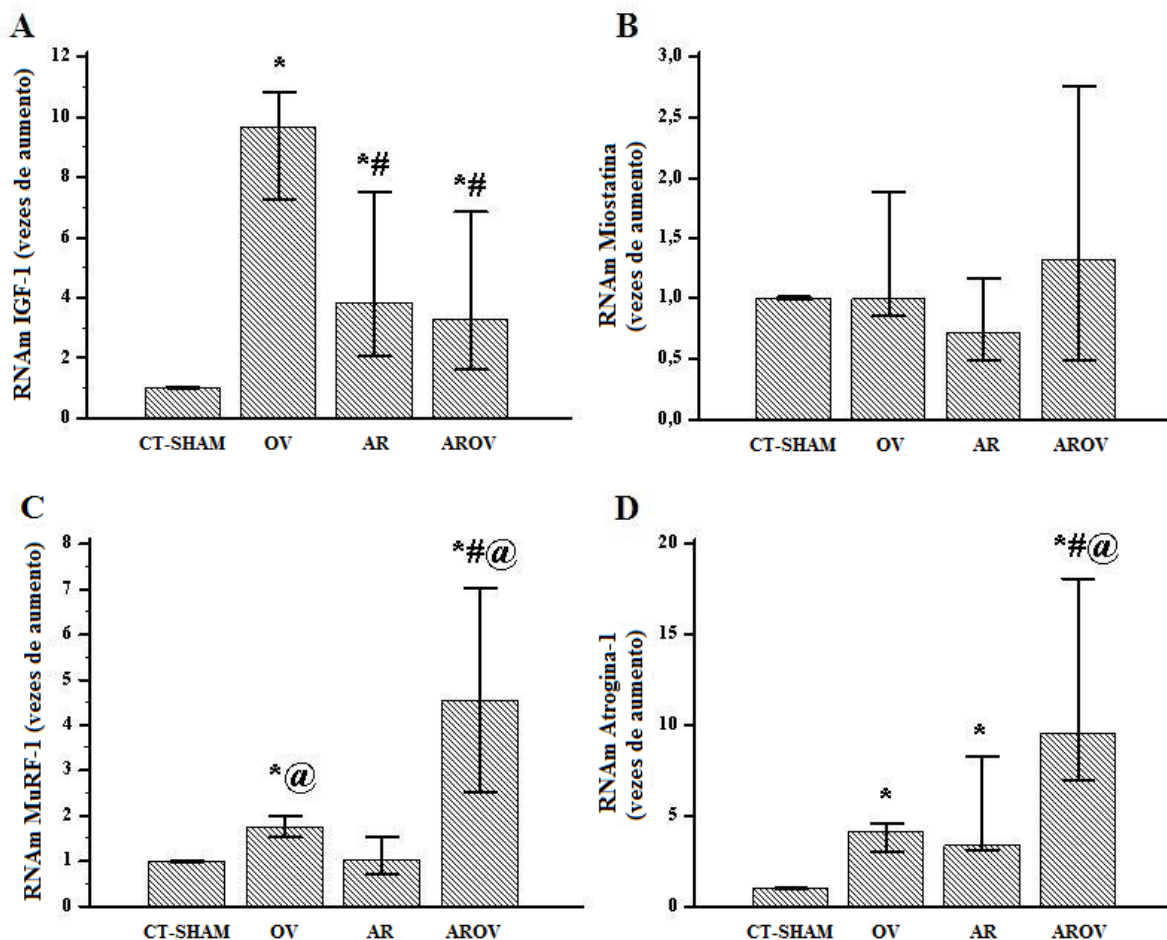


Figura 3 – (A) RNAm do IGF-1; (B) RNAm da Miostatina; (C) RNAm da MuRF-1 e (D) RNAm Atrogin-1 do grupo controle (CT-Sham); Grupo ovariectomizado (OV); Grupo artrítico (AR) e Grupo artrítico com ovariectomia (AROV); n = 6 ratos por grupo. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 - 75 percentis); * P <0,05 versus CT-Sham; # P <0,05 vs. OV @ P <0,05 versus AR.

Fonte: FURLANETTO JÚNIOR et al., 2016.

DISCUSSÃO

A PME induzida pela artrite reumatoide tem sido associada com a inflamação crônica, resistência insulínica e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) -1 e redução da atividade física (RALL; ROUBENOFF, 2004). Embora esses transtornos tenham sido amplamente investigados, ainda existem lacunas na nossa compreensão do papel regulador da PFO na progressão da PME na artrite reumatoide. Como as mulheres progredem naturalmente para a

PFO (menopausa) ou cirurgicamente (ovariectomia), a compreensão do papel da PFO na PME durante a artrite reumatoide e suas vias regulatórias poderiam identificar novos alvos terapêuticos. Assim, no presente estudo testamos os efeitos da ovariectomia na massa muscular do gastrocnêmio e a expressão de genes do IGF-1, atrogina-1, MuRF-1, e da miostatina em modelo experimental de artrite reumatoide (artrite induzida por adjuvante) em ratos. No presente estudo, a concentração de estradiol (Tabela 2) e sinais externos da doença mensurado pela espessura articular mostraram sucesso na indução da ovariectomia e da artrite por Met-BSA (Figuras 1 e 2). Descobrimos que a artrite reumatoide resulta em PME e que a PFO maximiza a PME. Também mostramos que o aumento da PME está associado com um aumento da expressão dos genes da ubiquitina-ligase E3 (atrogina-1 e MuRF-1).

No presente estudo, ratos artríticos (AR + AROV) mostraram redução no peso corporal e AST das fibras do músculo gastrocnêmio quando comparados com ratos sem artrite (CT-Sham + OV). A atrofia induzida pela artrite reumatoide tem sido consistentemente demonstrada em estudos com animais (CASTILLERO et al., 2009; FILIPPIN et al., 2013; LOPEZ-MENDUINA et al., 2010) e em humanos (RALL; ROUBENOFF, 2004). Uma vez que a artrite diminui a ingestão alimentar, a diminuição no músculo esquelético poderia ser secundária à ingestão de alimentos reduzida. No entanto, em ratos artríticos com ovariectomia, que mostraram menor AST da fibra muscular e AST corrigida pelo peso corporal, a ingestão de alimentos aumentou após o dia sete atingindo uma ingestão alimentar semelhante ao controle, na última semana do estudo. De fato, estudos anteriores mostraram que a ovariectomia em roedores induz a hiperfagia (FISHER; KOHRT; BROWN, 2000; SHINODA; LATOUR; LAVOIE, 2002). Porém, enquanto a ovariectomia pode recuperar a ingestão alimentar de ratos com artrite reumatoide, isso não foi suficiente para recuperar a PME neste estudo. Deste modo, a PME induzida pela artrite reumatoide não pode ser atribuída à diminuição no consumo de alimentos. Estes achados são semelhantes ao que foi descrito por outros investigadores (CASTILLERO et al., 2009; LOPEZ-MENDUINA et al., 2010).

Nós observamos aumento no RNAm do IGF-1 muscular no grupo OV (Figura 3). Nossos resultados convergem com achados anteriores de outros pesquisadores que relataram aumento no RNAm do IGF-1 no músculo de roedores ovariectomizados precocemente em comparação com animais que fizeram reposição de estrogênio (MANGAN et al., 2014; TSAI et al., 2007). Em contraste com os nossos resultados, foi demonstrado que mulheres pós-menopáusicas têm uma redução na expressão do gene IGF-1 muscular em comparação com mulheres na pré-menopausa (AHTIAINEN et al., 2012). Além disso, a terapia hormonal em mulheres na pós-menopausa aumenta a expressão do receptor de IGF-1 muscular (AHTIAINEN et al., 2012). O estrogênio tem sido relatado como tendo efeitos direto (i.e. receptores de estrogênio α e β) e indireto (i.e. eixo GH/IGF-1) sobre o IGF-1 (TIIDUS et al., 2013). Assim, como a PFO pode modular a expressão de RNAm do IGF-1 parece ser dependente da idade (imaturas vs pós-menopausa), no entanto, isto permanece sem resposta.

O IGF-1 é considerado um importante estimulador da hipertrofia do músculo esquelético. A superexpressão do IGF-1 no músculo esquelético induz hipertrofia em camundongos transgênicos, quando comparado com camundongos selvagem (MUSARO et al., 2001; YE et al., 2013). No entanto, os nossos resultados mostraram que o aumento do RNAm do IGF-1 pela ovariectomia não alterou a AST das fibras musculares (Figura 2A). Estes resultados sugerem que não há nenhuma relação clara entre o aumento de RNAm do IGF-1 e aumento da proteína IGF-1 (forma ativa). Além disso, as isoformas de ligação do IGF-1 (IGF-1Ea, IGF-1Eb e IGF-1Ec) têm papéis distintos no crescimento muscular (ENGERT; BERGLUND; ROSENTHAL, 1996; PHILIPPOU et al., 2009). Considerando que nosso qPCR mediu o IGF-1 "maduro", não podemos distinguir isoformas do IGF-1 no músculo, só podemos dizer que o RNAm do IGF-1 foi aumentado na perda da função ovariana. Assim, a ausência de dados sobre as variações específicas de isoformas do IGF-1 e IGFbps no nosso estudo pode ser considerada como uma limitação. No entanto, quaisquer possíveis efeitos do IGF-1 muscular e suas isoformas sobre a hipertrofia muscular parecem ser insignificantes no contexto da perda da função ovariana.

O presente estudo mostrou que o modelo de artrite reumatoide promove atrofia muscular (Figura 2; A e B) juntamente com um aumento do RNAm do IGF-1 (Figura 3A). Estes achados são semelhantes aos que foi descrito por outros investigadores (CASTILLERO et al., 2009; LOPEZ-MENDUINA et al., 2010;2012). Durante atrofia muscular de ratos artríticos, o aumento de RNAm do IGF-1 muscular tem sido descrito estar relacionado à resposta inflamatória promovida pela artrite reumatoide (CASTILLERO et al., 2009; TIDBALL, 2005). Considerando que o IGF-1 é conhecido como um estimulador do crescimento muscular, a regulação positiva de RNAm do IGF-1 durante a artrite reumatoide pode ser uma tentativa de mitigar a atrofia muscular (MUSARO et al., 2001; YE et al., 2013). No entanto, quando os grupos foram separados em condições experimentais para comparação, nós observamos que a AST da fibra muscular foi menor no grupo AROV (Figura 2; A e B), mas não houve nenhuma diferença de RNAm do IGF-1 muscular entre os grupos AR e AROV. Estes dados sugerem que menor AST da fibra muscular em ratos artríticos com PFO não é associado à resposta de RNAm do IGF-1 no músculo. Nossas descobertas convergem com estudos anteriores que mostraram a capacidade do estrogênio e da reposição hormonal em manter ou aumentar a massa muscular é independente das respostas do IGF-1 (DIELL-CONWRIGHT et al., 2009a;2009b; MANGAN et al., 2014; TIIDUS et al., 2013).

A miostatina inibe a expressão dos fatores reguladores miogênicos, inibindo assim a proliferação e diferenciação de mioblastos dos músculos esqueléticos (MCCROSKERY et al., 2003; MCFARLANE et al., 2006). A miostatina tem sido associada com perda de massa muscular em diferentes modelos de atrofia (MCCROSKERY et al., 2003; MCFARLANE et al., 2006; RAMIREZ et al., 2011). No entanto, nosso estudo não apoia este efeito (aumento de RNAm da miostatina) em modelos de artrite reumatoide e ovariectomia. De fato, a miostatina não tem sido associada com perda de massa muscular em modelos de artrite reumatoide (CASTILLERO et al., 2011) ou ovariectomia (TSAI et al., 2007). Entretanto, enquanto Castillero et al. não encontraram aumento de RNAm da miostatina muscular após 15 dias de administração da injeção de adjuvante (CASTILLERO et al., 2011), Ramires et al. encontraram aumento de RNAm de miostatina após dois

dias de injeções de I-carragenina (RAMIREZ et al., 2011). Estes dois estudos sugerem que após a indução da artrite reumatoide, há um aumento precoce da miostatina, que retorna aos níveis basais após alguns dias. Assim, no presente estudo, o RNAm da miostatina pode já ter atingido o pico antes do momento da nossa extração muscular.

Genes proteolíticos aumentados (i.e. ubiquitina-ligase E3) são indicativos de degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteassoma (BODINE et al., 2001). O aumento dos genes ubiquitina-ligase E3, tal como atrogina-1 e MuRF1, têm sido associados com perda de massa muscular em diferentes modelos de atrofia (CASTILLERO et al., 2009; MACEDO et al., 2014; RAMIREZ et al., 2011). No entanto, no presente estudo, houve um aumento substancial na expressão do gene da atrogina-1, mas não do gene da MuRF-1, na atrofia muscular dos ratos artríticos. A atrogina-1 e MuRF-1 têm papel diferente na degradação de proteínas musculares (PETROSKI; DESHAIES, 2005), assim, estes dados implicam que fatores de transcrição para atrogina-1 e MuRF-1 podem ser estimulado de maneira diferente na artrite reumatoide.

Aumento de atrogina-1 e MuRF-1 também têm sido associados com PFO (DIELI-CONWRIGHT et al., 2009b). Dieli-Conwright et al., investigando a expressão de genes proteolíticos, relataram aumento na expressão gênica de atrogina-1 e MuRF-1 em mulheres pós-menopausadas sem terapia de reposição hormonal comparadas com a mulheres com reposição hormonal. Junto com o estudo de Dieli-Conwright et al. e Tiidus et al., nossos dados suporta que o estrogênio atua como agente anti-catabólico baseado nos níveis mais elevados de expressão gênica de atrogina-1 e MuRF-1 no músculo atrofiado de ratas e mulheres com PFO (DIELI-CONWRIGHT et al., 2009a;2009b; TIIDUS et al., 2013).

Tem sido proposto que estrogênio é um protetor contra potenciais danos musculares devido a sua capacidade de diminuir fatores inflamatórios sistêmicos e musculares (TIIDUS et al., 2013). Como a artrite reumatoide é uma doença inflamatória (RALL; ROUBENOFF, 2004), a ausência deste mecanismo de proteção (induzida por ovariectomia) pode ter afetado indiretamente a PME

(TIIDUS et al., 2013) no presente estudo. Essa interação entre estrogênio, inflamação e músculo pode ser suportada por relatos consistentes do benefício da redução da inflamação muscular mediada pelo estrogênio e também maior regeneração seguida da atrofia muscular por desuso em roedores (TIIDUS et al., 2013). A inflamação crônica tem sido associada com a PME e aumento da atividade da atrogina-1 e MuRF-1 (SANDRI, 2008; ZOICO; ROUBENOFF, 2002). De fato, observamos maior espessura articular no dia 15 concomitantemente com maior ubiquitina ligase atrogina-1 e MuRF-1 e menor massa muscular no grupo AROV comparado com o grupo AR. Uma vez que a espessura articular tem sido considerada como uma medida indireta da resposta inflamatória na artrite reumatoide (CASTILLERO et al., 2009; LOPEZ-MENDUINA et al., 2010;2012), os nossos resultados sugerem que o grupo AROV apresentou uma resposta inflamatória prolongada em relação ao grupo AR, induzindo à maior perda de músculo esquelético relacionado à ubiquitina-ligase atrogina-1 e MuRF-1.

Em resumo, a PFO resulta em aumento da perda de músculo esquelético associado com ubiquitina-ligases atrogina-1 e MuRF-1 na artrite reumatoide. Estes resultados sugerem que uma abordagem terapêutica visando a manutenção da função dos ovários pode ser eficaz na neutralização da PME na artrite reumatoide. Além disso, o conhecimento das vias de regulação da perda de músculo esquelético induzido pela PFO durante a artrite reumatoide, tais como atrogina-1 e MuRF-1, podem identificar novos alvos terapêuticos. Portanto, estudos futuros são necessários para avaliar se essas abordagens terapêuticas serão eficazes.

AGRADECIMENTOS

Essa investigação foi apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

REFERÊNCIAS

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.

AHTIAINEN, M. et al. Age and estrogen-based hormone therapy affect systemic and local IL-6 and IGF-1 pathways in women. **Age (Dordr)**, v. 34, n. 5, p. 1249-60, Oct 2012.

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

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.

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-8, Nov 23 2001.

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.

DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al. Hormone therapy attenuates exercise-induced skeletal muscle damage in postmenopausal women. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 3, p. 853-8, Sep 2009a.

_____. Influence of hormone replacement therapy on eccentric exercise induced myogenic gene expression in postmenopausal women. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 5, p. 1381-8, Nov 2009b.

_____. Hormone therapy and maximal eccentric exercise alters myostatin-related gene expression in postmenopausal women. **J Strength Cond Res**, v. 26, n. 5, p. 1374-82, May 2012.

ENGERT, J. C.; BERGLUND, E. B.; ROSENTHAL, N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. **J Cell Biol**, v. 135, n. 2, p. 431-40, Oct 1996.

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.

FISHER, J. S.; KOHRT, W. M.; BROWN, M. Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 88, n. 1, p. 265-71, Jan 2000.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Description of a new method of ovariectomy in female rats. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 3, p. 462-70, May-Jun 2012.

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.

_____. Short-term growth hormone or IGF-I administration improves the IGF-IGFBP system in arthritic rats. **Growth Horm IGF Res**, v. 22, n. 1, p. 22-9, Feb 2012.

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.

MANGAN, G. et al. Oestrogen-dependent satellite cell activation and proliferation following a running exercise occurs via the PI3K signalling pathway and not IGF-1. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 212, n. 1, p. 75-85, Sep 2014.

MCCROSKERY, S. et al. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. **J Cell Biol**, v. 162, n. 6, p. 1135-47, Sep 15 2003.

MCFARLANE, C. et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. **J Cell Physiol**, v. 209, n. 2, p. 501-14, Nov 2006.

MUSARO, A. et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. **Nat Genet**, v. 27, n. 2, p. 195-200, Feb 2001.

PETROSKI, M. D.; DESHAIES, R. J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 9-20, Jan 2005.

PHILIPPOU, A. et al. Expression of IGF-1 isoforms after exercise-induced muscle damage in humans: characterization of the MGF E peptide actions in vitro. **In Vivo**, v. 23, n. 4, p. 567-75, Jul-Aug 2009.

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.

SANDRI, M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. **Physiology (Bethesda)**, v. 23, p. 160-70, Jun 2008.

SHINODA, M.; LATOUR, M. G.; LAVOIE, J. M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26, n. 3, p. 335-43, Mar 2002.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 2, p. R345-53, Feb 2005.

TIIDUS, P. M.; LOWE, D. A.; BROWN, M. Estrogen replacement and skeletal muscle: mechanisms and population health. **J Appl Physiol (1985)**, v. 115, n. 5, p. 569-78, Sep 1 2013.

TSAI, W. J. et al. Estrogen effects on skeletal muscle insulin-like growth factor 1 and myostatin in ovariectomized rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 232, n. 10, p. 1314-25, Nov 2007.

VELDERS, M. et al. Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. **FASEB J**, v. 26, n. 5, p. 1909-20, May 2012.

VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 5, n. 4, p. 261-3, Dec 2014.

YE, F. et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 attenuates skeletal muscle damage and accelerates muscle regeneration and functional recovery after disuse. **Exp Physiol**, v. 98, n. 5, p. 1038-52, May 2013.

ZOICO, E.; ROUBENOFF, R. The role of cytokines in regulating protein metabolism and muscle function. **Nutr Rev**, v. 60, n. 2, p. 39-51, Feb 2002.

2.2 ARTIGO 2: EXERCÍCIO DE FORÇA AGUDO REDUZ A EXPRESSÃO DE GENES QUE INDUZEM A ATROFIA MUSCULAR DE RATAS ARTRÍTICAS OVARIETOMIZADAS²

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito do exercício de força agudo (EF) sobre os níveis de RNAm de atrogina-1, MuRF1, e miostatina no músculo gastrocnêmio de ratas artríticas após a perda da função ovariana (PFO). **Métodos:** 30 ratos Wistar (9 semanas, $195,3 \pm 17,4$ gramas) foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos: controle (CT-Sham, n = 6); grupo com artrite reumatoide (AR, n = 6); grupo com artrite reumatoide submetido a EF (AREX; n = 6); grupo ovariectomia com artrite reumatoide (AROV; n = 6); grupo ovariectomia com artrite reumatoide submetido a EF (AROVEX; n = 6). Após 15 dias das injeções intra-articulares com Met-BSA, os animais foram submetidos ao EF e após seis horas do fim da sessão de exercício foram eutanasiados. **Resultados:** a artrite reumatoide provocou redução na área de secção transversa (AST) das fibras musculares, mas a AST foi menor no grupo AROV quando comparado com os grupos AR. O RNAm da atrogina-1 no músculo esquelético aumentou nos ratos artríticos (AR e AROV), mas o nível de atrogina-1 foi maior no grupo AROV quando comparado com outros grupos artríticos. O RNAm da MuRF-1 no músculo esquelético também aumentou no grupo AROV. O aumento do RNAm da atrogina-1 e MuRF-1 foram menores no grupo AROVEX do que no grupo AROV. O nível do RNAm da miostatina foi semelhante em todos os grupos, exceto para o grupo AROVEX, que foi menor quando comparado a outros grupos. **Conclusão:** o EF agudo reduz os níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1 e miostatina no músculo de ratas artríticas afetadas por PFO. Porém, a PFO resulta em aumento da perda de músculo esquelético relacionados com ubiquitina-ligasas E3 (atrogina-1 e MuRF-1).

² O artigo EXERCÍCIO DE FORÇA AGUDO REDUZ A EXPRESSÃO DE GENES NA ATROFIA MUSCULAR DE RATAS ARTRÍTICAS OVARIETOMIZADAS está em processo de submissão (Anexo C).

Palavras-chave: Caquexia. Artrite reumatoide. ubiquitina-ligase E3. Ovariectomia. Exercício de força.

ABSTRACT

Objective: evaluate the effect of acute resistance exercise (RE) on mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1, and myostatin in gastrocnemius muscle of arthritic rats after loss of ovarian function (LOF). **Methods:** 30 female Wistar rats (9 weeks, 195.3 ± 17.4 grams) were randomly allocated into five groups: control (CT-Sham; n = 6); group with rheumatoid arthritis (RA; n = 6); group with rheumatoid arthritis subjected to RE (RAEX; n = 6); ovariectomy group with rheumatoid arthritis (RAOV; n = 6); ovariectomy group with rheumatoid arthritis subjected to RE (RAOVEX; n = 6). After 15 days of intra-articular injections with Met-BSA the animals were subjected to the RE and after six hours from workout were euthanized. **Results:** The rheumatoid arthritis provoked reduction in the cross sectional area (CSA) of muscle fibers, but the CSA was lower in RAOV when compared to RA groups. Skeletal muscle atrogen-1 mRNA level was increased in arthritic rats (RA and RAOV), but the atrogen-1 level was higher in RAOV group when compared to other arthritic groups. The Muscle MuRF-1 mRNA level was also increased in the RAOV group. The increased atrogen-1 and MuRF-1 mRNA levels were lower in the RAOVEX group than in the RAOV group. The myostatin mRNA level was similar in all groups, except to RAOVEX, which was lower when compared to other groups. **Conclusion:** The acute RE reduces the atrogen-1, MuRF-1 and myostatin mRNA levels in muscle of arthritic rats affected by LOF. However, the LOF results in increased loss of skeletal muscle-related ubiquitin ligases (atrogen-1 and MuRF-1).

Key words: Cachexia, rheumatoid arthritis, E3 ubiquitin ligase, ovariectomy, resistance exercise.

INTRODUÇÃO

A perda de músculo esquelético (PME) tem sido postulada como importante contribuinte para o aumento da morbidade e mortalidade (EVANS; LAMBERT, 2007; EVANS et al., 2008; VON HAEHLING; ANKER, 2014). Desse modo, a PME é considerada uma consequência grave da artrite reumatoide (AR) (VON HAEHLING; ANKER, 2014; WALSMITH; ROUBENOFF, 2002), especialmente em mulheres (ALAMANOS, Y.; DROSOS, 2005b). A PME induzida pela AR está associada com a inflamação crônica e atividade física reduzida (RAJBHANDARY et al., 2011; RALL, L. C.; ROUBENOFF, 2004b).

A natureza complexa da perda de massa muscular envolve a regulação positiva de ubiquitina-ligase E3 dos genes do sistema ubiquitina-proteassoma (MuRF-1 e MAF-bx/Atrogina-1) (CASTILLERO; MARTIN; et al., 2009; DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al., 2009c;2012; LOPEZ-MENDUINA et al., 2012), que causam a degradação de proteínas pelo proteassoma 26S (BODINE; LATRES; et al., 2001; KACHAEVA; SHENKMAN, 2012). O aumento do nível de RNAm da miostatina também tem sido associado com a inflamação das articulações (RAMIREZ et al., 2011). A miostatina, um membro da família do fator de crescimento transformante (TGF)- β , que regula negativamente o crescimento do músculo esquelético (MCCROSKERY et al., 2003; MCFARLANE et al., 2006), tem sido associada com a ativação de genes das ubiquitina-ligases E3 no músculo (MCFARLANE et al., 2006; RODRIGUEZ et al., 2014). Notavelmente, a perda da função ovariana (PFO) foi reportada como contribuinte para a PME (ENNS; TIIDUS, 2008; MANGAN et al., 2014; MILANESI et al., 2009; MURRAY; HUSS, 2011; SITNICK et al., 2006; THOMAS, A. et al., 2010b; TIIDUS, P. M. et al., 2013a; VELDERS et al., 2012). Recentemente, mostramos que a PFO resulta em aumento da perda de músculo esquelético associada a aumento das ubiquitina-ligases atrogina-1 e MuRF-1 em ratos artríticos (FURLANETTO JÚNIOR et al., 2016). Assim, uma vez que as mulheres progridem naturalmente para a menopausa ou podem ser submetidas à ovariectomia, a identificação de

intervenções contra a PME induzida pela AR é necessária para minimizar ou reverter os danos provocados pela PME.

O exercício de força (EF) é conhecido por aumentar a massa e a força muscular e, portanto, é considerado importante meio para prevenir a perda de ambos (CHODZKO-ZAJKO et al., 2009). As respostas da adaptação dos músculos esqueléticos frente ao EF têm sido referidas como sendo o resultado do efeito acumulativo de respostas agudas de uma série de vias de sinalização moleculares de cada sessão de exercício (HAWLEY et al., 2014). Estas vias de sinalização molecular modulam a degradação e a síntese de proteínas musculares para promover a hipertrofia. Especificamente, o EF tem sido descrito por regular a expressão dos genes (i.e. atrogina-1, MuRF-1 e miostatina) que induzem a PME associados com a artrite reumatoide. Por exemplo, enquanto o nível de RNAm da MuRF-1 é aumentado 1-4 h pós-exercício e, em seguida, restaurado de volta ao controle, o nível de RNAm da atrogina-1 é reduzido 6-12 h pós-exercício (LOUIS et al., 2007; STEFANETTI et al., 2014). Além disso, o nível de RNAm da miostatina também é reduzido durante 24h pós EF (DURIGAN et al., 2014; LOUIS et al., 2007; MACKENZIE et al., 2013). Assim, o EF parece restaurar os níveis aumentados das expressões dos genes associados com a artrite reumatoide. Dieli-Conwright et al. (2012) relataram maiores níveis de expressão de RNAm da miostatina, ubiquitina-ligase E3 (atrogina-1 / MAF-bx e MuRF-1), de citocina pró-inflamatória e de dano muscular após o EF em mulheres pós-menopáusicas comparado a mulheres pós-menopáusicas fazendo reposição hormonal (DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al., 2009c;2012). Portanto, parece razoável supor que a PFO interfere no efeito do EF sobre expressões gênicas durante a artrite reumatoide.

