

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

EFEITO DA TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR NA  
EXPRESSÃO DE GENES DE ATROFIA NO MÚSCULO QUADRÍCEPS DE  
RATOS.

GABRIEL BORGES DELFINO

SÃO CARLOS

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

EFEITO DA TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR NA  
EXPRESSÃO DE GENES DE ATROFIA NO MÚSCULO QUADRÍCEPS DE  
RATOS.

GABRIEL BORGES DELFINO

Tese Apresentada Ao Programa De Pós  
Graduação Em Fisioterapia Da Universidade  
Federal De São Carlos Como Parte Dos Requisitos  
Para Obtenção Do Título De Doutor Em  
Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini

SÃO CARLOS

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

D349et

Delfino, Gabriel Borges.

Efeito da transecção do ligamento cruzado anterior na expressão de genes de atrofia no músculo quadríceps de ratos / Gabriel Borges Delfino. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

151 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Fisioterapia. 2. Ubiquitina. 3. Atrofia muscular. 4. Reabilitação. 5. Músculo quadríceps. 6. Estimulação elétrica. I. Título.

CDD: 615.82 (20<sup>a</sup>)

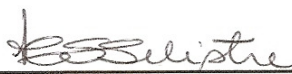
## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da banca examinadora para defesa de tese de doutorado de GABRIEL BORGES DELFINO, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 28 de novembro de 2011

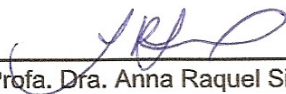
**Banca Examinadora:**



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Tania de Fatima Salvini



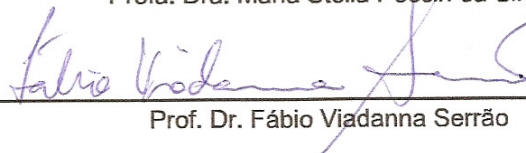
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Anna Raquel Silveira Gomes



\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria Stella Peccin da Silva



\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fábio Viadanna Serrão

Dedico esse trabalho a todos que acreditam que  
ensinar é mostrar o caminho da possibilidade.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu gostaria de agradecer a Profa Tania pela oportunidade de poder exercer a pesquisa em seu laboratório e de principalmente por transmitir seu conhecimento sobre músculo e atividades que vão desde a elaboração de projetos ao artigo final. E claro agradecê-la pela amizade e carinho com a qual sempre me tratou. Aprendi muito com você! Muito obrigado Tania por tudo.

Gostaria de agradecer a uma pessoa que muito me influenciou na vida e no trabalho, que me mostrou a importancia da pesquisa e da busca pelo conhecimento, que é o Prof Carlos Alberto da Silva, que se tornou um grande amigo e que sempre quando eu menos esperava ligava para saber como estavam as coisas.

Profa. Heloísa muito obrigado por abrir as portas do seu laboratório, viabilizando a história do PCR e muitas outras análises, sempre atenciosa e disposta a ajudar, exemplo de competência, uma graça de pessoa!!!

Prof Anselmo Moriscot, obrigado também por abrir as portas do seu laboratório e me salvar com a história dos western blots, sem sua a sua ajuda esses blots não teriam saído!!! Preciso falar que os papos cabeça logo no café da manha na Itália também foram enriquecedores. Agradeço ao Igor (gente boa demais!) seu aluno que com muita paciência me ajudou nos blots.

Prof Carlos Castro (Carlão) obrigado por dividir sua experiência clínica e conhecimento nas mais diversas áreas comigo.

Profa Stela meu muito obrigado pela possibilidade de aprender a técnica da cirurgia do LCA e por sempre ter demonstrado interesse no estudo.

Kelly (secretária da Pós) obrigado por sempre me atender com carinho, atenção, e paciência também.

Ao Claudio do nitrogênio líquido, sempre disponível e de bem com a vida.

Aos bioteristas Roberto e Revair (filósofo nas horas vagas) pelos ratos do biotério.

Teresa, minha técnica de laboratório favorita (tá certo que é a única, mas vale a intenção), obrigado por aceitar nossas piadas.

Aos colegas de laboratório: João, Sabrina, Tiago, Mari, Cris, Dório, Jamacy, Marcela, Fernanda, Amilton, Paulinha, Melina, Catarina e ao núcleo colombiano do lab como Esperanza, Carol e Cris, e a todos os ICs, André valeu pela ajuda no projeto. Agradeço os colegas de outros laboratórios: Thor, Clebão, Zé, Michel, Rita, Luciana, Naundaum.

A minha querida prima Bete, que proporcionou e fez minha estadia em São Paulo ser mais tranquila. Nesse pouco tempo juntos pude constatar a grande pessoa que você é, te admiro demais! Desculpe por inflar o bote (colchão inflável) e acabar com o espaço da sala.

Gostaria de agradecer principalmente aos meus pais, sem eles nada disso seria possível e nem faria sentido. Meus irmãos, Paty e Jhonatam obrigado por aguentar esse irmão xarope!!! Ao meu cunhado do coração Rodrigão. A Lavínia minha sobrinha linda, tão pequenininha e que causou uma mudança enorme na minha maneira de ver a vida, acho que na de todos de casa. Amo vocês família!

Por último, eu gostaria de agradecer a pessoa que mais sabe o quanto é e foi difícil tudo isso aqui, que é a Bruna, para falar verdade eu não sei como te agradecer, você me aguenta a tantos anos, como você consegue? Obrigado meu amor, por me incentivar a continuar nessa vida, sei que para você não foi fácil também, afinal ninguém gosta de ficar longe. Você é parte disso pode ter certeza!!!

Agradeço a FAPESP pelo apoio financeiro.

## RESUMO

A atrofia e fraqueza do quadríceps após a ruptura do ligamento cruzado anterior (LCA), presentes antes e após sua reconstrução, são importantes limitações que restringem o retorno dos indivíduos às atividades da vida diária e desportivas. A rápida proteólise muscular que ocorre nos diversos modelos animais e em diferentes condições em humanos se deve, principalmente, ao sistema ubiquitina proteassoma (UPS). Mecanismos neuromusculares são associados à atrofia e fraqueza do quadríceps após a ruptura e reconstrução do LCA, porém as vias moleculares envolvidas nesse processo são desconhecidas. A identificação dessas vias pode favorecer o estabelecimento de estratégias terapêuticas para amenizar o déficit muscular. Assim, o objetivo dessa tese foi avaliar o efeito da transecção do LCA de ratos na expressão dos genes pertencentes ao UPS (MuRF-1, a Atrogina-1), e também da Miostatina (envolvida no controle da massa muscular) pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real no quadríceps. Avaliou-se ainda o conteúdo de proteínas ubiquitinadas por Western Blotting e a área de secção transversa das fibras musculares (AST) dos músculos Vasto Medial (VM), Reto Femoral (RF) e Vasto Lateral (VL). Níveis elevados de Atrogina-1, MuRF-1 e Miostatina ocorreram após transecção do LCA em todos os músculos avaliados assim como a redução da AST nos músculos VM e VL. Os resultados desta tese contribuíram para a compreensão dos mecanismos de atrofia do quadríceps após a transecção do LCA.

**Palavras-chave:** Ubiquitina Proteassoma, Atrofia Muscular, Reabilitação, Quadríceps, LCA.



## **ABSTRACT**

The quadriceps muscle weakness and atrophy after the anterior cruciate ligament (ACL) rupture, is present before and after its reconstruction, and are important limitations that restrict the return of subjects to activities of daily living and sports. The combination of reduced synthesis and increased levels of protein degradation results in a rapid loss of muscle protein. The rapid muscle proteolysis occurs in several animal models and in different conditions in humans, and are mainly associated to the ubiquitin proteasome system (UPS). Neuromuscular mechanisms are associated with atrophy and weakness of the quadriceps muscle after ACL rupture and reconstruction, but the molecular pathways involved in this process are unknown. The identification of these pathways may facilitate the establishment of therapeutic strategies to alleviate the muscle deficit. Thus, the objective of this thesis was to evaluate the effect of ACL transection of rats in the expression of genes of UPS (MuRF-1, Atrogin-1), as well as the expression of myostatin (involved in control of muscle mass) by the Real Time PCR (polymerase chain reaction) technique. It was evaluated the content of ubiquitinated proteins by Western blotting and the cross-sectional area of muscle fibers (CSA) of the vastus medialis (VM), rectus femoris (RF) and vastus lateralis (VL) of the quadriceps. Elevated Atrogin-1, MuRF-1 and myostatin mRNA levels were observed after ACL transection in all muscles assessed, as the reduction of CSA in VM and VL muscles. The results of this thesis contributed to the understanding of the mechanisms of quadriceps muscle atrophy after ACL transection.

**Key Words:** Ubiquitin-Proteasome, Muscle Atrophy, Rehabilitation, Quadriceps, ACL.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	9
Atividades No Período .....	10
Justificativa .....	12
MANUSCRITO I.....	17
Resumo.....	19
Introdução .....	20
Material E Métodos.....	22
Resultados .....	27
Discussão.....	34
Referências.....	38
MANUSCRITO II.....	45
Resumo.....	48
Introdução .....	50
Material E Métodos.....	52
Resultados .....	58
Discussão.....	68
Referências.....	75
ANEXO I .....	84
ANEXO II .....	112

## **APRESENTAÇÃO**

---

A presente tese está estruturada de maneira a apresentar os artigos resultantes e submetidos à publicação do projeto de doutorado direto, aprovado pelo Programa de Pós Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (PPGFt), essa forma de apresentação é aceita e recomendada pelo PPGFt. Uma breve descrição das atividades desenvolvidas no período do doutorado direto é apresentada, assim como uma justificativa para a realização do estudo. Na sequência os dois trabalhos resultantes do projeto proposto serão apresentados na forma de manuscrito I e II.

## **ATIVIDADES NO PERÍODO**

---

Durante o período de doutorado pude participar de projetos desenvolvidos concomitantemente em nosso laboratório e em outros da UFSCar.

Em 2008, participei em parceria com o laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Fisiologia, coordenado pela Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre Araújo, do estudo que avaliou o efeito de uma desintegrina (a alternagina-C) isolada do veneno de cobra sobre o processo de regeneração do músculo esquelético. “*Effects of alternagin-C from Bothrops alternatus on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle.*” Durigan, JLQ, Peviani SM, Russo TL, Delfino GB, Ribeiro JU, Cominetti MR, Araujo HSS, Salvini TF. **Toxicon** 2008;52(6):687-94.

Em 2009 participei de projeto de outro aluno do laboratório, onde avaliamos o efeito da eletroestimulação e alongamento muscular, combinados ou isolados, na expressão de genes que regulam a massa muscular no músculo desnervado de ratos. Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, Gigo-Benato D, Delfino GB, Salvini TF. *Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle.* **Journal Of Muscle Research And Cell Motility.** 2010;31(1):45-57.

Ainda em 2009 participei de outro projeto de nosso laboratório onde se avaliou o efeito da inflamação articular de tornozelo na expressão de genes que regulam a massa muscular do músculo sóleo de ratos. Ramírez CR, Russo TL, Delfino GB, Peviani SM, Alcântara CC, Salvini TF. *Chronic joint inflammation leads to muscle atrophy in the soleus muscle in rats.* (submetido ao **Journal Of Muscle Research And Cell Motility**)

Durante o período de doutorado fiz estágio voluntário na Unidade de Saúde Escola da UFSCar na área de Ortopedia e Traumatologia (Fisioterapia Geral) sob supervisão do Prof. Carlos Castro. Auxiliei a Profa Tania de Fátima Salvini em vários módulos da disciplina de Cinesioterapia ofertada na graduação em Fisioterapia, assim como na Disciplina de Pós Graduação intitulada “Plasticidade dos músculos esqueléticos: implicações para a fisioterapia.”

Ministrei durante as Jornadas Científicas e Tecnológicas da UFSCar o mini curso: Plasticidade Muscular: da célula a função (2008); e o mini curso Tópicos avançados em exercício físico: Respostas metabólicas e moleculares; adaptações neuromusculares; avaliações cardiorrespiratórias; novos recursos ergogênicos (2010; 2011).

Fui representante discente no Conselho de Pós Graduação em Fisioterapia (2008/2009), experiência que me enriqueceu muito profissionalmente e politicamente. A participação no fórum de Pós Graduação em Fisioterapia nesse período também proporcionou esse amadurecimento.

Durante o Doutorado tive a oportunidade de apresentar parte da presente tese no “European Muscle Conference” sediado em Padova na Itália e realizado pela Sociedade Européia de Pesquisa Muscular. A experiência de participar desse congresso foi uma das mais enriquecedoras do Doutorado, pois tive a oportunidade de conhecer e ouvir os maiores nomes da pesquisa em músculo “conheci minhas referências bibliográficas”. Tive a oportunidade de discutir limitações metodológicas e principalmente de ver que eles também tem problemas com anticorpos!

## JUSTIFICATIVA

---

A ruptura do ligamento cruzado anterior (LCA) é uma das lesões mais frequentes que acometem a articulação do joelho resultando em dor, instabilidade, atrofia e fraqueza muscular. Apesar da alta incidência dessa lesão, há poucos estudos em modelos animais que avaliam as alterações musculares após a ruptura desse ligamento.<sup>9,12,13</sup> Os estudos em animais abordam mais as alterações articulares e do próprio ligamento.<sup>8,18,19</sup>

Mecanismos neurofisiológicos têm sido propostos para explicar a fraqueza e atrofia do quadríceps após a ruptura do LCA. Uma inibição reflexa pré-sináptica da musculatura que envolve a articulação, conhecida como inibição muscular artrogênica (IMA), pode ser iniciada pela distensão ou dano capsular.<sup>4, 5, 11</sup> Foi também demonstrado uma disfunção na alça motora gamma no músculo quadríceps após a reconstrução do LCA.<sup>10</sup> Esses mecanismos ajudam a explicar a dificuldade desses sujeitos em alcançar a contração voluntária máxima.

No entanto, os mecanismos moleculares e as vias intracelulares envolvidos no processo de atrofia muscular, nessa condição, ainda não foram investigados. A identificação das vias relacionadas à atrofia muscular pode favorecer o estabelecimento de estratégias terapêuticas para amenizar esse quadro. Já está estabelecido o envolvimento da via ubiquitina-proteassoma na atrofia do músculo esquelético, com aumento nos níveis de RNAm dos genes Atrogina-1 e MuRF-1 dessa via em diferentes condições de desuso muscular (para revisão Folleta et al., 2011).<sup>3</sup>

Outro gene importante é a miostatina, atuante no controle da massa muscular tanto no período embrionário, como no músculo já desenvolvido. O fato dos níveis aumentados da miostatina estarem correlacionados à perda de massa muscular em diferentes situações, como desuso<sup>1</sup> e

desnervação <sup>20</sup>, faz com seja interessante avaliar sua expressão no músculo quadríceps após a ruptura do LCA, uma vez que os níveis aumentados de miostatina poderiam estar relacionados com a manutenção do déficit de massa muscular nessas condições.

Estudos recentes do nosso laboratório identificaram alterações na expressão desses genes realizados em músculos de animais submetidos à eletroestimulação <sup>14,15</sup>, alongamento muscular <sup>5,12</sup>, lesão muscular <sup>2</sup> e inflamação articular <sup>14</sup>.

Considerando que a instabilidade causada pela ruptura do LCA induz alterações musculares que levam à atrofia e fraqueza muscular, é importante identificar as vias de sinalização envolvidas nesse processo. A hipótese da tese é que a ruptura do LCA causa atrofia, ativa genes associados à atrofia muscular (MuRF-1, Atrogina-1 e Miostatina) no músculo quadríceps de ratos. O presente projeto foi delineado para verificar a área de secção transversa (AST) das fibras musculares, a expressão desses genes e proteínas envolvidas na atrofia muscular no músculo quadríceps de ratos, submetidos à transecção do LCA.

## Referências

1. Carlson C, Booth F. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. **American Journal of Physiology** 1999; 277(2):601-06.
2. Durigan JLQ, Peviani SM, Russo TL, et al. Effects of alternagin-C from *Bothrops alternatus* on gene expression and activity of metalloproteinases in regenerating skeletal muscle. **Toxicon**. 2008;52(6):687-94.

3. Foletta VC, White LJ, Larsen AE, Léger B, Russell AP. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. **European journal of physiology.** 2011;461(3):325-35.
4. Galbán CJ, Ling SM, Galbán CJ, Taub DD, Gurkan I, Fishbein KW, Spencer RG. Effects of knee injection on skeletal muscle metabolism and contractile force in rats. **Osteoarthritis Cartilage.** 2007 May; 15(5):550-8.
5. Gerber C, Hoppeler H, Claassen H, Robotti G, Zehnder R, Jakob RP. The lower extremity musculature in chronic symptomatic instability of the anterior cruciate ligament. **J Bone Joint Surg Am.** 1985;67:1034–1043.
6. Gomes ARS, Soares AG, Peviani SM, Nascimento RB, Moriscot AS, and Salvini TF. The effect of 30 minutes of passive stretch of the rat soleus muscle on the myogenic differentiation, myostatin and atrogen-1 gene expressions. **Arch Phys Med Rehabil.** 2006; 87:241-246.
7. Hasegawa S, Kobayashi M, Arai R, Tamaki A, Nakamura T, Moritani T. Effect of early implementation of electrical muscle stimulation to prevent muscle atrophy and weakness in patients after anterior cruciate ligament reconstruction. **J Electromyogr Kinesiol.** 2011 Feb 17.
8. Kanaya A, Deie M, Adachi N, et al. Intra-articular injection of mesenchymal stromal cells in partially torn anterior cruciate ligaments in a rat model. **Arthroscopy** 2007;23(6):610-7.
9. Kilic BA, Dingil O, Erkula G, Elmas C, Erdogan D, Atik OS. Evaluation of the muscles around the knee in rabbits whose anterior cruciate and/or medial collateral ligaments were dissected. **Arch Orthop Trauma Surg.** 2004 Nov;124(9):626-30.



10. Konishi Y, Fukubayashi T, Takeshita D. Mechanism of quadriceps femoris muscle weakness in patients with anterior cruciate ligament reconstruction. **Scand J Med Sci Sports.** 2002 Dec;12(6):371-5.
11. Krishnan C, Williams GN. Factors explaining chronic knee extensor strength deficits after ACL reconstruction. *J Orthop Res.* 2011 May;29(5):633-40.
12. Okuyama R, Honda M, Fujiya H, Goto K, Sugiura T, Akema T. Expression of heat shock protein 72 in rat quadriceps muscles following anterior cruciate ligament resection. **J Orthop Sci.** 2003;8(2):213-7.
13. Pellisé F, Navarro-Quilis A. The muscles in chronic ligamentous instability of the knee: an experimental study. **ActaOrthop Belg** 1997;63:287–292.
14. Peviani SM, Gomes AR, Moreira RF, Moriscot AS, Salvini TF. Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. **Muscle Nerve.** 2007; 35:363-370.
15. Ramírez C, Russo TL, Sandoval MC, Durigan JLQ, Dentillo AA, Couto MAS, Salvini TF. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation.** In press 2011
16. Russo TL, Peviani SM, Durigan JLQ, et al. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogen-1 in denervated rat skeletal muscle. **Journal of muscle research and cell motility.** 2010;31(1):45-57.

17. Russo TL, Peviani SM, Freria CM, Gigo-Benato D, Geuna S, Salvini TF. Electrical stimulation based on Chronaxie reduces atrogen-1 and Myod gene expressions in Denervated rat muscle. **Muscle Nerve**. 2007;35; 87-97.
18. Stoop R, Buma P, Van Der Kraan P, Hollander AP, Billingham RC, Poole AR, Van Den Berg WB. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. **Arthritis Rheum**. 2000;43:2121-31.
19. Warden SJ, Saxon LK, Castillo AB, Turner CH. Knee ligament mechanical properties are not influenced by estrogen or its receptors. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. 2006; 290(5):E1034-40.
20. Zhang D, Liu M, Ding F, Gu X. Expression of myostatin RNA transcript and protein in gastrocnemius muscle of rats after sciatic nerve resection. **Journal of Muscle Research and Cell**. 2006; 27(1):37-44.

## MANUSCRITO I

---

Segue o manuscrito traduzido para o português que foi originalmente submetido ao periódico “**American Journal Of Physical Medicine and Reahabilitation**”.

**Título:** A transecção do ligamento cruzado anterior aumenta os níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1 e miostatina no quadríceps de ratos.

Gabriel B. Delfino<sup>1</sup>, Sabrina M. Peviani<sup>1</sup>, João L. Q. Durigan<sup>1</sup>, Thiago L. Russo<sup>1</sup>, Igor L. Baptista<sup>2</sup>, Mario Ferretti<sup>3</sup>, Anselmo S. Moriscot<sup>2</sup>, Tania F. Salvini<sup>1</sup>.

1-Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil; 2- Departamento de biologia celular e desenvolvimento, Instituto de ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; 3- Departamento de Ortopedia e Traumatologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

## **Abstract**

**Objective:** To assess the mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin in rat quadriceps after anterior cruciate ligament (ACL) transection.

**Design:** Wistar rats were randomized into 3 different groups (n=5 per group): ACL (surgery and ACL rupture), Sham (surgery without ACL transection) and Control. Vastus Medialis (VM), Rectus Femoris (RF) and Vastus Lateralis (VL) muscles were harvested at 1, 2, 3, 7 and 15 days after ACL rupture. The mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin, as well as the ubiquitinated protein content, muscle mass (MM) and cross sectional area (CSA) of the muscle fibers were evaluated.

**Results:** Elevated levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin mRNA were detected in all tested muscles at most time points. The ubiquitinated protein content was increased at 3 days in ACL and Sham. The MM of the ACL group was reduced at 3, 7 and 15 days (VL and VM) and at 7 and 15 days (RF), whereas it was reduced in the Sham group at 3 and 7 days (VL and VM) and at 7 days (RF). The CSA of VM was reduced at 3, 7 and 15 days in the ACL group and at 3 and 7 days in the Sham group. The CSA of VL was reduced at 7 and 15 days in the ACL group and at 7 days in the Sham. While MM and CSA recovery was noted in the sham group, no recovery was observed in the ACL group.

**Conclusions:** Quadriceps atrophy after ACL transection involves increased levels of myostatin, atrogen-1 and MuRF-1 mRNA and the accumulation of ubiquitinated protein.

**Key Words:** Ubiquitin Protein Ligases, Knee Injury, Sports Medicine, Physical Medicine

## **Resumo**

**Objetivo:** Investigar os níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1 e miostatina no músculo quadríceps de ratos após a transecção do ligamento cruzado anterior (LCA).

**Material e Métodos:** Ratos Wistar foram divididos em três grupos diferentes (n=5 por grupo). LCA (cirurgia e ruptura do LCA), Sham (cirurgia sem a ruptura do LCA) e Controle. Os músculos Vasto medial (VM), Vasto Lateral (VL) e Reto Femoral (RF) do quadríceps foram coletados 1, 2, 3, 7 e 15 dias após a transecção do LCA. Os níveis de RNAm para atrogina-1, MuRF-1 e miostatina e o conteúdo de proteínas ubiquitinadas foram avaliados. A área de secção transversa das fibras (AST) e a massa muscular (MM) também foram avaliados.

**Resultados:** Os grupos LCA e Sham aumentaram os níveis de RNAm em todos os músculos na maior parte dos períodos avaliados. O conteúdo de proteínas ubiquitinadas aumentou em três dias nos grupos LCA e Sham. A MM reduziu no grupo LCA em 3, 7 e 15 dias no VL e VM e em 7 dias no RF. A AST do VM reduziu em 3, 7, 15 dias no grupo LCA e em 3 e 7 dias no Sham. No VL a AST reduziu em 7 e 15 dias no grupo LCA e em 7 dias no grupo Sham. Diferentemente do grupo Sham, o grupo LCA não recuperou a MM e AST.

**Conclusão:** A atrofia muscular do quadríceps após a transecção do LCA envolve níveis aumentados de RNAm da miostatina e o sistema ubiquitina proteassoma pelo acúmulo de proteínas ubiquitinadas e níveis aumentados de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1.

Palavras chave: Proteína Ubiquitina Ligase; Lesão no joelho; Medicina esportiva, Fisioterapia.

## **Introdução**

O ligamento cruzado anterior (LCA) é o principal estabilizador do joelho e sua ruptura uma das lesões mais frequentes, principalmente em atividades esportivas que foram associadas a 63% das rupturas do LCA (7,25).