Para resolver este problema, nós estudamos os efeitos do EF sobre os níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1, e miostatina no músculo gastrocnêmio de ratas artríticas (modelo experimental de artrite reumatoide induzida por adjuvante) após a ovariectomia. A hipótese deste estudo é que uma sessão de EF agudo é capaz normalizar a expressão gênica de Atrogina-1, MuRF-1 e Miostatina em ratas menopausadas induzidas à AR. Este artigo esclarece as respostas

moleculares do músculo esquelético frente ao EF durante a artrite reumatoide e PFO.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

Este estudo estava de acordo com o Guia Nacional de Atenção e uso de animais de laboratório e obteve a aprovação do Comitê de Ética da Universidade (nº 274/2014). Todos os procedimentos foram realizados no Instituto de Pesquisa em Oncologia (IPON) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM).

Ratos Wistar fêmeas ($195,3 \pm 17,4$ gramas), com nove semanas de idade, foram utilizados no presente estudo. Os ratos foram alojados em gaiolas de plástico em condições normais a 22°C, ciclo de 12 horas claro/escuro, e tiveram acesso livre (ad libitum) para água e ração padrão (Nuvilab-CR1, Curitiba, PR, Brasil). Cinco grupos experimentais foram usados neste estudo: controle (CT-Sham; n = 6); grupo com artrite reumatoide (AR; n = 12) e grupo com a artrite reumatoide e ovariectomia (AROV; n = 12). Seis ratos do grupo AR (AREX) e seis ratos do grupo AROV (AROVEX) foram submetidos à EF para estudar o efeito do EF na expressão dos genes da atrogina-1, MuRF-1, e miostatina. Todos os ratos foram tratados de modo semelhante, em termos de manipulação diária. Os procedimentos de ovariectomia (OV e AROV) ou simulação (CT-Sham e AR) foram realizados ao mesmo tempo, quinze dias antes da indução da artrite reumatoide. Os grupos AR e AROV foram imunizados e, em seguida, foram injetados com albumina bovina metilada (Met-BSA) na articulação tibiotarsal. Quinze dias após a injeção intra-articular, os animais dos grupos AREX e AROVEX realizaram uma sessão de EF e após seis horas do fim do treino foram eutanasiados, todos no mesmo período do dia e hora. As amostras de músculo gastrocnêmio da pata traseira esquerda foram removidas, limpas, pesadas, e a sua porção branca foi obtida e armazenada em TRIzol a -80°C para análise molecular. Nós investigamos a parte branca do gastrocnêmio por possuir mais fibras de contração rápida.

Ovariectomia

Os ratos foram anestesiados com solução de injeção intraperitoneal contendo quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) para os procedimentos de ovariectomia. A ovariectomia foi realizada por uma única incisão ventral transversal de 0,4-0,6 cm na região abdominal média de acordo com o método descrito por Khajuria et al. (KHAJURIA et al., 2012).

Protocolo de indução da Artrite Reumatoide

Os ratos foram anestesiados com injeção intraperitoneal contendo solução de quetamina (40 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) para os procedimentos de indução da artrite reumatoide. Inicialmente, os ratos foram imunizados com duas injeções subcutâneas de 50µL. Met-BSA (40 mg/mL) diluída em glicose a 5% emulsificada com adjuvante completo de Freund (CFA) (contendo 1mg/ml de bactéria Tuberculosis inativada) na base da cauda, com intervalo de sete dias entre as injeções. Depois de sete dias a partir da última injeção na base da cauda, uma injeção intra-articular de 25 µL de Met-BSA, CFA e glicose a 5% foi aplicada nas articulações tibiotarsais (BAR et al., 2004).

Familiarização ao modelo de escalada

Durante três sessões de EF os ratos foram adaptados com o ato de escalar. Foram realizadas cinco escaladas consecutivas por sessão de EF, durante uma semana. 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. Essa familiarização foi feita para minimizar possíveis interferências que pudessem existir durante a sessão aguda de exercício de força.

Protocolo de Exercício de Força agudo

O modelo de EF (escalada) foi escolhido porque o estresse é menor do que outros modelos, tais como natação (água), modelo de agachamento (choque elétrico) e esteira (choque elétrico e ruído).

O protocolo de carga progressiva proposto por Matheny et al. (MATHENY et al., 2009) foi adaptado para as necessidades da pesquisa. O modelo consistiu nos animais subir uma escada (1,1 x 0,18m, com dois centímetros de espaçamento entre os degraus, 80° graus de inclinação) com uma carga fixa presa à cauda. O comprimento da escada e os espaços entre os degraus forçavam os ratos a executarem 8-12 movimentos (em cada pata) em cada subida. O aparato preso à cauda consistiu em tubos cilíndricos contendo esferas de chumbo no interior. Foi fixado na parte proximal da cauda do animal por fita autoadesiva (1,5 cm, Tartan 3M). Quando o animal era incapaz de completar uma subida com a carga estipulada, a carga foi reduzida para completar o total de 15 subidas. Os animais iniciaram o EF agudo com 3 subidas sem carga e posteriormente foi aumentando progressivamente com adições de 25%, 50%, 75% e 100% do próprio peso corporal do rato a cada três subidas totalizando 15 séries com recuperação de 120s entre elas. A sessão de EF foi realizada pela manhã.

Marcadores clínicos

O edema articular, o peso corporal e a ingestão de alimentos foram examinados semanalmente após a segunda injeção subcutânea. A avaliação da gravidade da artrite foi realizada através da medição do edema articular de cada animal. O edema articular foi avaliado pelo tamanho de espessura látero-lateral da articulação do tarso com paquímetro analógico (Starfer, São Paulo, SP, Brasil) (FILIPPIN et al., 2013). O edema articular foi calculado utilizando os valores médios (média aritmética) das duas patas traseiras.

Eutanásia

Os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal contendo solução de quetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A eutanásia foi realizada por punção cardíaca e choque hipovolêmico.

Estradiol, TNF- α e IL-6

As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca em sistema a vácuo (Vacutainer®, Inglaterra) dentro de um tubo seco com gel separador. O sangue foi centrifugado durante 10 minutos (3.000 rpm) e as amostras foram separadas e armazenadas (-20°C) para análises futuras. O estradiol sérico (MyBiosource, San Diego, CA, EUA), o TNF- α e a IL-6 (BD Biosciences, United States) foram analisados por imunoenensaio enzimático ELISA. Todos os ensaios foram realizados em conformidade com o protocolo do fabricante.

Extração do RNA e qPCR

As amostras do músculo gastrocnêmio (50-70 μ g) foram extraídas da porção branca. A extração do RNA total foi realizada utilizando TRIzol (Sigma-Aldrich, Sto Louis MO, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Depois da extração, o sedimento seco foi ressuspensão em água livre de RNase, tratada com DNase I (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para remover qualquer possível presença de DNA na amostra. O RNA total foi quantificado utilizando fluorímetro de alta precisão, Qubit 2,0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e kit RNA BR Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Todas as amostras tinham concentrações de RNA entre 20-100 ng/mL. Quando valores mais altos de RNA foram encontrados, as amostras foram diluídas em água livre de RNase.

A quantificação de RNAm foi obtida pelo aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) usando kits Quantifast SYBR Green RT-PCR one-step (QIAGEN, Hilden, Germany). Assim, 1 μ l das amostras de RNA tratadas com DNase foram adicionadas a uma mistura que continha 10 μ l de 2 x Quantifast SYBR GREEN RT-PCR Master Mix, 0,2 μ l de Quant Fast, 0,6 μ l de *primer* “sense” e “anti-sense” e completadas com água livre de RNase para alcançar o volume de 20 μ L. A temperatura e a curva de anelamento foram usadas como medidas da qualidade. As condições de reação do qPCR e ciclos executados no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) foram as seguintes: 50°C por 10 min, 95°C por 5 min para desnaturação inicial e amplificação de 40 ciclos de 95°C por

10 segundos para desnaturação e 60°C por 30 segundos para emparelhamento e extensão. Valores de fluorescência foram obtidos entre os estágios de anelamento / extensão e números de *thresholdcycle* (CT) foram determinados por meio do *Software* SDS versão 1.2.3 (Applied Biosystems, EUA). O RNAm da MuRF-1, atrogina-1 e miostatina foram normalizados para os valores de GAPDH (gene de referência) e calculados pelo método Livak ($\Delta\Delta CT$). Os *primers* para todos os genes (Tabela 1) foram obtidos a partir de estudos anteriores (AGUIAR et al., 2013; CASTILLERO; MARTIN; et al., 2009) e construído a partir de sequências publicadas no *GenBank* (www.pubmed.com) para garantir a especificidade das sequências alvo, evitar a geração de estruturas secundárias dos *primers* e a dimerização em cada *primer* e entre *primer sense* e *anti-sense*.

Análise morfométricas do músculo gastrocnêmio

As análises morfológicas foram realizadas a partir de cortes histológicos do gastrocnêmio (espessura 6µm). Os cortes histológicos do gastrocnêmio foram obtidos em um micrótomo (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha) e corados pelo método hematoxilina e eosina (HE). Os cortes corados foram usados para documentação fotográfica de seis campos histológicos aleatórios (objetiva de 20X) (Nikon Evolucion MP 5,0). Um *software* de análise de imagem (ImageJ 1.46r) foi usado para determinar a área de secção transversa (AST) de 200 fibras por músculo.

Análise estatística

Os dados foram testados para a distribuição normal utilizando o teste de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância, utilizando o teste de Levene. As variáveis foram comparadas por Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Quando apropriado ($p < 0,05$), o teste *post-hoc* de *rank* dos subgrupos foi realizado. O volume de treino e o estradiol foram comparados pelo teste Man-Whitney. Coeficiente de correlação de Spearman foi usado para avaliar as associações entre as variáveis. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (percentil 25 e 75). A significância foi estabelecida em $P < 0,05$.

RESULTADOS

O estradiol circulante, IL-6 e TNF- α foram medidos no fim do estudo, após a eutanásia, para garantir a ovariectomia e também avaliar o estado inflamatório. Como esperado, os ratos ovariectomizados exibiram nível inferior do estradiol circulante, quando comparado com ratos não ovariectomizados (Figura 1). Além disso, não houve alteração de IL-6 e TNF- α circulante provavelmente por causa do grande tempo de recuperação (15 dias) após a indução da artrite reumatoide (Tabela 2).

Como essas variáveis não foram afetadas pelo exercício agudo, reunimos os grupos exercitados com o grupo não exercitados para comparações estatísticas (Tabela 3).

No início do estudo (momento Pré), após a ovariectomia e antes da injeção intra-articular, o peso corporal dos ratos ovariectomizados foi maior (22,2%) do que nos outros grupos. No meio do estudo (7 dias após a injeção intra-articular), o peso corporal não diferiu entre os grupos. No final do estudo (15 dias após a injeção intra-articular) o peso corporal dos ratos ovariectomizados foi maior (7%) do que nos outros grupos.

A ingestão de ração foi diferente entre os grupos no início do estudo (Pré), sendo maior (2%) no grupo AROV. No dia sete, os grupos AR e AROV apresentaram menor ingestão (~30%) quando comparado ao grupo CT-Sham. No final do estudo (dia 15) a ingestão de ração também foi diferente entre os grupos, mas foi maior (62%) no grupo AROV quando comparado com o grupo AR.

A ingestão de alimentos corrigida pelo peso corporal não foi diferente entre os grupos no início do estudo (Pré). No entanto, no dia sete após a injeção intra-articular, a ingestão de ração foi diferente entre os grupos CT-Sham, AR e AROV (0,515; 0,384; 0,336 respectivamente), sendo menor no grupo AROV. No final do estudo (dia 15), a ingestão de ração também foi diferente entre os grupos, mas foi maior no grupo AROV (0,575) quando comparado com o grupo AR (0,410).

Alterações da espessura articular foram medidas ao longo da progressão da artrite reumatoide. Os grupos AR e AROV aumentaram fortemente a espessura

articular (9,0 e 10,0mm respectivamente) um dia depois da injeção intra-articular de Met-BSA em comparação com o grupo CT-Sham (6,0mm). Estes aumentos na espessura articular foram mantidos até o final do estudo (15 dias). A ovariectomia afetou a magnitude do aumento da espessura articular um dia após a injeção intra-articular de Met-BSA. No dia um, o grupo AROV mostrou maior espessura (10,0mm) da articulação quando comparado com o grupo AR (9,0mm). Este aumento da espessura articular no grupo AROV desapareceu nos dias sete e 15 após a injeção intra-articular de Met-BSA.

Para determinar a atrofia muscular foi avaliado o peso do gastrocnêmio (g), o peso do gastrocnêmio corrigido pelo peso corporal (%) (Tabela 3) e a área de secção transversa (AST) das fibras do músculo gastrocnêmio (μm^2) (Figura 2). Os grupos AR e AROV mostraram redução na AST das fibras (43,6% e 49,7% respectivamente) e no peso do gastrocnêmio (14,2%). O grupo AROV mostrou menores valores de AST quando comparado ao grupo AR ($1367,5\mu\text{m}^2$ e $1533,2\mu\text{m}^2$ respectivamente). Apenas o grupo AROV mostrou redução no peso relativo (21,5%) do gastrocnêmio (peso do gastrocnêmio corrigido pelo peso corporal).

O nível de RNAm da atrogina-1 muscular foi maior nos grupos artríticos (AR, AREX, AROV e AROVEX) quando comparado ao grupo controle. No entanto, o aumento do nível de RNAm da atrogina-1 foi maior (307,6%) no grupo AROV quando comparado com outros grupos artríticos. O nível de RNAm da miostatina não se alterou no músculo gastrocnêmio dos ratos artríticos, exceto para o grupo AROVEX, que foi menor (72,2%) em comparação com outros grupos. O nível de RNAm da MuRF-1 foi mais elevado (580,9%) no músculo gastrocnêmio do grupo AROV, no entanto, foi inferior (65,8%) no músculo do grupo AROVEX quando comparado com outros grupos (Tabela 2).

O volume de treino foi superior no grupo AROVEX comparado ao grupo AREX (figura 3). Houve correlações negativas significativas do volume de treino com a MuRF-1 ($r = 0,846$; $P=0,0050$) e Miostatina ($r = 0,726$; $P=0,0160$), mas não entre o volume de treino e Atrogina-1 ($r = 0,0912$; $P=0,7622$) (Figura 4).

Tabela 1- Desenho dos *Primers* para qPCR

Genes	Número (<i>GenBank</i>)	Sequência (5'-3')
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: AGATGGTGAAGGTCCGAGTG A: GAAGGTCAATGAAGGGGTCA

Tabela 1 - *Primers* usado para mensurar a reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR).

S = *Sense*; A = *Antisense*

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Tabela 2 – Expressão dos genes alvos e concentração circulante de citocinas

	CT-Sham	AR	AREX	AROV	AROVEX	P
Atrogina-1 (vezes de aumento)	0,999 ^a (0,979 - 1,011)	3,355 ^b (3,070 - 11,590)	3,230 ^b (1,650 - 6,620)	10,320 ^c (8,278 - 20,257)	5,125 ^b (3,660 - 8,080)	0,001
Miostatina (vezes de aumento)	1,004 ^a (0,987 - 1,012)	0,715 ^{a,b} (0,490 - 1,160)	0,840 ^a (0,508 - 1,030)	1,460 ^a (1,000 - 2,895)	0,405 ^b (0,210 - 0,680)	0,022
MuRF-1 (vezes de aumento)	0,995 ^{a,c} (0,989 - 1,010)	1,040 ^{a,c} (0,720 - 1,530)	3,810 ^{a,b} (0,992 - 5,170)	5,780 ^b (2,715 - 8,348)	0,340 ^c (0,310 - 1,660)	0,028
TNF-α (pg/ml)	54,5 ^a (45,7 - 93,1)	56,5 ^a (44,5 - 66,6)	59,0 ^a (55,6 - 76,9)	54,6 ^a (48,3 - 72,7)	40,5 ^a (40,0 - 58,3)	0,437
IL-6 (pg/ml)	103,5 ^a (85,7 - 125,1)	90,2 ^a (78,5 - 119,4)	91,9 ^a (89,4 - 103,4)	93,1 ^a (85,9 - 143,1)	120,5 ^a (96,6 - 133,3)	0,662

Tabela 2 – RNAm dos genes alvos e citocinas. Grupo CT-Sham - grupo controle (n = 6); AR – grupo com artrite reumatoide (n = 6); AREX – grupo com artrite reumatoide que realizou sessão de exercício de força (n = 6); AROV – grupo artrite com ovariectomia (n = 6); AROVEX – grupo artrite com ovariectomia que realizou sessão de exercício de força (n = 6); (pg/ml) – picograma por mililitros. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 - 75 percentis). ANOVA - teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes = P <0,05 (e.g. ^a é diferente de ^b e ^c; ^{a,c} é diferente de ^b; ^{a, c} não é diferente de ^c).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Tabela 3 – Característica das amostras

	CT-Sham (n=6)	AR (n=12)	AROV (n=12)	P
PESO CORPORAL (g)				
Pré	226,5 ^a (218,0 – 257,0)	239,0 ^a (226,5 – 253,0)	277,0 ^c (268,5 – 284,5)	<0,001
7 dias	235,0 ^a (219,0 – 263,0)	227,0 ^a (221,0 – 235,0)	244,0 ^a (236,5 – 269,0)	0,051
15 dias	244,0 ^a (230,0 – 277,0)	230,5 ^a (218,0 – 245,0)	262,5 ^b (247,5 – 280,0)	0,007
INGESTÃO ALIMENTAR (g)				
Pré	129,0 ^a (129,0 – 129,0)	118,5 ^b (115,0 – 122,0)	132,0 ^c (128,0 – 136,0)	<0,001
7 dias	121,0 ^a (121,0 – 121,0)	87,5 ^b (80,0 – 95,0)	86,0 ^b (81,0 – 91,0)	<0,001
15 dias	176,0 ^a (176,0 - 176,0)	94,0 ^b (93,0 – 95,0)	153,0 ^c (151,0 – 155,0)	<0,001
INGESTÃO ALIMENTAR / PESO CORPORAL				
Pre	0,570 ^a (0,502 – 0,592)	0,496 ^a (0,467 – 0,514)	0,478 ^a (0,462 – 0,496)	0,058
7 dias	0,515 ^a (0,460 – 0,553)	0,384 ^b (0,357 – 0,414)	0,336 ^c (0,322 – 0,375)	<0,001
15 dias	0,721 ^a (0,635 – 0,765)	0,410 ^b (0,384 – 0,431)	0,575 ^c (0,554 – 0,618)	<0,001

Tabela 3 – Característica das amostras. Grupo CT-Sham - grupo controle (n = 6); Grupo AR agrupado – AR + AREX (n = 12); Grupo AROV agrupado - AROV + AROVEX (n = 12); AR – grupo com artrite reumatoide (n = 6); AREX – grupo com artrite reumatoide que realizou sessão de exercício de força (n = 6); RAOV – grupo artrite com ovariectomia (n = 6); AROVEX – grupo artrite com ovariectomia que realizou sessão de exercício de força (n = 6); Pre - imediatamente antes da injeção intra-articular; 1 dia - um dias após injeção intra-articular, 7 dias - sete dias após a injeção intra-articular, 15 dias - quinze dias após a injeção intra-articular, (g) - grama, (mm) - milímetro (%) - valor percentual. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 - 75 percentis). ANOVA - teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes = P <0,05 (e.g. ^a é diferente de ^b e ^c; ^{a,c} é diferente de ^b; ^{a,c} não é diferente de ^c).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Continuação da Tabela 3 – Característica das amostras

	CT-Sham (n=6)	AR (n=12)	AROV (n=12)	P
PERIMETRIA ARTICULAR (mm)				
Pre	6,0 ^a (6,0 – 6,0)	6,0 ^a (6,0 – 6,0)	6,0 ^a (6,0 – 6,0)	0,114
1 dia	6,0 ^a (6,0 – 6,0)	9,0 ^b (9,0 – 10,0)	10,0 ^c (10,0 – 10,0)	<0,001
7 dias	6,0 ^a (6,0 – 6,0)	11,0 ^b (10,0 – 12,0)	10,0 ^c (9,0 – 10,0)	<0,001
15 dias	6,0 ^a (6,0 – 6,0)	9,0 ^b (9,0 – 10,0)	9,0 ^b (8,0 – 10,0)	<0,001
PESO DO GASTROCNÊMIO (g)	1,4 ^a (1,3 – 1,5)	1,2 ^b (1,1 – 1,3)	1,2 ^b (0,9 – 1,3)	0,022
PESO DO GASTROCNÊMIO / PESO CORPORAL (%)	0,56 ^a (0,53 – 0,64)	0,52 ^a (0,491 – 0,558)	0,44 ^c (0,391 – 0,496)	0,003

Tabela 3 – Característica das amostras. Grupo CT-Sham - grupo controle (n = 6); Grupo AR agrupado – AR + AREX (n = 12); Grupo AROV agrupado - AROV + AROVEX (n = 12); AR – grupo com artrite reumatoide (n = 6); AREX – grupo com artrite reumatoide que realizou sessão de exercício de força (n = 6); RAOV – grupo artrite com ovariectomia (n = 6); AROVEX – grupo artrite com ovariectomia que realizou sessão de exercício de força (n = 6); Pre - imediatamente antes da injeção intra-articular; 1 dia - um dia após injeção intra-articular, 7 dias - sete dias após a injeção intra-articular, 15 dias - quinze dias após a injeção intra-articular, (g) - grama, (mm) - milímetro (%) - valor percentual. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 - 75 percentis). ANOVA - teste de Kruskal-Wallis. Letras diferentes = P <0,05 (e.g. ^a é diferente de ^b e ^c; ^{a,c} é diferente de ^b; ^{a,c} não é diferente de ^c).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 1 – Concentração circulante de estradiol

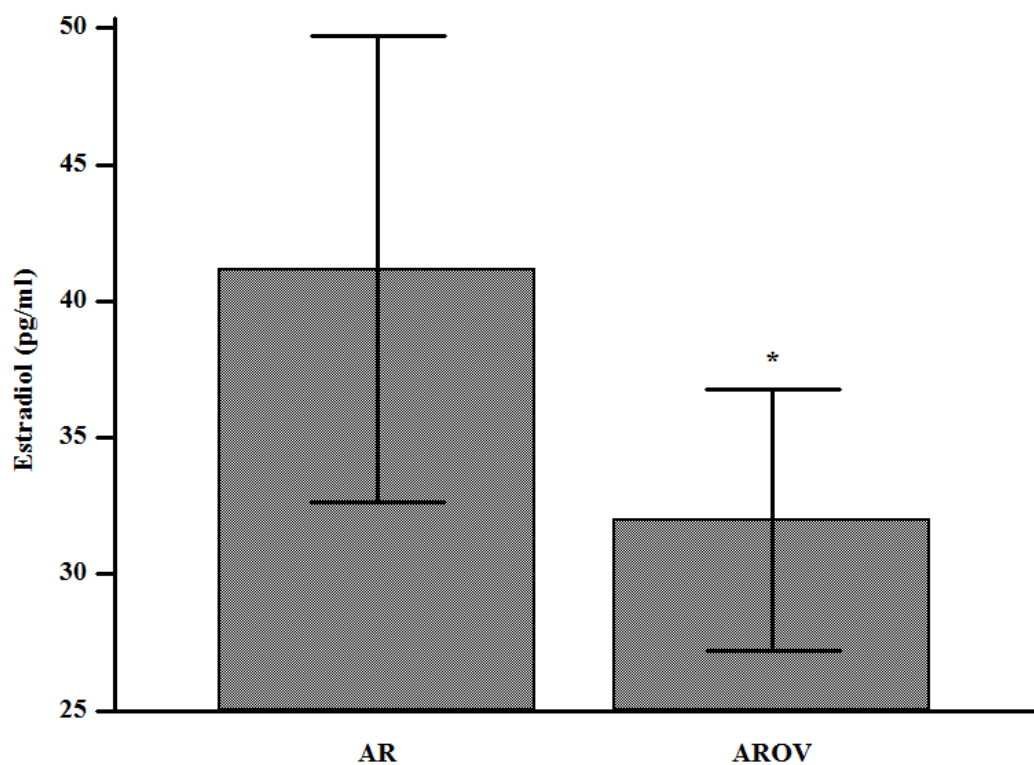


Figura 1 - Concentração de estradiol no grupo AR agrupado (CT-Sham + AR + AREX, n = 18); Grupo AROV agrupado (AROV + AROVEX, n = 12); CT-Sham - grupo controle (n = 6); AR – grupo artrítico (n = 6); AREX – grupo artrítico que realizou sessão aguda de exercício de força (n = 6); AROV – grupo artrítico e ovariectomizado (n = 6); AROVEX – grupo artrítico e ovariectomizado que realizou sessão aguda de exercício de força (n = 6). * P < 0,05.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 2 – Área de secção transversa das fibras do músculo gastrocnêmio

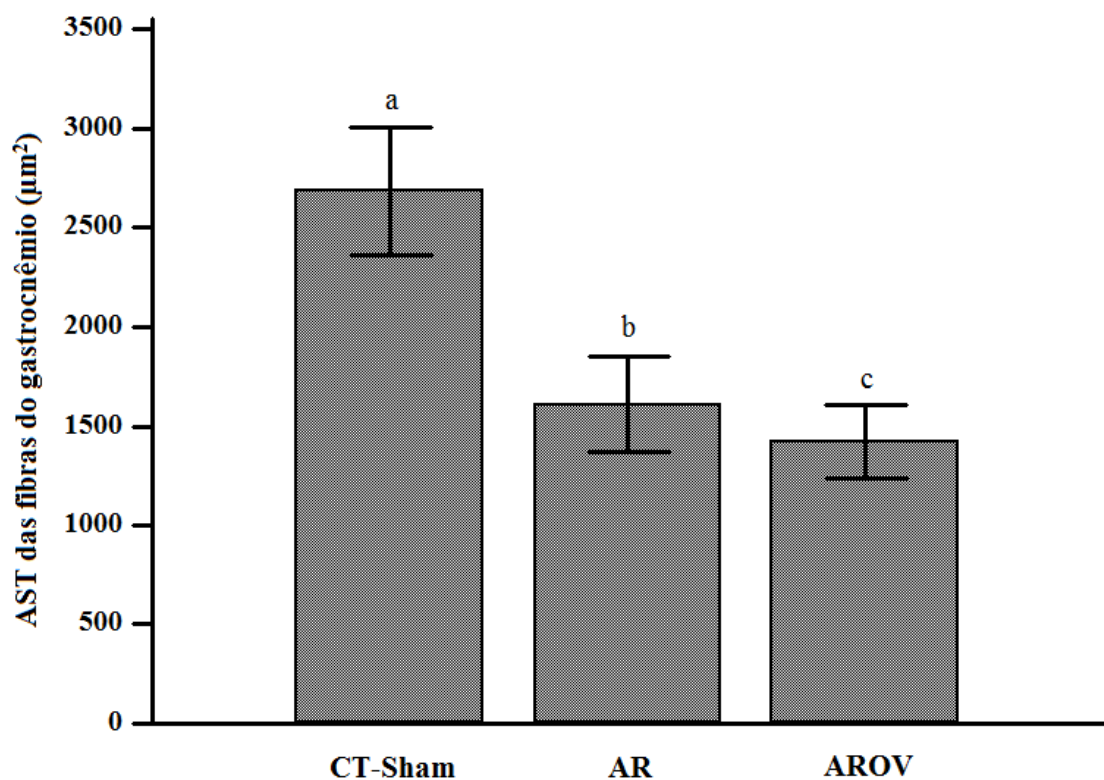


Figura 2 – Área de secção transversa (AST) das fibras do músculo gastrocnêmio. CT-Sham – grupo controle (n = 6); Grupo AR agrupado (AR + AREX, n = 12); Grupo AROV agrupado (AROV + AROVEX, n = 12), AR – grupo artrítico (n = 6); AREX – grupo artrítico que realizou sessão aguda de exercício de força (n = 6); OV – grupo ovariectomizado (n = 6); AROV – grupo artrítico e ovariectomizado (n = 6); AROVEX – grupo artrítico e ovariectomizado que realizou sessão aguda de exercício de força (n = 6). Letras diferentes = P < 0,05.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 3 – Volume de treino nos grupos que realizaram sessão aguda de exercício de força

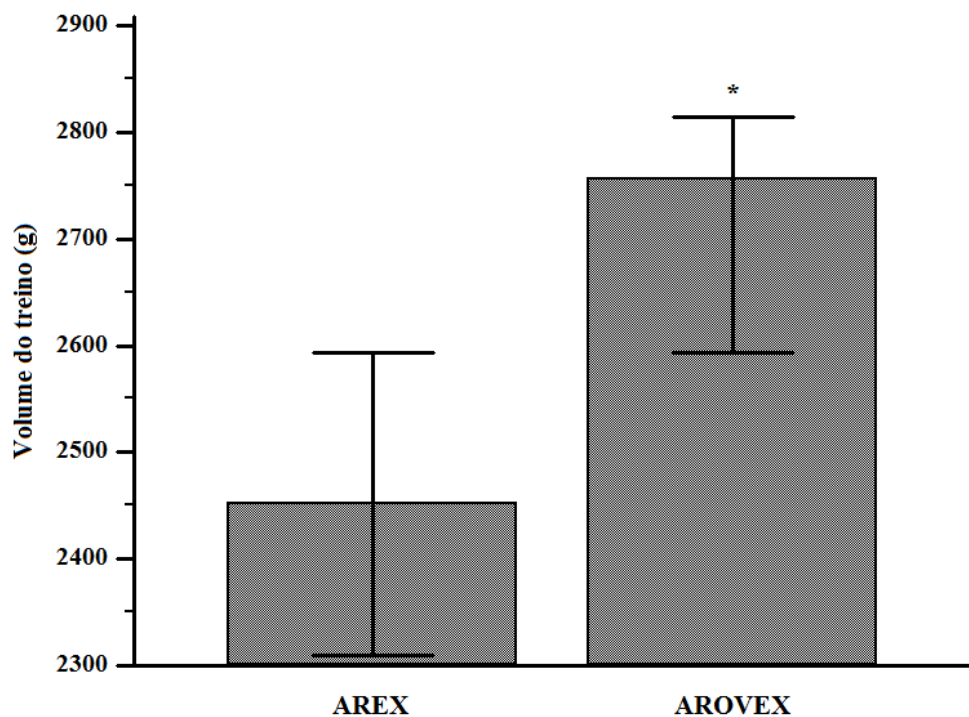


Figura 3 – Volume de treino nos grupos que realizaram sessão aguda de exercício de força. AREX – grupo artrítico que realizou sessão aguda de exercício de força (n = 6); AROVEX – grupo artrítico e ovariectomizado que realizou sessão aguda de exercício de força (n = 6). *P < 0.05.

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

Figura 4 – Correlações entre expressão dos genes alvos e o volume de treino

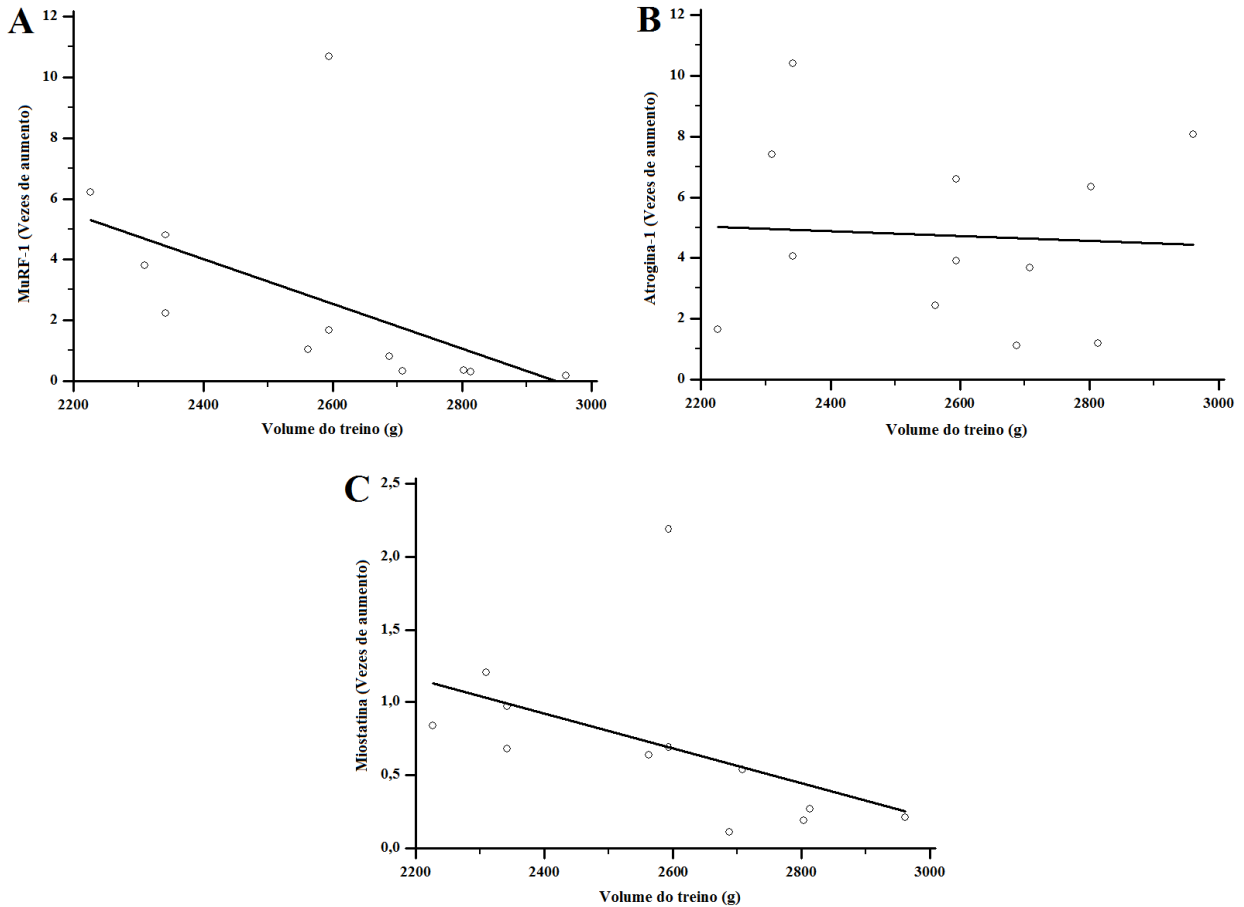


Figura 4 – Correlações dos genes alvos com o volume de treino. (A) Coeficiente de correlação de Spearman do RNAm da MuRF-1 com o volume de treino ($r = 0,846$; $P=0,0050$); (B) Coeficiente de correlação de Spearman do RNAm da Atrogin-1 com o volume de treino ($r = 0,0912$; $P=0,7622$); (C) Coeficiente de correlação de Spearman do RNAm da Miostatina com o volume de treino ($r = 0,726$; $P=0,0160$).

Fonte: Elaborado pelo Autor, 2016.

DISCUSSÃO

A perda de músculo esquelético (PME) tem sido postulada como um importante contribuinte para o aumento da morbidade e mortalidade na artrite reumatoide (VON HAEHLING; ANKER, 2014; WALSMITH; ROUBENOFF, 2002), especialmente em mulheres (ALAMANOS, Y.; DROSOS, 2005b). A via de sinalização molecular da perda de massa muscular envolve a regulação positiva de genes ubiquitina-ligases E3 do sistema ubiquitina-proteassoma (i.e. Atrogin-1 e MuRF-1) (CASTILLERO; MARTIN; et al., 2009; DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al., 2009c;2012; LOPEZ-MENDUINA et al.,

2012) e da miostatina (RAMIREZ et al., 2011). O EF tem sido reportado para modular os genes ubiquitina-ligases E3 do sistema ubiquitina-proteassoma e miostatina no músculo esquelético (LOUIS et al., 2007; STEFANETTI et al., 2014). No entanto, o efeito do EF nas ubiquitina-ligases E3 não foi testado na artrite reumatoide. Além disso, a PFO (menopausa ou ovariectomia) tem sido relatada como colaboradora direta da PME e também através de interações com a inflamação. Tem sido relatado que a PFO pode influenciar negativamente os efeitos do EF no músculo (ENNS; TIIDUS, 2008; MANGAN et al., 2014; MILANESI et al., 2009; MURRAY; HUSS, 2011; SITNICK et al., 2006; THOMAS, A. et al., 2010b; TIIDUS, P. M. et al., 2013a; VELDERS et al., 2012). Também, que a PFO influencia negativamente os efeitos de EF no músculo (DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al., 2009c;2012). Assim, parece razoável supor que a PFO intensifica a expressão de RNAm da miostatina e ubiquitina-ligases E3 (Atrogina-1 e MuRF-1) e também afeta negativamente o efeito "anti-catabólico" do EF no músculo esquelético durante a artrite reumatoide. Por isso, investigamos os efeitos do EF sobre os níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1, e miostatina no músculo gastrocnêmio de ratas artríticas após a ovariectomia. O nosso estudo mostrou que a artrite reumatoide induz PME e também aumenta os níveis de RNAm da atrogina-1, mas não da MuRF-1 e da miostatina, no músculo esquelético. Além disso, a PFO intensifica a PME e também aumenta a expressão gênica da atrogina-1 e MuRF-1 na artrite reumatoide. A PFO aumenta os níveis de RNAm da MuRF-1 e miostatina no músculo esquelético de ratos artríticos. Assim, a identificação de vias reguladoras da PFO que induz a PME durante a artrite reumatoide, tais como atrogina-1 e MuRF1, pode sugerir novos alvos terapêuticos durante artrite reumatoide com PFO. Deste modo, mostramos que o EF reduz os níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF1, e miostatina em ratos artríticos afetados pela PFO. Esses dados sugerem que o EF pode ser um importante meio terapêutico contra a PME induzida pela PFO durante a artrite reumatoide. Até agora, com o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que investigou os efeitos do EF agudo sobre vias de sinalização moleculares associados com a PME na artrite reumatoide com ou sem PFO. O efeito do EF sobre a MuRF-1 e miostatina, mas não atrogina-1, parece ser dependente do volume de treino / carga. Assim, trabalhos futuros devem, portanto, incluir estudos clínicos para avaliar se essa abordagem

terapêutica (EF) será eficaz para evitar ou prevenir a PME em mulheres com artrite afetadas por PFO.

No presente estudo, a concentração de estradiol (Figura 1) e os sinais externos da doença mensurada pela espessura articular mostraram sucesso na indução da ovariectomia e da artrite reumatóide (Met-BSA) (Tabela 3). Os ratos artríticos (AR e AROV) mostraram redução da AST de fibras do músculo gastrocnêmio quando comparados com ratos sem artrite (CT-Sham). De fato, a PME induzida pela artrite reumatoide tem sido consistentemente demonstrada em estudo com animais (CASTILLERO; MARTIN; et al., 2009; FILIPPIN et al., 2013; LOPEZ-MENDUINA et al., 2010) e humanos (RALL, L. C.; ROUBENOFF, 2004b). Observamos que a artrite reumatoide induz aumento substancial na expressão do gene atrogina-1 no músculo esquelético. Conforme a natureza complexa da PME envolvendo a regulação positiva dos genes ubiquitina-ligases E3 do sistema ubiquitina-proteassoma (CASTILLERO; MARTIN; et al., 2009; DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al., 2009c;2012; LOPEZ-MENDUINA et al., 2012), o aumento do nível de RNAm das ubiquitina-ligases E3 no músculo também tem sido observada em diferentes modelos de atrofia (CASTILLERO; MARTIN; et al., 2009; DUPONT-VERSTEEGDEN et al., 2006; MACEDO et al., 2014; RAMIREZ et al., 2011). No entanto, não houve aumento nos níveis de RNAm da MuRF-1 no músculo dos ratos artríticos. Estes dados sugerem que os genes Atrogina-1 e MuRF-1 podem ser regulados de forma diferente na artrite reumatoide. Estudos anteriores sugerem que a atrogina-1 promove a ubiquitinação de fatores reguladores miogénicos, tais como MyoD (TINTIGNAC, L. A. et al., 2005a) e miogenina (JOGO et al., 2009), o que leva a sua degradação pelo proteassoma, enquanto outras proteínas são degradadas também pelo sistema ubiquitina-proteassoma, porém mediadas pela MuRF-1 (PETROSKI; DESHAIES, 2005).

Embora o aumento no nível de RNAm da miostatina tenha sido associado com a perda de massa muscular em diferentes modelos de atrofia (MCCROSKERY et al., 2003; MCFARLANE et al., 2006; RAMIREZ et al., 2011; RODRIGUEZ et al., 2014), incluindo a inflamação articular (RAMIREZ et al., 2011), nosso estudo não suporta o aumento no RNAm da miostatina muscular na modelo de artrite reumatóide utilizado. De fato, o aumento no RNAm da miostatina no músculo não tem sido consistente, em

modelo de artrite reumatoide (CASTILLERO; NIETO-BONA; FERNANDEZ-GALAZ; et al., 2011; RAMIREZ et al., 2011). Por exemplo, enquanto Castellero et al. não encontraram aumento no RNAm da miostatina no músculo após 15 dias de administração da injeção de adjuvante (CASTILLERO; NIETO-BONA; FERNANDEZ-GALAZ; et al., 2011), Ramires et al. encontraram aumento no RNAm da miostatina no músculo após dois dias de injeção de I-carragenina (RAMIREZ et al., 2011). Estes dois estudos sugerem que após a indução da artrite reumatoide, há um aumento inicial no nível de RNAm da miostatina, que retorna aos níveis basais após alguns dias. Assim, no presente estudo, o RNAm da miostatina pode já ter atingido o pico antes do momento da nossa extração muscular. No entanto, só podemos especular isso. Assim, futuras pesquisas são necessárias para resolver esta questão.

Os resultados do estudo mostraram que a PFO resulta em aumento da perda de músculo esquelético. Além disso, a PFO aumentou os níveis de RNAm da atrogina-1 e MuRF-1 no músculo esquelético de ratos artríticos. De fato, o aumento do nível de RNAm da atrogina-1 e MuRF-1 têm sido associados com a PFO em mulheres (DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al., 2009c). Dieli-Conwright et al. investigaram a expressão de genes proteolíticos em mulheres pós-menopausadas que faziam e não terapia de reposição hormonal e relataram aumento na expressão gênica da atrogina-1 e MuRF-1 nas mulheres sem terapia de reposição hormonal. Assim, nossos dados suportam as descobertas anteriores que sugerem que o estrogênio atua como agente “anti-catabólico” com base nos níveis mais elevados da expressão gênica da atrogina-1 e MuRF-1 na atrofia muscular de ratas ovariectomizadas e mulheres na pós-menopausa (DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al., 2009a;2009c; TIIDUS, P. M. et al., 2013a).

Genes proteolíticos aumentados (i.e. ubiquitina-ligases E3) são indicativos de degradação de proteínas (BODINE; LATRES; et al., 2001; KACHAEVA; SHENKMAN, 2012). Assim, muito esforço tem sido feito para bloquear o aumento de RNAm de ubiquitina-ligases E3 durante a artrite reumatoide (CASTILLERO; NIETO-BONA; FERNANDEZ-GALAZ; et al., 2011; GRANADO et al., 2007; GRANADO et al., 2005; LOPEZ-MENDUINA et al., 2010; MARTIN et al., 2012) e, portanto, evitar a PME. Em outros modelos de atrofia muscular, como a dexametasona e desuso, o EF reduz os níveis de RNAm das ubiquitina-ligases E3 e miostatina (DUPONT-VERSTEEGDEN et

al., 2006; HADDAD et al., 2006; LANG et al., 2013; MACEDO et al., 2014). Notavelmente, no presente estudo, o EF regulou negativamente os níveis de RNAm da atrogina-1, Murf-1 e miostatina muscular em ratas artríticas com ovariectomia (Tabela 3). No entanto, observou-se correlações negativas e significante do volume de treino com níveis de RNAm da MuRF-1 e miostatina (Figura 4). Estes dados sugerem que a regulação negativa nos níveis de RNAm da MuRF-1 e miostatina para o EF são dependentes da quantidade de exercício, tais como volume de treino [carga (peso na cauda) x séries (número de subida)] (ACSM, 2009). O modelo de EF utilizado neste estudo consistiu no animal subir uma escada com carga fixada à cauda (MATHENY et al., 2009). Não fomos capazes de determinar a força muscular máxima (i.e. uma repetição máxima) em ratos artríticos por causa das limitações físicas do animal. Assim, o modelo de EF foi aumentando progressivamente adicionando 25% do peso corporal do rato a cada três subidas. Os 25% do peso corporal do rato foi utilizado porque esta carga percentual foi a mais tolerável por ratas artríticas durante a progressão da carga. Como os ratos ovariectomizados foram mais pesados do que os ratos não ovariectomizados (Tabela 2) (FISHER et al., 2000; SHINODA et al., 2002), o grupo AROVEX realizou maior volume de treino que o grupo AREX (Figura 3). Assim, no presente estudo a falta de resposta nos grupos AREX pode estar relacionada com o baixo volume executado.

CONCLUSÃO

Uma única sessão de EF foi capaz de reduzir os níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1, miostatina em ratos artríticos afetados pela PFO. No entanto, os efeitos do EF sobre os níveis de RNAm da MuRF1 e da miostatina, mas não da atrogina-1, parece ser dependente do volume de treino (provavelmente a carga). Assim, trabalhos futuros devem, portanto, incluir estudos clínicos para avaliar se essa abordagem terapêutica (EF) será eficaz para evitar ou prevenir a PME em mulheres com artrite afetadas pela PFO.

AGRADECIMENTOS

Essa investigação foi apoiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

REFERÊNCIAS

- ACSM. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009.
- 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.
- 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.
- BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-8, Nov 23 2001.
- 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.
- CHODZKO-ZAJKO, W. J. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 7, p. 1510-30, Jul 2009.
- DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al. Hormone therapy attenuates exercise-induced skeletal muscle damage in postmenopausal women. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 3, p. 853-8, Sep 2009a.
- _____. Influence of hormone replacement therapy on eccentric exercise induced myogenic gene expression in postmenopausal women. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 5, p. 1381-8, Nov 2009b.

_____. Hormone therapy and maximal eccentric exercise alters myostatin-related gene expression in postmenopausal women. **J Strength Cond Res**, v. 26, n. 5, p. 1374-82, May 2012.

DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E. et al. Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 101, n. 1, p. 202-12, Jul 2006.

DURIGAN, J. L. et al. Neuromuscular electrical stimulation alters gene expression and delays quadriceps muscle atrophy of rats after anterior cruciate ligament transection. **Muscle Nerve**, v. 49, n. 1, p. 120-8, Jan 2014.

ENNS, D. L.; TIIDUS, P. M. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 104, n. 2, p. 347-53, Feb 2008.

EVANS, W. J.; LAMBERT, C. P. Physiological basis of fatigue. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 86, n. 1 Suppl, p. S29-46, Jan 2007.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. **Clin Nutr**, v. 27, n. 6, p. 793-9, Dec 2008.

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.

FISHER, J. S.; KOHRT, W. M.; BROWN, M. Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 88, n. 1, p. 265-71, Jan 2000.

FURLANETTO JÚNIOR, R. et al. Loss of ovarian function results in increased loss of skeletal muscle in arthritic rats. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 38, n. 2, p. 056-064, Feb 2016.

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.

HADDAD, F. et al. Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. **J Appl Physiol (1985)**, v. 100, n. 2, p. 433-41, Feb 2006.

HAWLEY, J. A. et al. Integrative biology of exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738-49, Nov 6 2014.

JOGO, M.; SHIRAIISHI, S.; TAMURA, T. A. Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. **FEBS Lett**, v. 583, n. 17, p. 2715-9, Sep 3 2009.

- KACHAEVA, E.; SHENKMAN, B. Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.
- KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Description of a new method of ovariectomy in female rats. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 3, p. 462-70, May-Jun 2012.
- LANG, C. H. et al. Chronic alpha-hydroxyisocaproic acid treatment improves muscle recovery after immobilization-induced atrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, n. 3, p. E416-28, Aug 1 2013.
- 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.
- _____. Short-term growth hormone or IGF-I administration improves the IGF-IGFBP system in arthritic rats. **Growth Horm IGF Res**, v. 22, n. 1, p. 22-9, Feb 2012.
- LOUIS, E. et al. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 103, n. 5, p. 1744-51, Nov 2007.
- 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.
- MACKENZIE, M. G. et al. Inhibition of myostatin signaling through Notch activation following acute resistance exercise. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68743, 2013.
- MANGAN, G. et al. Oestrogen-dependent satellite cell activation and proliferation following a running exercise occurs via the PI3K signalling pathway and not IGF-1. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 212, n. 1, p. 75-85, Sep 2014.
- MARTIN, A. I. et al. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam, on atrogen-1 and myogenic regulatory factors in skeletal muscle of rats injected with endotoxin. **J Physiol Pharmacol**, v. 63, n. 6, p. 649-59, Dec 2012.
- 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.
- MCCROSKERY, S. et al. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. **J Cell Biol**, v. 162, n. 6, p. 1135-47, Sep 15 2003.
- MCFARLANE, C. et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. **J Cell Physiol**, v. 209, n. 2, p. 501-14, Nov 2006.
- MILANESI, L. et al. Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor beta in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. **Steroids**, v. 74, n. 6, p. 489-97, Jun 2009.

- MURRAY, J.; HUSS, J. M. Estrogen-related receptor alpha regulates skeletal myocyte differentiation via modulation of the ERK MAP kinase pathway. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 301, n. 3, p. C630-45, Sep 2011.
- PETROSKI, M. D.; DESHAIES, R. J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 9-20, Jan 2005.
- RAJBHANDARY, R.; KHEZRI, A.; PANUSH, R. S. Rheumatoid cachexia: what is it and why is it important? **J Rheumatol**, v. 38, n. 3, p. 406-8, Mar 2011.
- 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.
- RODRIGUEZ, J. et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 22, p. 4361-71, Nov 2014.
- SHINODA, M.; LATOUR, M. G.; LAVOIE, J. M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26, n. 3, p. 335-43, Mar 2002.
- SITNICK, M. et al. Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. **J Appl Physiol (1985)**, v. 100, n. 1, p. 286-93, Jan 2006.
- STEFANETTI, R. J. et al. Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. **Pflugers Arch**, Aug 8 2014.
- THOMAS, A.; BUNYAN, K.; TIIDUS, P. M. Oestrogen receptor-alpha activation augments post-exercise myoblast proliferation. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 198, n. 1, p. 81-9, Jan 2010.
- TIIDUS, P. M.; LOWE, D. A.; BROWN, M. Estrogen replacement and skeletal muscle: mechanisms and population health. **J Appl Physiol (1985)**, v. 115, n. 5, p. 569-78, Sep 1 2013.
- TINTIGNAC, L. A. et al. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 4, p. 2847-56, Jan 28 2005.
- VELDERS, M. et al. Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. **FASEB J**, v. 26, n. 5, p. 1909-20, May 2012.
- VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 5, n. 4, p. 261-3, Dec 2014.
- WALSMITH, J.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. **Int J Cardiol**, v. 85, n. 1, p. 89-99, Sep 2002.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A perda da função ovariana resulta em aumento na perda de músculo esquelético relacionado com as ubiquitinas ligases, atrogina-1 e MuRF-1, na artrite reumatoide. A identificação das vias regulatórias sugere novos alvos terapêuticos eficazes na redução da perda de músculo esquelético induzido pela perda da função ovariana durante a artrite reumatoide. Nessa perspectiva, o exercício de força parece reduzir os níveis de expressão da atrogina-1, MuRF-1 e miostatina em ratos artríticos afetados por perda da função ovariana. Isto sugere que o exercício de força é um importante meio terapêutico contra a perda de músculo esquelético induzido pela perda da função ovariana durante a artrite reumatoide. No entanto, os efeitos do exercício de força sobre os níveis de RNAm da MuRF1 e da miostatina, mas não da atrogina-1, parecem ser dependentes do volume de treino (provavelmente a carga). Assim, trabalhos futuros devem, portanto, incluir estudos clínicos para avaliar se essa abordagem terapêutica (exercício de força) será capaz de evitar ou prevenir a perda de músculo esquelético em mulheres com artrite reumatoide afetadas por perda da função ovariana.

REFERÊNCIAS

- ACSM. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 3, p. 687-708, Mar 2009.
- 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. **Autoimmunity reviews**, v. 4, n. 3, p. 130-136, 2005a.
- ALAMANOS, Y.; DROSOS, A. A. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. **Autoimmun Rev**, v. 4, n. 3, p. 130-6, Mar 2005b.
- ALETAHA, D. et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Ann Rheum Dis**, v. 69, n. 9, p. 1580-8, Sep 2010.
- ATHERTON, P. J. et al. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. **The FASEB journal**, v. 19, n. 7, p. 786-788, 2005.
- AUBERTIN-LEHEUDRE, M. et al. HRT provides no additional beneficial effect on sarcopenia in physically active postmenopausal women: a cross-sectional, observational study. **Maturitas**, v. 51, n. 2, p. 140-145, 2005.
- AZEVEDO, A. B. C.; FERRAZ, M. B.; CICONELLI, R. M. Indirect costs of rheumatoid arthritis in Brazil. **Value in Health**, v. 11, n. 5, p. 869-877, 2008.
- BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70S6 correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 276, n. 1, p. C120-C127, 1999.
- BAKER, J. F. et al. Associations between body composition and bone density and structure in men and women across the adult age spectrum. **Bone**, v. 53, n. 1, p. 34-41, 2013.
- BAKER, J. F. et al. Deficits in muscle mass, muscle density, and modified associations with fat in rheumatoid arthritis. **Arthritis care & research**, v. 66, n. 11, p. 1612-1618, 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.

BERGEN, H. R. et al. Myostatin as a mediator of sarcopenia versus homeostatic regulator of muscle mass: insights using a new mass spectrometry-based assay. **Skeletal muscle**, v. 5, n. 1, p. 1, 2015.

BODINE, S. C. et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. **Science**, v. 294, n. 5547, p. 1704-1708, 2001.

BODINE, S. C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature cell biology**, v. 3, n. 11, p. 1014-1019, 2001.

BREEN, L. et al. Two weeks of reduced activity decreases leg lean mass and induces “anabolic resistance” of myofibrillar protein synthesis in healthy elderly. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 6, p. 2604-2612, 2013.

BROOKS, N. et al. Resistance training and timed essential amino acids protect against the loss of muscle mass and strength during 28 days of bed rest and energy deficit. **Journal of Applied Physiology**, v. 105, n. 1, p. 241-248, 2008.

BROOKS, N.; MYBURGH, K. H. Skeletal muscle wasting with disuse atrophy is multi-dimensional: the response and interaction of myonuclei, satellite cells and signaling pathways. **Frontiers in physiology**, v. 5, 2014.

CARLSSON, P.; MAHLAPUU, M. Forkhead transcription factors: key players in development and metabolism. **Developmental biology**, v. 250, n. 1, p. 1-23, 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. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 309, n. 1, p. 8-16, 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.

CASTILLERO, E. et al. Fenofibrate, a PPAR α agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 5, p. E790-E799, 2011.