Dentre as alterações mais importantes em indivíduos com história recente ou crônica de ruptura do LCA estão a atrofia e fraqueza do músculo quadríceps (2,9,22,25,34,36,40). Estas alterações podem persistir de um ano após a lesão a quatro anos após a reconstrução do LCA e reabilitação (2,9,22).

Mecanismos neurofisiológicos têm sido propostos para explicar a fraqueza e atrofia do quadríceps após a ruptura do LCA. Uma inibição reflexa pré-sináptica da musculatura que envolve a articulação, conhecida como inibição muscular artrogênica (IMA), pode ser iniciada pela distensão ou dano capsular (13,14,18). Foi também demonstrado uma disfunção na alça motora gamma no músculo quadríceps após a reconstrução do LCA (17). Esses mecanismos ajudam a explicar a dificuldade desses sujeitos em alcançar a contração voluntária máxima. Além disso, alterações metabólicas e morfológicas, como mudanças no perfil metabólico das fibras de rápida para lenta podem também contribuir para tais deficiências após a ruptura do LCA (34).

As alterações musculares tem sido menos investigados após a ruptura do LCA do que o efeito dessa lesão na cartilagem (35). Okuyama et al. (26) demonstrou que a ruptura do LCA gera stress no músculo quadríceps devido ao aumento na expressão da Proteína de Choque Térmico (Heat Shock Protein 72 - HSP72). Estudos em coelhos, envolvendo diferentes lesões ligamentares, observaram atrofia no quadríceps somente quando a ruptura do LCA estava envolvida,

destacando dessa maneira a influência da ruptura desse ligamento no desenvolvimento da atrofia no músculo quadríceps (16,27).

A atrofia do músculo esquelético é caracterizada pela redução da massa muscular devido ao desequilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas, que resulta na perda do conteúdo protéico nas miofibras (23,30). O principal mecanismo de redução da massa muscular é o aumento da proteólise intracelular, atribuída ao sistema ubiquitina proteassoma (UPS), no qual proteínas danificadas ou mal formadas são poliubiquitinizadas e então degradadas pelo proteassoma 26S (30). Todo esse processo é mediado por três componentes enzimáticos, E1 (enzima ativadora da ubiquitina), E2 (enzima conjugadora da ubiquitina), E3 (proteína ubiquitina ligase) (30). O aumento nos níveis de duas E3 ligases, como a atrogina-1 (também conhecida como MaFbx) e MuRF-1 ocorre em diferentes modelos de atrofia muscular, como a desnervação, imobilização e suspensão de membro (3,4,5,32). A importância de investigar os níveis de RNAm dessas ubiquitina ligases é que seus aumentos precedem o início da perda de massa muscular (3,4,5,33).

A miostatina é uma importante proteína envolvida no controle da massa muscular, reconhecida como uma reguladora negativa do crescimento da massa muscular (28). Além disso, a expressão aumentada da miostatina tem sido associada a condições atroficas, como as observadas durante o desuso muscular (6,20,29) e desnervação (32).

Considerando que a atrofia do quadríceps é uma consequência da ruptura do LCA e que pode persistir mesmo após sua reconstrução e reabilitação e que a atrogina-1, MuRF-1 e miostatina são marcadores moleculares envolvidos no controle da massa muscular, o objetivo desse estudo foi de avaliar os níveis de RNAm desses genes no músculo quadríceps durante a fase aguda após a transecção do LCA de ratos. A massa muscular e a AST das fibras musculares também foram

avaliadas. Nossa hipótese foi que a atrofia do quadríceps após a ruptura do LCA poderia estar relacionada com os aumentos nos níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1 e miostatina. De nosso conhecimento este é o primeiro estudo que avalia as vias moleculares envolvidas na atrofia do quadríceps após a ruptura do LCA.

## **Material E Métodos**

Ratos *Wistar* com três meses de idade (n=75; 312,63±33g) foram estudados. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em sala com condições ambientais controladas com livre acesso a ração e água. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais da universidade (protocolo 015/2008) e foi conduzido de acordo com as normas internacionais de cuidado animal. Esse estudo foi dividido em cinco períodos experimentais de análise: 1, 2, 3, 7 e 15 dias após a transecção do LCA e para cada período os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais com cinco animais cada, sendo: LCA (cirurgia e transecção do LCA), Sham (cirurgia sem a transecção do LCA) e Controle.

## **Cirurgia Para A Transecção Do LCA**

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xilazina (12mg/kg) e ketamina (95mg/kg). Em condições anestésicas, a pata esquerda foi limpa e preparada utilizando-se solução de iodina. O animal foi colocado na posição supina, e então uma incisão central de 1 cm foi realizada sobre a face anterior do joelho esquerdo expondo o tendão patelar. A cavidade articular foi então exposta com a patela deslocada medialmente. O LCA foi então identificado com o joelho em flexão total e seccionado com uma tesoura cirúrgica tipo oftálmica. Depois disso, o teste de Lachman foi realizado para confirmar a transecção do LCA. A incisão peripatelar foi fechada com fio de sutura tipo Vycril 4-0 e a pele foi suturada



com fio de nylon 5-0. Depois da cirurgia os animais foram realocados nas gaiolas, sendo adicionado Paracetamol (13,5mg/100mL) na água disponível para beber nas primeiras 24hs para prover analgesia. O procedimento cirúrgico foi modificado de Stoop et al. (24) no qual a patela foi deslocada lateralmente ao invés de medialmente deslocada.

### **Coleta Das Amostras Musculares**

Depois dos períodos experimentais os animais foram pesados e anestesiados. Depois disso, os músculos Vasto lateral (VL), Reto Femoral (RF) e Vasto medial (VM) do quadríceps foram cuidadosamente isolados, removidos e pesados. A massa muscular de cada músculo (MM, g) foi então normalizada pela massa corporal (MC, g) para obter a relação  $MM/MC*100$ . Cada músculo foi dividido em duas partes a partir da região central no ventre muscular. A porção proximal foi congelada imediatamente em isopentano pré-congelado em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para serem utilizados na mensuração da AST das fibras. A porção distal foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para serem avaliados os níveis de RNAm e para a avaliação do western blot.

### **AST das fibras musculares**

Cortes histológicos seriados foram obtidos da porção ventral dos músculos VM, VL e RF em micrótomo criostato (Microm HE 505, Jena, Germany). Um corte histológico ( $10\mu\text{m}$ ) corado com azul de toluidina foi escolhido para mensuração das fibras musculares via microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Germany) e software para análise morfométrica (Axiovision 4.7.1.0, Carl Zeiss, Germany). A AST das fibras musculares de cada músculo foi obtida pela medida de cem fibras musculares localizadas na região central do corte histológico. Para cada músculo foi

então obtido a relação entre AST das fibras de cada animal pela sua respectiva massa corporal ( $\mu\text{m}^2/\text{g}$ ).

### **Isolamento e análise do RNA**

Um fragmento congelado de cada músculo foi homogeneizado e o RNA total isolado utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA isolado foi dissolvido em Tris-HCL e ácido etileno-diaminotetracético (TE) pH 7.6 e quantificado espectrofotometricamente. A pureza foi investigada pela determinação da taxa de absorvância a 260nm sobre a 280nm. A integridade do RNA foi então confirmada pela inspeção em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (Invitrogen, Carlsbad, CA), por meio de luz ultravioleta.

### **Transcrição reversa**

Para obter cDNA transcreveu-se reversamente 1  $\mu\text{g}$  de RNA em solução contendo, tampão de transcrição reversa 5x, uma mistura de dNTP (Promega, Madison, WI) contendo 0.2 mmol/L de dATP, dCTP, dGTP e 0.1 mol/L de dTTP, 1  $\mu\text{l}$  de oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 200U da enzima M-MLV RT (Promega, Madison, WI). A solução final foi então incubada a 70°C por 10 min, 42°C por 60 min e finalmente aquecidos a 95°C por 10 min.

### **Sequência Dos Primers**

As seqüências específicas para ratos utilizadas foram: atrogina-1 (senso: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT; anti-senso: GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT), MuRF1 (senso: TGACCAAGGAAAACAGCCACCAG; anti-senso: TCACTCCTTCTTCTCGTCCAGGATGG), Miostatina (senso:

CTACCACGGAAACAATCATTACCA; antisenso: AGCAACATTTGGGCTTTCCAT),  
GAPDH (senso: CCACCAACTGCTTAGCCC; anti-senso: GCCAAATTCGTTGTCATACC).

### **Reação Em Cadeia Da Polimerase Em Tempo Real (PCR-RT)**

Os níveis de transcrição para os músculos dos grupos experimentais e controle foram analisados simultaneamente e as reações conduzidas em duplicata no termociclador (Rotor Gene 3000, Cobertt Research, San Francisco, USA) utilizando-se o SYBR green (Applied Biosystems, Foster City, CA) como marcador de detecção de fluorescência e 180nM de cada primer num volume final de 50µL. As condições de ciclagem da temperatura para atrogina-1, MuRF-1, miostatina e GAPDH foram 10 min a 95°C e então 40 ciclos de 15s a 94°C, 30s a 56°C para atrogina-1, a 64°C para MuRF1, a 60°C para miostatina, e a 56°C para GAPDH, respectivamente, e 1 min a 72°C, seguido por 10 min a 72°C. Os dados foram analisados pelo método de comparação dos ciclos (Ct). A expressão do gene alvo foi normalizado pelo GAPDH. Controles negativos contendo RNA sem a enzima M-MLV transcriptase reversa garantiram que o produto da amplificação da PCR não foi resultado de uma amplificação de DNA genômico. Um ensaio branco com água ao invés de amostra, com primers e SYBR também foi realizado.

### **Western Blot**

A técnica de western blot foi realizada com anticorpo policlonal de coelho contra ubiquitina como o anticorpo primário (1:1000; Cat. No. A-100; Boston Biochem, Cambridge, Massachusetts). O anticorpo secundário utilizado foi cabra anti-imunoglobulina de coelho conjugado com alcalina fosfatase (1:2000; Cat. No D048701; Dako).

As amostras foram homogeneizadas em tampão de extração (para 10mL de tampão de extração: 330µl de 100mM tampão de fosfato de potássio, 100µl de 10mM de HEPES, 10µl de 1mM DTT, 100µl de 5mM ácido etileno-diamino tetracético EDTA pH 8.0, 30µl de 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10% de Glicerol, 40µl de solução de SDS a 10% , 1% de coquetel inibidor de protease e água MiliQ suficiente para 10ml de solução. Os homogenatos foram centrifugados a 12,000 x g por 10min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado. A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California) com albumina de soro bovino como padrão.

A proteína muscular (50µg) foi separada por eletroforese em gel 10% de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferida para uma membrana de nitrocellulose (0,45µm; BIO RAD Cat. No.162-0115). As membranas foram marcadas com solução de Ponceau para confirmar a transferência de proteínas e então lavadas com solução salina de Tris-Tween (TBST) (0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, e 0.1% Tween-20). As membranas foram incubadas sob baixa agitação por 12hs a 4°C com o anticorpo primário diluído em TBST com leite em pó desnatado a 0,1% (0,1% leite em pó desnatado, 0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5). Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas durante 30min em TBST, e então incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora em temperatura ambiente e lavada novamente por 20 min com TBST e 10 min com tampão de detecção (1M Tris-HCL, 1M NaCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, pH9,5). As proteínas marcadas foram detectadas com solução NBT/BCIP (ROCHE Diagnostics Cat. No.11681451001). O espectro das bandas foi determinado pelo software Scion Image (Scion Corp., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) sendo que as membranas foram normalizadas pela sua marcação prévia com Ponceau.

### **Análise Estatística**

Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram aplicados para avaliar respectivamente a normalidade e a homogeneidade dos resultados. Múltiplas comparações das médias foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey aplicado para comparar os valores das médias. Foram consideradas significantes as diferenças com valor de  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Níveis De RNAm Da Atrogina**

Comparado com o controle o grupo LCA apresentou níveis aumentados de RNAm da atrogina-1 em todos os músculos avaliados e na maioria dos períodos avaliados (Fig. 1, A,D,G). O VM apresentou níveis aumentados em todos os períodos avaliados (1 dia: 13 vezes,  $p < 0,001$ ; 2 dias: 12 vezes,  $p < 0,001$ ; 3 dias: 5 vezes,  $p < 0,001$ ; 7 dias: 4 vezes,  $p < 0,001$ ; 15 dias: 1,63 vezes,  $p = 0,03$ ; Fig. 1A), assim como o RF (1 dia: 5,3 vezes,  $p < 0,001$ ; 2 dias: 4,3 vezes,  $p < 0,001$ ; 3 dias: 16 vezes,  $p < 0,001$ ; 7 dias: 5,5 vezes,  $p < 0,001$ ; 15 dias: 1,6 vezes,  $p = 0,001$ ; Fig. 1D). No músculo VL os aumentos foram observados nos primeiros sete dias (1 dia: 12,1 vezes,  $p < 0,001$ ; 2 dias: 10,15 vezes,  $p < 0,001$ ; 3 dias: 33,45 vezes,  $p < 0,001$ ; 7 dias: 6,19 vezes,  $p < 0,001$ ; Fig. 1G).

O grupo LCA também apresentou níveis aumentados de RNAm de atrogina-1 quando comparados ao grupo Sham (Figura 1 A,D,G). (VM: 1 dia: 1,4 vezes,  $p < 0,001$ ; 2 dias: 1,4 vezes,  $p = 0,001$ ; 3 dias: 1,8 vezes,  $p = 0,001$ ; 7 dias: 1,55 vezes,  $p = 0,04$ ; 15 dias: 1,65 vezes,  $p = 0,03$ , Figura 1A; RF: 1 dia: 1,4 vezes,  $p < 0,001$ ; 7 dias: 1,4 vezes,  $p < 0,001$ , Figura 1D; VL: 1 dia: 1,6 vezes,  $p < 0,001$ ; 2 dias: 2 vezes,  $p < 0,001$ ; 3 dias: 2 vezes,  $p < 0,001$ , Figura 1G)

O grupo Sham também apresentou níveis aumentados de atrogina-1 em todos os músculos avaliados comparado ao controle nos primeiros sete dias (Figura 1 A,D,G). (VM: 1 dia: 9 vezes,  $p < 0,001$ ; 2 dias: 9 vezes,  $p < 0,001$ ; 3 dias: 3 vezes,  $p = 0,004$ ; 7 dias: 2,6 vezes,  $p = 0,02$ , Figura

1A; RF: 1 dia: 3,7 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 3,63 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 13 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 3,7 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1D; VL: 1 dia: 7,5 vezes  $p<0,001$ ; 2 dias: 5,16 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 17 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 5,18 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1G)

### **Níveis de RNAm de MuRF-1**

Os níveis de RNAm de MuRF-1 no grupo LCA encontravam-se aumentados nos primeiros três dias no VL, e nos sete primeiros dias no VM e RF quando comparados ao controle (Figura 1 B, E, H). (VM: 1 dia: 11 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 7,2 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 6,4 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 3,2 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1B; RF: 1 dia: 2,5 vezes,  $p=0,001$ , 2 dias: 3 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 5,1 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 2,7 vezes,  $p=0,001$ , Figura 1E; VL: 1 dia: 12 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 7 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 33 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1H). Também foram observados maiores níveis de RNAm de MuRF-1 quando comparados o grupo LCA ao Sham em todos os músculos avaliados (Figura 1 B,E,H). (VM: 1 dia: 2 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 2,5 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1B; RF: 1 dia: 2 vezes,  $p=0,003$ ; 3 dias: 1,8 vezes,  $p=0,002$ , Figura 1E; VL: 1 dia: 1,6 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 1,6 vezes,  $p=0,002$ ; 3 dias: 1,5 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1H).

O grupo Sham mostrou níveis aumentados de RNAm de MuRF-1 comparado ao controle em todos os músculos avaliados e na maioria dos períodos avaliados (Figura 1; VM: 1 dia: 5,6 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 6 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 2,5 vezes,  $p=0,008$ ; 7 dias: 2,68 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1B; RF: 2 dias: 2,3 vezes,  $p=0,003$ ; 3 dias: 2,7 vezes,  $p=0,01$ ; 7 dias: 2,23 vezes,  $p=0,01$ , Figura 1E; VL: 1 dia: 7,5 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 4,4 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 22 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1H).

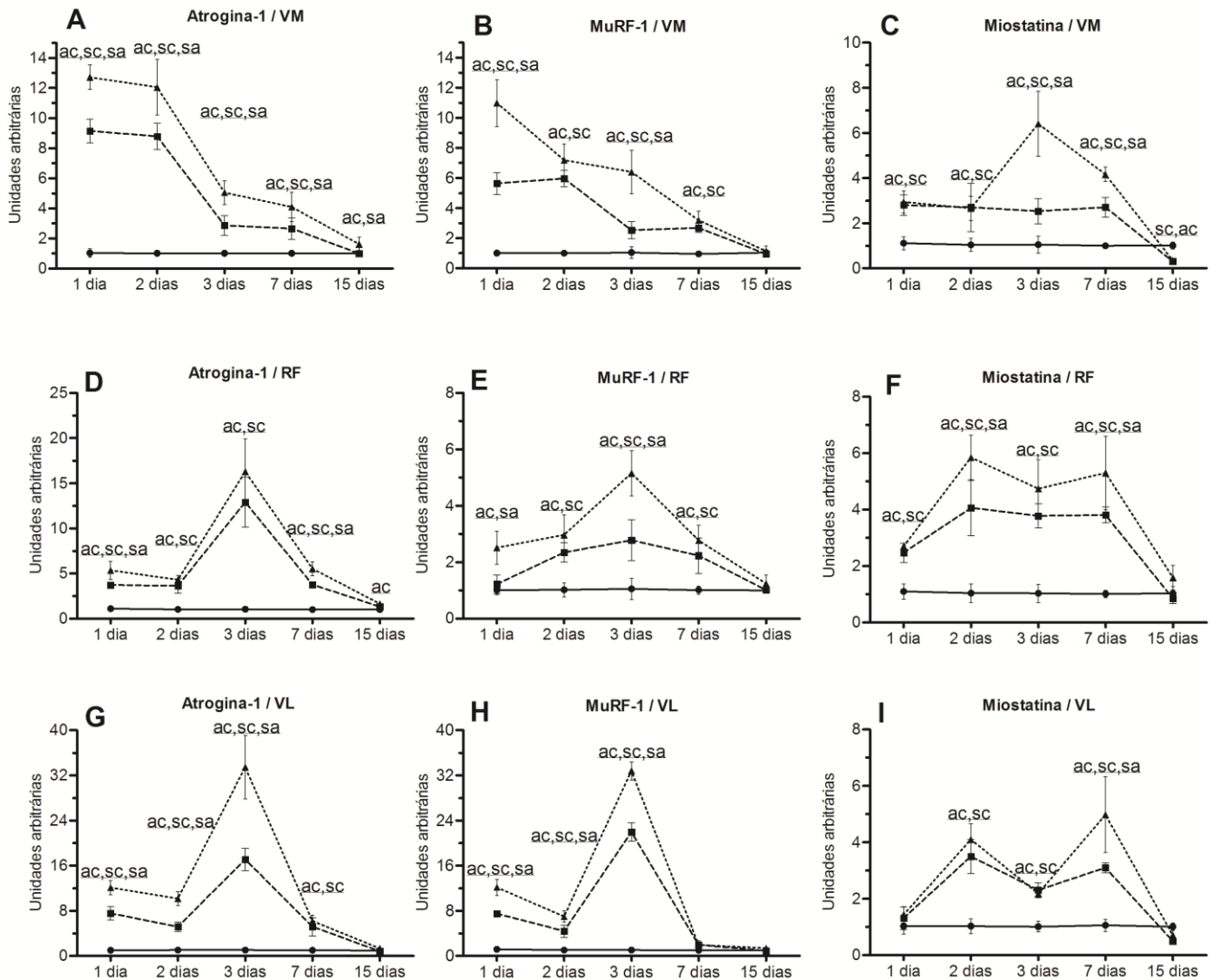
### **Níveis De RNAm De Miostatina**

O grupo LCA apresentou níveis aumentados de miostatina comparado ao controle em todos os músculos durante os primeiros sete dias (Figura 1, C,F,I). O músculo VM apresentou níveis aumentados nos primeiros sete dias (1 dia: 2,9 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 2,65 vezes,  $p=0,02$ ; 3 dias: 6,4 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 4,16 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1C), e em 15 dias os níveis estavam 70% abaixo dos níveis basais ( $p<0,001$ , Figura 1C). O músculo RF apresentou níveis aumentados nos primeiros sete dias (1 dia: 2,7 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 5,8 vezes,  $P<0,001$ ; 3 dias: 4,7 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 5,3 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1F). No VL os níveis de miostatina foram aumentados em 2, 3 e 7 dias (2 dias: 4 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 2 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 5 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1I).

Os níveis de miostatina também estiveram aumentados no grupo LCA quando comparados ao Sham em todos os músculos avaliados (Figura 1 C,F,I). (VM: 3 dias: 2,5 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 1,55 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1C; VL: 7 dias: 1,6 vezes,  $p=0,008$ , Figura 1I; RF: 2 dias: 1,45 vezes,  $p=0,02$ , 7 dias: 1,40 vezes,  $p=0,002$ , Figura 1F).

Os níveis de RNAm de miostatina também estavam elevados quando o grupo Sham foi comparado ao controle, em todos os músculos e na maioria dos períodos avaliados (Figura 1, C,F,I). O músculo VM mostrou níveis aumentados do RNAm de miostatina nos primeiros sete dias (1 dia: 2,8 vezes,  $p=0,001$ ; 2 dias: 2,7 vezes,  $p=0,02$ ; 3 dias: 2,5 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 2,7 vezes,  $p<0,001$ , Figura 1C), porém aos 15 dias os níveis estavam 70% abaixo dos níveis basais ( $p<0,001$ ). O músculo RF apresentou níveis aumentados de RNAm para miostatina nos primeiros sete dias (1 dia: 2,5 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 4 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 3,8 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 3,8 vezes,  $p=0,001$ , Figura 1F). No VL os aumentos ocorreram desde o primeiro dia até 7 dias (1 dia: 7,5 vezes,  $p<0,001$ ; 2 dias: 4,4 vezes,  $p<0,001$ ; 3 dias: 2 vezes,  $p<0,001$ ; 7 dias: 3 vezes,  $p=0,005$ , Figura 1I).

--- LCA    ■ Sham    ● Controle



**Figura 1:** Níveis de RNAm da Atrogin-1 no Vasto Medial (VM; A), Reto Femoral (RF; D) e Vasto Lateral (VL; G). Níveis de RNAm de MuRF-1 nos músculos VM (B), RF (E) e VL (H). Níveis de RNAm da miostatina nos músculos VM (C), RF (F) e VL (I). Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ac=  $p < 0,05$ : LCA em relação ao grupo controle; sc=  $p < 0,05$ : Sham comparado ao controle; sa=  $p < 0,05$ : Sham comparado com o grupo LCA.

## Proteínas Ubiquitinadas



Uma vez que os níveis da expressão gênica das ubiquitina ligases ocorreram principalmente nos primeiros três dias em ambos os grupos LCA e Sham, foram avaliados os níveis de acúmulo de ubiquitina no terceiro dia. Nesse sentido, foram observados um acúmulo de proteínas ubiquitinadas em todos os músculos de ambos os grupos, em relação ao controle (Fig. 2).

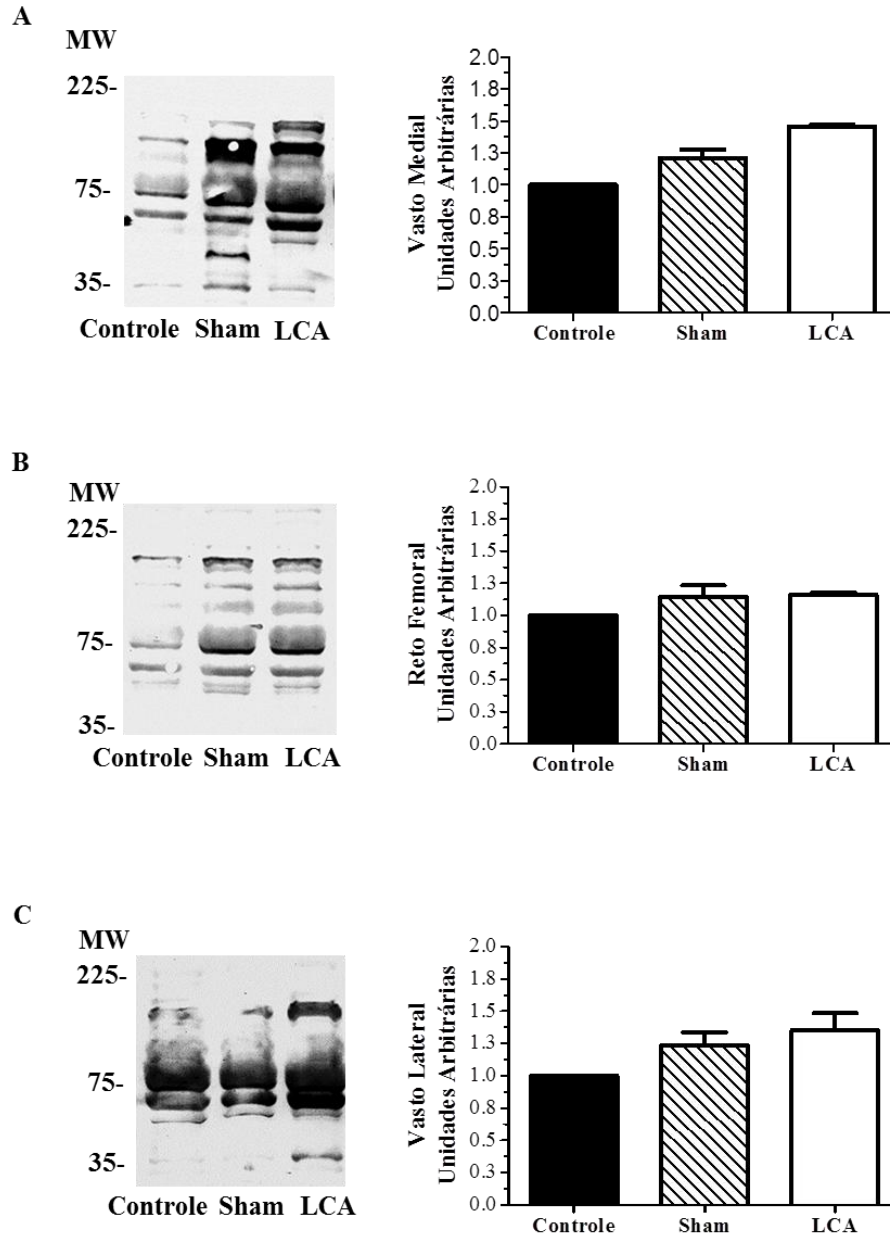


Figura 2: Membranas de Western Blot mostrando a quantidade de proteínas conjugadas com ubiquitina em 3 dias com as respectivas avaliações da densidade óptica das membranas (unidades arbitrárias) do Vasto Medial (A), Reto Femoral (B) e Vasto Lateral (C). MW: peso molecular.

## **Massa Muscular**

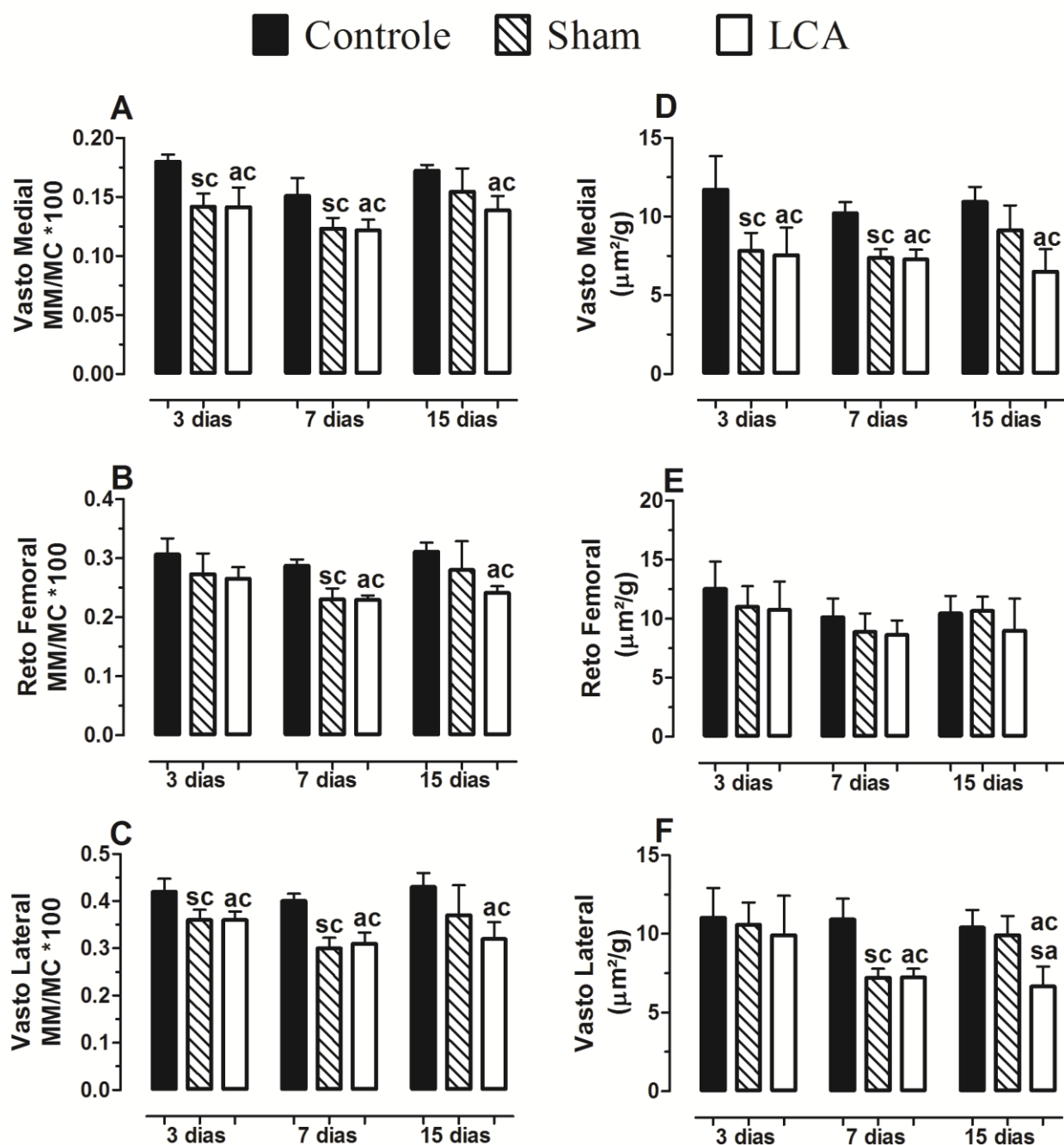
Os grupos LCA e Sham apresentaram redução na massa muscular em todos os músculos avaliados comparados ao controle (Figura 3). O grupo LCA apresentou as seguintes reduções: VM (3 dias: 21%,  $p=0,002$ ; 7 dias: 22%,  $p=0,002$ ; 15 dias: 19%,  $p=0,02$ , Figura 3A), RF (7 dias: 20%,  $p<0,001$ ; 15 dias: 22%,  $p<0,004$ , Figura 3B) e o VL (3 dias: 15%,  $p=0,005$ ; 7 dias: 23%,  $p<0,001$ ; 15 dias: 25%,  $p=0,02$ , Figura 3C).

O grupo Sham apresentou as seguintes reduções de massa muscular comparados ao controle: VM (3 dias: 21%,  $p=0,002$ ; 7 dias: 21%,  $p=0,003$ , Figura 3A), RF (7 dias: 20%,  $p<0,001$ , Figura 3B) e no VL (3 dias: 15%,  $p=0,005$ ; 7 dias: 26%,  $p<0,001$ , Figura 3C).

## **AST Das Fibras Musculares**

Os grupos LCA e Sham reduziram a relação AST/MC nos músculos VL e VM comparados ao controle (Figura 3). No grupo LCA, o músculo VM apresentou a primeira redução aos 3 dias e o VL aos sete dias (VM: 3 dias: 35%,  $p=0,012$ ; 7 dias: 29%,  $p<0,001$ ; 15 dias: 40%,  $p=0,012$ , Figura 3D; VL: 7 dias: 34%,  $p<0,001$ ; 15 dias: 36%,  $p=0,01$ , Figura 3F).

No grupo Sham a redução na relação AST/MC para os músculos VM foi observada em 3 e 7 dias, e no VL somente em 7 dias, comparados ao controle (VM: 3 dias: 33%,  $p=0,018$ ; 7 dias: 28%,  $p<0,001$ , Figura 3D; VL: 7 dias: 34%,  $p<0,001$ , Figura 3F).



**Figura 4:** Relação massa muscular/massa corporal (MM/BM) e a relação AST/massa corporal ( $\mu\text{m}^2/\text{g}$ ) dos músculos Vasto Medial (A, D), Reto Femoral (B, E) e Vasto Lateral (C, F) do músculo quadríceps de ratos. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. ac= p<0,05: LCA comparado ao grupo controle; sc= p <0,05: Sham comparado ao controle; sa= p<0,05: Sham comparado ao grupo LCA.

## **Discussão**

Os resultados desse estudo fornecem novas informações relacionadas as vias moleculares envolvidas na atrofia do quadríceps após a transecção do LCA em modelo animal, que foi caracterizado pelo rápido aumento dos níveis de RNAm de atrogina-1, MuRF-1 e miostatina associados a redução da massa muscular e da AST das fibras do músculo quadríceps, de acordo com a nossa hipótese. Além disso, resultados similares foram encontrados no grupo Sham, assim é possível sugerir que somente o procedimento cirúrgico na cápsula articular é suficiente para aumentar a expressão desses genes e induzir adaptações atroficas no quadríceps. Porém, diferentemente do grupo LCA o grupo Sham recuperou a massa muscular e a AST 15 dias após a cirurgia, evidenciando que a transecção do LCA é um fator limitante para a recuperação da massa muscular no período avaliado.

O processo de atrofia do músculo esquelético é caracterizado pela ativação do UPS. A transcrição aumentada de genes desse sistema, como a atrogina-1 e MuRF-1, tem sido associadas a atrofia muscular esquelética em diferentes modelos animais de desuso, como a desnervação, imobilização e suspensão de membro (3,4,10,33). Agora, demonstrou-se que esse sistema é também disparado na atrofia muscular do quadríceps após a cirurgia no joelho e especialmente após a transecção do LCA em ratos.

Embora os níveis aumentados de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1 tenham sido observados em todos os músculos dos grupos LCA e Sham, a transecção do LCA induziu os maiores níveis. Supõe-se que os maiores níveis de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1 no grupo LCA pode estar relacionado ao maior procedimento cirúrgico necessário para causar a transecção do ligamento, assim como pelo próprio ligamento lesado. Assim, os resultados encontrados em ambos os grupos, LCA e Sham, nos primeiros três dias estão provavelmente relacionados a inflamação

articular. A inflamação no joelho é descrita como uma resposta intrínseca a lesões e doenças como a osteoartrite, lesões ligamentares e meniscais, e a artroscopia (1,11,14,15).

Todavia, níveis aumentados de citocinas inflamatórias, como interleucina-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), têm sido observados no líquido sinovial de pacientes (15) e ratos (37) durante a fase inflamatória da ruptura do LCA e no quadríceps de ratos após injeção de salina no joelho (8). Nesse sentido, sabe-se que a exposição a citocinas inflamatórias aumenta a expressão de fatores de transcrição que regulam diretamente a expressão de MuRF-1 no músculo esquelético, como o TNF- $\alpha$  e fator nuclear kappa beta (12,19). Da mesma maneira, foi demonstrado que o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão da atrogina-1 através de componentes da família de Proteínas Cinasas Ativadas por Mitógeno (MAPK), como a p38 MAPK (21). Assim, os níveis aumentados de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1 observados no presente estudo podem ser resultados da exposição de citocinas inflamatórias da articulação lesada.

Os resultados relacionados aos níveis de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1 podem também ter sido influenciados pelo edema articular. O edema decorrente de dano capsular ou experimentalmente induzido causa uma potente IMA que favorece a atrofia muscular (31, 38). Recentemente, Ramirez et al. (28) demonstraram em modelo de edema articular de tornozelo induzido por injeção de salina, níveis elevados de RNAm de atrogina-1 no músculo tibial anterior dois dias após a injeção. Portanto, nossos resultados sugerem que a atrofia relacionada a IMA após lesão articular do joelho pode estar associada a níveis aumentados de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1. Assim, estudos futuros são necessários para avaliar os níveis das ubiquitinas-ligases em modelo de edema de joelho sem cirurgia.

Nossos resultados também mostraram níveis aumentados de RNAm para miostatina nos grupos LCA e Sham em todos os músculos avaliados. Interessantemente, os maiores níveis de RNAm de miostatina ocorreram quando os níveis de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1 estavam diminuindo ou baixos, especialmente no VL. Estudos prévios já demonstraram que a miostatina inibe a fosforilação da proteína cinase AKT, também conhecida como PKB, induzindo via FoxO1 a proteólise através de níveis aumentados de atrogina-1 (24). Além disso, a inibição de AKT pela miostatina compromete a via de hipertrofia muscular AKT/mTOR/p70S6K (39). Assim, supõe-se que a miostatina tem um papel chave após a transecção do LCA, seja sinalizando para proteólise via alvos da FoxO1 (como: atrogina-1 e MuRF-1) seja prejudicando a síntese de proteína via inibição da via AKT/mTOR/p70S6K. Estudos sobre as vias de hipertrofia após a transecção do LCA são necessários para avaliar essa hipótese.

Interessantemente, os níveis de RNAm da miostatina foram reduzidos em 15 dias nos músculos VM nos grupos LCA e Sham, isso pode ter contribuído para a recuperação da massa muscular no grupo Sham. No entanto, a não recuperação da massa muscular e da AST no grupo LCA pode estar relacionado aos níveis aumentados de RNAm para atrogina-1 nesse período.

Embora os níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1 e miostatina estivessem aumentados desde o primeiro dia para todos os músculos avaliados dos grupos LCA e Sham, a redução na massa muscular e AST foi primeiramente observada em 3 e 7 dias para o VM e VL respectivamente, com a redução na massa muscular no RF ocorrendo em 7 dias. Esse aumento rápido dos atrogenes seguido por reduções tardias da massa e AST foram similares as observadas por Sacheck et al. (33) em diferentes modelos de atrofia, e a outros estudos abordando atrofia muscular e expressão de atrogenes (3,4). Além disso, foi observado o acúmulo de proteínas

ubiquitinadas em 3 dias, possivelmente em consequência ao grande e rápido aumento nos primeiros três dias dos níveis de RNAm das ubiquitina ligases após os procedimentos cirúrgicos.

Diferentemente do grupo Sham, os animais do grupo LCA não recuperaram a massa muscular e a AST das fibras em todos os músculos em 15 dias. Isso pode também estar relacionado a ativação reduzida dos motoneuronios gamma após a ruptura do LCA, que é resultado da atenuação dos aferentes Ia que podem causar um desuso prolongado das fibras rápidas inervadas pelos motoneuronios de alto limiar (17). Além do mais, os aumentos prévios nos níveis de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1 no VL, VM e RF e a manutenção dos níveis aumentados de atrogina-1 no VM e RF em 15 dias podem ter influenciado a não recuperação da massa muscular.

A redução tardia na massa muscular (7 dias) e ausência de redução na área de secção transversa no músculo RF, podem ser associadas a sua função bi articular, que pode ter promovido uma maior atividade muscular oferecendo resistência a atrofia muscular apesar dos níveis aumentados dos atrogenes nesse período. Nossos resultados estão de acordo com estudos prévios mostrando que o VM e VL são os primeiros afetados em todo o quadríceps após lesão do LCA (9,22). Adicionalmente, Okuyama et. al. (26) demonstraram níveis aumentados de HSP72, somente no VM e VL de ratos após a ruptura do LCA. Nesse mesmo estudo a ausência de níveis aumentados de HSP72 no RF foi também atribuída a sua função bi articular (26).

É importante destacar que os músculos VL e VM do grupo LCA mantiveram os níveis baixos de massa muscular e AST das fibras em 15 dias, uma vez que as porcentagens de redução comparadas ao controle permaneceram próximo aos observados em 7 dias para o VL e a 3 dias para VM. Esses resultados indicam que a redução da massa muscular ocorreu na primeira

semana e foi mantida nos dias seguintes. Assim, baseados nesses resultados, presume-se que o possível problema na recuperação da massa muscular do quadríceps nas primeiras duas semanas após a transecção do LCA pode estar relacionada a uma síntese protéica deficitária associada aos aumentos prévios e sustentados dos atrogenes.

Esse estudo fornece novas informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na atrofia do quadríceps após a transecção do LCA. Esse conhecimento pode ajudar na investigação dos efeitos de intervenções usadas na reabilitação e no desenvolvimento de estratégias para minimizar a perda de massa muscular após a cirurgias no joelho e ruptura do LCA.

### **Agradecimentos**

Gabriel B Delfino e Igor L Baptista são bolsistas de doutorado da FAPESP (Processo numero: 08/03499-8 e 07/57613-3 respectivamente). João L Q Durigan é bolsista de pós doutorado da FAPESP (Processo numero: 08/09408-4). Sabrina M Peviani é pós doutoranda pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **Referências**

1. Akima H, Furukawa T: Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial menisectomy. *Knee Surg Sports TraumatolArthrosc* 2005;13:632-7.
2. Arangio GA, Chen C, Kalady M, Reed JF 3rd. Thigh muscle size and strength after anterior cruciate ligament reconstruction and rehabilitation. *J Orthop Sports PhysTher.* 1997 Nov;26(5):238-43.



3. Bajotto G, Sato Y, Kitaura Y, Shimomura Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles Eur J Appl Physiol. 2011 Jan 11.
4. Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, Curi R, Miyabara EH, Moriscot AS. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. Muscle Nerve. 2010 Jun;41(6):800-8.
5. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. Science. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.
6. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. Am J Physiol. 1999 Aug; 277(2 Pt 2):R601-6.
7. Cheatham SA, Johnson DL. Current concepts in ACL Injuries. PhysSportsmed. 2010 Oct;38(3):61-8.
8. Galbán CJ, Ling SM, Galbán CJ, Taub DD, Gurkan I, Fishbein KW, Spencer RG. Effects of knee injection on skeletal muscle metabolism and contractile force in rats. Osteoarthritis Cartilage. 2007 May; 15(5):550-8.
9. Gerber C, Hoppeler H, Claassen H, Robotti G, Zehnder R, Jakob RP. The lower extremity musculature in chronic symptomatic instability of the anterior cruciate ligament. J Bone Joint Surg Am. 1985;67:1034–1043.

10. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Dec 4;98(25):14440-5.
11. Gür H and Çakin N: Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:1534-41
12. Hong Li & Shweta Malhotra & Ashok Kumar. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy *J Mol Med* 2008;86:1113–1126.
13. Hopkins JT, Ingersoll CD, Krause BA, Edwards JE, Cordova ML. Effect of knee joint effusion on quadriceps and soleus motoneuron pool excitability. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Jan;33(1):123-6.
14. Hurley MV: The effects of joint damage on muscle function, proprioception and rehabilitation. *Man Ther* 1997;2:11-7.
15. Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee*. 2003 Mar;10(1):93-6.
16. Kilic BA, Dingil O, Erkula G, Elmas C, Erdogan D, Atik OS. Evaluation of the muscles around the knee in rabbits whose anterior cruciate and/or medial collateral ligaments were dissected. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2004 Nov;124(9):626-30.
17. Konishi Y, Fukubayashi T, Takeshita D. Mechanism of quadriceps femoris muscle weakness in patients with anterior cruciate ligament reconstruction. *Scand J Med Sci Sports*. 2002 Dec;12(6):371-5.

18. Krishnan C, Williams GN. Factors explaining chronic knee extensor strength deficits after ACL reconstruction. *J Orthop Res.* 2011 May;29(5):633-40.
19. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med.* 2004 Jul;82(7):434-48.
20. Lalani R, Bhasin S, Byhower F, Tarnuzzer R, Grant M, Shen R, Asa S, Ezzat S, Gonzalez-Cadavid NF. Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J Endocrinol.* 2000 Dec;167(3):417-28.
21. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J.* 2005 Mar;19(3):362-70.
22. Lorentzon R, Elmqvist LG, Sjöström M, Fagerlund M, Fuglmeier AR. Thigh musculature in relation to chronic anterior cruciate ligament tear: muscle size, morphology, and mechanical output before reconstruction. *Am J Sports Med.* 1989 May-Jun;17(3):423-9.
23. McCarthy JJ, Esser KA. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010 May;13(3):230-5.
24. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2006;209:501-514.

25. Natri A, Jarvinen M, Latvala K, Kannus P. Isokinetic muscle performance after anterior cruciate ligament surgery: long-term results and outcome predicting factors after primary surgery and late-phase reconstruction. *Int J Sports Med* 1996;17:223-8
26. Okuyama R, Honda M, Fujiya H, Goto K, Sugiura T, Akema T. Expression of heat shock protein 72 in rat quadriceps muscles following anterior cruciate ligament resection. *J Orthop Sci.* 2003;8(2):213-7.
27. Pellisé F, Navarro-Quilis A. The muscles in chronic ligamentous instability of the knee: an experimental study. *ActaOrthopBelg* 1997;63:287–292.
28. Ramírez C, Russo TL, Sandoval MC, Durigan JLQ, Dentillo AA, Couto MAS, Salvini TF. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*. In press 2011
29. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. 2001. Myostatin, insulin like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 24(7):893–899.
30. Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol.* 2005 Jun;288(6):R1423-31.
31. Rice D, McNair PJ, Dalbeth N. Effects of cryotherapy on arthrogenic muscle inhibition using an experimental model of knee swelling. *Arthritis Rheum.* 2009 Jan 15;61(1):78-83.

32. Russo TL, Peviani SM, Durigan JL, Gigo-Benato D, Delfino GB, Salvini TF. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogen-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2010 Jul;31(1):45-57.
33. Satchek JM, Hyatt JPK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* 2007;21, 140–155
34. Stockmar C, Lill H, Trapp A, Josten C, Punkt K. Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastusmedialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *ActaHistochem.* 2006;108(5):335-42
35. Stoop R, BumaP, Van Der Kraan P, Hollander AP, Billingham RC, Poole AR, Van Den Berg WB. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2121-31.
36. Takarada Y, Takazawa H, Ishii N. Applications of vascular occlusion diminishes disuse atrophy of knee extensor muscles. *Med Sci Sports Exerc.* 2000 Dec;32(12):2035-9.
37. Tang Z, Yang L, Wang Y, Xue R, Zhang J, Huang W, Chen PC, Sung KL. Contributions of different intraarticular tissues to the acute phase elevation of synovial fluid MMP-2 following rat ACL rupture. *J Orthop Res.* 2009 Feb;27(2):243-8.
38. Torry MR., Decker MJ, Millett PJ, Steadman JR and Sterett WI. The effects of knee joint effusion on quadriceps electromyography during jogging. *Journal of Sports Science and Medicine* 2005;4,1-8.

39. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C1258–C1270.
  
40. Williams GN, Snyder-Mackler L, Barrance PJ, Buchanan TS. Quadriceps femoris muscle morphology and function after ACL injury: a differential response in copers versus non-copers. *J Biomech.* 2005 Apr;38(4):685-93.

## MANUSCRITO II

Segue o manuscrito traduzido para o português que foi originalmente submetido ao periódico “**Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**”.

**Título:** Estimulação elétrica neuromuscular altera a expressão de genes e retarda a atrofia do músculo quadríceps de ratos após a transecção do ligamento cruzado anterior.

Gabriel B. Delfino<sup>1</sup>, João L. Q. Durigan<sup>1</sup>, Sabrina M. Peviani<sup>1</sup>, André Dario Belaz da Silva<sup>1</sup>  
Thiago L. Russo<sup>1</sup>, Carolina Ramirez Ramirez<sup>2</sup>, Tania F. Salvini<sup>1</sup>.

1-Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, Brasil;

2 –Escola de Fisioterapia, Universidade Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

## **ABSTRACT**

**STUDY DESIGN:** Controlled laboratory study.

**OBJECTIVE:** To assess the effects of neuromuscular electrical stimulation (NMES) on the mRNA levels of genes related to muscle atrophy in the quadriceps muscle of rats after anterior cruciate ligament transection (ACL).

**METHODS:** 125 Wistar rats were randomized into 5 different groups: ACL (surgery and ACL rupture), ACLES (surgery and ACL transection and NMES), Sham (surgery without ACL transection), ShamES (surgery without ACL transection and NMES) and Control. The vastus medialis (VM), rectus femoris (RF) and vastus lateralis (VL) muscles of quadriceps were harvested 1, 2, 3, 7 and 15 days after surgery. The mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin as well as the ubiquitinated protein content were evaluated. The muscle mass (MM) and cross sectional area (CSA) of muscle fibers were measured.