CHALLAL, S. et al. Cachexia and adiposity in rheumatoid arthritis. Relevance for disease management and clinical outcomes. **Joint Bone Spine**, 2015.

CHODZKO-ZAJKO, W. J. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. **Med Sci Sports Exerc**, v. 41, n. 7, p. 1510-30, Jul 2009.

CIECHANOVER, A. The ubiquitin–proteasome pathway: on protein death and cell life. **The EMBO journal**, v. 17, n. 24, p. 7151-7160, 1998.

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, 2013.

DE NIJS, R. et al. Prevalence of vertebral deformities and symptomatic vertebral fractures in corticosteroid treated patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 40, n. 12, p. 1375-1383, 2001.

DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al. Hormone therapy attenuates exercise-induced skeletal muscle damage in postmenopausal women. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 3, p. 853-8, Sep 2009a.

DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al. Influence of hormone replacement therapy on eccentric exercise induced myogenic gene expression in postmenopausal women. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 5, p. 1381-1388, 2009b.

DIELI-CONWRIGHT, C. M. et al. Influence of hormone replacement therapy on eccentric exercise induced myogenic gene expression in postmenopausal women. **J Appl Physiol (1985)**, v. 107, n. 5, p. 1381-8, Nov 2009c.

_____. Hormone therapy and maximal eccentric exercise alters myostatin-related gene expression in postmenopausal women. **J Strength Cond Res**, v. 26, n. 5, p. 1374-82, May 2012.

DIRKS, M. et al. Neuromuscular electrical stimulation prevents muscle disuse atrophy during leg immobilization in humans. **Acta Physiologica**, v. 210, n. 3, p. 628-641, 2014.

DREYER, H. C. et al. Resistance exercise increases AMPK activity and reduces 4E-BP1 phosphorylation and protein synthesis in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, v. 576, n. 2, p. 613-624, 2006.

DUPONT-VERSTEEGDEN, E. E. et al. Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 101, n. 1, p. 202-12, Jul 2006.

DURIGAN, J. L. et al. Neuromuscular electrical stimulation alters gene expression and delays quadriceps muscle atrophy of rats after anterior cruciate ligament transection. **Muscle Nerve**, v. 49, n. 1, p. 120-8, Jan 2014.

ELIAKIM, A.; NEMET, D. Exercise training, physical fitness and the growth hormone-insulin-like growth factor-1 axis and cytokine balance. **Med Sport Sci**, v. 55, p. 128-40, 2010.

ENNS, D. L.; TIIDUS, P. M. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 104, n. 2, p. 347-53, Feb 2008.

EVANS, W. J.; LAMBERT, C. P. Physiological basis of fatigue. **Am J Phys Med Rehabil**, v. 86, n. 1 Suppl, p. S29-46, Jan 2007.

EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. **Clin Nutr**, v. 27, n. 6, p. 793-9, Dec 2008.

FAVIER, F. B.; BENOIT, H.; FREYSSENET, D. Cellular and molecular events controlling skeletal muscle mass in response to altered use. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 456, n. 3, p. 587-600, 2008.

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.

FISHER, J. S.; KOHRT, W. M.; BROWN, M. Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. **J Appl Physiol (1985)**, v. 88, n. 1, p. 265-71, Jan 2000.

FLÜCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity-from gene to form and function. In: (Ed.). **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**: Springer, 2003. p.159-216. ISBN 3540002286.

FOLETTA, V. C. et al. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 461, n. 3, p. 325-335, 2011.

FRYSTYK, J. Exercise and the growth hormone-insulin-like growth factor axis. **Med Sci Sports Exerc**, v. 42, n. 1, p. 58-66, Jan 2010.

FURLANETTO JÚNIOR, R. et al. Loss of ovarian function results in increased loss of skeletal muscle in arthritic rats. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 38, n. 2, p. 056-064, Feb 2016.

GLOVER, E. I. et al. Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. **The Journal of physiology**, v. 586, n. 24, p. 6049-6061, 2008.

GOLDBERG, A. L. et al. Mechanism of work-induced hypertrophy of skeletal muscle. **Medicine and science in sports**, v. 7, n. 3, p. 185, 1975.

GOMES, M. D. et al. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 25, p. 14440-14445, 2001.

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.

HADDAD, F. et al. Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. **J Appl Physiol (1985)**, v. 100, n. 2, p. 433-41, Feb 2006.

HÄKKINEN, A. et al. Muscle strength, pain, and disease activity explain individual subdimensions of the Health Assessment Questionnaire disability index, especially in women with rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 65, n. 1, p. 30-34, 2006.

HAWLEY, J. A. et al. Integrative biology of exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738-49, Nov 6 2014.

HELLIWELL, P.; JACKSON, S. Relationship between weakness and muscle wasting in rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 53, n. 11, p. 726-728, 1994.

HOLLAN, I. et al. Cardiovascular disease in autoimmune rheumatic diseases. **Autoimmunity reviews**, v. 12, n. 10, p. 1004-1015, 2013.

HOOYMAN, J. R. et al. Fractures after rheumatoid arthritis a population-based study. **Arthritis & Rheumatism**, v. 27, n. 12, p. 1353-1361, 1984.

JOGO, M.; SHIRAISHI, S.; TAMURA, T. A. Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. **FEBS Lett**, v. 583, n. 17, p. 2715-9, Sep 3 2009.

KACHAEVA, E.; SHENKMAN, B. Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

KALLMAN, D. A.; PLATO, C. C.; TOBIN, J. D. The role of muscle loss in the age-related decline of grip strength: cross-sectional and longitudinal perspectives. **Journal of gerontology**, v. 45, n. 3, p. M82-M88, 1990.

KENNY, A. M. et al. Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in nonobese women who are long-term users of estrogen-replacement therapy. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 58, n. 5, p. M436-M440, 2003.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Description of a new method of ovariectomy in female rats. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 3, p. 462-70, May-Jun 2012.

KIM, J.-S.; CROSS, J. M.; BAMMAN, M. M. Impact of resistance loading on myostatin expression and cell cycle regulation in young and older men and women. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 288, n. 6, p. E1110-E1119, 2005.

KOURILOVITCH, M.; GALARZA-MALDONADO, C.; ORTIZ-PRADO, E. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. **J Autoimmun**, v. 48-49, p. 26-30, Feb-Mar 2014.

KUMAR, V. et al. Human muscle protein synthesis and breakdown during and after exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 6, p. 2026-2039, 2009.

KUMAR, V. et al. Age-related differences in the dose–response relationship of muscle protein synthesis to resistance exercise in young and old men. **The Journal of physiology**, v. 587, n. 1, p. 211-217, 2009.

LANG, C. H. et al. Chronic alpha-hydroxyisocaproic acid treatment improves muscle recovery after immobilization-induced atrophy. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 305, n. 3, p. E416-28, Aug 1 2013.

LÉGER, B. et al. Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **The Journal of physiology**, v. 576, n. 3, p. 923-933, 2006.

LEMMERY, A. B. et al. Effects of high-intensity resistance training in patients with rheumatoid arthritis: A randomized controlled trial. **Arthritis care & research**, v. 61, n. 12, p. 1726-1734, 2009.

LLOVERA, M. et al. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 230, n. 2, p. 238-241, 1997.

LONDHE, P.; GUTTRIDGE, D. C. Inflammation induced loss of skeletal muscle. **Bone**, v. 80, p. 131-142, 2015.

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.

_____. Short-term growth hormone or IGF-I administration improves the IGF-IGFBP system in arthritic rats. **Growth Horm IGF Res**, v. 22, n. 1, p. 22-9, Feb 2012.

LOUIS, E. et al. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 103, n. 5, p. 1744-51, Nov 2007.

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.

MACHIDA, S.; BOOTH, F. W. Regrowth of skeletal muscle atrophied from inactivity. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 36, n. 1, p. 52-59, 2004.

MACKENZIE, M. G. et al. Inhibition of myostatin signaling through Notch activation following acute resistance exercise. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e68743, 2013.

MADDALOZZO, G. F. et al. The association between hormone therapy use and changes in strength and body composition in early postmenopausal women. **Menopause**, v. 11, n. 4, p. 438-446, 2004.

MAESTA, N. et al. Effects of soy protein and resistance exercise on body composition and blood lipids in postmenopausal women. **Maturitas**, v. 56, n. 4, p. 350-358, 2007.

MANGAN, G. et al. Oestrogen-dependent satellite cell activation and proliferation following a running exercise occurs via the PI3K signalling pathway and not IGF-1. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 212, n. 1, p. 75-85, Sep 2014.

MARTIN, A. I. et al. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam, on atrogen-1 and myogenic regulatory factors in skeletal muscle of rats injected with endotoxin. **J Physiol Pharmacol**, v. 63, n. 6, p. 649-59, Dec 2012.

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.

MAYHEW, D. L. et al. Translational signaling responses preceding resistance training-mediated myofiber hypertrophy in young and old humans. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 5, p. 1655-1662, 2009.

MCCLUNG, J. et al. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. **Journal of Applied Physiology**, v. 100, n. 6, p. 2012-2023, 2006.

MCCROSKERY, S. et al. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. **J Cell Biol**, v. 162, n. 6, p. 1135-47, Sep 15 2003.

MCFARLANE, C. et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. **J Cell Physiol**, v. 209, n. 2, p. 501-14, Nov 2006.

METSIOS, G. S. et al. Individualised exercise improves endothelial function in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 73, n. 4, p. 748-751, 2014.

METSIOS, G. S. et al. Rheumatoid arthritis, cardiovascular disease and physical exercise: a systematic review. **Rheumatology**, v. 47, n. 3, p. 239-248, 2008.

MILANESI, L. et al. Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor beta in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. **Steroids**, v. 74, n. 6, p. 489-97, Jun 2009.

MOTA, L. M. H. D. et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 152-174, 2012.

MURRAY, J.; HUSS, J. M. Estrogen-related receptor alpha regulates skeletal myocyte differentiation via modulation of the ERK MAP kinase pathway. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 301, n. 3, p. C630-45, Sep 2011.

NARICI, M.; DE BOER, M. Disuse of the musculo-skeletal system in space and on earth. **European journal of applied physiology**, v. 111, n. 3, p. 403-420, 2011.

OLIVIERI, F. et al. Hormone replacement therapy enhances IGF-1 signaling in skeletal muscle by diminishing miR-182 and miR-223 expressions: a study on postmenopausal monozygotic twin pairs. **Aging Cell**, v. 13, n. 5, p. 850-61, Oct 2014.

ORSATTI, F. L. et al. Plasma hormones, muscle mass and strength in resistance-trained postmenopausal women. **Maturitas**, v. 59, n. 4, p. 394-404, 2008.

ORSATTI, F. L. et al. Low appendicular muscle mass is correlated with femoral neck bone mineral density loss in postmenopausal women. **BMC musculoskeletal disorders**, v. 12, n. 1, p. 225, 2011.

ØRSTAVIK, R. E. et al. Vertebral deformities in rheumatoid arthritis: a comparison with population-based controls. **Archives of internal medicine**, v. 164, n. 4, p. 420-425, 2004.

PEDERSEN, B. K. Muscle as a secretory organ. **Compr Physiol**, v. 3, n. 3, p. 1337-62, Jul 2013.

PEEL, N. et al. Risk of vertebral fracture and relationship to bone mineral density in steroid treated rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 54, n. 10, p. 801-806, 1995.

PETROSKI, M. D.; DESHAIES, R. J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 1, p. 9-20, Jan 2005.

PETTE, D.; STARON, R. S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochemistry and cell biology**, v. 115, n. 5, p. 359-372, 2001.

PHILLIPS, S.; GLOVER, E.; RENNIE, M. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 3, p. 645-654, 2009.

PHILLIPS, S. et al. Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. **Clinical Science**, v. 84, n. Pt 1, p. 95-98, 1993.

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.

RAJBHANDARY, R.; KHEZRI, A.; PANUSH, R. S. Rheumatoid cachexia: what is it and why is it important? **J Rheumatol**, v. 38, n. 3, p. 406-8, Mar 2011.

RALL, L.; ROUBENOFF, R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. **Rheumatology**, v. 43, n. 10, p. 1219-1223, 2004a.

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

RAMASWAMY, S. et al. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. **Cancer cell**, v. 2, n. 1, p. 81-91, 2002.

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.

RAUE, U. et al. Proteolytic gene expression differs at rest and after resistance exercise between young and old women. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 62, n. 12, p. 1407-1412, 2007.

ROCHA, O. M. D. 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**, v. 71, n. 22, p. 4361-71, Nov 2014.

ROTH, S. M. et al. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 6, p. 706-709, 2003.

SAMSON, M. M. et al. Relationships between physical performance measures, age, height and body weight in healthy adults. **Age and ageing**, v. 29, n. 3, p. 235-242, 2000.

SANDRI, M. et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 44, p. 16260-16265, 2006.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399-412, 2004.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. The Lancet Seminar: Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094-1108, 2010.

SENNA, E. R. et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. **The Journal of Rheumatology**, v. 31, n. 3, p. 594-597, 2004.

- SHINODA, M.; LATOUR, M. G.; LAVOIE, J. M. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 26, n. 3, p. 335-43, Mar 2002.
- SITNICK, M. et al. Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. **J Appl Physiol (1985)**, v. 100, n. 1, p. 286-93, Jan 2006.
- SMITH, C.; ARNETT JR, F. Diagnosing rheumatoid arthritis: current criteria. **American family physician**, v. 44, n. 3, p. 863-870, 1991.
- SOUBRIER, M. et al. Cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 81, n. 4, p. 298-302, 2014.
- SPECTOR, T. et al. Risk of vertebral fracture in women with rheumatoid arthritis. **British Medical Journal**, v. 306, p. 558-558, 1993.
- SPIERING, B. A. et al. Resistance exercise biology. **Sports medicine**, v. 38, n. 7, p. 527-540, 2008.
- STEFANETTI, R. J. et al. Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. **Pflugers Arch**, Aug 8 2014.
- STRASSER, B. et al. The effects of strength and endurance training in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical rheumatology**, v. 30, n. 5, p. 623-632, 2011.
- TAAFFE, D. R. et al. The effect of hormone replacement therapy and/or exercise on skeletal muscle attenuation in postmenopausal women: a yearlong intervention. **Clinical physiology and functional imaging**, v. 25, n. 5, p. 297-304, 2005.
- TANNER, R. E. et al. Age-related differences in lean mass, protein synthesis and skeletal muscle markers of proteolysis after bed rest and exercise rehabilitation. **The Journal of physiology**, v. 593, n. 18, p. 4259-4273, 2015.
- 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.
- THOMAS, A.; BUNYAN, K.; TIIDUS, P. Oestrogen receptor-alpha activation augments post-exercise myoblast proliferation. **Acta Physiologica**, v. 198, n. 1, p. 81-89, 2010a.

THOMAS, A.; BUNYAN, K.; TIIDUS, P. M. Oestrogen receptor-alpha activation augments post-exercise myoblast proliferation. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 198, n. 1, p. 81-9, Jan 2010b.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. R345-R353, 2005.

TIIDUS, P. M.; LOWE, D. A.; BROWN, M. Estrogen replacement and skeletal muscle: mechanisms and population health. **J Appl Physiol (1985)**, v. 115, n. 5, p. 569-78, Sep 1 2013a.

TIIDUS, P. M.; LOWE, D. A.; BROWN, M. Estrogen replacement and skeletal muscle: mechanisms and population health. **Journal of Applied Physiology**, v. 115, n. 5, p. 569-578, 2013b.

TINTIGNAC, L. A. et al. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 4, p. 2847-56, Jan 28 2005a.

TINTIGNAC, L. A. et al. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 4, p. 2847-2856, 2005b.

URSUM, J. et al. High prevalence of vertebral deformities in elderly patients with early rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 68, n. 9, p. 1512-1513, 2009.

VAN DER WOUDE, D. et al. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 4, p. 916-923, 2009.

VELDERS, M. et al. Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. **FASEB J**, v. 26, n. 5, p. 1909-20, May 2012.

VIS, M.; GÜLER-YÜKSEL, M.; LEMS, W. Can bone loss in rheumatoid arthritis be prevented? **Osteoporosis International**, v. 24, n. 10, p. 2541-2553, 2013.

VOLPI, E.; CHINKES, D. L.; RASMUSSEN, B. B. Sequential muscle biopsies during a 6-h tracer infusion do not affect human mixed muscle protein synthesis and muscle phenylalanine kinetics. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 4, p. E959-E963, 2008.

VON HAEHLING, S.; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**, v. 5, n. 4, p. 261-3, Dec 2014.

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

WOLFE, F. et al. The mortality of rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 37, n. 4, p. 481-494, 1994.

YAMADA, T. et al. Muscle dysfunction associated with adjuvant-induced arthritis is prevented by antioxidant treatment. **Skeletal muscle**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2015.

YE, F. et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 attenuates skeletal muscle damage and accelerates muscle regeneration and functional recovery after disuse. **Experimental physiology**, v. 98, n. 5, p. 1038-1052, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A: METODOLOGIA EXPANDIDA

1.1 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 274/2013 (Anexo 1).

1.2 ANIMAIS

Foram utilizados 36 ratos da linhagem Wistar, fêmeas, adultas, com peso de $195,3 \pm 17,4$ gramas, média de idade de nove 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) (figura 1) 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.

Figura 1 – Alocação dos animais



Fonte: Do Autor, 2014.

1.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi dividido em três fases, sendo: a primeira fase o procedimento de ovariectomia (indução do hipoestrogenismo); a segunda fase o procedimento de indução da AR e exercício de força; e a terceira fase a eutanásia seguida da coleta do sangue e tecidos conforme descrito abaixo sucintamente.

As ratas dos grupos OV; AROV e AROVEX foram submetidas ao procedimento cirúrgico para retirada dos ovários (indução do hipoestrogenismo). Quinze dias após o procedimento cirúrgico, todas as ratas passaram por uma semana de adaptação ao EF para familiarização com a escada, minimizando possíveis interferências. Tal adaptação consistiu em 3 sessões, separadas por 1 dia, com 5 subidas consecutivas por sessão.

Nas três semanas seguintes, os grupos experimentais (AR, AREX, AROV e AROVEX) receberam duas injeções sistêmicas (subcutâneas) e uma injeção nas articulações dos tornozelos, separada por sete dias, para indução da AR. Quinze dias após a última aplicação, os animais dos grupos AREX e AROVEX realizaram uma sessão de EF. Os animais foram eutanasiados seis horas após a aplicação do EF (conforme figura 5), para coincidir com o pico de expressão dos genes analisados.

Figura 2 – Desenho experimental



Fonte: Do Autor, 2015.

Os animais chegaram ao biotério do instituto de pesquisa em oncologia (IPON) da UFTM com aproximadamente cinco semanas de idade e passaram por duas semanas de aclimação. Em seguida, foram aleatoriamente divididos em grupos controle e experimentais, conforme classificação a seguir:

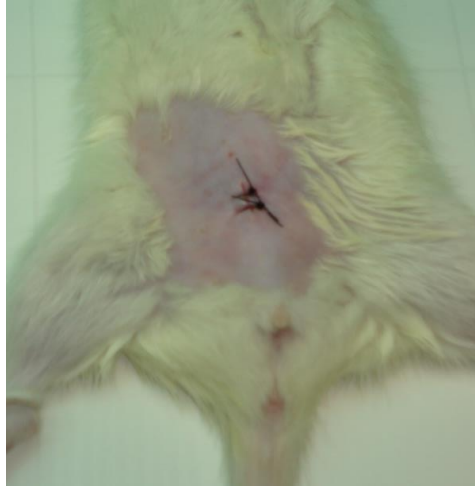
- Grupo Controle-Sham (CT-Sham) – composto por seis animais, sem indução de AR e sem EF;
- Grupo Artrite Reumatoide (AR) - composto por seis animais, com indução de AR e sem EF;
- Grupo Artrite Reumatoide e Exercício (AREX) – composto por seis animais, com indução de AR submetidos a uma sessão de EF.
- Grupo Ovariectomia (OV) - composto por seis animais ovariectomizados, sem indução de AR e sem EF;
- Grupo Artrite Reumatoide e Ovariectomia (AROV) - composto por seis animais, com indução de AR, ovariectomizados e sem EF;
- Grupo Artrite Reumatoide, Ovariectomia e Exercício (AROVEX) – composto por seis animais, com indução de AR, ovariectomizados e submetidos a uma sessão de EF.

1.3.1 Modelo de Indução Experimental da Ovariectomia em Ratos

Todos os procedimentos foram realizados conforme orientações descritas por Khajuria; Razdan e Mahapatra, (2012) e Waynforth e Flecknell, (1992). Este procedimento foi adotado por minimizar os processos invasivos (figura 2).

Para a indução da ovariectomia, os animais foram submetidos a jejum de 16 horas antes dos procedimentos cirúrgicos. Posteriormente foram submetidos à anestesia intraperitoneal transitória por meio da solução de Xilasina (10mg/kg) e Quetamina (70mg/kg). Sob ação anestésica, os animais tiveram o pelo do abdome parcialmente removido. A área da cirurgia foi limpa e esterilizada com etanol (Merck, Índia) e o local seco com lenços de papel *Kimwipes* (Fisher Scientific). O animal foi colocado em decúbito dorsal com a cauda em direção ao pesquisador na mesa de operação e as patas de trás amarradas e presas por cordões encerados para facilitar o acesso à área da cirurgia. Foi realizada uma pequena incisão transversal peritoneal de 0,4–0,6 cm feita com bisturi cirúrgico (lâmina nº 11) na parte média do abdome, ligeiramente lateralizada para a direita, próxima ao segundo mamilo direito da rata. Após acessar a cavidade peritoneal, o tecido adiposo foi afastado até identificar a tuba uterina direita e o ovário correspondente que foram exteriorizados delicadamente, evitando desprender pequenos pedaços que pudessem reimplantar-se e continuar a função normal. O procedimento foi repetido para o ovário esquerdo através da mesma incisão. Uma sutura foi feita no terço distal entre a tuba uterina e o ovário e um corte feito entre a sutura e ovário, juntamente com todos os vasos sanguíneos e gordura que acompanhavam o ovário. Os cornos uterinos foram retornados para a cavidade abdominal. O fechamento da incisão foi realizado em duas camadas, muscular e cutânea, utilizando-se fios de suturas estéreis. O peritônio e as camadas musculares foram suturadas com fio absorvível Catgut simples (Ethicon sutures-3/0, Johnson & Johnson Ltda., Índia), e a pele foi suturada com fio não absorvível de nylon (Ethicon sutures-3/0, Johnson & Johnson Ltda., Índia), aplicando iodopovidona na área para desinfetar a pele após a sutura. O alto grau de assepsia foi mantido durante todo o procedimento. A rata foi retornada para a gaiola, isolada das demais até a mesma recobrar a consciência e não haver mais o efeito dos anestésicos, tendo o seu estado de saúde verificado a cada hora por um período de 6 horas, assim como nos dias seguintes. A ovariectomia foi confirmada pela determinação das concentrações de estradiol circulante no grupo ovariectomizado em comparação ao grupo não ovariectomizado ($22,7 \pm 10,3$ pg/mL vs. $56,7 \pm 17,6$ pg/mL; $P = 0,002$).

Figura 3 – Sutura da pequena incisão transversal



Fonte: Do Autor, 2014.

1.3.2 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 50 μ L 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 14^o dia a indução da AR foi realizada por injeção intra-articular (figura 3) de 25 μ L 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 (CASTILLERO; NIETO-BONA; FERNÁNDEZ-GALAZ; et al., 2011).

Figura 4 – Injeção intra-articular na articulação do tornozelo



Fonte: Do Autor, 2014.

1.3.3 Exercício de Força

1.3.3.1 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, 80° de inclinação) com uma carga presa na base da cauda (figura 4).

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 autoadesiva (1,5cm, 3M Tartan), era constituído de tubos cilíndricos contendo pesos esféricos de chumbo em seu interior.

Figura 5 – Escada para realização do protocolo de escalada



Fonte: Do Autor, 2014.

1.3.3.2 Familiarização ao modelo de escalada

Durante três sessões de EF as ratas foram adaptadas com o ato de escalar. Foram realizadas cinco escaladas consecutivas por sessão de EF, durante uma semana. 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. Essa familiarização foi feita para minimizar possíveis interferências que pudessem existir durante a sessão de exercício de força.

1.3.3.3 Sessão aguda de Exercício de Força

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 esta 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 AREX e AROVEX), foi calculada a média aritmética de estímulos manuais e reproduzida de forma pareada nos animais que não fizeram exercício (grupos CT-Sham; AR; OV e AROV). Tanto o EF quanto os estímulos manuais foram realizados no período da manhã.

1.4 PROTOCOLO DE EUTANÁSIA E COLETA SANGUÍNEA

Seis horas após a sessão de EF (AREX e AROVEX) ou à aplicação dos estímulos manuais (CT-Sham; AR; OV e AROV), 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 a 3.000 rotações por minuto (rpm) (Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O plasma foi separado em alíquotas de 500µL e armazenado à -80°C até as análises.

1.5 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 (Methacarn) para análises morfológicas, enquanto dos músculos da perna esquerda foram retiradas as fáscias e os tendões, assim, os músculos “limpos” foram alocados em *cryovial* (Corning Incorporated), imediatamente mergulhados em nitrogênio líquido e

posteriormente armazenados a -80° para análises da expressão muscular de RNAm dos genes de interesse.

1.6 ANÁLISES LABORATORIAIS

1.6.1 Análise Morfológica

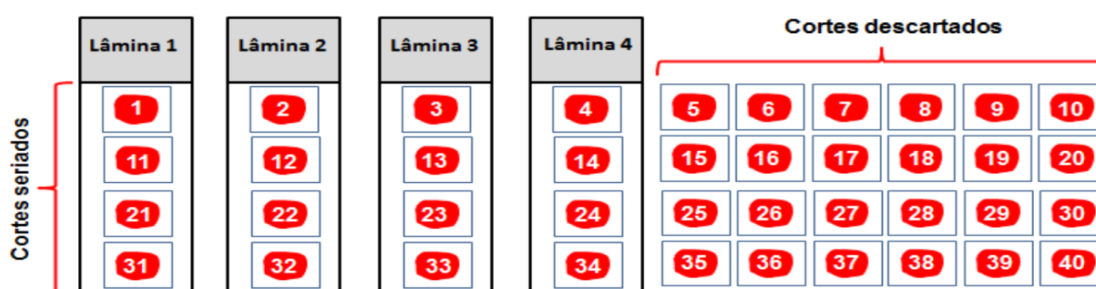
Todos os procedimentos envolvidos no processamento, inclusão, cortes, coloração e análise do tecido muscular aqui informados, foram previamente testados em estudo piloto. Assim, os músculos gastrocnêmios logo que removidos foram armazenados em cassetes identificados e embebidos por 24 horas em potes 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 o protocolo de processamento dos músculos gastrocnêmios:

- 25 min em álcool 80%;
- 25 min em álcool 95% (I);
- 25 min em álcool 95% (II);
- 25 min em álcool 95% (III);
- 25 min em álcool Absoluta (I);
- 25 min em álcool Absoluta (II);
- 35 min em álcool Absoluta (III);
- 50 min em Xilol (I);
- 50 min em Xilol (II);
- 35 min em parafina (I);
- 35 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 emblocado 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. Posteriormente, 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 6).

Figura 6 – Corte seriado do tecido muscular



Fonte: Do Autor, 2015.

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 (H&E) de acordo com os seguintes procedimentos:

- 3 min em xilol (I);
- 3 min em xilol (II);
- 4 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 comum 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, utilizando adesivo Entellan[®] (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) e levadas ao microscópio (Nikon Eclipse Ci-S). Algumas lâminas apresentaram-se mais escuras devido ao adesivo Bálsamo do Canadá (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil), que foi utilizado substituindo o adesivo Entellan[®].