**RESULTS:** ACL and Sham showed increased atrogen-1, MuRF-1 and myostatin mRNA levels in all evaluated muscles in most periods. In the ACLES and ShamES, the increase of mRNA atrogens and myostatin was minimized or prevented in some evaluated periods. The ubiquitinated protein content increased at 3 days in all groups. NMES prevented a reduction in MM in all muscles of the ACLES group at 3 days and in ShamES in all periods, but did not prevent a reduction in the CSA of the VM and VL at 7 and 15 days in ACLES, as it did at 7 days in the VM of ShamES. Unlike the Sham and ShamES groups, the MM and CSA of the ACLES and ACL groups did not recover.



CONCLUSIONS: NMES minimized an increase of atrogenes and myostatin mRNA in the quadriceps muscles of the ACLES and ShamES groups, inhibiting the early atrophy at 3 days, although it did not prevent atrophy at 7 and 15 days after ACL rupture. Sham and ShamES, however, displayed recovery of quadriceps mass and CSA.

*KEY WORDS: Knee injury, Physical therapy, Sports Injuries, Ubiquitin Protein Ligases.*

## RESUMO

**Tipo de estudo:** Ensaio experimental controlado

**OBJETIVOS:** Investigar os efeitos da estimulação elétrica neuromuscular (EENM) nos níveis de RNAm dos genes relacionados à atrofia muscular do quadríceps de ratos após a transecção do ligamento cruzado anterior (LCA).

**Métodos:** 125 Ratos *Wistar* foram aleatorizados a 5 grupos diferentes: LCA (cirurgia e transecção do LCA), LCAES (cirurgia e transecção do LCA e EENM), Sham (cirurgia sem a transecção do LCA), ShamES (cirurgia sem transecção do LCA e EENM) e Controle. Os músculos Vastos Medial (VM), Reto Femoral (RF) e Vasto Lateral do quadríceps foram coletados 1, 2, 3, 7 e 15 dias após a cirurgia. Os níveis de RNAm de atrogina-1, MuRF-1 e miostatina e o conteúdo de proteínas ubiquitinadas foram avaliados. A massa muscular (MM) e a área de secção transversa das fibras musculares (AST) foram mensurados.

**Resultados:** LCA e Sham apresentaram níveis aumentados de RNAm de miostatina, atrogina-1 e MuRF-1 em todos os músculos e na maioria dos períodos avaliados. Nos grupos LCAES e ShamES os aumentos dos atrogenes e miostatina foram minimizados e prevenidos em alguns períodos. O conteúdo de proteínas ubiquitinadas estava aumentado em 3 dias em todos os grupos. A EENM preveniu a redução de massa muscular em todos os músculos em 3 dias no grupo LCAES e em todos os períodos no ShamES, mas não preveniu a redução da AST do VM e VL em 7 e 15 dias no LCAES, assim como em 7 dias para o VM do ShamES. Diferentemente dos grupos Sham e ShamES, os grupos LCAES e LCA não recuperaram a MM e AST.

**Conclusão:** A EENM minimizou os aumentos no RNAm dos atrogenes e da miostatina no músculo quadríceps dos grupos LCAES e ShamES, inibindo a rápida atrofia observada em 3 dias, porém a EENM não impediu a atrofia em 7 e 15 dias após a transecção do LCA. Do contrário os grupos Sham e ShamES recuperaram a MM e AST do quadríceps.

**Palavras Chave:** Proteína Ubiquitina Ligases, Lesão no Joelho, Lesões Esportivas, Fisioterapia.

## INTRODUÇÃO:

A ruptura do ligamento cruzado anterior (LCA) é uma das lesões mais comuns do joelho. <sup>(41)</sup> Após a ruptura e reconstrução do LCA os indivíduos apresentam dor, função do joelho prejudicada, fraqueza e atrofia muscular, especialmente no músculo quadríceps, o mais afetado por essa lesão. <sup>(16)</sup>

Tem sido demonstrado que a atrofia do quadríceps persiste por anos, mesmo após a reabilitação. <sup>(3,15,34,47)</sup> A atrofia tem sido associada a mecanismos comuns após lesões articulares, como a inibição muscular artrogênica (IMA) e a disfunção na alça motora gamma, inibindo a contração das grandes unidades motoras comprometendo o desenvolvimento da contração voluntária máxima. <sup>(22,23,27)</sup>

Diferentes estratégias de reabilitação vem sendo precocemente empregadas para minimizar a atrofia e as deficiências na ativação do quadríceps após cirurgia de reconstrução do LCA, como as contrações excêntricas, oclusão vascular, suplementação com vitaminas e a estimulação elétrica neuromuscular (EENM). <sup>(3,7,19,51)</sup>

A EENM é utilizada clinicamente para melhorar a função do quadríceps após a lesão do LCA pelo fato de facilitar o recrutamento e restaurar a força muscular, que pode estar inibida pela dor, edema, ou pelo próprio trauma no joelho. <sup>(25,30)</sup> Demonstrou-se recentemente que a EENM pode sobrepor os déficits de ativação muscular contribuindo para minimizar a atrofia e perda de força muscular no quadríceps. <sup>(19)</sup> Entretanto, Kim e colaboradores em revisão sistemática apresentaram contradições e inconsistências na efetividade da EENM na reabilitação do LCA. <sup>(25)</sup> Diferenças consideráveis foram notadas nos parâmetros da EENM e nas técnicas de aplicação nos ensaios clínicos, além de falhas metodológicas e seleção de parâmetros de qualidade inferior. Bons

ensaios clínicos e estudos na área básica envolvendo os efeitos da EENM após lesão do LCA são escassos.<sup>(25)</sup> Ainda não se sabe se a EENM pode regular vias moleculares de sinalização minimizando a atrofia do quadríceps após lesão do LCA.

A atrofia muscular esquelética ocorre em decorrência de um programa coordenado de proteólise, conhecido como sistema ubiquitina proteassoma (UPS).<sup>(35)</sup> Esse programa requer a poliubiquitinação de proteínas alvo pelas ubiquitinas E3 ligases, fazendo com que a proteína possa ser reconhecida e degradada pelo proteassoma.<sup>(44)</sup>

Em diferentes modelos de atrofia muscular foram encontrados níveis aumentados de atrogina-1 (também conhecida como MAFbx) e de MuRF-1 (*Muscle Ring Finger 1*) que são ubiquitinas do tipo E3 ligase específicas do músculo.<sup>(4,6,45)</sup> Ambas, atrogina-1 e MuRF-1, são conhecidas como marcadores moleculares de atrofia muscular, uma vez que seus níveis elevados precedem e se correlacionam com a máxima perda de massa muscular.<sup>(46)</sup>

Outro importante regulador de massa muscular é a miostatina, atuando como um fator de transcrição inibitório ao crescimento muscular. Os níveis aumentados de miostatina tem sido observados em diferentes modelos de atrofia muscular.<sup>(8,31,36,43,45)</sup>

Uma vez que a atrogina-1, MuRF-1 e a miostatina são marcadores moleculares envolvidos no controle de massa muscular, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da EENM precoce aplicada no quadríceps sobre os níveis de RNAm desses genes durante a fase aguda após a transecção do LCA de ratos. A massa muscular e a área de secção transversa das fibras musculares do quadríceps também foram avaliadas. Nossa hipótese foi que a EENM poderia proteger o quadríceps de sua atrofia via redução nos níveis de RNAm da atrogina-1, MuRF-1 e

miostatina. Para o nosso conhecimento esse é primeiro estudo que avalia os efeitos da EENM nas vias moleculares de atrofia no músculo quadríceps após transecção do LCA.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Desenho Experimental**

Ratos Wistar com três meses de idade (n=125; 313,32±30g) foram estudados. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em sala com condições ambientais controladas e com livre acesso a ração e água. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais da universidade (protocolo 015/2008) e foi conduzido de acordo com as normas internacionais de cuidado animal. Esse estudo foi dividido em cinco períodos experimentais de análise: 1, 2, 3, 7 e 15 dias após a transecção do LCA e para cada período os animais foram aleatoriamente distribuídos em cinco grupos experimentais com cinco animais cada, sendo: LCA (cirurgia e transecção do LCA), LCAES (cirurgia e transecção do LCA e EENM), Sham (cirurgia sem a transecção do LCA), ShamES (cirurgia sem transecção do LCA e EENM), e Controle (sem intervenção).

### **Cirurgia Para A Transecção do LCA**

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de xilazina (12mg/kg) e ketamina (95mg/kg). Em condições anestésicas, a pata esquerda foi limpa e preparada utilizando-se solução de iodina. O animal foi colocado na posição supina, e então uma incisão central de 1 cm foi realizada sobre a face anterior do joelho esquerdo expondo o tendão patelar. A cavidade articular foi então exposta com a patela deslocada medialmente. O LCA foi então identificado com o joelho em flexão total e seccionado com uma tesoura cirúrgica

tipo oftálmica. Depois disso, o teste de gaveta anterior foi realizado para confirmar a transecção do LCA. A incisão peripatelar foi fechada com fio de sutura tipo Vycril 4-0 e a pele foi suturada com fio de nylon 5-0. Depois da cirurgia os animais foram realocados nas gaiolas, sendo adicionado Paracetamol (135mg/100mL) na água disponível para beber nas primeiras 24hs para prover analgesia. O procedimento cirúrgico foi modificado de Stoop et al. <sup>(50)</sup> no qual a patela foi deslocada lateralmente ao invés de medialmente deslocada.

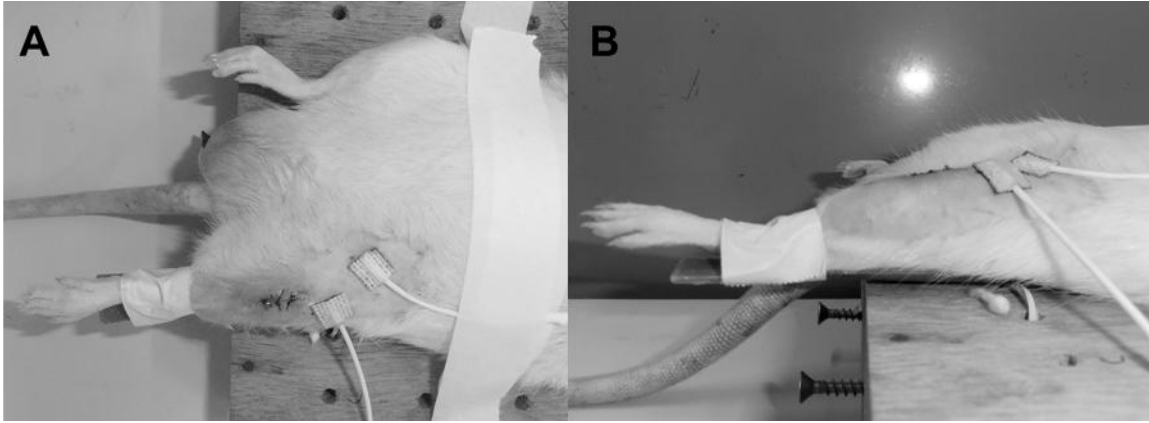
### **Parâmetros Da EENM**

A EENM foi realizada com os animais ainda sedados imediatamente após a cirurgia, e nos demais períodos os animais eram novamente sedados e então submetidos à sessão de EENM. Após tricotomia da região do quadríceps e inguinal a pele foi limpa e coberta com camada de gel condutor, dois eletrodos (quadrados e auto-adesivos, cada um com 1 cm<sup>2</sup>) foram colocados sob a pata posterior esquerda dos ratos um na região inguinal na eminência do nervo femoral e o outro eletrodo colocado sob a porção distal do quadríceps 1 cm acima da borda superior da patela. O joelho foi mantido em extensão total com o quadril em neutro, mantendo-se essa posição com fitas adesivas a fim de evitar qualquer movimento durante as contrações.

Sessões diárias de EENM, cada uma com 20 contrações do quadríceps, foram realizadas até o último dia do desenho experimental, sendo a primeira sessão logo após a cirurgia. Esse procedimento foi realizado nos grupos ShamES e LCAES.

A EENM foi realizada com o gerador de corrente Neurodin<sup>®</sup> (IBRAMED, Indústria Brasileira de Equipamentos Médicos, Brasil). Os parâmetros da EENM foram: pulso retangular bifásico simétrico, frequência carreadora de 2500Hz, modulada em 75 bursts por segundo, largura de

pulso de 400 $\mu$ s, 10s tempo *ON*, subida 2s, 50s tempo *OFF*. Os parâmetros utilizados foram baseados em protocolo clínico previamente descrito. <sup>(12)</sup>



**Figura 1:** Figura mostrando a localização dos eletrodos para o procedimento da EENM. A-Vista Anterior. B - Vista Lateral.

### **Coleta Das Amostras Musculares**

Depois dos períodos experimentais os animais foram pesados e anestesiados. Depois disso, os músculos Vasto lateral (VL), Reto Femoral (RF) e Vasto medial (VM) do quadríceps foram cuidadosamente isolados, removidos e pesados. A massa muscular de cada músculo (MM, g) foi então normalizada pela massa corporal (MC, g) para obter a relação  $MM/MC*100$ . Cada músculo foi dividido em duas partes a partir da região central no ventre muscular. A porção proximal foi congelada imediatamente em isopentano pré-congelado em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para serem utilizados na mensuração da AST das fibras. A porção distal foi rapidamente congelada em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para serem avaliados os níveis de RNAm e para a avaliação do western blot.

### **AST Das Fibras Musculares**

Cortes histológicos seriados foram obtidos da porção ventral dos músculos VM, VL e RF em micrótomo criostato (Microm HE 505, Jena, Germany). Um corte histológico (10 $\mu$ m) corado



com azul de toluidina foi escolhido para mensuração das fibras musculares via microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Germany) e software para análise morfológica (Axiovision 4.7.1.0, Carl Zeiss, Germany). A AST das fibras musculares de cada músculo foi obtida pela medida de cem fibras musculares localizadas na região central do corte histológico. Para cada músculo foi então obtido a relação entre AST das fibras de cada animal pela sua respectiva massa corporal ( $\mu\text{m}^2/\text{g}$ ).

### **Isolamento E Análise Do RNA**

Um fragmento congelado de cada músculo foi homogeneizado e o RNA total isolado utilizando o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA isolado foi dissolvido em Tris-HCL e ácido etileno-diaminotetracético (TE) pH 7.6 e quantificado espectrofotometricamente. A pureza foi investigada pela determinação da taxa de absorvância a 260nm sobre a 280nm. A integridade do RNA foi então confirmada pela inspeção em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (Invitrogen, Carlsbad, CA), por meio de luz ultravioleta.

### **Transcrição Reversa**

Para obter cDNA transcreveu-se reversamente 1  $\mu\text{g}$  de RNA em solução contendo, tampão de transcrição reversa 5x, uma mistura de dNTP (Promega, Madison, WI) contendo 0.2 mmol/L de dATP, dCTP, dGTP e 0.1 mol/L de dTTP, 1  $\mu\text{l}$  de oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 200U da enzima M-MLV RT (Promega, Madison, WI). A solução final foi então incubada a 70°C por 10 min, 42°C por 60 min e finalmente aquecidos a 95°C por 10 min.

### **Sequência Dos Primers**

As sequências específicas para ratos utilizadas foram: atrogina-1 (senso: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT; anti-senso: GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT), MuRF1 (senso: TGACCAAGGAAAACAGCCACCAG; anti-senso: TCACTCCTTCTTCTCGTCCAGGATGG), Miostatina (senso: CTACCACGGAAACAATCATTACCA; antisenso: AGCAACATTTGGGCTTTCCAT), GAPDH (senso: CCACCAACTGCTTAGCCC; anti-senso: GCCAAATTCGTTGTCATACC).

### **Reação Em Cadeia Da Polimerase Em Tempo Real (PCR-RT)**

Os níveis de transcrição para os músculos dos grupos experimentais e controle foram analisados simultaneamente e as reações conduzidas em duplicata no termociclador (Rotor Gene 3000, Cobertt Research, San Francisco, USA) utilizando-se o SYBR green (Applied Biosystems, Foster City, CA) como marcador de detecção de fluorescência e 180nM de cada primer num volume final de 50µL. As condições de ciclagem da temperatura para atrogina-1, MuRF-1, miostatina e GAPDH foram 10 min a 95°C e então 40 ciclos de 15s a 94°C, 30s a 56°C para atrogina-1, a 64°C para MuRF1, a 60°C para miostatina, e a 56°C para GAPDH, respectivamente, e 1 min a 72°C, seguido por 10 min a 72°C. Os dados foram analisados pelo método de comparação dos ciclos (Ct). A expressão do gene alvo foi normalizado pelo GAPDH. Controles negativos contendo RNA sem a enzima M-MLV transcriptase reversa garantiram que o produto da amplificação da PCR não foi resultado de uma amplificação de DNA genômico. Um ensaio branco com água ao invés de amostra, com primers e SYBR também foi realizado.

### **Western Blot**

A técnica de western blot foi realizada com anticorpo policlonal de coelho contra ubiquitina como o anticorpo primário (1:1000; Cat. No. A-100; Boston Biochem, Cambridge,

Massachusetts). O anticorpo secundário utilizado foi cabra anti-imunoglobulina de coelho conjugado com alcalina fosfatase (1:2000; Cat. No D048701; Dako).

As amostras foram homogeneizadas em tampão de extração (para 10mL de tampão de extração: 330µl de 100mM tampão de fosfato de potássio, 100µl de 10mM de HEPES, 10µl de 1mM DTT, 100µl de 5mM ácido etileno-diamino tetracético EDTA pH 8.0, 30µl de 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10% de Glicerol, 40µl de solução de SDS a 10% , 1% de coquetel inibidor de protease e água MiliQ suficiente para 10ml de solução. Os homogenatos foram centrifugados a 12,000 x g por 10min a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado. A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California) com albumina de soro bovino como padrão.

A proteína muscular (50µg) foi separada por eletroforese em gel 10% de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferida para uma membrana de nitrocellulose (0,45µm; BIO RAD Cat. No.162-0115). As membranas foram marcadas com solução de Ponceau para confirmar a transferência de proteínas e então lavadas com solução salina de Tris-Tween (TBST) (0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, e 0.1% Tween-20). As membranas foram incubadas sob baixa agitação por 12hs a 4°C com o anticorpo primário diluído em TBST com leite em pó desnatado a 0,1% (0,1% leite em pó desnatado, 0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5). Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas durante 30min em TBST, e então incubadas com o anticorpo secundário por 1 hora em temperatura ambiente e lavada novamente por 20 min com TBST e 10 min com tampão de detecção (1M Tris-HCL, 1M NaCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, pH9,5). As proteínas marcadas foram detectadas com solução NBT/BCIP (ROCHE Diagnostics Cat. No.11681451001). O espectro das bandas foi determinado pelo software Scion Image (Scion Corp., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) sendo que as membranas foram normalizadas pela sua marcação prévia com Ponceau.

## **Análise Estatística**

Os testes Shapiro-Wilk e Levene foram aplicados para avaliar respectivamente a normalidade e a homogeneidade dos resultados. Múltiplas comparações das médias foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey aplicado para comparar os valores das médias. Foram consideradas significantes as diferenças com valor de  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Níveis De RNAm De Atrogina-1**

Comparados ao controle, o grupo LCAES apresentou níveis elevados de RNAm de atrogina-1 em todos os músculos avaliados e na maioria dos períodos estudados (Figura 2 A,D,G). O músculo VM apresentou elevados níveis nos sete primeiros dias (1 dia: 9 vezes; 2 dias: 12 vezes; 3 dias: 3 vezes; 7 dias: 4,73 vezes, todos  $p < 0,01$ , Figura 2A), assim como o RF (1 dia: 6,2 vezes; 2 dias: 2,7 vezes; 3 dias: 8,6 vezes; 7 dias: 7,6 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2D). No VL os níveis foram aumentados nos sete primeiros dias (1 dia: 9,5 vezes; 2 dias: 7,5 vezes; 3 dias: 12 vezes; 7 dias: 7,3 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2G), e em 15 dias os níveis de RNAm estavam reduzidos em 85% ( $p < 0,001$ ; Figura 2G).

O grupo LCAES apresentou níveis alterados de RNAm de atrogina-1, comparado ao grupo LCA (Figura 2 A,D,G). O VM apresentou níveis reduzidos nos seguintes dias (1 dia: 1,42 vezes; 3 dias: 1,64 vezes; 15 dias: 1,64 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2A). No RF as reduções ocorreram em 2 dias (1,56 vezes;  $p < 0,01$ ) e em 3 dias (1,8 vezes;  $p < 0,01$ ), enquanto que em 7 dias um aumento de 1,37 vezes ( $p = 0,01$ ) nos níveis de RNAm da atrogina-1 foram observados (Figura 2 D). O VL apresentou redução na maioria dos períodos avaliados (1 dia: 1,26 vezes; 2 dias: 1,34 vezes; 3 dias: 2,7 vezes, todos  $p < 0,05$ ; Figura 2G).

Em relação ao controle, o grupo LCA apresentou aumento dos níveis de RNAm de atrogina-1 em todos os músculos avaliados e na maioria dos períodos avaliados (Figura 2: A, D, G). O músculo VM apresentou níveis aumentados em todos os períodos avaliados (1 dia: 13 vezes; 2 dias: 12 vezes; 3 dias: 5 vezes; 7 dias: 4 vezes; 15 dias: 1,63 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2A), assim como o RF (1 dia: 5,3 vezes; 2 dias: 4,3 vezes; 3 dias: 16 vezes; 7 dias: 5,5 vezes; 15 dias: 1,6 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2D). No músculo VL foram encontrados níveis aumentados na maioria dos períodos avaliados (1 dia: 12,1 vezes; 2 dias: 10,15 vezes; 3 dias: 33,45 vezes; 7 dias: 6,19 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2G).

O grupo LCA também apresentou maiores níveis de RNAm da atrogina-1 em relação ao grupo Sham (Figura 2 A,D,G) (VM: 1 dia: 1,4 vezes; 2 dias: 1,4 vezes; 3 dias: 1,8 vezes; 15 dias: 1,65 vezes, todos  $p < 0,05$ ; Figura 2A; RF: 1 dia: 1,4 vezes; 7 dias: 1,4 vezes, ambos  $p < 0,05$  Figura 2D; VL: 1 dia: 1,6 vezes; 2 dias: 2 vezes, 3 dias: 2 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2G).

O grupo Sham também apresentou aumento nos níveis de RNAm de atrogina-1 em todos os músculos avaliados comparados ao controle nos sete primeiros dias (Figura 2 A,D,G). (VM: 1 dia: 9 vezes; 2 dias: 9 vezes, 3 dias: 3 vezes; 7 dias , todos  $p < 0,01$ ; Figura 2A; RF: 1 dia: 3,7 vezes; 2 dias: 3,63 vezes; 3 dias: 13 vezes; 7 dias: 3,7 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2D; VL: 1 dia: 7,5 vezes; 2 dias: 5,16 vezes; 3 dias: 17 vezes; 7 dias: 5,18 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2G). No entanto, a EENM no grupo ShamES reduziu os níveis de RNAm de atrogina-1 comparados ao Sham. No VM ocorreu redução de 1,82 vezes no primeiro dia ( $p < 0,01$ , Figura 2A). No RF ocorreram reduções nos três primeiros dias (1 dia: 1,48 vezes; 2 dias: 2,11 vezes; 3 dias: 1,49 vezes, todos  $p < 0,05$ ; Figura 2D). No VL os níveis de RNAm foram reduzidos em 1,38 vezes no terceiro dia somente ( $p = 0,02$ ; Figura 2G)

O grupo ShamES apresentou níveis alterados de RNAm de atrogina-1 em relação ao controle (Figura 2A, D, G). O VM apresentou níveis aumentados nos três primeiros dias (1 dia: 4,9 vezes; 2 dias: 10,3 vezes; 3 dias: 2,8 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2A). No RF os níveis de RNAm aumentaram na maioria dos períodos avaliados (1 dia: 5 vezes; 3 dias: 7 vezes; 7 dias: 2,86 vezes, todos  $p < 0,05$ ; Figura 2D). O músculo VL apresentou níveis aumentados nos primeiros sete dias (1 dia: 6,86 vezes; 2 dias: 3,6 vezes; 3 dias: 9,8 vezes; 7 dias: 3,8 vezes, todos  $p < 0,05$ ; Figura 2G), e 80% de redução em 15 dias ( $p < 0,001$ ; Figura 2G).