A captura de imagens foi realizada pela câmera Infinity 1-3C-Lumenera (Ottawa, Ontario, Canada) na objetiva de 20X usando-se o *Software* Infinity Analyze (versão 6.4.0) disponíveis no laboratório do Programa de Pós-Graduação em Educação Física da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (PPGEF-UFTM). A partir das imagens, 200 fibras por músculo tiveram mensuradas suas AST através do *Software* Imagem J (Image J 1.46r). As análises das imagens foram feitas por um mesmo avaliador que possuía experiência prévia adquirida no estudo piloto.

1.6.2 Análise da Expressão Gênica

1.6.2.1 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 núcleoproteicos. 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.

1.6.2.2 Tratamento do RNA com DNase

O pellet seco aderido ao fundo do tubo foi dissolvido em 40µl de água destilada e auto clavada (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.

1.6.2.3 Fluorimetria de alta precisão - 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) respeitando todas as instruções contidas no manual do fabricante. 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 199µl da solução de trabalho para determinar a concentração de RNAm. Todas as amostras testadas apresentaram concentrações entre 20-100 ng/µl. Caso as amostras apresentassem valores mais altos de RNA, estas eram diluídas em água livre de RNase.

1.6.2.4 Reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR)

A reação em cadeia de 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; MARTÍN; et al., 2009) e construídos a partir de sequências publicadas no GenBank (www.pubmed.com) para garantir a especificidade das sequências-alvo, evitando 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 min, 95°C por

5 min para desnaturação inicial e amplificação de 40 ciclos (95°C por 10 segundos para desnaturação, 60°C por 30 segundos 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 da MuRF-1, MAFbx e miostatina foram normalizados para os valores de GAPDH (controle endógeno) e calculados pelo método de Livak ($\Delta\Delta CT$).

Tabela 1 – Desenho dos primers

Genes	Número (GenBank)	Sequência (5'-3')
IGF-1	NM_178866	S: GCTATGGCTCCAGCATDCG A: TCCGGAAGCAACTCATCC
MuRF-1	NM_080903.1	S: TGACCAAGGAAAACAGCCACCAG A: TCACTCCTTCTTCTCGTCCAGGATGG
MAFbx	NM_133521.1	S: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT A: GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT
Miostatina	NM_019151.1	S: CTACCACGGAAACAATCATTACCA A: AGCAACATTTGGGCTTTCCAT
GAPDH	NM_001034034	S: AGATGGTGAAGGTCGGAGTG A: GAAGGTCAATGAAGGGGTCA

*S = *Sense*; A = *Anti-Sense*

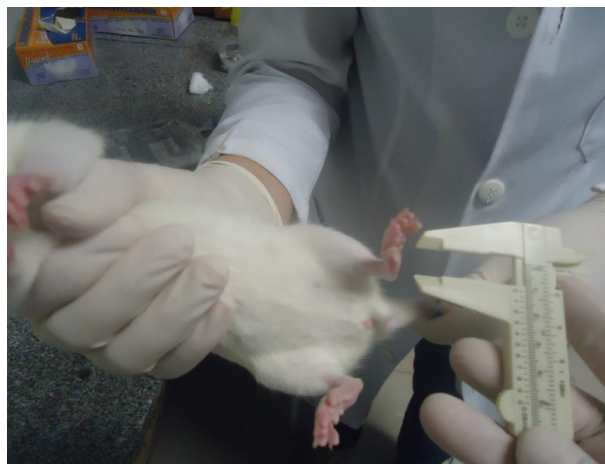
Fonte: Aguiar et al. (2013); Castillero et al. (2009)

1.6.3 Perimetria articular

Para se avaliar as manifestações externas da AR a perimetria articular foi medida em diferentes momentos da pesquisa, sendo estes: 1ª semana de indução sistêmica; 2ª semana de indução sistêmica; pre indução local; 1 dia pós indução local; 1ª semana pós indução local e 2ª semana pós indução local. 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 (figura 7). Após a realização da leitura as hastes eram novamente abertas e afastadas da articulação do animal. Todas as

medidas foram realizadas por um mesmo avaliador para evitar diferenças interavaliadores. 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.

Figura 7 – Mensuração da perimetria articular



Fonte: Do Autor, 2014.

1.6.4 Escore de inflamação

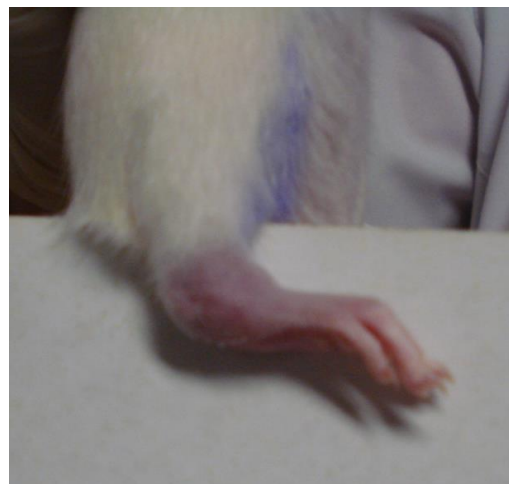
Outra medida realizada com o objetivo de avaliar as alterações causadas pela AR foi a inspeção visual do nível de inflamação (figuras 8 e 9). Como referenciado anteriormente por Castillero et al. (2009) o escore de inflamação de cada uma das patas foi avaliado por um mesmo avaliador em diferentes pontos da pesquisa e classificados de acordo com o seguintes critérios: 0- sem evidências de eritema (vermelhidão) ou edema; 1- ligeiro eritema e inchaço restrito ao tarso ou articulação do tornozelo; 2- eritema e leve inchaço 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 inchaço grave envolvendo a articulação do tornozelo, pé e dedos, ou anquilose (perda de movimento) do membro (CASTILLERO; MARTÍN; et al., 2009).

Figura 8 – Perimetria articular (Score 0).



Fonte: Do Autor, 2014.

Figura 9 – Perimetria articular (Score 4).



Fonte: Do Autor, 2014.

1.6.5 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 ficassem 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 de ração diária por animal dividindo-se o valor semanal por 7 (dias da semana).

1.6.6 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.

1.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando o *Software MedCalc* (versão 11.1.1.0). Os dados foram testados para a distribuição normal utilizando o teste de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de variância, utilizando o teste de Levene. As variáveis foram comparadas inter-grupos por Kruskal-Wallis (dados não paramétricos). Quando apropriado ($p < 0,05$), um teste de comparação post hoc para os subgrupos foi feita. O volume de treinamento e estradiol foram comparados inter-grupos pelo teste de Mann-Whitney. O coeficiente de correlação de Spearman foi usado para avaliar as associações entre as variáveis. Os dados estão expressos em mediana e intervalo interquartil (percentil 25 e 75). A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$.

APÊNDICE B: MATERIAIS

- Ácido acético glacial (Neon Comercial, São Paulo, SP, Brasil)
- Ácido clorídrico (Proquímios, Bangu, RJ, Brasil)
- Adesivo para histologia – Bálsamo do Canadá (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- Adesivo para histologia - Entellan[®] (Merck Millipore, Darmstadt, Germany)
- Adjuvante completo de Freud (CFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Albumina bovina metilada (Met-BSA) (Sigma-Aldrich, St. 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)
- Cabo para Bisturi nº 3 (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Cabo para Bisturi nº 4 (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Câmera Infinity 1-3C – Lumenera (Ottawa, Ontario, Canada)
- Clorofórmio (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- *Cryovial* – 2ml (Corning Incorporated, NY, USA)
- Eosina (Inlab, Pinhais, PR, Brasil)
- Fio de Sutura Catgut Simples (Ethicon sutures-3/0, Johnson & Johnson Ltda., Índia)
- Fio de Sutura Nylon (Ethicon sutures-3/0, Johnson & Johnson Ltda., Índia)
- Glicose 5% (FreseniusKabi, Aquiraz, CE, Brasil)
- Hematoxilina de Harris (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil)
- Isopropano (Vetec, Duque de Caxias, Barueri, SP, Brasil)
- Lâmina de Bisturi nº 11 (Lamedid Solidor[®], Barueri, SP, Brasil)
- Lâmina de Bisturi nº 22 (Lamedid Solidor[®], Barueri, SP, Brasil)
- Lenços de papel *Kimwipes* (Fisher Scientific)
- Microscópio Nikon Eclipse Ci-S (Nikon Corporation, Tokyo, Japan)

- Nitrogênio líquido (Nitrovet, Barretos, SP, Brasil)
- Paquímetro analógico (Starfer, São Paulo, SP, Brasil)
- Pinça Anatômica 1x2 Dentes (Dente de Rato) – 16 cm (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Pinça Anatômica dissecação – 14 cm (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Pinça Anatômica dissecação – 16 cm (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Porta Agulha Mayo Hegar – 16cm (ABC Instrumentos Cirúrgicos, São Paulo, SP, Brasil)
- Pote coletor universal – 80ml (J.Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil)
- Quetamina (Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil)
- Tesoura Cirúrgica F/F curva – 12 cm (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Tesoura Cirúrgica F/F reta – 12 cm (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Tesoura Cirúrgica R/R reta – 15 cm (Golgran, São Caetano do Sul, SP, Brasil)
- Xilasina (Vallée, São Paulo, SP, Brasil)
- Xilol (Vetec, Duque de Caxias, RJ, Brasil)

ANEXOS

ANEXO A: ARTIGO 1 – LOSS OF OVARIAN FUNCTION RESULTS IN INCREASE OF SKELETAL MUSCLE IN ARTHRITIC RAST (Normas da revista - RBGO)

**LOSS OF OVARIAN FUNCTION RESULTS IN INCREASED LOSS OF SKELETAL
MUSCLE IN ARTHRITIC RATS**

**PERDA DA FUNÇÃO OVARIANA RESULTA EM PERDA DE MÚSCULO
ESQUELÉTICO AUMENTADA EM RATOS ARTRÍTICOS**

**Roberto Furlanetto Júnior¹, Fernanda Maria Martins¹, Anselmo Alves de Oliveira¹,
Paulo Ricardo Prado Nunes¹, Márcia Antoniazi Michelin², Eddie Fernando Candido
Murta², Fábio Lera Orsatti^{1*}**

¹*Exercise Biology Research Group (BioEx), Health Sciences Institute, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brazil.*

²*Research Institute of Oncology (IPON), Discipline of Gynecology and Obstetrics, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), 38025-440 Uberaba, Minas Gerais, Brazil.*

***Corresponding author:**

Fábio Lera Orsatti

Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Exercise Biology Laboratory (BioEx).

Av. Tutunas, 490, Uberaba-MG, Brazil, 38061-500 – Phone: +55 (34) 3318-5067

E-mail: fabiorsatti@gmail.com

The authors have no conflict of interest.

ABSTRACT

Objective: We studied the effects of loss of ovarian function (ovariectomy) on muscle mass of gastrocnemius and the mRNA levels of IGF-1, atrogen-1, MuRF-1, and myostatin in an experimental model of rheumatoid arthritis in rats. **Methods:** 24 female Wistar rats (9 weeks, 195.3 ± 17.4 grams) were randomly allocated into four groups: control (CT-Sham; $n = 6$); rheumatoid arthritis (RA; $n = 6$); ovariectomy without rheumatoid arthritis (OV; $n = 6$); ovariectomy with rheumatoid arthritis (RAOV; $n = 6$). The ovariectomy (OV and RAOV) or Sham (CT-Sham or RA) procedures were performed at the same time, fifteen days before the rheumatoid arthritis induction. The RA and RAOV groups were immunized and then were injected with Met-BSA in the tibiotarsal joint. After 15 days of intra-articular injections the animals were euthanized. We evaluated the external manifestations of rheumatoid arthritis (perimeter joint) as well as animal weight, food intake throughout the study. Also, the cross-sectional areas (CSA) of gastrocnemius muscle fibers were analyzed in 200 fibers (H&E method). In the gastrocnemius muscle, mRNA expression was analyzed by quantitative real time PCR followed by Livak method ($\Delta\Delta CT$). **Results:** The rheumatoid arthritis induced reduction in CSA of gastrocnemius muscle fibers. The RAOV group showed a lower CSA of gastrocnemius muscle fibers compared to RA and CT-Sham groups. Skeletal muscle IGF-1 mRNA was increased in arthritics and ovariectomized rats. The increased IGF-1 mRNA was higher in OV groups than in the RA and RAOV groups. Atrogen-1 mRNA was also increased in the gastrocnemius muscle of arthritic and ovariectomized rats. However, the increased atrogen-1 mRNA was higher in RAOV groups than in the RA and OV groups. Gastrocnemius muscle MuRF-1 mRNA was increased in the OV and RAOV groups, but not in the RA and Sham groups. However, the RAOV group showed higher MuRF-1 mRNA than the OV group. The myostatin gene expression was similar in all groups. **Conclusion:** Loss of ovarian function results in increased loss of skeletal muscle-related ubiquitin ligases atrogen-1 and MuRF-1 in arthritic rats.

Key words: Cachexia, rheumatoid arthritis, E₃ ubiquitin ligase, ovariectomy, disuse.

RESUMO

Objetivo: foram estudados os efeitos da perda da função ovariana (ovariectomia) sobre músculo esquelético e os níveis de RNAm de IGF-1, atrogina-1, MuRF-1, e de miostatina em modelo experimental de artrite reumatoide em ratos. **Métodos:** 24 ratos Wistar (9 semanas, $195,3 \pm 17,4$ gramas) foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: controle (CT-Sham, n = 6); artrite reumatoide (RA, n = 6); ovariectomia sem artrite reumatoide (OV; n = 6); ovariectomia com artrite reumatoide (RAOV; n = 6). Os procedimentos da ovariectomia (OV e RAOV) ou simulação da ovariectomia (CT-Sham ou RA) foram realizados ao mesmo tempo, quinze dias antes da indução da artrite reumatoide. Os grupos RA e RAOV foram imunizados e, em seguida, foram injetados com Met-BSA na articulação tibiotársica. Após 15 dias das injeções intra-articulares, os animais foram eutanasiados. Foram avaliadas as manifestações externas da artrite reumatoide (perimetria articular), bem como o peso dos animais e a ingestão de alimentos ao longo do estudo. Além disso, as áreas de secção transversa (CSA) do músculo gastrocnêmio foram analisadas em 200 fibras (método H & E). No músculo gastrocnêmio, a expressão de RNAm foi analisada por PCR quantitativo em tempo real, seguido pelo método Livak ($\Delta\Delta CT$). **Resultados:** a artrite reumatoide reduziu a CSA das fibras do músculo gastrocnêmio. O grupo RAOV mostrou uma CSA menor nas fibras do músculo gastrocnêmio em comparação com os grupos RA e CT-Sham. O RNAm do IGF-1 do músculo esquelético aumentou nos ratos artríticos e ovariectomizados. O RNAm do IGF-1 foi maior nos grupos OV do que nos grupos RA e RAOV. A expressão de atrogina-1 também aumentou no músculo gastrocnêmio dos ratos artríticos e ovariectomizados. No entanto, o aumento do RNAm da atrogina-1 foi maior no grupo RAOV do que nos grupos RA e OV. O RNAm da MuRF-1 aumentou nos grupos OV e RAOV, mas não nos grupos RA e CT-Sham. Porém, o grupo RAOV apresentou maior expressão gênica de MuRF-1 do que o grupo OV. A expressão do gene da miostatina foi semelhante em todos os grupos. **Conclusão:** a perda de função ovariana resulta em perda de músculo esquelético associado às ubiquitina-ligases atrogina-1 e MuRF-1 em ratos artríticos.

Palavras-chave: caquexia, artrite reumatoide, E₃ ubiquitina-ligase, ovariectomia, desuso.

INTRODUCTION

Loss of skeletal muscle (LSM) has been postulated to be an important contributor to increasing morbidity and mortality (1). LSM is a serious consequence of rheumatoid arthritis (1), especially in women (2). The complex nature of rheumatoid arthritis-induced LSM is associated with chronic inflammation, insulin and insulin-like growth factor (IGF)-1 resistance and reduced physical activity (3). While these disorders have been widely investigated, there are still gaps in our understanding of the regulatory role of loss of ovarian function (LOF) in the progression of LSM in rheumatoid arthritis. LOF has the potential to be a contributor to LSM directly and also through interactions with inflammation (4). While previous studies have demonstrated the harmful potential role of LOF in LSM, they fall short in replicating the disrupted systemic environment created by rheumatoid arthritis. Since women naturally progress to menopause or can be subjected to ovariectomy, a better understanding of effects of LOF in LSM during rheumatoid arthritis and their regulatory pathways could identify new therapeutic targets.

Estrogen treatment has been reported to enhance muscle mass recovery following atrophy or injury in rodents and also to retain muscle mass in postmenopausal women (4). As regards the mechanisms in skeletal muscle that are influenced by estrogen, Dieli-Conwright et al. have reported greater levels in expression of muscle mRNA of myostatin and E3 ubiquitin ligases (Atrogin-1/MAFbx and MuRF-1) in postmenopausal women relative to postmenopausal women taking hormone replacement (5, 6). Moreover, myostatin is a member of the transforming growth factor (TGF)- β family that negatively regulates skeletal muscle growth by inhibition of satellite cell activation (7). Myostatin has been associated with activation of E3 ubiquitin ligases genes in skeletal muscle (8). E3 ubiquitin ligases cause proteins to be degraded by the 26S proteasome and it has been reported to induce skeletal muscle atrophy (9). These results highlight the beneficial role of estrogen on skeletal muscle, suggesting that the LOF may induce increase of myostatin, atrogin-1 and MuRF-1, causing muscle atrophy.

In this context, it would seem reasonable to assume that the LOF is extremely harmful to skeletal muscle in rheumatoid arthritis since rheumatoid arthritis has been consistently reported to upregulate atrogin-1 and MuRF-1 in skeletal muscle atrophy.

LSM in rheumatoid arthritis has also been associated with increase in muscle IGF-1 gene expression (10-12). As the IGF-1 is well known to be an important stimulator of skeletal muscle growth, upregulation of IGF-1 during the rheumatoid arthritis could be an attempt to mitigate muscle atrophy (13, 14). A link between estrogen and upregulation of IGF-1-signalling-related muscle mass maintenance has been established in LOF. Estrogen receptor agonists treatment in ovariectomized rodents (15) and estrogen replacement in postmenopausal women (16) have been reported to upregulate IGF-1-signalling-related muscle mass hypertrophy and maintenance, respectively. However, while these studies suggest that LOF seems to be associated with downregulation of IGF-1-signalling-related muscle mass maintenance, ovariectomy in rats has been reported to augment muscle IGF-1 mRNA expression and muscle hypertrophy and these changes were reversed by estrogen replacement (17). In addition, a recent study reported that estrogen supplementation decreases muscle levels of IGF-1 in ovariectomized rats (18). Therefore, the LOF linked muscle atrophy via decreased IGF-1 remains still unclear.

Although the LOF has been widely mentioned as having a great potential for promoting a catabolic molecular milieu in skeletal muscle, the role of LOF during the progression of rheumatoid arthritis has not been established. Thus, to tackle this problem, we studied the effects of ovariectomy on muscle mass of gastrocnemius and the mRNA levels of IGF-1, atrogin-1, MuRF-1, and myostatin in an experimental model of rheumatoid arthritis (adjuvant-induced arthritis) in rats. This paper clarifies the molecular responses of the skeletal muscle to LOF during rheumatoid arthritis.

MATERIALS AND METHODS

This experimental study was in accordance with the National Guide for Care and use of Laboratory Animals (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)) and obtained the approval of the University Ethics Committee (No.

274/2014). All procedures were performed in Research Institute of Oncology (IPON) of the Federal University of Triangulo Mineiro (UFTM).

Female Wistar rats (195.3 ± 17.4 grams) with nine weeks of age were used in present study. The rats were housed in plastic cages in standard conditions at 22°, 12h light-dark cycle, and had free access (*ad libitum*) to water and standard food (Nuvilab-CR1, Curitiba, PR, Brazil). Four experimental groups were used in this study: control (CT-Sham; $n = 6$); group with rheumatoid arthritis (RA; $n = 6$); ovariectomy without rheumatoid arthritis (OV; $n = 6$); ovariectomy with rheumatoid arthritis (RAOV; $n = 6$). All rats were treated similarly in terms of daily manipulation. The ovariectomy (OV and RAOV) or Sham (CT-Sham or RA) procedures were performed at the same time, fifteen days before the rheumatoid arthritis induction. RA and RAOV groups were immunized and then the groups were injected with bovine albumin methylated (Met-BSA) in the tibiotarsal joint. Fifteen days after intra-articular injection, all animals were euthanized at the same period and day time. The gastrocnemius muscle samples of the left hind paw were removed, weighed, cleaned and their white portion was obtained and stored in TRIzol at -80°C for molecular analysis. We investigated the gastrocnemius white portion because it possesses more fast-twitch fibers.

The rats were anesthetized with intraperitoneal injection solution containing ketamine (80 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg) for ovariectomy procedures. Ovariectomy was preceded by a single ventral transverse incision of 0.4–0.6 cm at the middle abdominal region according to the method described by Khajuria et al. (2012)(19).

The rats were anesthetized with intraperitoneal injection solution containing ketamine (40 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) for rheumatoid arthritis procedures. Initially, rats were immunized with two subcutaneous injections of 50 μL . Met-BSA (40 mg/mL) diluted in glucose 5% emulsified with Freund's Complete Adjuvant (FCA) (supplemented with 1 mg/ml of inactivated *Mycobacterium tuberculosis*) into the base tail, with an interval of seven days between the injections. After seven days from last injection at base tail, an intra-articular injection of 25 μL Met-BSA, FCA and glucose 5% was applied in the tibiotarsal joints (20).

Joint edema, body weight and food intake were examined weekly after the second subcutaneous injection. Evaluation of arthritis severity was performed by

measuring the joint edema of each animal. Joint edema was assessed by size of latero-lateral thickness of the tarsal joint with analogic calipers (Starfer, São Paulo, SP, Brazil) (21). The joint edema was performed with mean values (average arithmetic) of two hind paws.

Animals were anesthetized with intraperitoneal injection solution containing Ketamine (80 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). Euthanasia was performed by cardiac puncture and hypovolemic shock.

The blood samples were collected by cardiac puncture in a vacuum-sealed system (Vacutainer[®], England) into a dry tube with gel separator. The sample was centrifuged for 10 minutes (3.000 rpm) and samples were separated and stocked (-20C) for futures analysis. The serum estradiol (MyBiosource, San Diego, CA, USA) was analyzed by enzymatic immunoassay ELISA. All assays were in accordance with the manufacturer's protocol.

Muscles samples were extracted (50-70mg) from gastrocnemius white portion. Total RNA extraction was performed using TRIzol (SIGMA-ALDRICH, Sto Louis MO, USA), following the manufacturers protocol. After extraction, a dry pellet was resuspended in RNase-free water, treated with DNase I (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) to remove any possible DNA presence in sample. Total RNA was quantified using a high precision fluorometer QUBIT 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) and kit RNA BR Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). All samples had RNA concentrations between 20-100 ng/μl. When RNA higher values were found, samples were diluted in RNase-free water.

Quantification of mRNA was obtained by 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using kits Quantifast SYBR Green RT-PCR one-step (QIAGEN, Hilden, Germany). Thus, 1μl RNA samples treated with DNase were added to a mixture containing, 10μl 2 x Quantifast SYBR GREEN RT-PCR Master Mix, 0,2μl Quant Fast, 0,6μl primer sense and anti-sense and completed with RNase Free water to reach the volume of 20μl. Annealing temperature and curve were used as measures of the quality. The qPCR reaction conditions and cycles performed in the apparatus 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were as follows: 50°C per 10 min, 95°C per 5 min for initial denaturation and

amplification of 40 cycles (95°C per 10 seconds for denaturation, 60°C per 30 seconds for annealing and extension). Fluorescence values were obtained between annealing/extension stages and threshold cycle numbers (CT) were determined using Software SDS version 1.2.3 (Applied Biosystems, USA). mRNA IGF-1, MuRF-1, atrogin-1 and myostatin were normalized for GAPDH values (reference gene) and calculated by Livak method ($\Delta\Delta CT$). Primers for all genes (Table 1) were obtained from previous studies (10, 22) and constructed from sequences published in GenBank (www.pubmed.com) to ensure the specificity of target sequences, avoid generation of secondary structures of primers and dimerization in each primer and between primers sense and anti-sense.

Morphological analyses were performed from gastrocnemius histological sections (6 μ m thickness). The gastrocnemius histological sections were obtained in a microtome (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) and stained with hematoxylin and eosin (HE) method. The stained sections were used for photographic documentation of six random histological fields (20 x lens) (Nikon Evolucion MP 5.0). An image analysis software (Image J 1.46r) was used to determine cross-sectional area (CSA) of 200 fibers per muscle.

Statistical analysis

The data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test and for variance homogeneity using the Levene test. The variables were compared inter-groups by Kruskal-Wallis (nonparametric data). When appropriate ($p < 0.05$), a post hoc comparison test of subgroups was made. Data are expressed as median \pm 25th – 75th percentiles. Statistical procedures were performed with a statistical software. Significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Circulating estradiol was measured at end of study, after euthanasia (i.e. day 15 after intra-articular injection), to ensure the ovariectomy. The ovariectomized rats displayed decreased estradiol. In addition, the RA group also displayed decreased estradiol compared to control group (Table 1).

At beginning of the study (i.e. before of ovariectomy) the body weight did not differ between groups. However, in middle of the study (i.e. after ovariectomy and before intra-articular injection) the weight of ovariectomized rats increased compared to CT-Sham, while the weight of the RA group did not (Table 2).

Joint thickness, food intake and body weight change were measured throughout the progression of rheumatoid arthritis. The thickness joint of arthritic rats (RA and RAOV) strongly increased seven days after intra-articular Met-BSA injection compared to CT-Sham and OV groups (Ht = 19.9; $P < 0.01$). This increase in joint thickness was maintained up to the end study (at day 15). Although the ovariectomy did not affect the magnitude of joint thickness, the RAOV group showed higher joint thickness values than the RA group 15 days after intra-articular injection (Ht = 20.9; $P < 0.01$) (Figure 1 A). The food intake change was similar in RA and CT-Sham groups on day seven (Ht = 14.5; $P < 0.01$). There was an increase in food intake for OV and reduction for RAOV compared to CT-Sham. On day 15, there was reduction in food intake for RA group compared to CT-Sham, OV and RAOV (Ht = 16.5; $P < 0.01$). The OV food intake change was similar to CT-Sham group and the food intake gain was maintained in OV group (Figure 1 B). Regarding body weight change, rheumatoid arthritis induced reduction in body weight related to control groups (CT-Sham+OV) ($P < 0.01$). When the rats were divided in their specific conditions, there was no difference between groups on day seven (Ht = 8.2; $P < 0.01$). However, the RAOV group showed a lower body weight compared with control group on day 15. Moreover, the RA group showed a lower body weight compared with OV group (Figure 1 C).

To determine the muscle atrophy we evaluated cross-sectional area (CSA) of gastrocnemius muscle fibers (absolute) and CSA of gastrocnemius muscle fibers corrected by body weight (relative) in all groups. When the groups were pooled (RA+RAOV vs. CT-Sham+OV), the group with rheumatoid arthritis induced reduction in absolute ($P < 0.01$) and relative ($P < 0.01$) CSA of gastrocnemius muscle fibers (Figure 2; A and B). When the groups were separated, the ovariectomized arthritic rats (RAOV) showed a lower absolute (Ht = 18.7; $P < 0.01$) and relative (Ht = 18.9; $P < 0.01$) CSA of gastrocnemius muscle fibers compared to arthritic rats without ovariectomy (RA). The

OV showed a lower relative CSA of gastrocnemius muscle fibers compared to CT-Sham (Figure 2; A and B).