### **Níveis De RNAm De MuRF-1.**

Os níveis de RNAm de MuRF-1 no grupo LCAES aumentaram nos primeiros sete dias no VM, e no VL e RF na maioria dos períodos avaliados comparados ao controle (Figura 2 B, E, H). (Figura 2; VM: 1 dia: 6,16 vezes; 2 dias: 7,7 vezes; 3 dias: 3,8 vezes; 7 dias: 2 vezes, todos  $p < 0,05$ , Figura 2B; RF: 1 dia: 3,2 vezes; 2 dias: 1,8 vezes; 3 dias: 2,2 vezes; 7 dias: 2,4 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2E; VL: 1 dia: 4,2 vezes; 2 dias: 7 vezes; 3 dias: 11,5 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2H)

A EENM aplicada ao grupo LCAES reduziu os níveis de RNAm de MuRF-1 comparados ao LCA em todos os músculos avaliados (Figura 2 B, E, H). (VM: 1 dia: 1,78 vezes; 3 dias: 1,6 vezes; 7 dias: 1,61 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2B; RF: 2 dias: 1,64 vezes; 3 dias: 2,27 vezes, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 2E ; VL: 1 dia: 2,8 vezes; 3 dias: 2,8 vezes, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 2H).

Os níveis de RNAm de MuRF-1 foram elevados em todos os músculos avaliados na maioria dos períodos no grupo LCA comparado ao controle (Figura 2 B, E, H). (VM: 1 dia: 11 vezes; 2 dias: 7,2 vezes; 3 dias: 6,4 vezes; 7 dias: 3,2 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2B; RF: 1 dia: 2,5 vezes; 2

dias: 3 vezes; 3 dias: 5,1 vezes; 7 dias: 2,7 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2E ; VL: 1 dia: 12 vezes; 2 dias: 7 vezes; 3 dias: 33 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2H)

Observou-se também maiores níveis de RNAm de MuRF-1 no grupo LCA em comparação ao Sham em todos os músculos avaliados (Figura 2 B, E, H). (VM: 1 dia: 2 vezes, 3 dias: 2,5 vezes, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 2B ; RF: 1 dia: 2 vezes, 3 dias: 1,8 vezes, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 2E; VL: 1 dia: 1,6 vezes; 2 dias: 1,6 vezes; 3 dias: 1,5 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2H).

O grupo ShamES apresentou níveis aumentados de RNAm de MuRF-1 em relação ao controle em todos os músculos avaliados (Figura 2 B, E, H). (VM: 1 dia: 3 vezes, 2 dias: 6 vezes; 3 dias: 2,6 vezes; 7 dias: 1,83 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2B; RF: 1 dia: 2,6 vezes; 2 dias, 1,81 vezes, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 2E; VL: 1 dia: 7 vezes; 2 dias: 5 vezes; 3 dias: 6,3 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2H) Apresentando ainda níveis alterados de RNAm em comparação com Sham, minimizados em 1,8 vezes no VM no primeiro dia ( $p = 0,01$ ; Figura 2B), e no RF em 3 e 7 dias (respectivamente 2,5 vezes,  $p < 0,001$  e 2,2 vezes,  $p < 0,01$ ; Figura 2E) e também no VL no terceiro dia (3,5 vezes,  $p < 0,001$ ; Figura 2H). Os níveis de RNAm de MuRF-1 aumentaram no ShamES comparado ao Sham apenas no RF no primeiro dia (2 vezes,  $p < 0,05$ ; Figura 2E).

Um aumento dos níveis de RNAm de MuRF-1 foram encontrados no Sham comparado ao controle (Figura 2 B, E, H). (VM: 1 dia: 5,6 vezes; 2 dias: 6 vezes; 3 dias: 2,5 vezes; 7 dias: 2,6 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2B; RF: 2 dias: 2.3 vezes, 3 dias: 2,8 vezes; 7 dias: 2,2 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2E; VL: 1 dia: 7,5 vezes; 2 dias: 4,3 vezes; 3 dias: 22 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2H).

### **Níveis De RNAm De Miostatina**

O grupo LCAES apresentou aumento nos níveis de RNAm da miostatina em relação ao controle em todos os músculos avaliados durante os primeiros sete dias (Figura 2, C, F, I). O VM apresentou níveis aumentados em 3 e 7 dias (3 dias 3,6 vezes; 7 dias: 2,3 vezes, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 2C), e em 15 dias seus níveis estavam 50% abaixo dos valores basais ( $p < 0,001$ , Figura 2C). O RF apresentou níveis aumentados nos primeiros 7 dias (1 dia: 1,6 vezes; 2 dias: 4,2 vezes; 3 dias: 2,8 vezes; 7 dias: 5,3 vezes, todos  $p < 0,05$ , Figura 2F). No VL os níveis de RNAm de miostatina aumentaram em 2, 3 e 7 dias (2 dias: 5 vezes; 3 dias: 1,7 vezes; 7 dias: 2,7 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2I).

A EENM aplicada ao grupo LCAES reduziu os níveis de RNAm de miostatina comparado ao LCA (Figura 2 C, F, I). (VM: 1 dia: 1,9 vezes; 2 dias: 2,4 vezes; 3 dias: 1,6 vezes; 7 dias: 1,77 vezes, todos  $p < 0,01$ , Figura 2C; RF: 1 dia: 1,7 vezes; 2 dias: 1,38 vezes; 3 dias: 1,7 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2F; VL: 7 dias: 1,79 vezes; Figura 2I).

Os níveis de RNAm da miostatina foram também aumentadas no grupo LCA comparado ao grupo controle em todos os músculos avaliados (Figura 2, C, F, I). (VM: 1 dia: 3 vezes, 2 dias: 2,6 vezes; 3 dias: 6,4 vezes; 7 dias: 4 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2C; RF: 1 dia: 2,7 vezes; 2 dias: 6 vezes; 3 dias: 4,7 vezes; 7 dias: 5,2 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2F; VL: 2 dias: 4 vezes; 3 dias: 2 vezes; 7 dias: 5 vezes, todos  $p < 0,01$ , Figura 2I). Em 15 dias os níveis de RNAm da miostatina estavam 70% abaixo dos valores basais no VM ( $p < 0,001$ ; Figura 2C).

O grupo ShamES também apresentou níveis de RNAm da miostatina aumentados comparado ao grupo controle (Figura 2, C, F, I). (VM: 3 dias: 2,6 vezes; 7 dias: 2 vezes, tanto  $p < 0,05$ ; Figura 2C; RF: 2 dias: 3,6 vezes; 3 dias: 2,3 vezes; 7 dias: 4,5 vezes, todos os  $p < 0,01$ ; Figura 2F; VL: 2

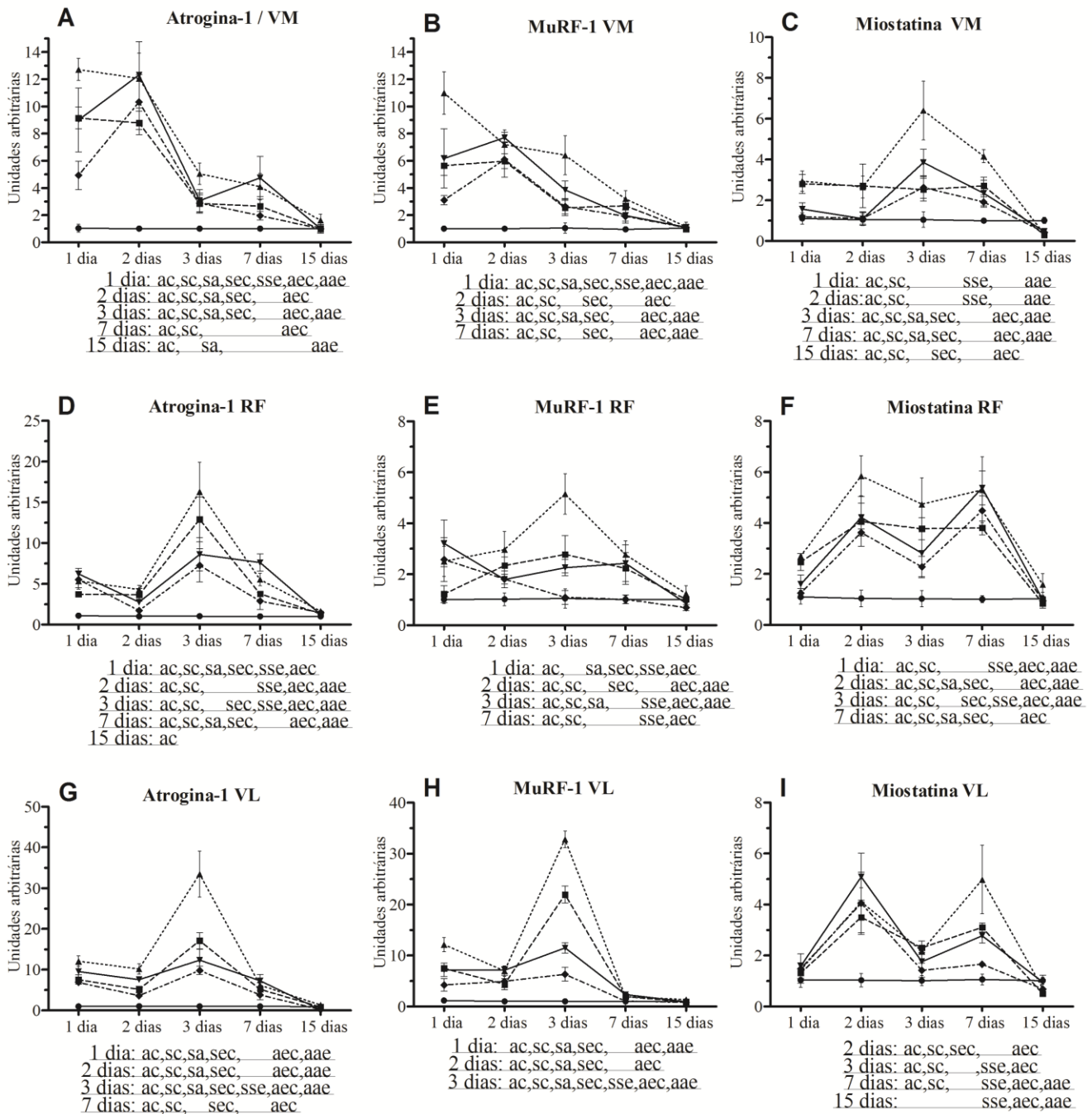


dias: 4 vezes,  $p < 0,001$ ; Figura 2I). Em 15 dias os níveis de RNAm da miostatina estavam 60% abaixo dos valores basais no VM ( $p < 0,001$ ; Figura 2C).

A EENM no grupo ShamES reduziu os níveis de RNAm da miostatina em comparação ao Sham (Figura 2, C, F, I). (VM: 1 dia: 2,35 vezes; 2 dias: 2,4 vezes, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 2C; RF: 1 dia: 2 vezes, 3 dias: 1,66 vezes, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 2F; VL: 3 dias: 1,73 vezes; 15 dias: 4.4 vezes, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 2I).

O grupo Sham apresentou elevação nos níveis de RNAm da miostatina em todos os músculos na maioria dos períodos avaliados comparado ao controle (Figura 2, C, F, I). O VM teve aumento dos níveis de RNAm da miostatina nos primeiros 7 dias (1 dia: 2,8 vezes; 2 dias: 2,7 vezes; 3 dias: 2,5 vezes; 7 dias: 2,7 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2C), porém em 15 dias estava 70% ( $p < 0,001$ ) abaixo dos valores normais. O RF teve aumento dos níveis de RNAm da miostatina nos primeiros 7 dias (1 dia: 2,5 vezes; 2 dias: 4 vezes; 3 dias: 3,8 vezes; 7 dias: 3,8 vezes, todos  $p < 0,01$ ; Figura 2F). No VL os aumentos ocorreram do segundo até o sétimo dia (2 dias: 3,5 vezes; 3 dias: 2,3 vezes; 7 dias: 3 vezes, todos  $p < 0,05$ ; Figura 2I).

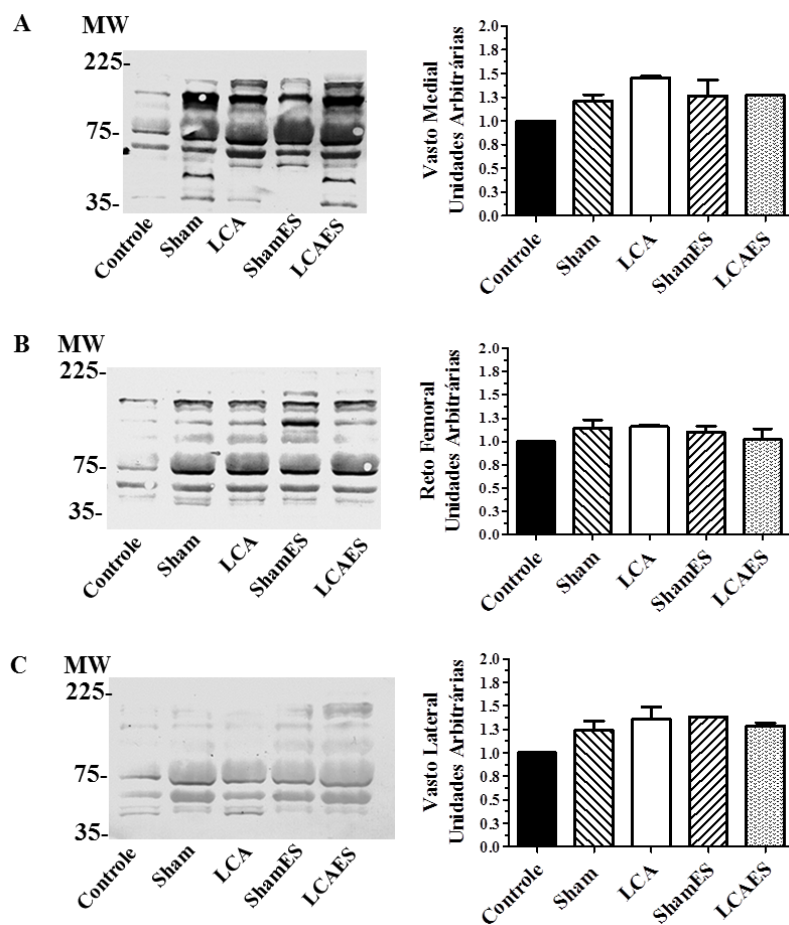
→ LCAES   \* LCA   ♦ ShamES   ■ Sham   ● Controle



**Figura 2** Níveis de RNAm de atrogin-1 nos músculos Vasto Medial (VM; A), Reto Femoral (RF; D) e Vasto Lateral (VL; G). Níveis de RNAm de MuRF-1 nos músculos VM (B), RF (E) e VL (H). Níveis de RNAm da miostatina nos músculos VM (C), RF (F) e VL (I). Os dados são expressos como média ± desvio padrão. aec= p<0,05: LCAES comparado ao controle; sec= p<0,05: ShamES comparado ao controle; sse= p<0,05: Sham comparado ao ShamES; aae= p<0,05: LCA comparado com LCAES; ac= p<0,05: LCA em relação ao grupo controle; sc= p<0,05: Sham comparado ao controle; sa= p<0,05 : Sham comparação com LCA.

## Proteínas Ubiquitinadas

Afim de avaliar o rápido aumento e os níveis mais altos de expressão gênica das ubiquitinas ligases, que ocorreram principalmente nos três primeiros dias em todos os grupos, foram avaliados os níveis de acumulação de proteínas ubiquitinadas no terceiro dia. Assim, em relação ao controle observou-se o acúmulo de proteínas ubiquitinadas em todos os músculos de todos os grupos avaliados (Figura 3).



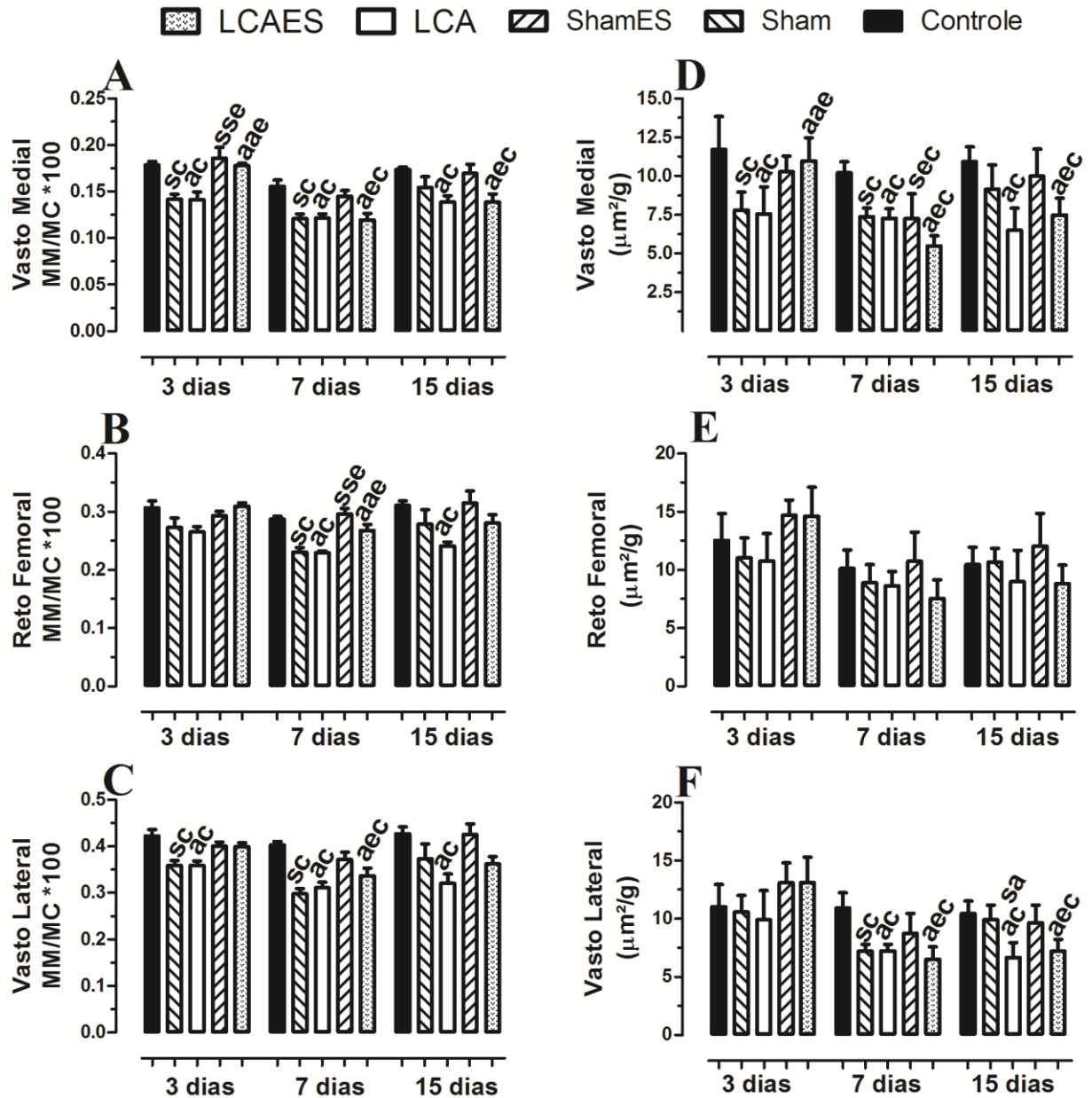
**Figura 3:** Membranas de Western Blot mostrando a quantidade de proteínas conjugadas com ubiquitina em 3 dias com as respectivas avaliações da densidade óptica das membranas (unidades arbitrárias) do Vasto Medial (A), Reto Femoral (B) e Vasto Lateral (C). MW: peso molecular.

## **Massa Muscular**

A EENM aplicada no grupo LCAES impediu a perda de massa muscular em relação ao controle em 3 dias no VM e VL, em 7 dias no RF, e em 15 dias no RF e VL (Figura 4). No entanto, reduções da massa muscular ainda ocorreram no VM (7 dias: 23%,  $p<0,01$ ; 15 dias: 20%,  $p=0,01$ ; Figura 4 A) e no VL (7 dias: 16,5%,  $p=0,01$ ; Figura 4 C).

O grupo LCA apresentou redução da massa muscular em todos os músculos avaliados em relação ao controle apresentando as seguintes reduções: no VM (3 dias: 21%; 7 dias: 22%; 15 dias: 19%, todos  $p<0,01$ ; Figura 4A), no RF (7 dias: 20%; 15 dias: 22%, ambos  $p<0,05$ ; Figura 4B) e no VL (3 dias: 15%; 7 dias: 23%; 15 dias: 25%, todos  $p<0,05$ ; Figura 4C).

O grupo Sham apresentou as seguintes reduções de massa muscular: VM (3 dias: 21%; 7 dias: 21%, ambos  $p<0,01$ ; Figura 4A), RF (7 dias: 20%,  $p<0,001$ , Figura 4B) e VL muscular (3 dias: 15%; 7 dias: 26%, ambos  $p<0,01$ ; Figura 4C). A EENM aplicada ao grupo ShamES impediu a perda de massa muscular em todos os músculos e períodos avaliados.



**Figura 4:** Relação massa muscular/massa corporal (MM/MC) e a relação AST/massa corporal ( $\mu\text{m}^2/\text{g}$ ) dos músculos Vasto Medial (A, D), Reto Femoral (B, E) e Vasto Lateral (C, F) do músculo quadríceps de ratos. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. aec=  $p < 0,05$ : LCAES comparado ao controle; sec=  $p < 0,05$ : ShamES comparado ao controle; sse=  $p < 0,05$ : Sham comparado ao ShamES; aae=  $p < 0,05$ : LCA comparado com LCAES; ac=  $p < 0,05$ : LCA em relação ao grupo controle; sc=  $p < 0,05$ : Sham comparado ao controle; sa=  $p < 0,05$ : Sham comparado com LCA.

## **Ast Das Fibras Musculares**

A EENM impediu a redução precoce da AST das fibras musculares no grupo LCAE no VM em três dias, observando-se ainda as seguintes reduções em relação ao controle: (VM: 7 dias, 46%; 15 dias, 36%, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 4D; VL: 7 dias: 40%; 15 dias: 35% ambos  $p < 0,01$ ; Figura 4F).

No grupo LCA, o músculo VM apresentou a primeira redução na AST em 3 dias e no músculo VL em 7 dias (VM: 3 dias: 35%; 7 dias: 29%; 15 dias: 40%, todos  $p < 0,01$ , Figura 4D; VL: 7 dias: 31%; 15 dias: 34%, ambos  $p < 0,01$ ; Figura 4F).

No grupo Sham as reduções na AST foram encontradas em 3 e 7 dias no músculo VM, e no músculo VL apenas em 7 dias, comparados com o controle (músculo VM: 3 dias: 33%; 7 dias: 26%, ambos  $p < 0,01$ , Figura 4D; VL: 7 dias: 32%,  $p = 0,003$ , Figura 4F). A EENM aplicada ao grupo ShamES impediu a redução da AST no VL, enquanto que no VM foi impedida apenas em 3 dias, mostrando as seguintes reduções em relação ao controle. (VM: 7 dias: 29%,  $p = 0,01$ ; Figura 4D).

## **Discussão**

Os resultados deste estudo fornecem novas informações sobre os efeitos da EENM nas vias moleculares envolvidas na atrofia do quadríceps após a transecção do LCA em modelo animal. A EENM favoreceu a redução e inibição dos níveis aumentados de RNAm de atrogina-1, MuRF-1 e miostatina, assim como inibiu a redução precoce da massa muscular do quadríceps e AST das fibras musculares, de acordo com nossa hipótese. Além disso, resultados semelhantes também foram encontrados no grupo ShamES, onde os aumentos dos genes avaliados foram impedidos ou minimizados no quadríceps. Destacamos ainda, que o procedimento cirúrgico realizado na

articulação do joelho é suficiente para desencadear o aumento dos níveis de RNAm destes genes e induzir as adaptações atróficas nos músculos do quadríceps. Além disso, diferentemente do grupo LCA e LCAES, o grupo Sham e ShamES recuperaram a massa muscular e AST das fibras musculares 15 dias pós-cirurgia em todos os músculos avaliados, mostrando que a transecção do LCA é um fator restritivo para a restauração da massa muscular nos períodos avaliados, mesmo após um protocolo de EENM.