Skeletal muscle IGF-1 mRNA was increased in arthritics and ovariectomized rats (Ht = 14.6; $P < 0.01$). The increased IGF-1 mRNA was higher in OV groups than RA and RAOV groups (Figure 3A). Atrogin-1 gene expression was also increased in gastrocnemius muscle of arthritic and ovariectomized rats (Ht = 15.9; $P < 0.01$). However, the increased atrogin-1 mRNA was higher in RAOV groups than RA and OV groups (Figure 3D). Gastrocnemius muscle MuRF-1 mRNA was increased in ovariectomized, but not in arthritic rats (Ht = 15.9; $P < 0.01$). However, the RAOV group showed MuRF-1 mRNA values higher than the OV group (Figure 3C). The myostatin gene expression was similar in all groups (Ht = 1.9; $P = 0.5$) (Figure 3B).

DISCUSSION

The rheumatoid arthritis-induced LSM have been associated with chronic inflammation, insulin and insulin-like growth factor (IGF)-1 resistance and reduced physical activity (3). While these disorders have been widely investigated, there are still gaps in our understanding of regulatory role of LOF in the progression of LSM in rheumatoid arthritis. As women naturally (postmenopause) or surgically (ovariectomy) progress to LOF, understanding the role of LOF in the LSM during rheumatoid arthritis and their regulatory pathways could identify new therapeutic targets. Hence, in this study we tested the effects of ovariectomy on muscle mass of gastrocnemius and genes expression of IGF-1, atrogin-1, MuRF-1, and myostatin in an experimental model of rheumatoid arthritis (adjuvant-induced arthritis) in rats. In the current study, the estradiol concentration and external signs of the illness measured by joint thickness showed success in ovariectomy and Met-BSA-induced arthritis (Figures 1 and 2). We found that the rheumatoid arthritis results in LSM and that LOF maximizes the LSM. We also showed that this increased LSM is associated with an increased E3 ubiquitin ligase gene expression in skeletal muscle (atrogin-1 and MuRF-1).

In the current study, arthritic rats (RA+RAOV) showed reduction in body weight and CSA of gastrocnemius muscle fibers when compared to rats without arthritis (CT-Sham+OV). Rheumatoid arthritis-induced muscle reduction has been consistently

demonstrated in animal (10, 12, 21) and human studies (3). Since arthritis decreases food intake, the decrease in skeletal muscle could be secondary to the decreased food intake. However, in arthritic rats with ovariectomy, which showed lower CSA of muscle fiber and CSA corrected by body weight, the food intake increased after the day seven reaching a food intake similar to the control in the last week of the study. Indeed, previous studies have showed that ovariectomy induces hyperphagia in rodents (23, 24). But while ovariectomy can regain the food intake of rats with rheumatoid arthritis, this was not enough to regain the skeletal muscle in this study. Thus, rheumatoid arthritis-induced LSM cannot be attributed to the decrease in food intake. These findings are similar to what has been described by other researchers (10, 12).

We observed a strong increase in muscle IGF-1 mRNA in the OV group (Figure 3). Our findings converge with other researchers' previous findings have reported to increase in muscle IGF-1 RNA in ovariectomized immature rodents compared to estrogen replacement ones (17, 18). In contrast to our findings, it has been shown that postmenopausal women have a reduction in muscle gene expression of IGF-1 compared to premenopausal women (16). Moreover, hormonal therapy in postmenopausal women had enhanced IGF-1 receptor expression (16). Estrogen has been reported to have direct (i.e. estrogen receptors β and α) and indirect (i.e. GH/IGF-1 axis) effects on IGF-1 (4). Thus, how the LOF may modulate IGF-1 RNA expression seems to be dependent on the age (immature vs postmenopause), however, remains unanswered.

The IGF-1 is considered an important stimulator of skeletal muscle growth. The overexpression of IGF-1 in skeletal muscle has induced hypertrophy in transgenic mice when compared with wild-type mice (13, 25). However, our results have showed that the ovariectomy-increased IGF-1 mRNA did not change the CSA of muscle fibers (Figure 2A). These results suggest that there is no clear relationship between increased IGF-1 mRNA and increased IGF-1 protein. Additionally, IGF-1 splice variants (IGF-1Ea, IGF-1Eb and IGF-1Ec) have distinct roles in muscle growth (26, 27). Considering that our qPCR measured "mature" IGF-1, we cannot distinguish isoforms of the muscle IGF-1, we can only say that it was increased by loss of ovarian function. Thus, a lack of data on specific IGF-1 splice variants and IGF1BPs expression of the current study may be

considered a limitation. Nevertheless, any possible effects that muscle IGF-1 and its isoforms may have had on muscle hypertrophy seem to be negligible in the context of loss of ovarian function.

The current study showed that rheumatoid arthritis model induces muscle atrophy (Figure 2; A and B) and increases IGF-1 mRNA in muscle atrophy (Figure 3A). These findings are similar to what has been described by other researchers (10-12). Increased muscle IGF-1 mRNA in muscle atrophy of arthritic rats has been related to have a relationship between the inflammatory response, induced by rheumatoid arthritis (10), and muscle regeneration (14). Considering IGF-1 is well known to be an important stimulator of skeletal muscle growth, upregulation of IGF-1 mRNA during the rheumatoid arthritis could be an attempt to mitigate the muscle atrophy (13, 25). However, when the groups were separated in experimental conditions for comparison, we observed that CSA of muscle fiber was lower in RAOV (Figure 5B), but there was no difference in muscle IGF-1 mRNA between RA and RAOV groups. These data suggest that a lower CSA of muscle fiber in arthritic rats with LOF is not associated to muscle IGF-1 mRNA response. Our findings converge with previous studies that have shown that the ability of estrogen and hormone replacement to maintain or augment muscle mass is regardless of IGF-1 responses (4, 5, 18, 28).

Myostatin inhibits expression of the myogenic regulatory factors, thus inhibiting proliferation and differentiation of skeletal muscle myoblasts (7, 8). Myostatin has been associated with muscle wasting in different atrophy models (7, 8, 29). However, our study did not support increased myostatin mRNA in rheumatoid arthritis and ovariectomy models. Indeed, myostatin has not been associated with muscle wasting in rheumatoid arthritis (30) or ovariectomy (17) models. However, while Castillero et al. have not found increased myostatin mRNA in muscle after 15 days from administration of adjuvant injection (30), Ramirez et al. have found increased myostatin mRNA in muscle after two days of l-carrageenan injection (29). These two studies suggest that after induction of rheumatoid arthritis there is an early myostatin increase, which returns to basal levels after a few days. Thus, in the current study, the myostatin mRNA may have already peaked before the time of our muscle excision.

Increased proteolytic genes (i.e. E3 ubiquitin ligase) are indicative of protein degradation in the ubiquitin–proteasome system (9). The increased E3 ubiquitin ligase genes, such as atrogin-1 and MuRF-1, have been associated with muscle wasting in different atrophy models (10, 29, 31). However, in the current study, there was a substantial increase in atrogin-1 gene expression in the muscle atrophy of the arthritic rats, but not in MuRF-1 mRNA. The atrogin-1 and MuRF1 have a different role in the degradation of muscle proteins (32), thus these data imply that upstream factors of atrogin-1 and MuRF-1 mRNA might be differently stimulated in rheumatoid arthritis.

Increased atrogin-1 and MuRF-1 have also been associated with LOF (5). Dieli-Conwright et al. investigated proteolytic gene expression in postmenopausal women taking and not taking hormone replacement therapy and reported increased gene expression of atrogin-1 and MuRF-1 in postmenopausal women not taking hormone replacement therapy. Our data support previous findings that have suggested that estrogen act as anti-catabolic agents based on higher gene expression levels of the atrogin-1 and MuRF-1 in lowered muscle of ovariectomized rats and postmenopausal women (4, 5, 28).

It has been proposed that the ability of estrogen to diminish systemic and muscle inflammatory factors is a potential protector against muscle damage (4). As the rheumatoid arthritis is an inflammatory disease (3), the absence of protective mechanism of estrogen (induced by ovariectomy) may have indirectly affected rheumatoid arthritis-induced LSM (4) in the current study. This interaction between estrogen and inflammation and muscle may be supported by consistent reports of benefits of estrogen-mediated reductions in muscle inflammation and enhanced regeneration following disuse muscle atrophy in rodents (4). The chronic inflammation has been associated with LSM and increased activity of atrogin-1 and MuRF-1(33, 34). Indeed, we observed a higher joint thickness on day 15 concomitantly with higher ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF-1 and lower relative muscle mass in RAOV group compared with RA group. As the joint thickness has been considered an indirect measure of inflammatory response in rheumatoid arthritis (10-12), our findings suggest that the RAOV group could have had an extended inflammatory response compared to

RA group, inducing higher loss of skeletal muscle-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF-1.

In summary, LOF results in increased loss of skeletal muscle associated with ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF-1 in rheumatoid arthritis. These results suggest that a therapeutic approach targeting the maintenance of ovarian function can be effective in counteracting LSM in rheumatoid arthritis. Moreover, the knowledge of regulatory pathways of loss of ovarian function-induced LSM during rheumatoid arthritis, such as atrogin-1 and MuRF-1, may have identified new therapeutic targets. Therefore, future studies are required to evaluate whether these therapeutic approaches will be effective.

Table 1 - Primers for qPCR.

Genes	Number (<i>GenBank</i>)	Sequence (5'-3')
IGF-1	NM_178866	S: GCTATGGCTCCAGCATDCG A: TCCGGAAGCAACTCATCC
MuRF-1	NM_080903.1	S: TGACCAAGGAAAACAGCCAC CAG A: TCACT CCTTCTTCTCGTCCAGGATGG
Atrogin-1	NM_133521.1	S: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT A: GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT
Myostatin	NM_019151.1	S: CTACCACGGAAACAATCATTACCA A: AGCAAC ATTTGGGCTTTCCAT
GAPDH	NM_001034034	S: AGATGGTGAAGGTCGGAGTG A: GAAGGTCAATGAAGGGGTCA

Table 1 - Primers for qPCR.
S = Sense; A = Antisense

Table 2 - Characteristics of the sample.

	CT-Sham	OV	RA	RAOV	P
Estradiol (pg.mL-1)	53.5 (42.6 - 67.3)	20.4* (16.8 - 23.3)	31.8* (26.6 - 41.8)	35.8* (31.3 - 38.4)	0.003
Body weight before of ovariectomy (g)	185.0 (172.0 - 208.0)	204.5 (192.0 - 220.0)	190.0 (179.0 - 210.0)	198.5 (196.0 - 220.0)	0.227
Body weight before of intra- articular injection (g)	221,5 (217,0 - 242,0)	269,0* (251,0 - 286,0)	237,0 (230,0 - 256,0)	271,0* (264,0 - 284,0)	0.012
Gastrocnemius weight (g)	1.45 (1.33 - 1.55)	1.71* (1.61 - 1.86)	1.10* (0.93 - 1.28)	1.21 (0.96 - 1.42)	0.002
Gastrocnemius weight (g). body weight (g)-1. 100	0.56 (0.53 - 0.64)	0.60 (0.56 - 0.64)	0.49 (0.45 - 0.55)	0.44* (0.40 - 0.50)	0.013

Table 2 - Estradiol concentration, body weight, gastrocnemius weight in control (CT+Sham), ovariectomized rats (OV) and arthritic rats (RA) and arthritic rats with ovariectomy (RAOV). n = 6 rats per group. Data are expressed as median and 25 – 75 percentiles.*P < 0.05 vs. CT+ Sham

FIGURES

Figure 1 - External manifestations

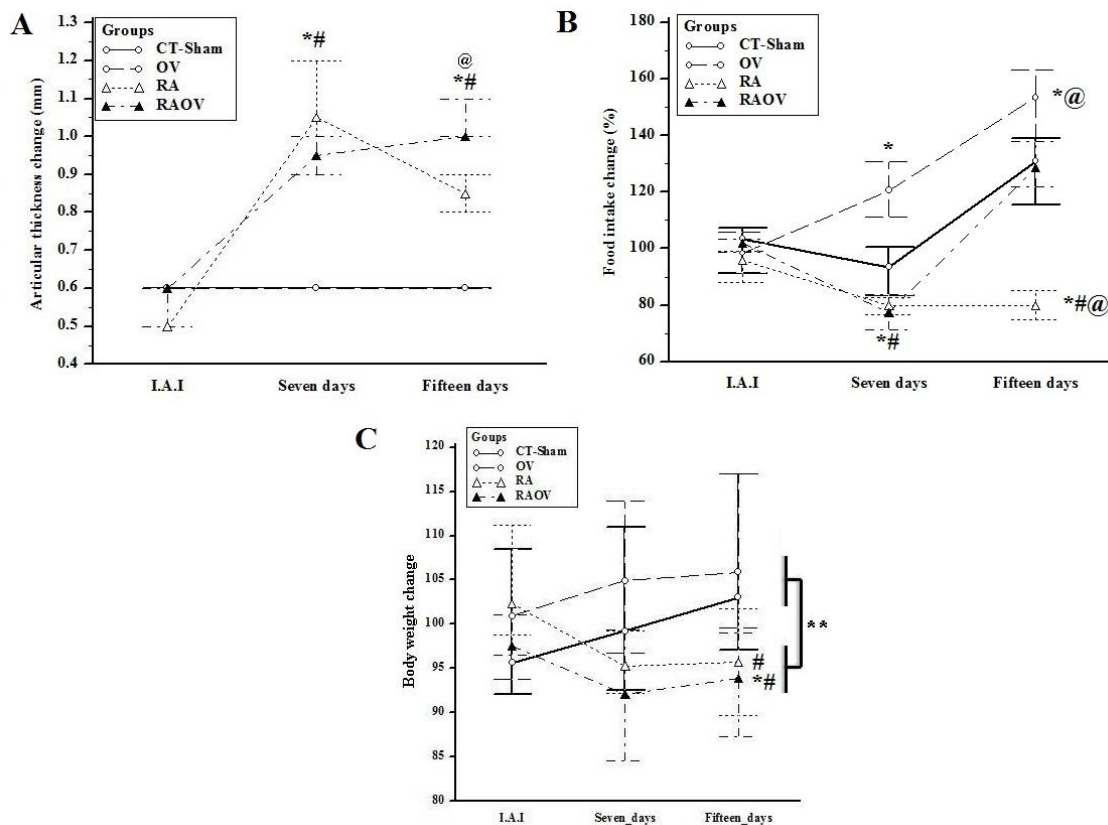


Figure 1. (A) Joint thickness, (B) Food intake change (%) and (C) Body weight change (%) in control (CT+Sham), ovariectomized rats (OV) and arthritic rats (RA) and arthritic rats with ovariectomy (RAOV) at immediately before intra-articular injection (I.A.I), seven days after intra-articular injection (seven days) and fifteen days after intra-articular injection (fifteen days). $n = 6$ rats per group. Data are expressed as median and 25 – 75 percentiles. * $P < 0.05$ vs. CT-Sham, ** $P < 0.05$ vs pooled RA groups, # $P < 0.05$ vs. OV and @ $P < 0.05$ vs. RA.

Figure 2 - Cross section area of gastrocnemius

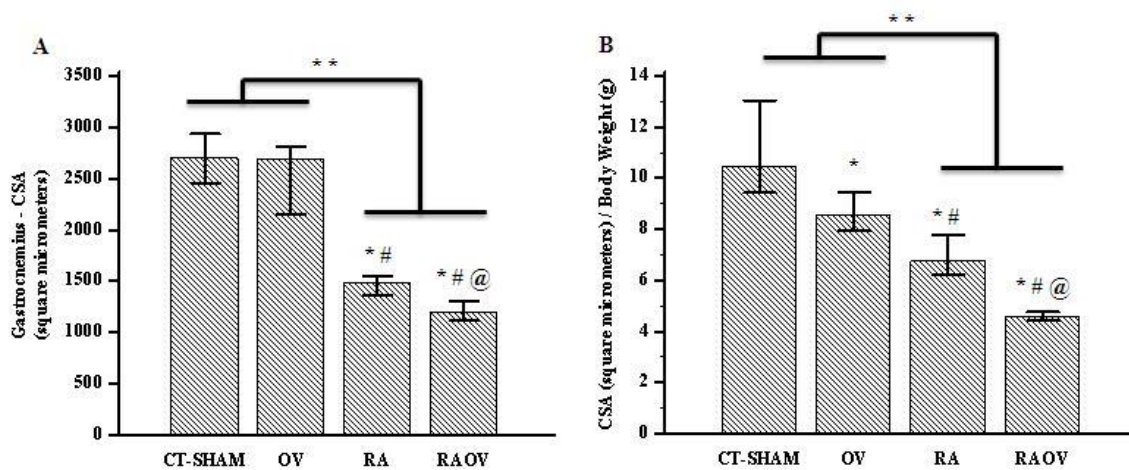


Figure 2 – (A) Cross sectional area (CSA) of gastrocnemius muscle fiber and (B) CSA corrected by body weight in control (CT+Sham), ovariectomized rats (OV) and arthritic rats (RA) and arthritic rats with ovariectomy (RAOV). n = 6 rats per group. Data are expressed as median and 25 – 75 percentiles *P < 0.05 vs. CT-Sham, #P < 0.05 vs. OV and @P < 0.05 vs. RA. **P < 0.05 vs pooled RA groups.

Figure 3 - mRNA of target genes

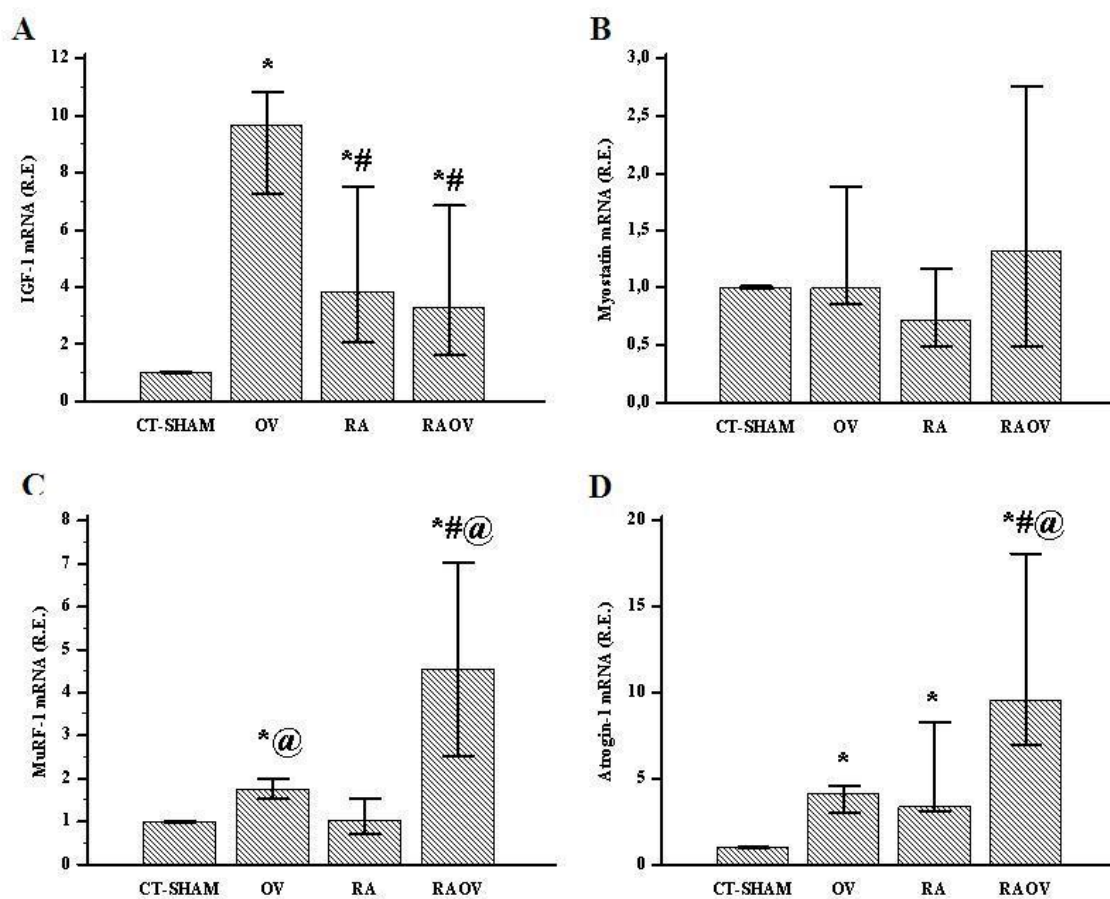


Figure 3 – IGF-1 mRNA (A), myostatin mRNA (B), MuRF-1 mRNA (C) and atrogin-1 mRNA in control (CT and Ex) and arthritics (RA and RAEx) rats in control (CT+Sham), ovariectomized rats (OV) and arthritic rats (RA) and arthritic rats with ovariectomy (RAOV). n = 6 rats per group. Data are expressed as median and 25 – 75 percentiles*P < 0.05 vs. CT-Sham, #P < 0.05 vs. OV and @P<0.05 vs. RA. **P<0,05 vs pooled RA groups.

REFERENCES

1. von Haehling S, Anker SD. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2014;5(4):261-3.
2. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*. 2005;4(3):130-6.
3. Rall LC, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology (Oxford)*. 2004;43(10):1219-23.
4. Tiidus PM, Lowe DA, Brown M. Estrogen replacement and skeletal muscle: mechanisms and population health. *J Appl Physiol (1985)*. 2013;115(5):569-78.
5. Dieli-Conwright CM, Spektor TM, Rice JC, Sattler FR, Schroeder ET. Influence of hormone replacement therapy on eccentric exercise induced myogenic gene expression in postmenopausal women. *J Appl Physiol (1985)*. 2009;107(5):1381-8.
6. Dieli-Conwright CM, Spektor TM, Rice JC, Sattler FR, Schroeder ET. Hormone therapy and maximal eccentric exercise alters myostatin-related gene expression in postmenopausal women. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. 2012;26(5):1374-82.
7. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of cell biology*. 2003;162(6):1135-47.
8. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2006;209(2):501-14.
9. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001;294(5547):1704-8.
10. Castellero E, Martin AI, Lopez-Menduina M, Granado M, Villanua MA, Lopez-Calderon A. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. *Molecular and cellular endocrinology*. 2009;309(1-2):8-16.
11. Lopez-Menduina M, Martin AI, Castellero E, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Short-term growth hormone or IGF-I administration improves the IGF-IGFBP system in arthritic rats. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2012;22(1):22-9.
12. Lopez-Menduina M, Martin AI, Castellero E, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Systemic IGF-I administration attenuates the inhibitory effect of chronic arthritis on gastrocnemius mass and decreases atrogen-1 and IGFBP-3. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2010;299(2):R541-51.
13. Ye F, Mathur S, Liu M, Borst SE, Walter GA, Sweeney HL, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 attenuates skeletal muscle damage and accelerates muscle regeneration and functional recovery after disuse. *Exp Physiol*. 2013;98(5):1038-52.

14. Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2005;288(2):R345-53.
15. Velders M, Schleipen B, Fritzemeier KH, Zierau O, Diel P. Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26(5):1909-20.
16. Ahtiainen M, Pollanen E, Ronkainen PH, Alen M, Puolakka J, Kaprio J, et al. Age and estrogen-based hormone therapy affect systemic and local IL-6 and IGF-1 pathways in women. *Age (Dordr)*. 2012;34(5):1249-60.
17. Tsai WJ, McCormick KM, Brazeau DA, Brazeau GA. Estrogen effects on skeletal muscle insulin-like growth factor 1 and myostatin in ovariectomized rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007;232(10):1314-25.
18. Mangan G, Bombardier E, Mitchell AS, Quadrilatero J, Tiidus PM. Oestrogen-dependent satellite cell activation and proliferation following a running exercise occurs via the PI3K signalling pathway and not IGF-1. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014;212(1):75-85.
19. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Rev Bras Reumatol*. 2012;52(3):462-70.
20. Bar KJ, Schaible HG, Brauer R, Halbhuber KJ, von Banchet GS. 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. *Neuroscience letters*. 2004;361(1-3):172-5.
21. Filippin LI, Teixeira VN, Viacava PR, Lora PS, Xavier LL, Xavier RM. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2013;4(3):231-8.
22. Aguiar AF, Vechetti-Junior IJ, Alves de Souza RW, Castan EP, Milanezi-Aguiar RC, Padovani CR, et al. Myogenin, MyoD and IGF-I regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats. *International journal of sports medicine*. 2013;34(4):293-301.
23. Fisher JS, Kohrt WM, Brown M. Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. *J Appl Physiol* (1985). 2000;88(1):265-71.
24. Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(3):335-43.
25. Musaro A, McCullagh K, Paul A, Houghton L, Dobrowolny G, Molinaro M, et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nature genetics*. 2001;27(2):195-200.
26. Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *The Journal of cell biology*. 1996;135(2):431-40.
27. Philippou A, Papageorgiou E, Bogdanis G, Halapas A, Sourla A, Maridaki M, et al. Expression of IGF-1 isoforms after exercise-induced muscle damage in humans: characterization of the MGF E peptide actions in vitro. *In Vivo*. 2009;23(4):567-75.

28. Dieli-Conwright CM, Spektor TM, Rice JC, Sattler FR, Schroeder ET. Hormone therapy attenuates exercise-induced skeletal muscle damage in postmenopausal women. *J Appl Physiol* (1985). 2009;107(3):853-8.
29. Ramirez C, Russo TL, Sandoval MC, Dentillo AA, Couto MA, Durigan JL, et al. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*. 2011;90(11):930-9.
30. Castellero E, Nieto-Bona MP, Fernandez-Galaz C, Martin AI, Lopez-Menduina M, Granado M, et al. Fenofibrate, a PPAR(THOMAS, A et al.) agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2011;300(5):E790-9.
31. Macedo AG, Krug AL, Herrera NA, Zago AS, Rush JW, Amaral SL. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;143:357-64.
32. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(1):9-20.
33. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. 2008;23:160-70.
34. Zoico E, Roubenoff R. The role of cytokines in regulating protein metabolism and muscle function. *Nutr Rev*. 2002;60(2):39-51.

ANEXO B: ARTIGO 2 - ACUTE RESISTANCE EXERCISE REDUCES INCREASED GENE EXPRESSIONS IN MUSCLE ATROPHY OF OVARIECTOMIZED ARTHRITIC RAT (Normas da revista – RBR)

ACUTE RESISTANCE EXERCISE REDUCES INCREASED GENE EXPRESSIONS IN MUSCLE ATROPHY OF OVARIECTOMIZED ARTHRITIC RAT

Roberto Furlanetto Júnior¹, Aletéia de Paula Souza¹, Anselmo Alves de Oliveira¹, Paulo Ricardo Prado Nunes¹, Márcia Antoniazi Michelin³, Javier Emilio Lazo Chica⁴, Eddie Fernando Candido Murta³, Fábio Lera Orsatti^{1,2*}

¹*Exercise Biology Research Group (BioEx) and ²Sport Sciences Department, Health Sciences Institute, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brazil.*

³*Research Institute of Oncology (IPON), Discipline of Gynecology and Obstetrics, Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), 38025-440 Uberaba, Minas Gerais, Brazil.*

⁴*Discipline of Cell Biology, Institute of Biological and Natural Sciences, Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brazil.*

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

***Corresponding author:**

Fábio Lera Orsatti

Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM), Postgraduate Course of Physical Education, Exercise Biology Laboratory (BioEx). Av. Tutunas, 490, Uberaba-MG, Brazil, 38061-500 – Phone: +55 (34) 3318-5067

E-mail: fabiorsatti@gmail.com

ABSTRACT

Objective: Evaluate the effect of acute resistance exercise (RE) on mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1, and myostatin in gastrocnemius muscle of arthritic rats after loss of ovarian function (LOF). **Methods:** 30 female Wistar rats (9 weeks, 195.3 ± 17.4 grams) were randomly allocated into five groups: control (CT-Sham; $n = 6$); group with rheumatoid arthritis (RA; $n = 6$); group with rheumatoid arthritis subjected to RE (RAEX; $n = 6$); ovariectomy group with rheumatoid arthritis (RAOV; $n = 6$); ovariectomy group with rheumatoid arthritis subjected to RE (RAOVEX; $n = 6$). After 15 days of intra-articular injections with Met-BSA the animals were subjected to the RE and after six hours from workout were euthanized. **Results:** The rheumatoid arthritis provoked reduction in the cross sectional area (CSA) of muscle fibers, but the CSA was lower in RAOV when compared to RA groups. Skeletal muscle atrogen-1 mRNA level was increased in arthritic rats (RA and RAOV), but the atrogen-1 level was higher in RAOV group when compared to other arthritic groups. The Muscle MuRF-1 mRNA level was also increased in the RAOV group. The increased atrogen-1 and MuRF-1 mRNA levels were lower in the RAOVEX group than in the RAOV group. The myostatin mRNA level was similar in all groups, except to RAOVEX, which was lower when compared to other groups. **Conclusion:** LOF results in increased loss of skeletal muscle-related ubiquitin ligases (atrogen-1 and MuRF-1). However, the RE reduces the atrogen-1, MuRF-1 and myostatin mRNA levels in muscle of arthritic rats affected by LOF.

Key words: Cachexia, rheumatoid arthritis, E3 ubiquitin ligase, ovariectomy, resistance exercise.

INTRODUCTION

Loss of skeletal muscle (LSM) has been postulated to be an important contributor to increasing morbidity and mortality.¹⁻³ Thereby, LSM is considered a serious consequence of rheumatoid arthritis (RA) ³⁻⁴, especially in women.⁵ The RA-induced LSM is associated with chronic inflammation and reduced physical activity.⁶⁻⁷ The complex nature of muscle wasting involves upregulation of E3 ubiquitin ligases of the ubiquitin–proteasome system genes (muscle ring finger 1 and muscle atrophy F-box protein) ⁸⁻¹¹, which cause proteins to be degraded by the 26S proteasome.¹²⁻¹³ An increased mRNA level of myostatin has also been associated with joint inflammation.¹⁴ Myostatin, a member of the transforming growth factor (TGF)- β family that negatively regulates skeletal muscle growth ¹⁵⁻¹⁶, has been associated with the activation of E3 ubiquitin ligases genes in muscle.¹⁵ ¹⁷ Notably, loss of ovarian function (LOF), such as menopause or ovariectomy, has been reported to be a direct contributor to LSM and also through interactions with inflammation.¹⁸⁻²⁵ We have shown that the LOF results in increased LSM associated with increased ubiquitin ligases atrogen-1 and MuRF-1 in arthritic rats.²⁶ Thus, since women naturally progress to menopause or can be subjected to ovariectomy, the identification of interventions against AR-induced LSM is necessary to women with loss of ovarian function.

Resistance exercise (RE) is known to increase the muscle mass and strength and therefore is considered an important way to prevent the muscle mass and strength loss.²⁷ The adaptive responses of skeletal muscle to RE have been reported to be the result of a cumulative effect of acute responses of a series of molecular signaling pathways of each successive exercise bout.²⁸ These molecular signaling pathways from RE modulate muscle protein breakdown and synthesis to promote hypertrophy. Specifically, the RE has been reported to regulate those gene expressions associated with rheumatoid arthritis-induced LSM (i.e. atrogen-1, MuRF-1 and myostatin). For instance, while the MuRF-1 mRNA level is increased 1–4 h post-exercise and then restored back to control, the atrogen-1 mRNA level is reduced 6–12 h post-exercise.²⁹⁻³⁰ Moreover, myostatin mRNA level is also

reduced during 24 h post RE.^{29, 31-32} Thus, the RE appears to have a great potential to restore the increased gene expressions associated with the rheumatoid arthritis back to control. However, LOF may negatively influence the RE effects on gene expression of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin. Dieli-Conwright et al. have reported greater levels in expression of muscle mRNA of myostatin, E3 ubiquitin ligases (Atrogen-1/MAFbx and MuRF-1) and pro-inflammatory cytokine and muscular damage after the RE in postmenopausal women compared to postmenopausal women taking hormone replacement.⁸⁻⁹ Therefore, it would seem reasonable to assume that the LOF interferes with the effect of RE on rheumatoid arthritis-induced gene expressions in muscle.

To tackle this problem, we studied the effects of the RE on mRNA levels of the atrogen-1, MuRF-1, and myostatin in gastrocnemius muscle of arthritic rats (an experimental model of rheumatoid arthritis - adjuvant-induced arthritis) after ovariectomy. This paper clarifies the molecular responses of the skeletal muscle to RT during the rheumatoid arthritis and LOF.

MATERIALS AND METHODS

Animal and Experimental Groups

This study was in accordance with the National Guide for Care and use of Laboratory Animals and obtained the approval of the University Ethics Committee (No. 274/2014). All procedures were performed in Research Institute of Oncology (IPON) of the Federal University of Triangulo Mineiro (UFTM).

Female Wistar rats (195.3 ± 17.4 grams) with nine weeks of age were used in present study. The rats were housed in plastic cages in standard conditions at 22°, 12h light-dark cycles, and had free access (ad libitum) to water and standard food (Nuvilab-CR1, Curitiba, PR, Brazil). Three experimental groups were used in this study: control (CT-Sham; n = 6); group with rheumatoid arthritis (RA; n = 12) and group with rheumatoid arthritis and ovariectomy (RAOV; n = 12). Six rats of the RA group (RAEX) and six rats of the RAOV group (RAOVEX) underwent RE so we could study the effect of RE on genes expression. All rats were treated similarly in terms of daily manipulation. The ovariectomy (RAOV and RAOVEX) or Sham (CT-

Sham or RA) procedures were performed at the same time, fifteen days before the rheumatoid arthritis induction. RA and RAOV groups were immunized and then the groups were injected with bovine albumin methylated (Met-BSA) in the tibiotarsal joint. Fifteen days after intra-articular injection, the animals RAEX and RAOVEX groups performed an acute RE session and after six hours of the end of workout were euthanized at the same time of day and time. The gastrocnemius muscle of the left hind paw was removed, weighed, cleaned and their white portion was obtained and stored in TRIzol at -80°C for molecular analysis. We investigated the gastrocnemius white portion because it possesses more fast-twitch fibers.

Ovariectomy

The rats were anesthetized with intraperitoneal injection solution containing ketamine (80 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg) for ovariectomy procedures. Ovariectomy was preceded by a single ventral transverse incision of 0.4–0.6 cm at the middle abdominal region according to the method described by Khajuria et al..³³

Rheumatoid Arthritis protocol

The rats were anesthetized with intraperitoneal injection solution containing ketamine (40 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) for rheumatoid arthritis procedures. Initially, rats were immunized with two subcutaneous injections of 50µL. Met-BSA (40 mg/mL) diluted in glucose 5% emulsified with Freund's Complete Adjuvant (FCA) (supplemented with 1 mg/ml of inactivated *Mycobacterium tuberculosis*) was injected into the tail base, with an interval of seven days between the injections. After seven days from the last injection, an intra articular injection of 25 µL was applied in the tibiotarsal joints.³⁴

Familiarization to climb model

During three sessions of RE rats were adapted to the act of climbing. Five consecutive scaled were made by RE session, during a week. Therefore, the animals were placed at the bottom of the ladder and motivated to climb applying on

its tail a manual stimulus to start or every time they interrupt the movement. This familiarity was made to minimize possible interference that might exist during the acute bout of resistance exercise.

Acute resistance exercise protocol

The RE model was chosen because the stress is lower than other models, such as swimming (water), the squat RE model (electric shock) and treadmill (electric shock and noise).

The progressive loading protocol proposed by Matheny et al.³⁶ was adapted for the research needs. The model consisted in animals climbing up a ladder (1.1 x 0,18m, with 2 cm spacing between grid steps, 80° inclination grades) with a fixed load attached to the tail. The ladder's length and space between grid steps forced the rats to perform 8-12 movements (in each paw) in each climb. The apparatus attached to the tail consisted of cylindrical tubes containing spherical lead weights inside. It was attached to the proximal part of the animal's tail by a self-adhesive tape (1.5cm, Tartan 3M). The acute RE initially consisted of no load and was progressively increased by an additional 25% of their own body weights every three climbs. For instance, the rats started doing three climbs with no load; next, three climbs with a load at 25% of their body weight (BW) added to the apparatus; then, three climbs with 50% of BW; after that three climbs with 75% of BW and finally three climbs with 100% of BW, totaling 15-climbs with a recovery period of 120s between them. When the animal was unable to complete a climb with the stipulated load the load was decreased to complete the total of 15-climbs. The RE session was performed in the morning.

Clinical markers

Joint edema, body weight and food intake were examined weekly after the second subcutaneous injection. Evaluation of arthritis severity was performed by measuring the joint edema of each animal. Joint edema was assessed by size of latero-lateral thickness of the tarsal joint with analogic calipers (Starfer, São Paulo, SP, Brazil).³⁵ The joint edema was performed (calculated) with mean values (average arithmetic) of two hind paw.

Euthanasia

Animals were anesthetized with intraperitoneal injection solution containing Ketamine (80 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). Euthanasia was performed by cardiac puncture and hypovolemic shock.

Estradiol, TNF- α and IL-6

The blood samples were collected by cardiac puncture in a vacuum-sealed system (Vacutainer[®], England) into a dry tube with gel separator. The sample was centrifuged for 10 minutes (3.000 rpm) and samples were separated and stocked (-20C) for futures analysis. The serum estradiol (MyBiosource, San Diego, CA, USA), TNF- α and IL-6 (BD Biociences, United States) were analyzed by enzymatic immunoassay ELISA. All assays were in accordance with the manufacturer's protocol.

RNA extraction and qPCR

Muscles samples were extracted (50-70mg) from gastrocnemius white portion. Total RNA extraction was performed using TRIzol (SIGMA-ALDRICH, Sto Louis MO, USA), following the manufacturers protocol. After extraction, a dry pellet was resuspended in RNase-free water, treated with DNase I (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) to remove any possible DNA presence in sample. Total RNA was quantified using a high precision fluorometer (QUBIT 2.0, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) and RNA BR Assay kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). All samples had RNA concentrations between 20-100 ng/ μ l. When RNA higher values were found, samples were diluted in RNase-free water.

Quantification of mRNA was obtained by 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) using Quantifast SYBR Green RT-PCR one-step kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Thus, 1 μ l RNA samples treated with DNase were added to a mixture containing, 10 μ l 2 x Quantifast SYBR GREEN RT-PCR Master Mix, 0,2 μ l Quant Fast, 0,6 μ l primer sense and anti-sense and completed with RNase Free water to reach the volume of 20 μ l. Annealing

temperature and curve were used as measures of the quality. The qPCR reaction conditions and cycles performed in the 7900HT Fast Real-Time PCR System apparatus (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were as follows: 50°C per 10 min, 95°C per 5 min for initial denaturation and amplification of 40 cycles (95°C per 10 seconds for denaturation, 60°C per 30 seconds for annealing and extension). Fluorescence values were obtained between annealing/extension stages and *threshold cycle numbers* (CT) were determined using Software SDS version 1.2.3 (Applied Biosystems, USA). mRNA MuRF-1, atrogin-1 and miostatin were normalized for GAPDH values (reference gene) and calculated by Livak method ($\Delta\Delta CT$). Primers for all genes (TABLE 1) were obtained from previous studies^{11, 37} and constructed from sequences published in GenBank (www.pubmed.com) to ensure the specificity of target sequences, avoid generation of secondary structures of primers and dimerization in each primer and between primers sense and anti-sense.

Muscle morphometric analysis

Morphological analyses were performed from gastrocnemius histological sections (6µm thickness). The gastrocnemius histological sections were obtained in a microtome (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) and stained with hematoxylin and eosin (HE) method. The stained sections were used for photographic documentation of six random histological fields (20 x lens) (Nikon Evolucion MP 5.0). An image analysis software (Image J 1.46r) was used to determine cross-sectional area (CSA) of 200 fibers per muscle.

Statistical analysis

The data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilk test and for variance homogeneity using the Levene test. The intergroup comparison was done by the Kruskal-Wallis or Man-Whitney tests (nonparametric data). When appropriate (Kruskal-Wallis, $p < 0.05$), a post hoc comparison test of subgroups was made. Spearman's coefficient of rank correlation was used to assess associations among variables. Data are expressed as median \pm 25th – 75th

percentiles. Statistical procedures were performed with a statistical software. Significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Circulating estradiol, IL-6 and TNF- α were measured at end of study, after euthanasia, to ensure the ovariectomy and also assess the inflammatory condition. As expected, the ovariectomized rats displayed a lower level of circulating estradiol when compared to non-ovariectomized rats (Figure 1). Also, there was no change in circulating IL-6 and TNF- α probably because of the large recovery time (15 days) after rheumatoid arthritis induction (Table 2).

The body weight, joint thickness, food intake and muscle atrophy were measured as clinical signs of rheumatoid arthritis during the current study. As these variables were not affected by acute exercise, we pooled the exercised groups with the group not exercised to perform the Statistical comparisons (Table 3).

At the beginning of the study (Pre), after ovariectomy and before intra-articular injection, the body weight of ovariectomized rats was greater (22.2%) than other groups. At the middle of the study (7 days after before intra-articular injection), the body weight did not differ between groups. At the end of the study (15 days after intra-articular injection) body weight of ovariectomized rats was greater (7%) than rats in other groups.

The food intake was significantly different between groups at baseline (pre) and higher (2%) in RAOV group. On the seventh day, the RA and RAOV groups showed lower intake (~30%) compared to CT-Sham group. At the end of the study (day 15) the feed intake was also significantly different between groups, but was higher (62%) in RAOV group compared to the group RA.

The food intake corrected by body weight did not differ between the groups at beginning of the study (Pre). However, at day seven after intra-articular injection, food intake was different between CT-Sham, RA and RAOV groups (0.515; 0.384; 0.336 respectively) being lower in RAOV group. At end of study (day 15), the food

intake was also different between groups, but was higher in the group RAOV (0.575) compared to the group RA (0.410).

Joint thickness changes were measured throughout the progression of rheumatoid arthritis. The RA and RAOV groups strongly increased the joint thickness (9.0 and 10.0 mm respectively) at day one after intra-articular Met-BSA injection compared to CT-Sham (6.0 mm). These increases in joint thickness were maintained up to the end study (15 days). The ovariectomy affected the magnitude of increase of joint thickness at day one after intra-articular Met-BSA injection. The RAOV showed a greater joint thickness (10.0 mm) when compared to RA (9.0 mm) at day one. This increased joint thickness in RAOV group disappeared at days seven and 15 after intra-articular Met-BSA injection.

To determine the muscle atrophy, we evaluated the gastrocnemius weight (g), gastrocnemius weight corrected by body weight (%) (Table 3) and cross-sectional area (CSA) of gastrocnemius muscle fibers (μm^2) (Figure 2). The RA and RAOV groups showed reduction in CSA of fibers (43.6% and 49.7% respectively) and gastrocnemius weight (14.2%). The AROV group showed lower values of CSA when compared to the RA group (1367.5 μm^2 e 1533.2 μm^2 respectively). Only the RAOV group showed reduction (21.5%) in relative gastrocnemius weight (gastrocnemius weight corrected by body weight).

The atrogen-1 mRNA level was higher in gastrocnemius muscle of arthritic groups (RA, RAEX, RAOV and RAOVEX) when compared to control group. However, the increased atrogen-1 mRNA level was higher in RAOV group when compared to other arthritics groups. The myostatin mRNA level did not change in gastrocnemius muscle of arthritic rats, except to RAOVEX, which was lower (72.2%) when compared to other groups. The MuRF-1 mRNA level was higher (580.9%) in gastrocnemius muscle of RAOV group, however, it was lower (65.8%) in RAOVEX muscle when compared to other groups (Table 2).

The training volume was greater in RAOVEX when compared to RAEX (figure 3). There were significant negative correlations of training volume with MuRF-1 ($r = 0.846$; $P = 0.0050$) and Myostatin ($r = 0.726$; $P = 0.0160$), but not between training volume and Atrogen-1 ($r = 0.0912$; $P = 0.7622$) (Figure 4).

DISCUSSION

The LSM has been postulated to be an important contributor to increasing morbidity and mortality in rheumatoid arthritis³⁻⁴, especially in women.⁵ The molecular signaling pathway of muscle wasting involves upregulation of E3 ubiquitin ligases of the ubiquitin–proteasome system (i.e. Atrogin-1 and MuRF-1)⁸⁻¹¹ and myostatin¹⁴ genes. The RE has been reported to modulate E3 ubiquitin ligases of the ubiquitin–proteasome system and myostatin genes in muscle.²⁹⁻³⁰ However, the effect of RE on E3 ubiquitin ligases has not been tested in rheumatoid arthritis. Moreover, the LOF (menopause or ovariectomy) has been reported to be a contributor to LSM directly and also through interactions with inflammation.¹⁸⁻²⁵ It has been reported that LOF may negatively influence the effects of RE on muscle.⁸⁻⁹ Thus, it seems reasonable to assume that the LOF intensifies the expression of myostatin and E3 ubiquitin ligases (Atrogin-1 and MuRF-1) mRNA and also negatively affects the “anti-catabolic” effect of RE on skeletal muscle during rheumatoid arthritis. Hence, we investigated the effects of RE on mRNA levels of atrogin-1, MuRF-1, and myostatin in gastrocnemius muscle of arthritic rats after ovariectomy. Our study showed that the rheumatoid arthritis induces LSM and also increases atrogin-1 mRNA levels, but not MuRF-1 mRNA and Myostatin mRNA, in skeletal muscle. Also, the LOF intensifies the LSM and also increases atrogin-1 gene expression in rheumatoid arthritis. The LOF increases MuRF-1 and Myostatin mRNA levels in skeletal muscle of arthritic rats. Thus, the identification of regulatory pathways of LOF-induced LSM during rheumatoid arthritis, such as atrogin-1 and MuRF-1, may suggest new therapeutic targets during rheumatoid arthritis with LOF. Hence, we showed that the RE reduces the atrogin-1, MuRF-1, and myostatin mRNA levels in arthritic rats affected by LOF. This data suggests the RE would be an important therapeutic means against LOF-induced LSM during rheumatoid arthritis. So far, to the best of our knowledge, this is the first study that has investigated the effects of acute RE on molecular signaling pathways associated with LSM in rheumatoid arthritis with or without LOF. Also, the RE effect on MuRF-1 and myostatin, but not atrogin-1, seems to be dependent on training volume/load. Thus, future works should

therefore include clinical studies designed to evaluate whether this therapeutic approach (RE) will be effective to avoid or prevent LSM in arthritic women affected by LOF.

In the current study, the estradiol concentration (Figure 1) and external signs of the illness measured by joint thickness showed success in ovariectomy and Met-BSA-induced arthritis (Table 3). Arthritic rats (RA and RAOV) showed reduction in fibers CSA of gastrocnemius muscle when compared to rats without arthritis (CT-Sham). Indeed, rheumatoid arthritis-induced LSM has been consistently demonstrated in animal^{11, 35, 38} and human studies.⁶ We observed that the rheumatoid arthritis induced a substantial increase in the atrogin-1 gene expression in skeletal muscle. As the complex nature of LSM involves upregulation of E3 ubiquitin ligases of the ubiquitin–proteasome system (UPS) genes⁸⁻¹¹, the increased E3 mRNA level in muscle has also been observed in different atrophy models.^{11, 14, 39-40} However, there was no increase in MuRF-1 mRNA levels in arthritic rats. These data suggest that the atrogin-1 and MuRF-1 genes might be differently regulated in rheumatoid arthritis. Previous studies have suggested that atrogin-1 causes the ubiquitination of myogenic regulatory factors, such as MyoD⁴¹ and myogenin⁴², which leads to its degradation in the proteasome, while other proteins are actually degraded by MuRF1-mediated UPS.⁴³

Although the increased myostatin mRNA level has been associated with muscle wasting in different atrophy models¹⁴⁻¹⁷, including joint inflammation¹⁴, our study did not support increased myostatin mRNA in muscle in rheumatoid arthritis. Indeed, increased myostatin mRNA in muscle has not been consistent in rheumatoid arthritis model.^{14, 44} For example, while Castellero et al. have not found increased myostatin mRNA in muscle after 15 days from administration of adjuvant injection⁴⁴, Ramires et al. have found increased myostatin mRNA in muscle after two days of I-carrageenan injection.¹⁴ These two studies suggest that after induction of rheumatoid arthritis there is an early increase of the myostatin mRNA level, which returns to basal levels after a few days. Thus, in the current study, the myostatin mRNA may have already peaked before the time of our muscle excision.

However, we may only speculate this. Thus, future research is needed to address this issue.

The current study findings showed that the LOF results in increased loss of skeletal muscle. Also, the LOF increased the mRNA levels of atrogin-1 and MuRF-1 in skeletal muscle of arthritic rats. Indeed, increased mRNA level of atrogin-1 and MuRF-1 have been associated with LOF in women.⁸ Dieli-Conwright et al. investigated proteolytic gene expression in postmenopausal women taking and not taking hormone replacement therapy and reported increased gene expression of atrogin-1 and MuRF-1 in postmenopausal women not taking hormone replacement therapy. Thus, our data support previous findings that have suggested that estrogen act as anti-catabolic agents based on higher gene expression levels of the atrogin-1 and MuRF-1 in lowered muscle of ovariectomized rats and postmenopausal women.^{8, 25, 45}

Increased proteolytic genes (i.e. E3 ubiquitin ligase) are indicative of protein degradation.¹²⁻¹³ Hence, a lot of effort has been made to block the increase in E3 ubiquitin ligase mRNA level during rheumatoid arthritis^{38, 44, 46-48} and therefore avoid LSM. In other models of muscle atrophy, such as dexamethasone and unload, the RE has downregulated mRNA levels of E3 ubiquitin ligase and myostatin.^{39-40, 49-50} Notably, in the current study, the RE downregulated the mRNA levels of atrogin-1, Murf-1, and myostatin solely in arthritic rats with ovariectomy (Table 3). However, we observed significantly negative correlations of training volume with Murf-1 and myostatin mRNA levels (Figure 4). This data suggests that downregulated the mRNA levels of MuRF-1 and myostatin to RT are dependent on the amount of exercise, such as training volume [load (weight on tail) x sets (number of climb)].⁵¹ The RE model used in this study consisted in the animal climbing up a ladder with a fixed load attached to the tail.³⁶ We were unable to determine the maximum muscle strength (i.e. one repetition maximum) in arthritic rats because of the physical limitations of the animal. Thus, the RE model was progressively increased adding 25% of rat body weight every three climbs. The 25% of rat body weight was used because this percentage load was the most tolerable by arthritic rats during load progression. As the ovariectomized rats were

heavier than non-ovariectomized rats (Table 2)⁵²⁻⁵³, the RAOVEX groups performed a greater training volume than RAEX (Figure 3). Thus, in present study the lack of response in RAEX groups might be related to the low volume performed.

CONCLUSION

A single RE session was able to reduce atrogenin-1, MuRF-1, and myostatin mRNA levels in arthritic rats affected by LOF. However, the effects of RE on MuRF-1 and myostatin mRNA levels, but not atrogenin-1, seem to be dependent of training volume/load. Thus, future works should therefore include clinical studies designed to evaluate whether this therapeutic approach (RE) will be effective to avoid or prevent LSM in arthritic women affected by LOF.

TABLES

Table 1- Primers for qPCR.

Genes	Number (<i>GenBank</i>)	Sequence (5'-3')
MuRF-1	NM_080903.1	S: TGACCAAGGAAAACAGCCAC CAG A: TCACT CTTCTTCTCGTCCAGGATGG
Atrogenin-1	NM_133521.1	S: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT A: GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT
Myostatin	NM_019151.1	S: CTACCACGGAAACAATCATTACCA A: AGCAAC ATTTGGGCTTTCCAT
GAPDH	NM_001034034	S: AGATGGTGAAGGTCCGAGTG A: GAAGGTCAATGAAGGGGTCA

S = Sense; A = Antisense

Table 2 – mRNA of genes and cytokines

	CT-Sham Median 25 - 75 P	RA Median 25 - 75 P	RAEX Median 25 - 75 P	RAOV Median 25 - 75 P	RAOVEX Median 25 - 75 P	P
Atrogin-1 (Fold change)	0.999 ^a (0.979 - 1.011)	3.355 ^b (3.070 - 11.590)	3.230 ^b (1.650 - 6.620)	10.320 ^c (8.278 - 20.257)	5.125 ^b (3.660 - 8.080)	0.001
Myostatin (Fold change)	1.004 ^a (0.987 - 1.012)	0.715 ^{a,b} (0.490 - 1.160)	0.840 ^a (0.508 - 1.030)	1.460 ^a (1.000 - 2.895)	0.405 ^b (0.210 - 0.680)	0.022
MuRF-1 (Fold change)	0.995 ^{a,c} (0.989 - 1.010)	1.040 ^{a,c} (0.720 - 1.530)	3.810 ^{a,b} (0.992 - 5.170)	5.780 ^b (2.715 - 8.348)	0.340 ^c (0.310 - 1.660)	0.028
TNF-α (pg/ml)	54.5 ^a (45.7 - 93.1)	56.5 ^a (44.5 - 66.6)	59.0 ^a (55.6 - 76.9)	54.6 ^a (48.3 - 72.7)	40.5 ^a (40.0 - 58.3)	0.437
IL-6 (pg/ml)	103.5 ^a (85.7 - 125.1)	90.2 ^a (78.5 - 119.4)	91.9 ^a (89.4 - 103.4)	93.1 ^a (85.9 - 143.1)	120.5 ^a (96.6 - 133.3)	0.662

Table 2 – CT-Sham group – control group (n = 6), RA group – rheumatoid arthritis group (n = 6), RAEX group – rheumatoid arthritis who held an acute session of resistance exercise (n = 6), RAOV group – ovariectomy with rheumatoid arthritis (n = 6), RAOVEX group – ovariectomy with rheumatoid arthritis who held an acute session of resistance exercise (n = 6), (pg/ml) – picogram by milliliters. Data are expressed as median and 25 – 75 percentiles. ANOVA – Kruskal-Wallis test. Different letters = P < 0.05 (e.g. ^a is different of ^b and ^c; ^{a,c} is differente of ^b; ^{a,c} is not differente of ^c).