Foi demonstrado que todos os procedimentos cirúrgicos desencadearam aumentos nos níveis de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1 em todos os músculos avaliados, porém o grupo LCA mostrou níveis maiores, o que pode ser devido ao próprio ligamento lesionado. Nesse sentido, a inflamação articular que ocorre após lesões no joelho ou doenças (osteoartrite e lesões de menisco, e artroscopia) está provavelmente relacionada com os resultados observados nesta fase aguda após os procedimentos cirúrgicos. <sup>(2,17,23,24)</sup>

Tem sido demonstrado que durante a fase inflamatória aguda após a ruptura do LCA ocorre o aumento nos níveis de citocinas inflamatórias, como a interleucina-6 e o Fator De Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) em líquido sinovial de pacientes e ratos, assim como no músculo quadríceps de ratos após a injeção de soro fisiológico no joelho. <sup>(14,24,51)</sup> Dessa maneira, os aumentos nos níveis de RNAm de atrogina-1 e MuRF-1 observados no presente estudo podem ser resultado da exposição à citocinas inflamatórias da articulação lesionada, uma vez que tem sido demonstrado que o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão da atrogina-1 através de componentes da via de Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK), como a p38 MAPK. <sup>(21,32)</sup> Da mesma forma, a TNF- $\alpha$  e outras citocinas inflamatórias como o fator nuclear  $\kappa\beta$ , aumentam a transcrição de fatores que modulam diretamente a expressão de MuRF-1 no músculo esquelético. <sup>(29)</sup> Recentemente, Ramirez e colaboradores demonstraram níveis aumentados de RNAm de TNF- $\alpha$ ,

MuRF-1 e atrogina-1 no músculo tibial anterior de ratos submetidos à inflamação do tornozelo.<sup>(42)</sup>

A EENM tem sido utilizada na tentativa de minimizar ou prevenir a atrofia muscular em muitas condições, como no músculo desnervado, em sujeitos pós lesão medular e na atrofia do quadríceps após a ruptura do LCA.<sup>(5, 33,47)</sup> Poucos estudos demonstraram os efeitos da EENM no retardo da atrofia muscular. Em um modelo de rato desnervado, 200 contrações por dia com um intervalo de 8 horas entre cada sessão de estímulo foi capaz de deter a atrofia das fibras musculares<sup>(9, 10)</sup> e as alterações moleculares<sup>(28)</sup> no músculo extensor longo dos dedos (EDL) de ratos. Estes estudos têm utilizado eletrodos implantados, ao invés de eletrodos de superfície, que são os recomendados em protocolos clínicos de EENM. Assim, este protocolo não foi testado em ensaios clínicos, devido a limitação de usar eletrodos implantados.

Apesar da EENM diária no grupo LCAES ter-se iniciado logo após os procedimentos cirúrgicos e ter sido realizada no decorrer dos períodos avaliados, o estímulo precoce não impediu o aumento dos níveis de RNAm da atrogina-1 e MuRF-1 na primeira semana, mas ajudou a minimizá-los em todos os músculos avaliados. Estudos avaliando a EENM e expressão de atrogenes, mostraram que seus níveis podem ser minimizados ou mesmo aumentados em resposta a periodicidade do estímulo (diária ou dias alternados) no músculo desnervado de ratos, ou minimizados como observado em ratos com lesão medular ou em suspensão de membro posterior com o uso de eletrodos implantados.<sup>(18,26,33)</sup> Russo et al. usando eletrodo de superfície, similar ao nosso, demonstraram níveis mais baixos de atrogina-1 após EENM no músculo de ratos desnervados.<sup>(45)</sup> Assim, a modulação dos atrogenes por EENM dependerá de diversos fatores, incluindo os parâmetros (número de sessões, frequência, amplitude de pulso, intensidade) e da maneira que é fornecido (eletrodos implantados ou de superfície).



Esperava-se que a EENM no grupo ShamES inibiria o aumento nos níveis de RNAm dos atrogenes observado no grupo Sham nos primeiros dias após a cirurgia, mas como no grupo LCAES o estímulo apenas minimizou os níveis de RNAm. Assim, acreditamos que a contração estimulada pela EENM sozinha não foi suficiente para inibir estes aumentos, possivelmente devido a IMA observada após lesões e distensão da cápsula articular, inibindo a ativação total do quadríceps. <sup>(23)</sup> Por outro lado, os estudos de aplicação de EENM após ruptura do LCA associam contrações voluntárias a esse estímulo, o que favorece um maior recrutamento de unidades motoras, e que recentemente mostrou-se positivo para minimizar a atrofia do quadríceps em indivíduos após a reconstrução do LCA. <sup>(19)</sup> Assim, uma das principais limitações deste estudo foi a inviabilidade de associar a contração muscular voluntária com a EENM em ratos.

Afim de avaliar os efeitos do rápido aumento na expressão dos atrogenes, foi avaliado o nível de proteínas ubiquitinadas em todos os músculos no terceiro dia pós cirurgia, e como seria de esperar um acúmulo de proteínas ubiquitinadas ocorreu nos grupos LCA e Sham em todos os músculos avaliados. No entanto, os níveis de proteínas ubiquitinadas mantiveram-se elevados, apesar da atenuação dos níveis de RNAm dos atrogenes em alguns períodos até 3 dias em todos os músculos avaliados dos grupos submetidos à EENM, e curiosamente neste período, a perda de massa muscular foi impedida em todos os músculos assim como a redução na AST no VM. Assim, sabe-se que o acúmulo de proteínas ubiquitinadas também pode resultar de reduções na rápida proteólise em decorrência da inibição do proteassoma como observado em diferentes modelos de atrofia. <sup>(20,53)</sup> Assim, supomos que o acúmulo de proteína ubiquitinadas nos grupos submetidos à EENM pode ter-se dado pelos níveis aumentados de atrogenes associado às menores taxas de proteólise, retardando neste período, a perda de massa muscular no VM e VL.

O efeito positivo da contração muscular durante as fases iniciais de atrofia têm sido mais relacionados com a manutenção da síntese de proteínas durante as fases iniciais do que com a redução na degradação, que se torna mais prevalente nos tempos seguintes.<sup>(11)</sup> Assim, foi demonstrado que as taxas de proteólise muscular e as atividades proteolíticas do proteossoma 20S permanecem praticamente inalterada após uma forma aguda de exercícios de alta resistência, apesar de aumentadas os índices de conjugação aguda de ubiquitina pós-exercício, sugerindo que este pode ser um importante mecanismo envolvido na resposta remodeladora do músculo para o exercício de alta resistência.<sup>(38)</sup>

O exercício como modalidade terapêutica pode atenuar a perda de massa muscular, mesmo na presença de níveis mais elevados de proteína ubiquitina ligases e proteínas ubiquitinadas como demonstrado por Dupont-Versteegden et al. em modelo animal de suspensão de membro.<sup>(11)</sup> Além disso, a perda de massa muscular pode ser evitada durante níveis aumentados de RNAm de atrogina-1 com a diminuição dos níveis de RNAm da miostatina, que poderia suprimir o processo catabólico através do estímulo da via anabólica.<sup>(1)</sup>

Com relação a miostatina, observou-se a alteração nos níveis de RNAm em todos os músculos avaliados e na maioria dos períodos avaliados. Os principais achados foram que a EENM foi capaz de inibir os níveis de RNAm da miostatina nos 2 primeiros dias no VM para ambos os grupos LCAES e ShamES, neste último grupo a inibição ocorreu também no VL em 3 e 7 dias e no RF no primeiro dia. Nos grupos LCA e Sham percebeu-se que os níveis mais elevados do RNAm da miostatina ocorreram quando a os níveis de RNAm da atrogina-1 e MuRF-1 estavam baixos ou diminuindo, especialmente no VL. Quando a inibição do RNAm da miostatina não foi alcançado pela EENM, notou-se ao menos uma minimização em seus níveis. Assim, acreditamos que a resposta da miostatina a EENM também pode ter influenciado a manutenção da massa

muscular de VM e VL em 3 dias e RF em 7 dias. No entanto, mais estudos avaliando as vias de hipertrofia no músculo quadríceps após a transecção do LCA são necessárias para verificar essa hipótese.

Todavia, foi demonstrado que a miostatina inibe a fosforilação da proteína quinase AKT, também conhecido como PKB, induzindo proteólise através de níveis aumentados de atrogina-1 via FoxO1 dependente.<sup>(36)</sup> Além disso, a inibição da AKT pela miostatina compromete a via hipertrófica Akt/mTOR/p70S6K.<sup>(54)</sup> Assim, supomos que a miostatina poderia ter um papel fundamental após a transecção do LCA, sinalizando para a degradação de proteínas através das proteínas alvo da FOXO-1 (ou seja, atrogina-1 e MuRF-1) e prejudicando a síntese de proteínas através da inibição da via Akt/mTOR/p70S6K.

Embora os níveis aumentados de atrogina-1, MuRF-1 e miostatina tenham ocorrido desde o primeiro dia a todos os músculos avaliados nos grupos LCA e Sham, a redução da massa muscular e AST foi notada pela primeira vez aos 3 e 7 dias respectivamente para o VM e VL, com a redução da massa no RF a partir de 7 dias. O mesmo padrão ocorreu para os grupos em que a EENM foi aplicada, cuja reduções na AST foram observadas pela primeira vez em 7 dias no VM e VL do grupo LCAES, e em 7 dias para o VM do grupo ShamES. Este aumento repentino na expressão dos atrogenes seguida de alterações posteriores da massa muscular e AST foram semelhantes aos observados por Sacheck et al.<sup>(46)</sup> em diferentes modelos de atrofia, e a outros estudos relacionados a atrofia muscular e expressão atrogenes.<sup>(4,6)</sup>

Diferentemente dos grupos Sham e ShamES, os animais dos grupo LCA e LCAES não recuperaram a massa muscular e AST das fibras em todos os músculos em 15 dias. Isso também poderia estar relacionado com a ativação reduzida dos motoneurônios gama após ruptura do

LCA, o que resulta em atenuação da aferentes Ia, que pode causar um desuso prolongado de fibras rápidas inervados pelo motoneurônios de alto limiar como também limitar a ativação total do músculo. <sup>(27)</sup> Além disso, os aumentos anteriores nos níveis de atrogina-1 e MuRF-1 no VL, VM e RF dos grupos LCAES e LCA, assim como os níveis aumentados de atrogina-1 no RF e VM em 15 dias no grupo LCA podem ter influenciado a ausência de recuperação da massa muscular do quadríceps.

O RF é o único músculo bi-articular do quadríceps, atuando também como flexor do quadril. Esta dupla função pode ter causado um maior nível de atividade muscular do que nos músculos VL e VM, impedindo (apesar de os níveis mais elevados atrogenes) a redução na AST e a perda de massa muscular, que foi observada somente no dia 7. Além disso, a EENM foi eficaz em preservar a massa muscular do RF. Nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores mostrando que o VM e VL são os primeiros afetados em todo o quadríceps após a lesão do LCA. <sup>(15, 34)</sup> Além disso, Okuyama et al. <sup>(40)</sup> demonstraram níveis aumentados de HSP72 apenas nos músculos VM e VL de ratos após transecção do LCA. Nesse mesmo estudo, a ausência de aumento nos níveis da HSP72 no músculo RF também foi atribuída à sua função bi-articular.

Destaca-se que em 15 dias as porcentagens de redução da massa muscular e AST das fibras musculares nos músculos VM e VL do grupo LCA mantiveram-se próximo aos encontrados em 3 e 7 dias nos respectivamente músculos VM e VL. Além disso, a EENM em nenhum período avaliado provocou uma maior redução da massa muscular e AST nos grupos LCAES e ShamES. Estes resultados indicam que a redução da massa muscular ocorreu na primeira semana e foi mantido nos dias seguintes, apesar da intervenção com EENM. Assim, podemos presumir, com base em nossos resultados, que o possível problema na recuperação da massa e AST do quadríceps nas primeiras duas semanas após a transecção do LCA pode estar também

relacionado a uma deficiente síntese de proteínas associados a manutenção e aumentos prévios dos atrogenes. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a recuperação da massa muscular, pode ocorrer enquanto as taxas de degradação protéica ainda estão elevadas, como observado em ratos sépticos. <sup>(37)</sup>

Esse estudo fornece novas informações sobre os efeitos da EENM na modulação dos mecanismos moleculares envolvidos na atrofia muscular do quadríceps após a transecção do LCA. Esse conhecimento pode ajudar a melhorar as intervenções utilizadas na reabilitação com o objetivo de minimizar a perda de massa muscular após a do LCA e após cirurgia no joelho.

## **REFERÊNCIAS**

1. Adams GR, Haddad F, Bodell PW, Tran PD, Baldwin KM. Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. *J Appl Physiol*. 2007 Nov;103(5):1644-54. Epub 2007 Sep 13.
2. Akima H, Furukawa T: Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial menisectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005;13:632-7.
3. Arangio GA, Chen C, Kalady M, Reed JF 3rd. Thigh muscle size and strength after anterior cruciate ligament reconstruction and rehabilitation. *J Orthop Sports Phys Ther*. 1997 Nov;26(5):238-43.
4. Bajotto G, Sato Y, Kitaura Y, Shimomura Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles *Eur J Appl Physiol*. 2011 Jan 11.

5. Baldi JC, Jackson RD, Moraille R, Mysiw WJ. Muscle atrophy is prevented in patients with acute spinal cord injury using functional electrical stimulation. *Spinal Cord* 1998;36:463–469.
6. Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, Curi R, Miyabara EH, Moriscot AS. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle Nerve*. 2010 Jun;41(6):800-8.
7. Barker T, Leonard SW, Hansen J, Trawick RH, Ingram R, Burdett G, Lebold KM, Walker JA, Traber MG. Vitamin E and C supplementation does not ameliorate muscle dysfunction after anterior cruciate ligament surgery. *Free Radic Biol Med*. 2009 Dec 1;47(11):1611-8.
8. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol*. 1999 Aug; 277(2 Pt 2):R601-6.
9. Dow DE, Cederna PS, Hassett CA et al (2004) Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 30:77-86.
10. Dow DE, Faulkner JA, Dennis RG (2005) Distribution of rest periods between electrically generated contractions in denervated muscles of rats. *Artif Organs* 29:432-435.
11. 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*. 2006 Jul;101(1):202-12.

12. Fitzgerald GK, Piva SR, Irrgang JJ. A modified neuromuscular electrical stimulation protocol for quadriceps strength training following anterior cruciate ligament reconstruction. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2003; 33: 492-501.
13. Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2000 Aug;89(2):823-39.
14. Galbán CJ, Ling SM, Galbán CJ, Taub DD, Gurkan I, Fishbein KW, Spencer RG. Effects of knee injection on skeletal muscle metabolism and contractile force in rats. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 May; 15(5):550-8.
15. Gerber C, Hoppeler H, Claassen H, Robotti G, Zehnder R, Jakob RP. The lower extremity musculature in chronic symptomatic instability of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am.* 1985;67:1034–1043.
16. Gerber JP, Marcus RL, Dibble LE, Greis PE, Burks RT, LaStayo PC. Effects of early progressive eccentric exercise on muscle structure after anterior cruciate ligament reconstruction. *J Bone Joint Surg Am.* 2007 Mar;89(3):559-70.
17. Gür H and Çakin N: Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:1534-41
18. 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.* 2006 Feb;100(2):433-41. Epub 2005 Oct 20.

19. Hasegawa S, Kobayashi M, Arai R, Tamaki A, Nakamura T, Moritani T. Effect of early implementation of electrical muscle stimulation to prevent muscle atrophy and weakness in patients after anterior cruciate ligament reconstruction. *J Electromyogr Kinesiol*. 2011 Feb 17.
20. Hobler SC, Tiao G, Fischer JE, Monaco J, Hasselgren PO. Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific proteasome inhibitors. *Am J Physiol*. 1998 Jan;274(1 Pt 2):R30-7.
21. Hong Li & Shweta Malhotra & Ashok Kumar. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy *J Mol Med* 2008;86:1113–1126.
22. Hopkins JT, Ingersoll CD, Krause BA, Edwards JE, Cordova ML. Effect of knee joint effusion on quadriceps and soleus motoneuron pool excitability. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Jan;33(1):123-6.
23. Hurley MV: The effects of joint damage on muscle function, proprioception and rehabilitation. *Man Ther* 1997;2:11-7.
24. Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee*. 2003 Mar;10(1):93-6.
25. Kim KM, Croy T, Hertel J, Saliba S. Effects of neuromuscular electrical stimulation after anterior cruciate ligament reconstruction on quadriceps strength, function, and patient-oriented outcomes: a systematic review. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2010 Jul;40(7):383-91.



26. Kim SJ, Roy RR, Kim JA, Zhong H, Haddad F, Baldwin KM, Edgerton VR. Gene expression during inactivity-induced muscle atrophy: effects of brief bouts of a forceful contraction countermeasure. *J Appl Physiol*. 2008 Oct;105(4):1246-54. Epub 2008 Jul
27. Konishi Y, Fukubayashi T, Takeshita D. Mechanism of quadriceps femoris muscle weakness in patients with anterior cruciate ligament reconstruction. *Scand J Med Sci Sports*. 2002 Dec;12(6):371-5.
28. Kostrominova TY, Dow DE, Dennis RG et al (2005) Comparison of gene expression of 2-mo denervated, 2-mo stimulated-denervated, and control rat skeletal muscles. *Physiol Genomics* 22:227-243.
29. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med*. 2004 Jul;82(7):434-48.
30. Lake DA. Neuromuscular electrical stimulation. An overview and its application in the treatment of sports injuries. *Sports Med*. 1992 May;13(5):320-36.
31. Lalani R, Bhasin S, Byhower F, Tarnuzzer R, Grant M, Shen R, Asa S, Ezzat S, Gonzalez-Cadavid NF. Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J Endocrinol*. 2000 Dec;167(3):417-28
32. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*. 2005 Mar;19(3):362-70.

33. Lima SC, Caierão QM, Peviani SM, Russo TL, Somazz MC, Salvini TF, Teodori RM, Minamoto VB. Muscle and nerve responses after different intervals of electrical stimulation sessions on denervated rat muscle. *Am J Phys Med Rehabil.* 2009 Feb;88(2):126-35.
34. Lorentzon R, Elmqvist LG, Sjöström M, Fagerlund M, Fuglmeyer AR. Thigh musculature in relation to chronic anterior cruciate ligament tear: muscle size, morphology, and mechanical output before reconstruction. *Am J Sports Med.* 1989 May-Jun;17(3):423-9.
35. McCarthy JJ, Esser KA. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010 May;13(3):230-5
36. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2006;209:501–514.
37. Minnaard R, Wagenmakers AJ, Combaret L, Attaix D, Drost MR, van Kranenburg GP, Schaart G, Hesselink MK. Ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic activity remains elevated after zymosan-induced sepsis in rats while muscle mass recovers. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Oct;37(10):2217-25.
38. Minnaard R. The acute effect of high-resistance exercise on rat muscle protein breakdown and ubiquitin-proteasome pathway activity. In Minnaard, R. *Muscle wasting; the role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy and remodelling.* MD Maastricht, Netherlands: Universiteit Maastricht. 2006 p.142 <http://www.nutrim.unimaas.nl/uk/04.html>

39. Natri A, Jarvinen M, Latvala K, Kannus P. Isokinetic muscle performance after anterior cruciate ligament surgery: long-term results and outcome predicting factors after primary surgery and late-phase reconstruction. *Int J Sports Med* 1996;17:223-8.
40. Okuyama R, Honda M, Fujiya H, Goto K, Sugiura T, Akema T. Expression of heat shock protein 72 in rat quadriceps muscles following anterior cruciate ligament resection. *J Orthop Sci.* 2003;8(2):213-7.
41. Prodromos CC, Han Y, Rogowski J, Joyce B, Shi K. A meta-analysis of the incidence of anterior cruciate ligament tears as a function of gender, sport, and a knee injury-reduction regimen. *Arthroscopy.* 2007 Dec;23(12):1320-1325.e6
42. Ramírez C, Russo TL, Sandoval MC, Durigan JLQ, Dentillo AA, Couto MAS, Salvini TF. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation.* In press 2011
43. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. 2001. Myostatin, insulin like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 24(7):893–899.
44. Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Jun;288(6):R1423-31
45. Russo TL, Peviani SM, Durigan JL, Gigo-Benato D, Delfino GB, Salvini TF. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogen-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil.* 2010 Jul;31(1):45-57.

46. Sacheck JM, Hyatt JPK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J.* 2007;21, 140–155.
47. Snyder-Mackler L, Delitto A, Bailey SL, Stralka SW. Strength of the quadriceps femoris muscle and functional recovery after reconstruction of the anterior cruciate ligament. A prospective, randomized clinical trial of electrical stimulation. *J Bone Joint Surg Am.* 1995;77:1166-1173
48. Stevens JE, Mizner RL, Snyder-Mackler L. Neuromuscular electrical stimulation for quadriceps muscle strengthening after bilateral total knee arthroplasty: a case series. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2004 Jan;34(1):21-9.
49. Stockmar C, Lill H, Trapp A, Josten C, Punkt K. Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochem.* 2006;108(5):335-42.
50. Stoop R, Buma P, Van Der Kraan P, Hollander AP, Billingham RC, Poole AR, Van Den Berg WB. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2121-31.
51. Takarada Y, Takazawa H, Ishii N. Applications of vascular occlusion diminishes disuse atrophy of knee extensor muscles. *Med Sci Sports Exerc.* 2000 Dec;32(12):2035-9.
52. Tang Z, Yang L, Wang Y, Xue R, Zhang J, Huang W, Chen PC, Sung KL. Contributions of different intraarticular tissues to the acute phase elevation of synovial fluid MMP-2 following rat ACL rupture. *J Orthop Res.* 2009 Feb;27(2):243-8.

53. Tawa NE Jr, Odessey R, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest.* 1997 Jul 1;100(1):197-203.
54. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C1258–C1270.
55. van Grinsven S, van Cingel RE, Holla CJ, van Loon CJ. Evidence-based rehabilitation following anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Aug;18(8):1128-44.
56. Williams GN, Snyder-Mackler L, Barrance PJ, Buchanan TS. Quadriceps femoris muscle morphology and function after ACL injury: a differential response in copers versus non-copers. *J Biomech.* 2005 Apr;38(4):685-93.
57. Wright RW, Preston E, Fleming BC, Amendola A, Andrish JT, Bergfeld JA, Dunn WR, et al. A systematic review of anterior cruciate ligament reconstruction rehabilitation: part II: open versus closed kinetic chain exercises, neuromuscular electrical stimulation, accelerated rehabilitation, and miscellaneous topics. *J Knee Surg.* 2008 Jul;21(3):225-34.

## **ANEXO I**

---

Segue o manuscrito original submetido ao periódico “**American Journal Of Physical Medicine and Reahabilitation**”.

## **Quadriceps Muscle Atrophy after Anterior Cruciate Ligament Transection Involves Increased mRNA Levels of atrogin-1, MuRF-1 and Myostatin**

### **Authors:**

Gabriel B. Delfino<sup>1</sup>, Sabrina M. Peviani<sup>1</sup>, PhD, João L. Q. Durigan<sup>1</sup>, PhD, Thiago L. Russo<sup>1</sup>, PhD, Igor L. Baptista<sup>2</sup>, Mario Ferretti<sup>3</sup>, PhD, Anselmo S. Moriscot<sup>2</sup>, PhD, Tania F. Salvini<sup>1</sup>, PhD

### **Affiliations:**

1-Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil;

2-Department of Cell and Developmental Biology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil;

3-Department of Orthopaedic Surgery, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil

### **Correspondence:**

Prof. PhD Tania F. Salvini

Muscle Plasticity Laboratory

Department of Physical Therapy

Federal University of São Carlos

São Paulo, Brazil

Phone: +551633518345

Fax: +551633618111

E-mail: tania@ufscar.br

### **Disclosures:**

Financial disclosure statements have been obtained, and no conflicts of interest have been reported by the authors or by any individuals in control of the content of this article.

This project was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Process number: 2010/06940-7). Gabriel B Delfino and Igor L

Baptista are PhD grant holders supported by FAPESP (Process numbers: 08/03499-8 and 07/57613-3 respectively). João L Q Durigan is a post-doctoral grant holder supported by FAPESP (Process numbers: 08/09408-4). Sabrina M Peviani is a post-doctoral grant holder supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The study has not been submitted previously in any form.

## **ABSTRACT**

**Objective:** To assess the mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin in rat quadriceps after anterior cruciate ligament (ACL) transection.

**Design:** Wistar rats were randomized into 3 different groups: ACL (surgery and ACL rupture), Sham (surgery without ACL transection) and Control. Vastus Medialis (VM), Rectus Femoris (RF) and Vastus Lateralis (VL) muscles were harvested at 1, 2, 3, 7 and 15 days after ACL rupture. The mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin, as well as the ubiquitinated protein content, muscle mass (MM) and cross sectional area (CSA) of the muscle fibers were evaluated.

**Results:** Elevated levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin mRNA were detected in all tested muscles at most time points. The ubiquitinated protein content was increased at 3 days in ACL and Sham. The MM of the ACL group was reduced at 3, 7 and 15 days (VL and VM) and at 7 and 15 days (RF), whereas it was reduced in the Sham group at 3 and 7 days (VL and VM) and at 7 days (RF). The CSA of VM was reduced at 3, 7 and 15 days in the ACL group and at 3 and 7 days in the Sham group. The CSA of VL was reduced at 7 and 15 days in the ACL group and at 7 days in the Sham. While MM and CSA recovery was noted in the sham group, no recovery was observed in the ACL group.



**Conclusions:** Quadriceps atrophy after ACL transection involves increased levels of myostatin, atrogen-1 and MuRF-1 mRNA and the accumulation of ubiquitinated protein.

**Key Words:** Ubiquitin Protein Ligases, Knee Injury, Sports Medicine, Physical Medicine

## **INTRODUCTION**

The anterior cruciate ligament (ACL) is the main stabilizer of the knee and its rupture is a common injury that occurs mainly during sports, which accounts for 63% of ACL ruptures (1,2).

Among the most important changes in individuals with a recent or chronic history of ACL rupture are quadriceps atrophy and weakness (2,3,4,5,6,7,8). These alterations can persist from one year after injury to 4 years after ACL reconstruction and rehabilitation (3,4,5).

Neurophysiological mechanisms have been proposed to explain quadriceps weakness and atrophy after ACL rupture. A presynaptic reflex inhibition of joint musculature called arthrogenic muscle inhibition (AMI) could be triggered by joint distension and damage (9,10,11). The involvement of gamma loop dysfunction in the quadriceps muscle after ACL reconstruction has also been demonstrated (12). Such mechanisms help explain the difficulty these subjects have in achieving maximal voluntary contraction. Moreover, morphological and metabolic alterations such as the metabolic profile of fibers changing from a fast to a slow phenotype could contribute to this deficiency after ACL rupture (6).

Studies of skeletal muscle alterations after ACL transection in animal models have been less investigated than studies focusing on the effect of this joint injury on cartilage properties (13). Okuyama et al. (14) showed that some stress is generated in the quadriceps muscle of rats after ACL transection due to an increase in Heat Shock Protein-72 (HSP72) expression. Rabbit studies assessing ligament injuries found

quadriceps muscle atrophy only when the ACL was transected, which highlights its influence (15,16).

Skeletal muscle atrophy is characterized by a reduction in muscle mass due to an imbalance of protein synthesis and degradation, which results in a loss of protein content in the myofibers (17,18). The principal mechanism of muscle mass reduction is increased intracellular proteolysis by the ubiquitin proteasome system (UPS), in which misfolded or damaged proteins are polyubiquitinated and then degraded by 26S proteasome (18). These processes are mediated by three enzyme components, E1 (Ub-activating enzyme), E2 (Ub-conjugating enzymes), and E3 (ubiquitin protein ligase) (18). The up-regulation of two E3 ligases, atrogin-1 (also called muscle atrophy F-box, MAFbx) and muscle ring finger 1 (MuRF-1), occurs in different models of muscle atrophy such as denervation, immobilization and limb suspension (19,20,21,22). The importance of investigating the mRNA levels of these atrogenes (atrogin-1 and MuRF-1) is that their increase precedes the onset of muscle weight loss (19,20,21,23).

Myostatin is also an important protein involved in the control of muscle mass, recognized as a negative regulator of muscle mass growth (24). Furthermore, increases in myostatin expression have been associated with atrophic conditions like muscle disuse (24,25,26) and denervation (22).

Given that quadriceps muscle atrophy is a consequence of ACL rupture and could persist after reconstruction and rehabilitation and that atrogin-1, MuRF-1 and myostatin are molecular markers involved in the control of muscle mass, the objective of this study was to evaluate the mRNA levels of these genes in quadriceps muscle in the acute phase after ACL transection in rats. The muscle mass and cross-sectional area of muscle

fibers of the quadriceps muscle were also evaluated. Our hypothesis was that quadriceps muscle atrophy after ACL transection would be related to increased atrogen-1, MuRF-1 and myostatin mRNA levels. To our knowledge this is the first study that has evaluated the molecular pathways involved in quadriceps muscle atrophy after ACL transection.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental Design**

Three month old male Wistar rats (n=75; 312.63±33g) were studied. The animals were housed in plastic cages under controlled environmental conditions with free access to water and standard chow. The University Ethics Committee approved the experimental procedures and the study was conducted in accordance with the National Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. This study was divided into five experimental analysis periods: 1, 2, 3, 7 and 15 days after ACL transaction. The rats were randomly distributed in three experimental groups of 5 animals for each time period: ACL (submitted to the ACL transection), Sham (submitted to surgical procedures without ACL transection) and Control (intact animals).

### **ACL Transection Surgery**

The rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (12 mg/kg) and ketamine (95 mg/kg) for the surgical procedures. Under anesthesia, the left knee was shaved and prepared using an iodine solution. The animal was placed in the supine position and a 1-cm midline incision was then made over the anterior left knee exposing the patellar tendon. The joint cavity was exposed using a lateral parapatellar approach with the patella dislocated to the medial side. The ACL was identified with the knee

joint in full flexion and then sectioned with ophthalmological scissors. Afterwards, the anterior drawer test was performed to confirm ACL transection. The peripatellar capsular incision was closed using 4-0 Vicryl sutures and the skin was closed with 5-0 nylon sutures. The sham surgical procedure was identical to the ACL identification procedure but without ACL transection. After surgery the animals were returned to their cages and Paracetamol (13.5mg/100mL) was added to the drinking water for the first 24hs after surgery as postoperative analgesia. The surgical procedure was modified from Stoop et al. (13), in which the patella was laterally instead of medially dislocated.

### **Muscle Sample Collection**

After the experimental periods, the animals were anesthetized and weighed. The Vastus Lateralis (VL), Rectus Femoris (RF) and Vastus Medialis (VM) muscles of quadriceps were then carefully isolated, removed and weighed. Each muscle's mass (MM, g) was normalized using body mass (BM, g) to obtain the MM/BM ratio. Each muscle was divided into two parts at the middle of the belly. The proximal fragment was immediately frozen in isopentane (pre-cooled in liquid nitrogen), stored at -80°C and used for measuring muscle fiber CSA. The distal fragment was quick-frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C and used for measuring mRNA levels and for the Western blot evaluation.

### **Muscle Fiber CSA**

Histological serial sections were cut from the middle of the VM, VL and RF muscles in a cryostat microtome (Microm HE 505, Jena, Germany). One histological cross-section (10µm) stained with Toluidine Blue was chosen to measure muscle fiber CSA under a light microscope (Axiolab, Carl Zeiss, Germany) using morphometric analysis software

(Axiovision 4.7.1.0, Carl Zeiss, Germany). The CSA for each muscle was obtained by measuring 100 fibers located in the central region of the section. The ratio between muscle fiber CSA and the body mass of each animal (CSA/BM) was then determined for each muscle.

### **RNA Isolation and Analysis**

One frozen fragment of each muscle was homogenized and the total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The isolated RNA was dissolved in tris-HCl and ethylene-diaminetetracetic acid (TE) pH 7.6 and quantified spectrophotometrically. The purity was assessed by determining the ratio of absorbance at 260 nm to that at 280 nm. The integrity of the RNA, in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide (Invitrogen, Carlsbad, CA), was then confirmed by ultra-violet light inspection.

### **Reverse Transcription**

In order to obtain Cdna, we reverse transcribed 1 µg of RNA in a reaction mixture containing 1 µg of cellular RNA, 5x reverse transcription buffer, a dNTP (Promega, Madison, WI) mixture containing 0.2 mmol/L each of dATP, dCTP, dGTP and 0.1 mol/L of dTTP, 1 µl of oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 200U of M-MLV RT enzyme (Promega, Madison, WI), which was incubated at 70°C for 10 min, 42°C for 60 min and then heated to 95°C for 10 min before quick chilling on ice.

### **Oligonucleotide Primers**

The following rat sequences were used: atrogin-1 (forward: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT; reverse:

GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT), MuRF-1 (forward:  
TGACCAAGGAAAACAGCCACCAG; reverse:  
TCACTCCTTCTTCTCGTCCAGGATGG), Myostatin (forward:  
CTACCACGGAAACAATCATTACCA; reverse: AGCAACATTTGGGCTTTCCAT),  
GAPDH (forward: CCACCAACTGCTTAGCCC; reverse:  
GCCAAATTCGTTGTCATACC).

### **Real-Time Polymerase Chain Reactions**

The RNA transcript levels for the different experimental and control muscles were analyzed simultaneously and the reactions were carried out in duplicate in a Lightcycler (Rotor Gene 3000, Cobertt Research, San Francisco, USA) using fluorescent dye SYBR green detection (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 180 nM of each primer for a final volume of 50  $\mu$ l. Thermal cycling conditions for atrogen-1, MuRF-1, myostatin and GAPDH included 10 min at 95°C and then 40 cycles each of 15s at 94°C, 30s at 56°C for atrogen-1, at 64°C for MuRF-1, at 60°C for myostatin, and at 56°C for GAPDH, respectively, and 1 min at 72°C, followed by 10 min at 72°C. The data were analyzed using the comparative cycle threshold (Ct) method. The target gene expression was normalized to GAPDH. In addition, negative controls containing RNA without M-MLV RT ensured that the PCR product was not the result of amplified genomic DNA. A blank with water instead of template sample, primers and SYBER green was also analyzed.

### **Western Blot**

Western blotting was performed with rabbit polyclonal antibody against ubiquitin as the primary antibody (1:1000; Cat. No. A-100; Boston Biochem, Cambridge,

Massachusetts). The secondary antibody used was alkaline-phosphatase conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1:2000; Cat. No D048701; Dako).

The muscle samples were homogenized in extraction buffer solution (10ml of extraction buffer solution included 330µl of 100mM potassium phosphate buffer, 100µl of 10mM HEPES, 10µl of 1mM DTT, 100µl of 5mM ethylene-diaminetetraacetic acid EDTA pH 8.0, 30µl of 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10% pure glycerol, 40µl of 10% SDS solution, and 1% phosphatase inhibitor cocktail in MilliQ water). Homogenates were centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C and the supernatant was used. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, California), with bovine serum albumin as a standard.

Muscle proteins (50µg) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a pure nitrocellulose membrane (0.45µm; BIO RAD Cat. No.162-0115). The membranes were stained with Ponceau Solution to confirm the protein amount and then rinsed with Tween Tris-buffered saline solution (TBST) (0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, and 0.1% Tween-20). The membranes were incubated under low agitation overnight at 4°C with the primary antibody diluted in milk/Tween tris-buffered saline solution (0.1% powdered skimmed milk, 0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5). After the primary antibody incubation period, the membranes were washed for 30-min in TBST, incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature and then washed again for 20 min in TBST and 10 min in Detection Buffer (1M Tris-HCL, 1M NaCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, pH9,5). Labeled proteins were detected through alkaline phosphatase detection with NBT/BCIP solution (ROCHE Diagnostics Cat. No.11681451001). The whole spectrum of bands was determined using Scion Image software (Scion Corp., National Institutes of Health,



Bethesda, Maryland) and the membranes were all normalized with the previous Ponceau stain.

### **Statistical Analysis**

Multiple comparisons of mean values were performed using analysis of variance (ANOVA) and a post hoc Tukey test to compare mean values when appropriate. For all comparisons,  $p < 0.05$  was considered significant.

## **RESULTS**

### **Atrogin-1 mRNA Levels**

Compared to controls, the ACL group showed increased levels of atrogin-1 mRNA in all evaluated muscles and in most of the evaluated periods (Figure 1, A, D, G). The VM muscle showed increased levels in all evaluated periods (1 day: 13 fold; 2 days: 12 fold; 3 days: 5 fold; 7 days: 4 fold; 15 days: 1.63 fold; all  $p < 0.05$ , Figure 1A), as did the RF muscle (1 day: 5.3 fold; 2 days: 4.3 fold; 3 days: 16 fold; 7 days: 5.5 fold; 15 days: 1.6 fold; all  $p < 0.01$ ; Figure 1D). An increase was found in the VL muscle in the first seven days (1 day: 12.1 fold; 2 days: 10.15 fold; 3 days: 33.45 fold; 7 days: 6.19 fold; all  $p < 0.01$ ; Figure 1G).

The ACL group also showed higher mRNA levels of atrogin-1 than the Sham group (Figure 1; VM muscle: 1 day: 1.4 fold; 2 days: 1.4 fold; 3 days: 1.8 fold; 7 days: 1.55 fold; 15 days: 1.65 fold, all  $p < 0.05$ ; Figure 1A; RF muscle: 1 day: 1.4 fold; 7 days: 1.4 fold, all  $p < 0.01$ ; Fig 1D; VL muscle: 1 day: 1.6 fold; 2 days: 2 fold; 3 days: 2 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1G)

The Sham group also displayed higher atrogin-1 mRNA levels in all evaluated muscles than controls in the first seven days (Figure 1; VM muscle: 1 day: 9 fold; 2 days: 9 fold; 3 days: 3 fold; 7 days: 2.6 fold, all  $p<0.05$ ; Figure 1A; RF muscle: 1 day: 3.7 fold; 2 days: 3.63 fold; 3 days: 13 fold; 7 days: 3.7 fold,  $p<0.01$ ; Figure 1D; VL: 1 day: 7.5 fold; 2 days: 5.16 fold; 3 days: 17 fold; 7 days: 5.18 fold, all  $p<0.01$ , Figure 1G)

### **MuRF-1 mRNA Levels**

The MuRF-1 mRNA levels were higher in the ACL group than in the control group for the VL muscle in the first three days and for the VM and RF muscles in the first seven days (Figure 1; VM muscle: 1 day: 11 fold; 2 days: 7.2 fold; 3 days: 6.4 fold; 7 days: 3.2 fold, all  $p<0.01$ , Figure 1B; RF muscle: 1 day: 2.5 fold, 2 days: 3 fold; 3 days: 5.1 fold; 7 days: 2.7 fold, all  $p<0.01$ , Figure 1E; VL muscle: 1 day: 12 fold; 2 days: 7 fold; 3 days: 33 fold, all  $p<0.01$ , Figure 1H)

Higher MuRF-1 mRNA levels were also found in the ACL group than in Sham in all evaluated muscles; see Figure 1 (VM muscle: 1 day: 2 fold; 3 days: 2.5 fold, all  $p<0.01$ , Figure 1B; RF muscle: 1 day: 2 fold, 3 days: 1.8 fold, all  $p<0.01$ , Fig 1E; VL muscle: 1 day: 1.6 fold; 2 days: 1.6 fold; 3 days: 1.5 fold, all  $p<0.01$ , Figure 1H).

The sham group showed higher MuRF-1 mRNA levels than controls in all evaluated muscles in most evaluated periods, Figure 1 (VM muscle: 1 day: 5.6 fold; 2 days: 6 fold; 3 days: 2.5 fold; 7 days: 2.68 fold, all  $p<0.001$ , Figure 1B; RF muscle: 2 days: 2.3 fold; 3 days: 2.7 fold; 7 days: 2.23 fold, all  $p<0.01$ , Figure 1E; VL muscle: 1 day: 7.5 fold; 2 days: 4.4 fold; 3 days: 22 fold, all  $p<0.001$ , Figure 1H).

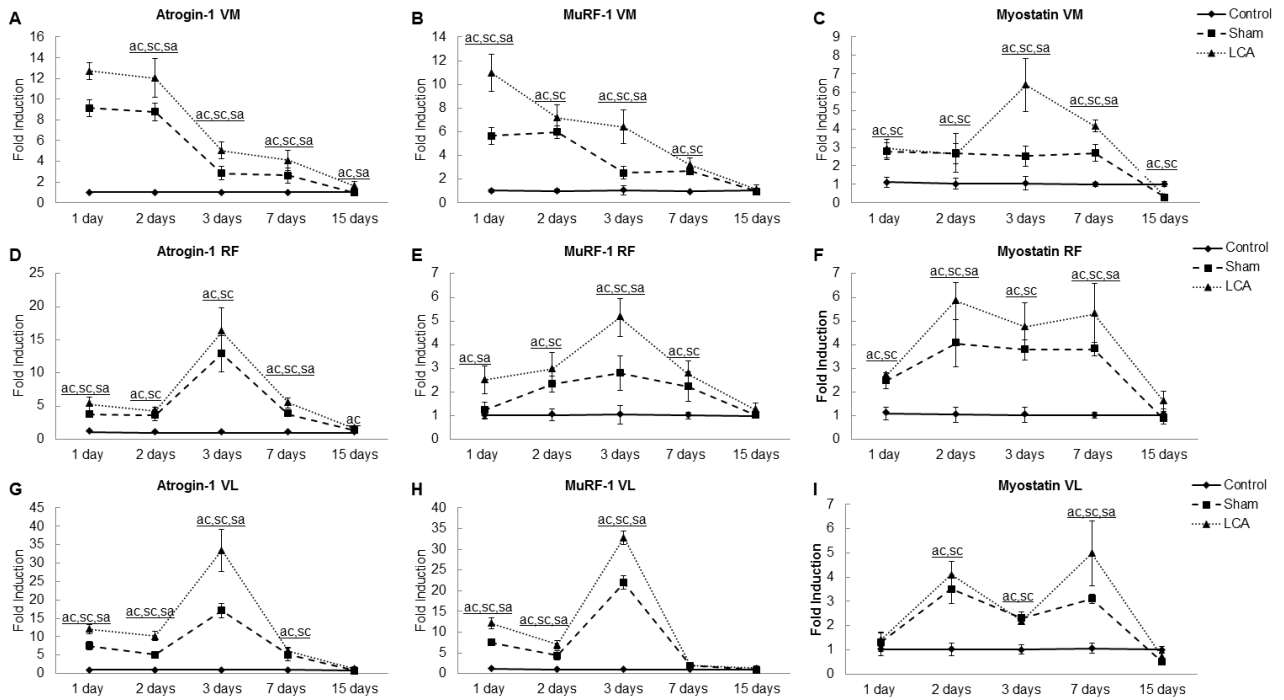
### **Myostatin mRNA Levels**

The ACL group showed higher myostatin mRNA levels than controls in all evaluated muscles during the first seven days (Figure 1, C,F,I). The VM muscle showed increased levels in the first 7 days (1 day: 2.9 fold; 2 days: 2.65 fold; 3 days: 6.4 fold; 7 days: 4.16 fold, all  $p < 0.05$ , Figure 1C), and at 15 days its levels were 70% below basal values ( $p < 0.001$ , Figure 1C). There were increased myostatin mRNA levels in the RF muscle in the first 7 days (1 day: 2.7 fold; 2 days: 5.8 fold; 3 days: 4.7 fold; 7 days: 5.3 fold,  $p < 0.001$ , Figure 1F) as well as in the VL muscle at 2, 3 and 7 days (2 days: 4 fold; 3 days: 2 fold; 7 days: 5 fold, all  $p < 0.001$ , Figure 1I).

The myostatin mRNA levels were also higher in the ACL group than the sham groups in all evaluated muscles (Figure 1: VL muscle: 7 days: 1.6 fold,  $p = 0.008$ , Figure 1I; VM muscle: 3 days: 2.5 fold; 7 days: 1.55 fold, all  $p < 0.01$ , Figure 1C; RF muscle: 2 days: 1.45 fold; 7 days: 1.40 fold, all  $p < 0.05$ , Figure 1F).

In most of the evaluated periods, there were higher levels of myostatin mRNA in all evaluated muscles in Sham than in Control (Figure 1, C,F,I). The VM muscle showed increased levels of myostatin mRNA in the first 7 days (1 day: 2.8 fold; 2 days: 2.7 fold; 3 days: 2.5 fold; 7 days: 2.7 fold, all  $p < 0.05$ , Figure 1C), but at 15 days it was 70% ( $p < 0.001$ ) downregulated. RF muscle had increased levels of myostatin mRNA in the first 7 days (1 day: 2.5 fold; 2 days: 4 fold; 3 days: 3.8 fold; 7 days: 3.8 fold, all  $p < 0.01$ , Figure 1F), as did the VL muscle from day 2 until day 7 (2 days: 3.5 fold; 3 days: 2 fold; 7 days: 3 fold, all  $p < 0.01$ , Figure 1I).

**Figure 1:** The mRNA levels of Atrogin-1 in Vastus Medialis (VM; A), Rectus Femoris (RF; D) and Vastus Lateralis (VL; G) muscles of the quadriceps. The mRNA levels of MuRF-1 in VM (B), RF (E) and VL (H) muscles. The mRNA levels of Myostatin in

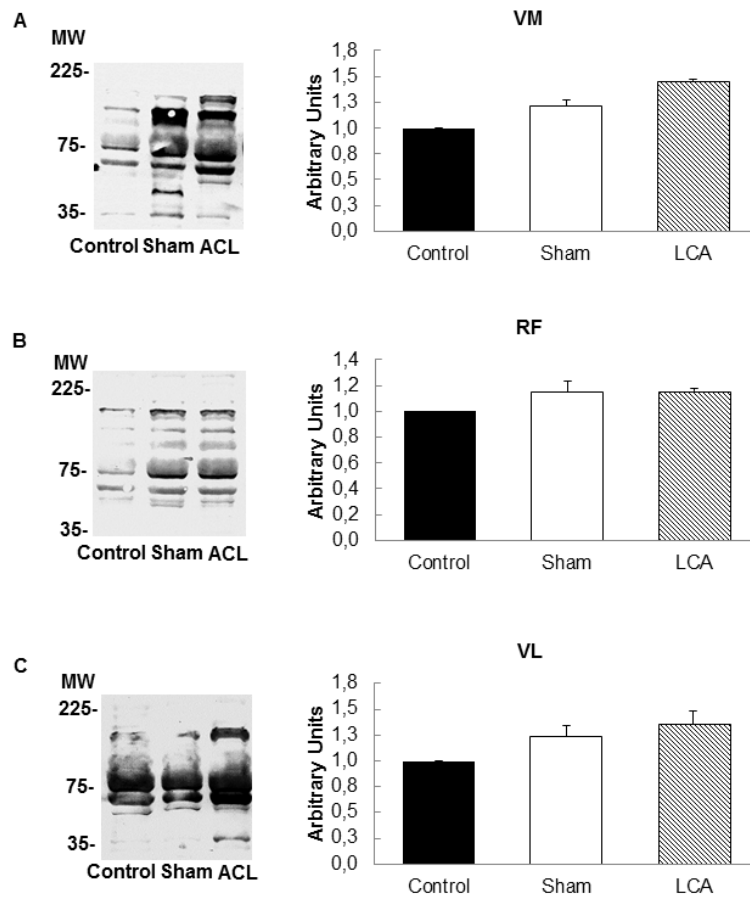


VM (C), RF (F) and VL (I) muscles. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

ac =  $p < 0.05$ : ACL compared to Control group; sc =  $p < 0.05$ : Sham compared to Control group; sa =  $p < 0.05$ : Sham compared to ACL group.

## Ubiquitinated Proteins

Since the highest levels of ubiquitin ligase gene expression occurred mainly in the first three days in both the ACL and Sham groups, we evaluated the levels of ubiquitin accumulation on the third day. Accordingly, more ubiquitinated proteins were observed in all evaluated muscles in ACL and Sham than in Control (Figures 2A-2C).