Table 3 – Characteristic of the sample

	CT-Sham (n=6) Median 25 - 75 P	RA (n=12) Median 25 - 75 P	RAOV (n=12) Median 25 - 75 P	P
BODY WEIGHT (g)				
Pre	226.5 ^a (218.0 – 257.0)	239.0 ^a (226.5 – 253.0)	277.0 ^c (268.5 – 284.5)	<0.001
7 days	235.0 ^a (219.0 – 263.0)	227.0 ^a (221.0 – 235.0)	244.0 ^a (236.5 – 269.0)	0.051
15 days	244.0 ^a (230.0 – 277.0)	230.5 ^a (218.0 – 245.0)	262.5 ^c (247.5 – 280.0)	0.007
FOOD INTAKE (g)				
Pre	129,0 ^a (129,0 – 129,0)	118,5 ^b (115,0 – 122,0)	132,0 ^c (128,0 – 136,0)	<0,001
7 days	121,0 ^a (121,0 – 121,0)	87,5 ^b (80,0 – 95,0)	86,0 ^b (81,0 – 91,0)	<0,001
15 days	176,0 ^a (176,0 - 176,0)	94,0 ^b (93,0 – 95,0)	153,0 ^c (151,0 – 155,0)	<0,001
FOOD INTAKE / BODY WEIGHT				
Pre	0.570 ^a (0.502 – 0.592)	0.496 ^a (0.467 – 0.514)	0.478 ^a (0.462 – 0.496)	0.058
7 days	0.515 ^a (0.460 – 0.553)	0.384 ^b (0.357 – 0.414)	0.336 ^c (0.322 – 0.375)	<0.001
15 days	0.721 ^a (0.635 – 0.765)	0.410 ^b (0.384 – 0.431)	0.575 ^c (0.554 – 0.618)	<0.001
JOINT EDEMA (mm)				
Pre	6.0 ^a (6.0 – 6.0)	6.0 ^a (6.0 – 6.0)	6.0 ^a (6.0 – 6.0)	0.114
1 day	6.0 ^a (6.0 – 6.0)	9.0 ^b (9.0 – 10.0)	10.0 ^c (10.0 – 10.0)	<0.001
7 days	6.0 ^a (6.0 – 6.0)	11.0 ^b (10.0 – 12.0)	10.0 ^c (9.0 – 10.0)	<0.001
15 days	6.0 ^a (6.0 – 6.0)	9.0 ^b (9.0 – 10.0)	9.0 ^b (8.0 – 10.0)	<0.001
GASTROCNEMIUS WEIGHT (g)				
	1.4 ^a (1.3 – 1.5)	1.2 ^b (1.1 – 1.3)	1.2 ^b (0.9 – 1.3)	0.022
GASTROCNEMIUS / BODY WEIGHT (%)				
	0.56 ^a (0.53 – 0.64)	0.52 ^a (0.491 – 0.558)	0.44 ^c (0.391 – 0.496)	0.003

Table 3 – CT-Sham group – control group (n = 6), RA Group –RA + RAEX (n = 12), RAOV Group – RAOV + RAOVEX (n = 12), RA – rheumatoid arthritis group (n = 6), RAEX – rheumatoid arthritis who held a strength exercise session group (n = 6), RAOV –

ovariectomy with rheumatoid arthritis (n = 6), RAOVEX – ovariectomy with rheumatoid arthritis who held a strength exercise session (n = 6), Pre – at immediately before intra-articular injection, 1 day – one days after intra-articular injection, 7 days – seven days after intra-articular injection, 15 days - fifteen days after intra-articular injection, (g) – gram, (mm) – millimeter, (%) – percent value. Data are expressed as median and 25 – 75 percentiles. ANOVA – Kruskal-Wallis test. Different letters = P < 0.05 (e.g. ^a is different of ^b and ^c; ^{a,c} is differente of ^b; ^{a,c} is not differente of ^c).

FIGURES

Figure 1 – Estradiol concentration

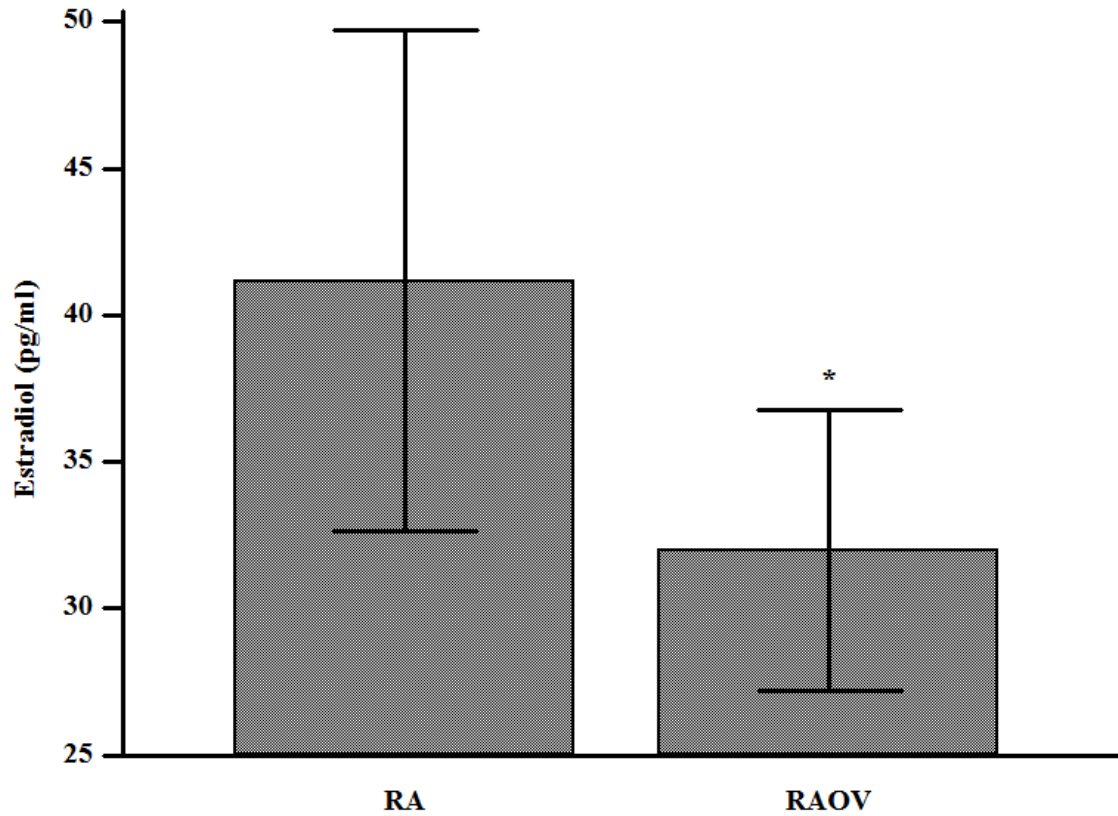


Figure 1 – Estradiol concentration in RA group (CT-Sham + RA + RAEX) (n = 18) – [CT-Sham – control group (n = 6); RA – rheumatoid arthritis (n = 6); RAEX – rheumatoid arthritis who held an acute session of resistance exercise rheumatoid arthritis who held a strength exercise session group (n = 6)]; RAOV group (RAOV + RAOVEX) (n = 12) – [RAOV – ovariectomy with rheumatoid arthritis (n = 6); RAOVEX – ovariectomy with rheumatoid arthritis who held an acute session of resistance exercise (n = 6)]. *P < 0.05.

Figure 2 – Cross section area of fibers of gastrocnemius muscle.

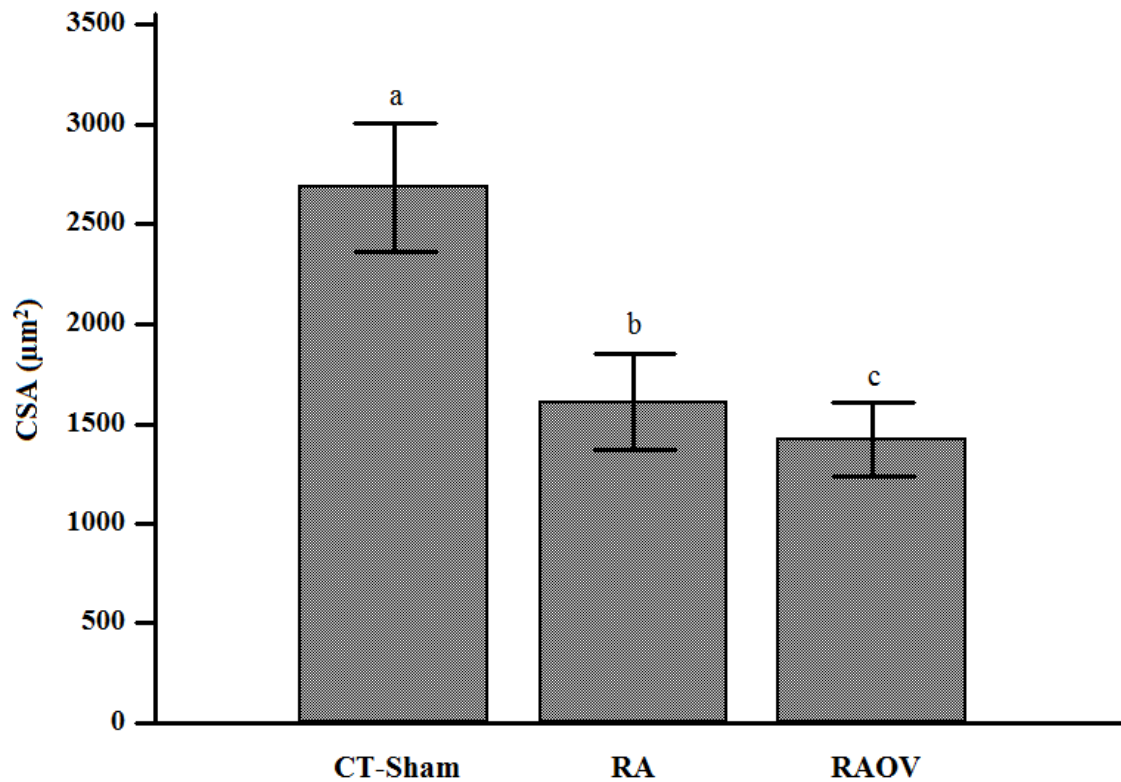


Figure 2 – Cross section area of fibers of gastrocnemius muscle. CT-Sham group – control group (n = 6); RA Group – RA+RAEX (n = 12); RAOV Group – RAOV + RAOVEX (n = 12), RA – rheumatoid arthritis group (n = 6); RAEX – rheumatoid arthritis who held an acute session of resistance exercise rheumatoid arthritis who held a strength exercise session group (n = 6); RAOV – ovariectomy with rheumatoid arthritis (n = 6); RAOVEX – ovariectomy with rheumatoid arthritis who held an acute session of resistance exercise (n = 6). Different letters = P < 0.05.

Figure 3 – Training volume in groups who held an acute session of resistance exercise.

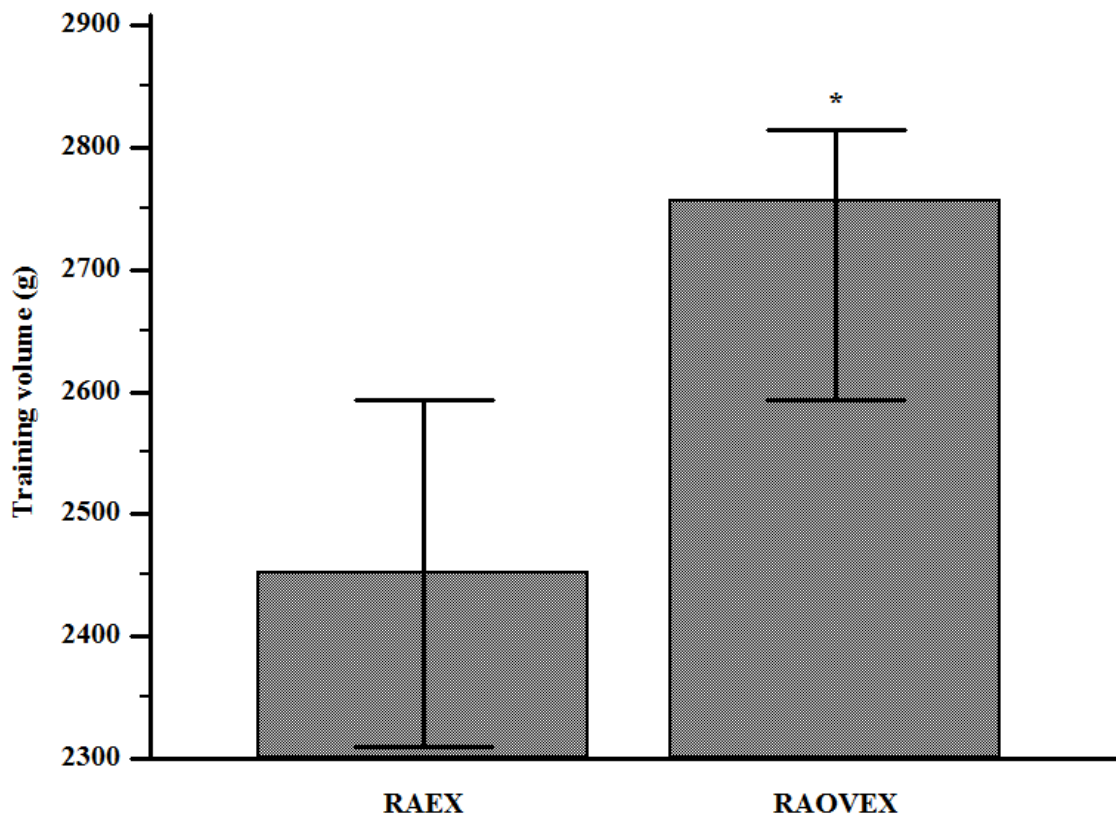


Figure 3 – Training volume in groups who held an acute session of resistance exercise. RAEX – rheumatoid arthritis who held an acute session of resistance exercise rheumatoid arthritis who held a strength exercise session group (n = 6); RAOVEX – ovariectomy with rheumatoid arthritis who held an acute session of resistance exercise (n = 6). *P < 0.05.

Figure 4 – Correlations of target genes with training volume.

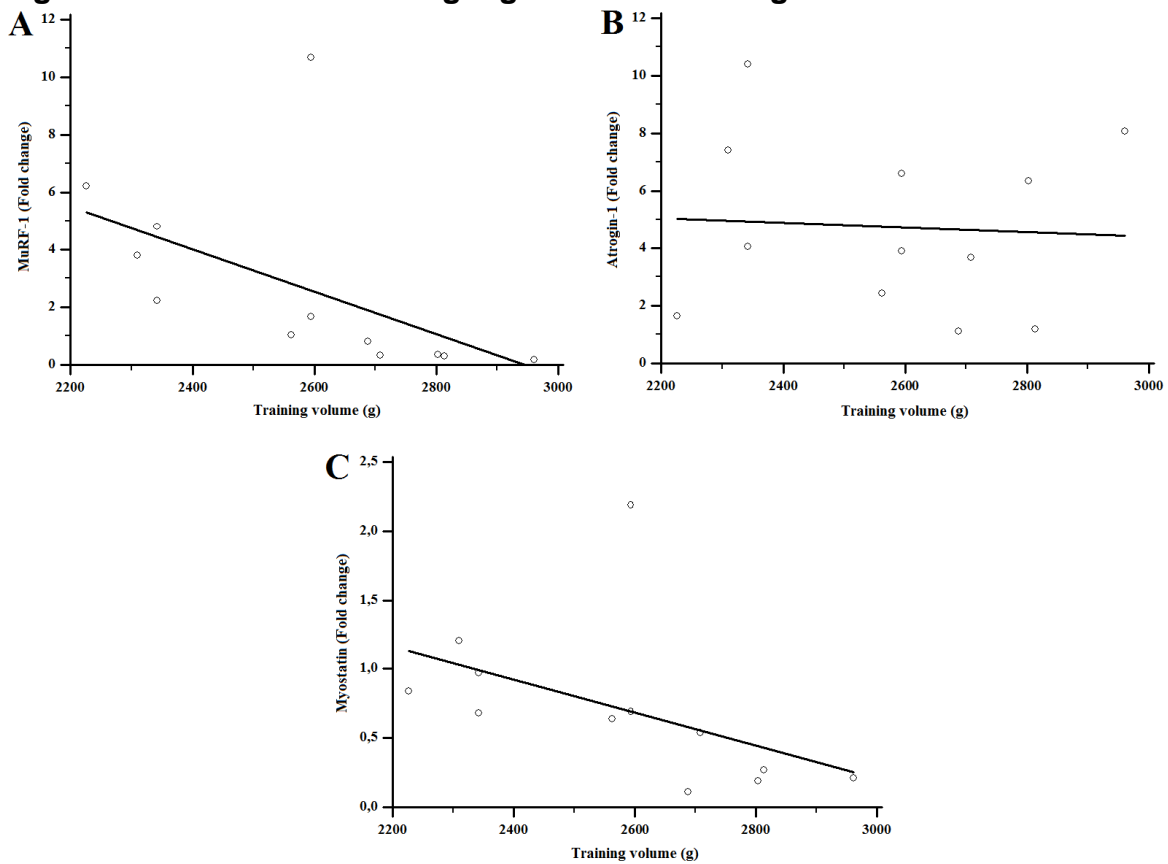


Figure 4 – (A) Spearman's coefficient of rank correlation of MuRF-1 mRNA with training volume ($r = 0,846$); (B) Spearman's coefficient of rank correlation of Atrogin-1 mRNA with training volume ($r = 0,0912$); (C) Spearman's coefficient of rank correlation of Myostatin mRNA with training volume ($r = 0,726$).

REFERENCES

1. Evans WJ, Morley JE, Argiles J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 2008 Dec;27(6):793-9.
2. Evans WJ, Lambert CP. Physiological basis of fatigue. *Am J Phys Med Rehabil.* 2007 Jan;86(1 Suppl):S29-46.
3. von Haehling S, Anker SD. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle.* 2014 Dec;5(4):261-3.
4. Walsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *International journal of cardiology.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. 2002 Sep;85(1):89-99.
5. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews.* [Review]. 2005 Mar;4(3):130-6.
6. Rall LC, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology (Oxford).* [Review]. 2004 Oct;43(10):1219-23.

7. Rajbhandary R, Khezri A, Panush RS. Rheumatoid cachexia: what is it and why is it important? *The Journal of rheumatology*. [Editorial]. 2011 Mar;38(3):406-8.
8. Dieli-Conwright CM, Spektor TM, Rice JC, Sattler FR, Schroeder ET. Influence of hormone replacement therapy on eccentric exercise induced myogenic gene expression in postmenopausal women. *J Appl Physiol* (1985). [Randomized Controlled Trial Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Nov;107(5):1381-8.
9. Dieli-Conwright CM, Spektor TM, Rice JC, Sattler FR, Schroeder ET. Hormone therapy and maximal eccentric exercise alters myostatin-related gene expression in postmenopausal women. *Journal of strength and conditioning research / National Strength & Conditioning Association*. [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2012 May;26(5):1374-82.
10. Lopez-Menduina M, Martin AI, Castellero E, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Short-term growth hormone or IGF-I administration improves the IGF-IGFBP system in arthritic rats. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Feb;22(1):22-9.
11. Castellero E, Martin AI, Lopez-Menduina M, Granado M, Villanua MA, Lopez-Calderon A. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. *Molecular and cellular endocrinology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Oct 15;309(1-2):8-16.
12. Kachaeva E, Shenkman B. Various jobs of proteolytic enzymes in skeletal muscle during unloading: facts and speculations. *BioMed Research International*. 2012;2012.
13. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.
14. Ramirez C, Russo TL, Sandoval MC, Dentillo AA, Couto MA, Durigan JL, et al. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Nov;90(11):930-9.
15. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2006 Nov;209(2):501-14.
16. McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *The Journal of cell biology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2003 Sep 15;162(6):1135-47.
17. Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj Sassi A, et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2014 Nov;71(22):4361-71.
18. Milanese L, Vasconsuelo A, de Boland AR, Boland R. Expression and subcellular distribution of native estrogen receptor beta in murine C2C12 cells and skeletal muscle tissue. *Steroids*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Jun;74(6):489-97.

19. Enns DL, Tiidus PM. Estrogen influences satellite cell activation and proliferation following downhill running in rats. *J Appl Physiol* (1985). [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2008 Feb;104(2):347-53.
20. Thomas A, Bunyan K, Tiidus PM. Oestrogen receptor-alpha activation augments post-exercise myoblast proliferation. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010 Jan;198(1):81-9.
21. Velders M, Schleipen B, Fritzscheier KH, Zierau O, Diel P. Selective estrogen receptor-beta activation stimulates skeletal muscle growth and regeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012 May;26(5):1909-20.
22. Sitnick M, Foley AM, Brown M, Spangenburg EE. Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. *J Appl Physiol* (1985). [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. 2006 Jan;100(1):286-93.
23. Murray J, Huss JM. Estrogen-related receptor alpha regulates skeletal myocyte differentiation via modulation of the ERK MAP kinase pathway. *American journal of physiology Cell physiology*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Sep;301(3):C630-45.
24. Mangan G, Bombardier E, Mitchell AS, Quadriatero J, Tiidus PM. Oestrogen-dependent satellite cell activation and proliferation following a running exercise occurs via the PI3K signalling pathway and not IGF-1. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014 Sep;212(1):75-85.
25. Tiidus PM, Lowe DA, Brown M. Estrogen replacement and skeletal muscle: mechanisms and population health. *J Appl Physiol* (1985). 2013 Sep 1;115(5):569-78.
26. Furlanetto Júnior R, Martins FM, Oliveira AA, Nunes PRP, Michelin MA, Murta EFC, et al. Loss of ovarian function results in increased loss of skeletal muscle in arthritic rats. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*. 2016 Feb;38(2):056-064.
27. Chodzko-Zajko WJ, Proctor DN, Fiatarone Singh MA, Minson CT, Nigg CR, Salem GJ, et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2009 Jul;41(7):1510-30.
28. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Integrative biology of exercise. *Cell*. 2014 Nov 6;159(4):738-49.
29. Louis E, Raue U, Yang Y, Jemiolo B, Trappe S. Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol* (1985). [Comparative Study Research Support, N.I.H., Extramural]. 2007 Nov;103(5):1744-51.
30. Stefanetti RJ, Lamon S, Wallace M, Vendelbo MH, Russell AP, Vissing K. Regulation of ubiquitin proteasome pathway molecular markers in response to endurance and resistance exercise and training. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2014 Aug 8.
31. Durigan JL, Delfino GB, Peviani SM, Russo TL, Ramirez C, Da Silva Gomes AD, et al. Neuromuscular electrical stimulation alters gene expression and delays quadriceps muscle atrophy of rats after anterior cruciate ligament transection. *Muscle & nerve*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2014 Jan;49(1):120-8.
32. MacKenzie MG, Hamilton DL, Pepin M, Patton A, Baar K. Inhibition of myostatin signaling through Notch activation following acute resistance exercise. *PloS one*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2013;8(7):e68743.

33. Khajuria DK, Razdan R, Mahapatra DR. Description of a new method of ovariectomy in female rats. *Rev Bras Reumatol*. 2012 May-Jun;52(3):462-70.
34. Bar KJ, Schaible HG, Brauer R, Halbhuber KJ, von Banchet GS. 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. *Neuroscience letters*. 2004 May 6;361(1-3):172-5.
35. Filippin LI, Teixeira VN, Viacava PR, Lora PS, Xavier LL, Xavier RM. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2013 Sep;4(3):231-8.
36. Matheny RW, Merritt E, Zannikos SV, Farrar RP, Adamo ML. Serum IGF-I deficiency does not prevent compensatory skeletal muscle hypertrophy in resistance exercise. *Exp Biol Med (Maywood)*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Feb;234(2):164-70.
37. Aguiar AF, Vechetti-Junior IJ, Alves de Souza RW, Castan EP, Milanezi-Aguiar RC, Padovani CR, et al. Myogenin, MyoD and IGF-I regulate muscle mass but not fiber-type conversion during resistance training in rats. *International journal of sports medicine*. 2013 Apr;34(4):293-301.
38. Lopez-Menduina M, Martin AI, Castellero E, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Systemic IGF-I administration attenuates the inhibitory effect of chronic arthritis on gastrocnemius mass and decreases atrogenin-1 and IGF-BP-3. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Aug;299(2):R541-51.
39. Macedo AG, Krug AL, Herrera NA, Zago AS, Rush JW, Amaral SL. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2014 Sep;143:357-64.
40. Dupont-Versteegden EE, Fluckey JD, Knox M, Gaddy D, Peterson CA. Effect of flywheel-based resistance exercise on processes contributing to muscle atrophy during unloading in adult rats. *J Appl Physiol (1985)*. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Jul;101(1):202-12.
41. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Jan 28;280(4):2847-56.
42. Jogo M, Shiraishi S, Tamura TA. Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS letters*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2009 Sep 3;583(17):2715-9.
43. Petroski MD, Deshaies RJ. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature reviews Molecular cell biology*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. 2005 Jan;6(1):9-20.
44. Castellero E, Nieto-Bona MP, Fernandez-Galaz C, Martin AI, Lopez-Menduina M, Granado M, et al. Fenofibrate, a PPAR(CASTILLERO; NIETO-BONA; FERNANDEZ-GALAZ; et al.) agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 May;300(5):E790-9.
45. Dieli-Conwright CM, Spektor TM, Rice JC, Sattler FR, Schroeder ET. Hormone therapy attenuates exercise-induced skeletal muscle damage in postmenopausal

- women. *J Appl Physiol* (1985). [Research Support, N.I.H., Extramural]. 2009 Sep;107(3):853-8.
46. Martin AI, Nieto-Bona MP, Castellero E, Fernandez-Galaz C, Lopez-Menduina M, Gomez-Sanmiguel AB, et al. Effect of cyclooxygenase-2 inhibition by meloxicam, on atrogenin-1 and myogenic regulatory factors in skeletal muscle of rats injected with endotoxin. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Dec;63(6):649-59.
47. Granado M, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Experimental arthritis inhibits the insulin-like growth factor-I axis and induces muscle wasting through cyclooxygenase-2 activation. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2007 Jun;292(6):E1656-65.
48. Granado M, Priego T, Martin AI, Villanua MA, Lopez-Calderon A. Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 Mar;288(3):E486-92.
49. Lang CH, Pruznak A, Navaratnarajah M, Rankine KA, Deiter G, Magne H, et al. Chronic alpha-hydroxyisocaproic acid treatment improves muscle recovery after immobilization-induced atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013 Aug 1;305(3):E416-28.
50. Haddad F, Adams GR, Bodell PW, Baldwin KM. Isometric resistance exercise fails to counteract skeletal muscle atrophy processes during the initial stages of unloading. *J Appl Physiol* (1985). [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2006 Feb;100(2):433-41.
51. ACSM. American College of Sports Medicine position stand. Progression models in resistance training for healthy adults. *Med Sci Sports Exerc*. 2009 Mar;41(3):687-708.
52. Fisher JS, Kohrt WM, Brown M. Food restriction suppresses muscle growth and augments osteopenia in ovariectomized rats. *J Appl Physiol* (1985). 2000 Jan;88(1):265-71.
53. Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM. Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002 Mar;26(3):335-43.

ANEXO C: 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 Orsatti
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 aos 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

ANEXO D: ACEITE DO PEDIDO DE EXTENSÃO DO PROTOCOLO CEUA



Ministério da Educação
Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Rua Frei Paulino nº 30 – 2º andar - Sala H – CEA-Centro Educacional e Administrativo – Bairro Abadia
CEP: 38025-180 – Uberaba-MG - Telefax: (0**34) 3318 5854 - E-mail: cep@prodepe.ufm.edu.br

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que, de acordo com a solicitação (Mem. nº 003/2014/Professor/PPGEF) do Prof. Dr. Fábio Lera Orsatti, o Projeto denominado **“Adaptações morfofuncionais e respostas moleculares do músculo esquelético em modelo experimental de artrite reumatóide submetido ao treinamento resistido”**, protocolado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Triângulo Mineiro sob o nº 274, e aprovado em 05/07/2013, teve o **pedido de extensão aceito** em 25/04/2014. Desta forma, fica autorizada a utilização de seis grupos com 7 animais cada, totalizando 42 animais. Estes animais serão divididos em grupos não ovariectomizados (3 grupos) e ovariectomizados (3 grupos).

Uberaba, 25 de abril de 2014.

Prof.ª Dr.ª Rosângela Soares Chriguer

Coordenadora da CEUA