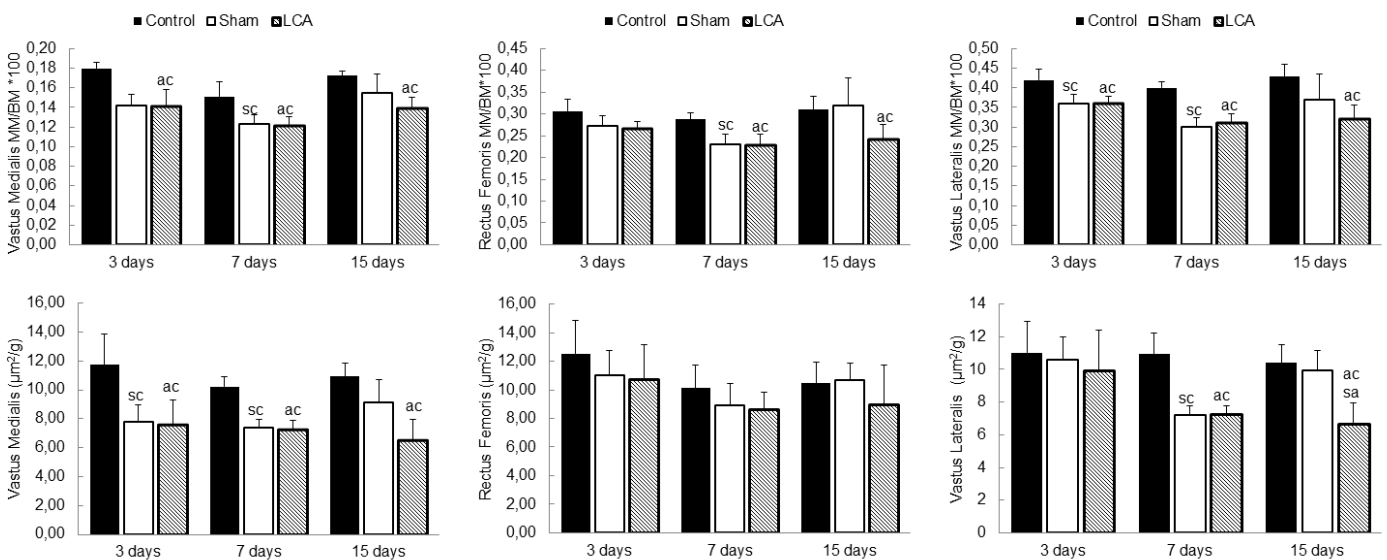


**Figure 2:** Western Blot membranes showing the amount of ubiquitinated protein conjugate at 3 days and respective densitometric optical membrane evaluation (arbitrary units) obtained from Vastus Medialis (A), Rectus femoris (B) and Vastus Lateralis (C) muscles of the quadriceps. MW: molecular weight.

## Muscle Mass

The mass of all evaluated muscles was lower in both the ACL and sham groups than in the control group (Figure 3). The ACL group showed the following reductions: VM muscle (3 days: 21%; 7 days: 22%; 15 days: 19%, all  $p < 0.05$ , Figure 3A), RF muscle (7 days: 20%; 15 days: 22%, all  $p < 0.05$ , Figure 3B) and VL muscle (3 days: 15%, 7 days: 23%; 15 days: 25%, all  $p < 0.05$ , Figure 3C).

The following reductions in muscle mass occurred in the sham group: VM muscle (3 days: 21%; 7 days: 21%, all  $p < 0.01$ , Figure 3A), RF muscle (7 days: 20%,  $p < 0.001$ , Figure 3B) and VL muscle (3 days: 15%; 7 days: 26%, all  $p < 0.01$ , Figure 3C).



**Figure 3:** The muscle mass/body mass ratio (MM/BM) and the cross sectional area/body mass ratio ( $\mu\text{m}^2/\text{g}$ ) of Vastus Medialis (A,D), Rectus Femoris (B,E) and Vastus Lateralis (C,F) of rat quadriceps muscles. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. ac =  $p < 0.05$ : ACL compared to Control group; sc =  $p < 0.05$ : Sham compared to Control group; sa =  $p < 0.05$ : Sham compared to ACL group.

## Muscle Fiber CSA

Both the ACL and sham groups had a lower CSA/BM ratio in the VL and VM muscles than controls (Figures 3A-3F). In the ACL group, the VM muscle presented the first reduction at 3 days and the VL muscle at 7 days (VM muscle: 3 days: 35%; 7 days: 29%; 15 days: 40%, all  $p < 0.05$ , Figure 3D; VL muscle: 7 days: 34%; 15 days: 36%, all  $p < 0.01$ , Figure 3F).

In the sham group, a reduced CSA/BM ratio compared to controls was found in the VM muscle at 3 and 7 days, and in the VL muscle only at 7 days (VM muscle: 3 days: 33%; 7 days: 28%, all  $p < 0.01$ , Figure 3D; VL muscle: 7 days: 34%,  $p < 0.001$ , Figure 3F).

## **DISCUSSION**

The results of this study provide new information about the molecular pathways involved in quadriceps muscle atrophy after ACL transection in a rat model, especially the early increase in mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin associated with a reduction of quadriceps muscle mass and muscle fiber CSA, which agrees with our hypothesis. Similar results were also found in the sham group. It is possible that the knee capsular joint surgical procedure itself is enough to increase the mRNA levels of these genes and induce atrophic adaptations in the quadriceps muscles. However, unlike that of the ACL group, Sham muscle mass and muscle fiber CSA were restored 15 days post-surgery, showing that ACL transection was a restricted muscle mass restoration in the evaluated period.

The process of skeletal muscle atrophy is characterized by activation of ATP-dependent UPS. Upregulated transcription of genes in this system, such as atrogen-1 and MuRF-1, have been associated with skeletal muscle atrophy in different animal models of disuse (e.g. denervation, immobilization and hindlimb suspension) (19,20,27,22). Now we

have shown that this pathway is also triggered in quadriceps muscle atrophy after knee surgery, especially after ACL transection in a rat model.

Although the increased levels of atrogin-1 and MuRF-1 mRNA were observed in the ACL and Sham groups in all evaluated muscles, ACL transection induced the highest levels. We might suppose that these higher levels of atrogin-1 and MuRF-1 mRNA in the ACL group are related to the ligament transection itself. Thus, the ACL and Sham results in the first three days are probably related to joint inflammation. Knee inflammation is described as an intrinsic response to injuries and pathologies such as ligament and meniscus injuries, osteoarthritis, and arthroscopy (10,28,29,30).

Nevertheless, higher levels of inflammatory cytokines such as interleukin-6 and tumoral necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) have been observed in the synovial liquid of patients (30) and rats (31) during the acute inflammatory phase of ACL rupture and in the quadriceps muscle of rats after saline injection into the knee (32). Accordingly, it is known that exposure to pro-inflammatory cytokines increases the expression of transcription factors that directly regulate MuRF-1 expression in skeletal muscle, such as TNF- $\alpha$  and nuclear factor- $\kappa\beta$  (33,34). Likewise, it has been demonstrated that TNF- $\alpha$  up-regulates atrogin-1 expression through components of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) family, such as p38 MAPK (35). Thus, the increased mRNA levels of atrogin-1 and MuRF-1 in the present study could be the result of exposure to inflammatory cytokines from the injured joint.

It is known that swelling either induced experimentally or due to joint damage causes acute quadriceps AMI, reducing electromyographic (EMG) activity and favoring muscle atrophy (36,37). Thus, the results related to atrogin-1 and MuRF-1 mRNA levels could



also have been influenced by joint swelling. Accordingly, Ramirez et al. (38), in a model of ankle swelling induced by saline injection, recently showed higher mRNA levels of atrogin-1 in the tibialis anterior muscle after two days. Hence, our results suggest that AMI-related muscle atrophy after knee joint injury could be associated with increased atrogin-1 and MuRF-1 mRNA levels. However, further studies are necessary to investigate ubiquitin ligase levels in a knee swelling model without joint surgery.

Our results also showed increased myostatin mRNA levels in the ACL and Sham groups in all evaluated muscles. Interestingly, higher myostatin mRNA levels occurred when atrogin-1 and MuRF-1 mRNA levels were low or diminishing, especially in the VL muscle. Accordingly, it has been shown that myostatin targets and inhibits the phosphorylation of protein kinase AKT, also known as PKB, inducing proteolysis through increased levels of atrogin-1 in a FoxO1-dependent manner (39). Moreover, AKT inhibition by myostatin compromises the hypertrophic Akt/mTOR/p70S6K pathway (40). We hypothesize that myostatin could have a pivotal role after an ACL transection, signaling protein breakdown through FoxO-1 downstream targets (i.e., atrogin-1 and MuRF-1) and impairing protein synthesis by inhibiting the Akt/mTOR/p70S6K pathway. Further studies evaluating the molecular pathways of muscle hypertrophy in the quadriceps after ACL transection would be necessary to verify this hypothesis.

Interestingly, myostatin mRNA levels were downregulated at 15 days in the VM of ACL and Sham, which could have contributed to the restoration of muscle mass in the sham group. Nevertheless, the absence of muscle mass and CSA recovery in the VM of ACL group could be related to the augmented mRNA levels of atrogin-1 during this period.

Although elevated levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin were observed in all muscles tested on days 1, 2 and 3 in both ACL and Sham, the reductions in muscle mass and CSA were first noticed at 3 and 7 days for the VM and VL, respectively, with a reduction in RF mass starting on the 7<sup>th</sup> day. This sudden increase in atrogene expression followed by later changes in muscle mass and CSA was similar to the results of Satchek et al. (22) in different models of muscle wasting, as well as to other muscle atrophy and atrogene expression studies (19,20). Moreover, an accumulation of ubiquitin protein conjugates was observed in all evaluated muscles at 3 days, possibly as consequence of the rapid and great increase in the first three days of ubiquitin ligase mRNA levels after the surgical procedures.

Unlike the Sham group, the ACL group had not recovered muscle mass or muscle fiber CSA in any muscle at 15 days. This could also be related to reduced gamma motor neuron activation after ACL rupture, which results in an attenuation of Ia afferents that might cause a prolonged disuse of fast-twitch fibers innervated by the high threshold motoneurons (12). Moreover, the previous increases in atrogen-1 and MuRF-1 in VL, VM and RF and the increased levels of atrogen-1 in RF and VM at 15 days might have influenced quadriceps muscle mass recovery.

The RF is the only bi-articular muscle in the quadriceps, acting also as hip flexor. We believe that this dual function could have led to a greater muscle activity level than was present in the VL and VM muscles, preventing (despite the higher atrogene levels) muscle mass loss, which was observed only on the 7<sup>th</sup> day, and CSA reduction. Thus, our results agree with previous studies showing that the VM and VL are the most-affected of all the muscles in the quadriceps after ACL injury (4,5). Additionally, Okuyama et al. (14) demonstrated increased levels of HSP72 only in the VM and VL

muscles of rats after ACL transection. In this same study, the absence of increased HSP72 levels in RF muscle was also attributed to its bi-articular function (14).

In contrast to other animal studies (15, 16) where quadriceps atrophy was not found in groups with sham-operated knees with intact ACL, we did find such atrophy in our sham group. This difference may be attributed to the evaluated periods, since we studied an acute instead of a chronic phase in which muscle mass could have been restored.

We would like to point out that at 15 days the percentages of reduction in muscle mass and muscle fiber CSA in the VM and VL muscles of the ACL group remained close to those found at 3 days and 7 days in the VM and VL muscles, respectively. Thus, based in our results, we might presume that the problem with quadriceps mass recovery in the first two weeks after ACL transection could be related to previous increases in atrogene levels as well as to poor protein synthesis.

This study provides new information about the molecular mechanisms involved in quadriceps atrophy after ACL transection. This knowledge could be useful for assessing the effects of rehabilitation interventions as well as for developing strategies to minimize muscle mass losses after knee surgery and ACL transection.

## **REFERENCES**

1. Cheatham SA, Johnson DL. Current concepts in ACL Injuries. *PhysSportsmed*. 2010 Oct;38(3):61-8.
2. Natri A, Jarvinen M, Latvala K, Kannus P. Isokinetic muscle performance after anterior cruciate ligament surgery: long-term results and outcome predicting factors after primary surgery and late-phase reconstruction. *Int J Sports Med* 1996;17:223-8

3. Arangio GA, Chen C, Kalady M, Reed JF 3rd. Thigh muscle size and strength after anterior cruciate ligament reconstruction and rehabilitation. *J Orthop Sports PhysTher.* 1997 Nov;26(5):238-43.
4. Gerber C, Hoppeler H, Claassen H, Robotti G, Zehnder R, Jakob RP. The lower extremity musculature in chronic symptomatic instability of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am.* 1985;67:1034–1043.
5. Lorentzon R, Elmqvist LG, Sjöström M, Fagerlund M, Fuglmeyer AR. Thigh musculature in relation to chronic anterior cruciate ligament tear: muscle size, morphology, and mechanical output before reconstruction. *Am J Sports Med.* 1989 May-Jun;17(3):423-9.
6. Stockmar C, Lill H, Trapp A, Josten C, Punkt K. Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastusmedialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *ActaHistochem.* 2006;108(5):335-42
7. Takarada Y, Takazawa H, Ishii N. Applications of vascular occlusion diminishes disuse atrophy of knee extensor muscles. *Med Sci Sports Exerc.* 2000 Dec;32(12):2035-9.
8. Williams GN, Snyder-Mackler L, Barrance PJ, Buchanan TS. Quadriceps femoris muscle morphology and function after ACL injury: a differential response in copers versus non-copers. *J Biomech.* 2005 Apr;38(4):685-93.
9. Hopkins JT, Ingersoll CD, Krause BA, Edwards JE, Cordova ML. Effect of knee joint effusion on quadriceps and soleus motoneuron pool excitability. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Jan;33(1):123-6.

10. Hurley MV: The effects of joint damage on muscle function, proprioception and rehabilitation. *Man Ther* 1997;2:11-7.
11. Krishnan C, Williams GN. Factors explaining chronic knee extensor strength deficits after ACL reconstruction. *J Orthop Res*. 2011 May;29(5):633-40.
12. Konishi Y, Fukubayashi T, Takeshita D. Mechanism of quadriceps femoris muscle weakness in patients with anterior cruciate ligament reconstruction. *Scand J Med Sci Sports*. 2002 Dec;12(6):371-5.
13. Stoop R, Buma P, Van Der Kraan P, Hollander AP, Billingham RC, Poole AR, Van Den Berg WB. Differences in type II collagen degradation between peripheral and central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum*. 2000;43:2121-31.
14. Okuyama R, Honda M, Fujiya H, Goto K, Sugiura T, Akema T. Expression of heat shock protein 72 in rat quadriceps muscles following anterior cruciate ligament resection. *J Orthop Sci*. 2003;8(2):213-7.
15. Kilic BA, Dingil O, Erkula G, Elmas C, Erdogan D, Atik OS. Evaluation of the muscles around the knee in rabbits whose anterior cruciate and/or medial collateral ligaments were dissected. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2004 Nov;124(9):626-30.
16. Pellisé F, Navarro-Quilis A. The muscles in chronic ligamentous instability of the knee: an experimental study. *Acta Orthop Belg* 1997;63:287–292.
17. McCarthy JJ, Esser KA. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 May;13(3):230-5.

18. Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J PhysiolRegulIntegr Comp Physiol*. 2005 Jun;288(6):R1423-31.
19. Bajotto G, Sato Y, Kitaura Y, Shimomura Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles *Eur J Appl Physiol*. 2011 Jan 11.
20. Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, Curi R, Miyabara EH, Moriscot AS. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle Nerve*. 2010 Jun;41(6):800-8.
21. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.
22. Russo TL, Peviani SM, Durigan JL, Gigo-Benato D, Delfino GB, Salvini TF. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2010 Jul;31(1):45-57.
23. Satchek JM, Hyatt JPK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J*. 2007;21, 140–155

24. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. 2001. Myostatin, insulin like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 24(7):893–899.
25. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol.* 1999 Aug; 277(2 Pt 2):R601-6.
26. Lalani R, Bhasin S, Byhower F, Tarnuzzer R, Grant M, Shen R, Asa S, Ezzat S, Gonzalez-Cadavid NF. Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J Endocrinol.* 2000 Dec;167(3):417-28.
27. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *ProcNatlAcadSci U S A.* 2001 Dec 4;98(25):14440-5.
28. Akima H, Furukawa T: Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial menisectomy. *Knee Surg Sports TraumatolArthrosc* 2005;13:632-7.
29. Gür H and Çakin N: Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:1534-41
30. Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee.* 2003 Mar;10(1):93-6.
31. Tang Z, Yang L, Wang Y, Xue R, Zhang J, Huang W, Chen PC, Sung KL. Contributions of different intraarticular tissues to the acute phase elevation of synovial fluid MMP-2 following rat ACL rupture. *J Orthop Res.* 2009 Feb;27(2):243-8.

32. Galbán CJ, Ling SM, Galbán CJ, Taub DD, Gurkan I, Fishbein KW, Spencer RG. Effects of knee injection on skeletal muscle metabolism and contractile force in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 May; 15(5):550-8.
33. Hong Li & Shweta Malhotra & Ashok Kumar. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy *J Mol Med* 2008;86:1113–1126.
34. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med*. 2004 Jul;82(7):434-48.
35. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*. 2005 Mar;19(3):362-70.
36. Rice D, McNair PJ, Dalbeth N. Effects of cryotherapy on arthrogenic muscle inhibition using an experimental model of knee swelling. *Arthritis Rheum*. 2009 Jan 15;61(1):78-83.
37. Torry MR., Decker MJ, Millett PJ, Steadman JR and Sterett WI. The effects of knee joint effusion on quadriceps electromyography during jogging. *Journal of Sports Science and Medicine* 2005;4,1-8.
38. Ramírez C, Russo TL, Sandoval MC, Durigan JLQ, Dentillo AA, Couto MAS, Salvini TF. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*. In press 2011
39. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin



proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism.  
J Cell Physiol 2006;209:501–514.

40. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ.  
Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation  
and myotube size. Am J Physiol Cell Physiol 2009;296:C1258–C1270.

## ANEXO II

---

Segue o manuscrito original submetido ao periódico “**Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**”.

# **Neuromuscular electrical stimulation alters genes expression and delays quadriceps muscle atrophy of rats after anterior cruciate ligament transection.**

## **Authors:**

Gabriel B. Delfino, PT, PhD<sup>1\*</sup>, João L. Q. Durigan PT, PhD<sup>2\*</sup>, , Sabrina M. Peviani PT, PhD<sup>2\*</sup>, Thiago L. Russo PT, PhD<sup>3</sup>, Carolina Ramírez, PT, PhD<sup>4</sup>, André D. B. da Silva Gomes PT<sup>5</sup>, Tania F. Salvini PT, PhD<sup>6</sup>

\*Authors contributed equally to the work.

## **Affiliations:**

<sup>1</sup>-PhD student, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>-Post Doctoral Fellows, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup>- Associate Professor, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>- Associate Professor, School of Physical Therapy, Industrial University of Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.

<sup>5</sup>-Graduate Student, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil;

<sup>6</sup>-Titular Professor, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil;

## **Correspondence:**

Prof. PhD Tania F. Salvini  
Muscle Plasticity Laboratory  
Department of Physical Therapy  
Federal University of São Carlos  
São Paulo, Brazil  
Phone: +551633518345  
Fax: +551633618111  
E-mail: tania@ufscar.br

## **Disclosures:**

Financial disclosure statements have been obtained, and no conflicts of interest have been reported by the authors or by any individuals in control of the content of this article.

The University Ethics Committee approved the experimental procedures (protocol: 015/2008) and the study was conducted in accordance with the National Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

This project was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Process number: 2010/06940-7). Gabriel B Delfino is PhD grant holder supported by FAPESP (Process numbers: 08/03499-8). João L Q Durigan is a post-doctoral grant holder supported by FAPESP (Process numbers: 08/09408-4). Sabrina M Peviani is a post-doctoral grant holder supported by Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).The study has not been submitted previously in any form.

**Neuromuscular electrical stimulation alters genes expression and delays quadriceps muscle atrophy of rats after anterior cruciate ligament transection.**

Financial disclosure statements have been obtained, and no conflicts of interest have been reported by the authors or by any individuals in control of the content of this article.

**Acknowledgements:**

The authors are grateful to Prof. PhD. Anselmo Sigari Moriscot and Igor Luchini Baptista PhD, both from Biomedical Sciences Institute of University of São Paulo (USP) by the assistance in the western blot development and analyses.

**STUDY DESIGN:** Controlled laboratory study.

**OBJECTIVE:** To assess the effects of neuromuscular electrical stimulation (NMES) on the mRNA levels of genes related to muscle atrophy in the quadriceps muscle of rats after anterior cruciate ligament (ACL) transection.

**METHODS:** 125 Wistar rats were randomized into 5 different groups: ACL (surgery and ACL rupture), ACLES (surgery and ACL transection and NMES), Sham (surgery without ACL transection), ShamES (surgery without ACL transection and NMES) and Control. The vastus medialis (VM), rectus femoris (RF) and vastus lateralis (VL) muscles of quadriceps were harvested 1, 2, 3, 7 and 15 days after surgery. The mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin as well as the ubiquitinated protein content were evaluated. The muscle mass (MM) and cross sectional area (CSA) of muscle fibers were measured.

**RESULTS:** ACL and Sham showed increased atrogen-1, MuRF-1 and myostatin mRNA levels in all evaluated muscles in most periods. In the ACLES and ShamES, the increase of mRNA atrogenes and myostatin was minimized or prevented in some evaluated periods. The ubiquitinated protein content increased at 3 days in all groups. NMES prevented a reduction in MM in all muscles of the ACLES group at 3 days and in ShamES in all periods, but did not prevent a reduction in the CSA of the VM and VL at 7 and 15 days in ACLES, as it did at 7 days in the VM of ShamES. Unlike the Sham and ShamES groups, the MM and CSA of the ACLES and ACL groups did not recover.

**CONCLUSIONS:** NMES minimized an increase of atrogenes and myostatin mRNA in the quadriceps muscles of the ACLES and ShamES groups, inhibiting the early atrophy

at 3 days, although it did not prevent atrophy at 7 and 15 days after ACL rupture. Sham and ShamES, however, displayed recovery of quadriceps mass and CSA.

**KEY WORDS:** *Knee injury, Physical therapy, Sports Injuries, Ubiquitin Protein Ligases.*

## **INTRODUCTION**

Anterior cruciate ligament (ACL) rupture is one of the most common sports injuries to the knee.<sup>41</sup> After ACL rupture and reconstruction, individuals experience pain, impaired knee function, muscle weakness and atrophy, especially in the quadriceps muscle, which is the most affected by this injury.<sup>16</sup>

It has been demonstrated that quadriceps muscle atrophy persists for years, even after rehabilitation.<sup>3,15,34,47</sup> This outcome has been associated with mechanisms triggered after joint injury and damage, such as arthrogenic muscle inhibition (AMI) and gamma loop dysfunction, which occur after ACL rupture and reconstruction and inhibit the recruitment of sufficient motor neurons for maximal voluntary contraction.<sup>22,23,27</sup>

Different rehabilitation strategies such as eccentric contraction, vascular occlusion, vitamin supplementation and electrical muscle stimulation (NMES) have been attempted soon after injury to minimize quadriceps muscle activation deficits and atrophy after knee surgery.<sup>3,7,19,51</sup> NMES is a clinical approach used to improve quadriceps function after ACL injury by facilitating muscle recruitment and restoring quadriceps strength, which may be inhibited by pain, effusion, or knee trauma.<sup>25,30</sup> It has been recently shown that NMES may overcome muscle activation deficits, helping to minimize quadriceps strength loss and atrophy.<sup>19</sup> However, Kim et al. demonstrated contradictions and inconsistencies regarding the effectiveness of NMES on ACL



rehabilitation in a systematic review. Considerable discrepancies were noted in NMES parameters and application techniques across trials as well as methodological flaws and suboptimal parameter selection. Good clinical trials and basic scientific studies are scarce regarding the effects of NMES after ACL injury.<sup>25</sup> It is unknown whether NMES can regulate atrophy signaling pathways and thus minimize quadriceps muscle atrophy after ACL injury.

The skeletal muscle atrophy occurs through a coordinated molecular program of proteolysis, known as ubiquitin proteasome system (UPS).<sup>35</sup> This program requires the polyubiquitination of target proteins by E3 ubiquitin ligases, which causes the protein to be degraded by the 26S proteasome.<sup>44</sup>

Atrogin-1 (also called muscle atrophy F-box, MAFbx) and muscle ring finger 1 (MuRF-1) MuRF-1 are muscle specific E3 ubiquitin ligases found to be upregulated in different models of muscle atrophy.<sup>4,6,45</sup> Both atrogin-1 and MuRF-1 are known as molecular markers of muscle atrophy, since their higher levels precede and correlate with maximal loss of muscle mass.<sup>46</sup>

Another important regulator of muscle mass is Myostatin, which acts as muscle antigrowth transcription factor and has been demonstrated to be upregulated in different models of muscle atrophy.<sup>8,31,36,43,45</sup>

Given that atrogin-1, MuRF-1 and myostatin are molecular markers involved in the control of muscle mass, the objective of this study was to evaluate the effects of early NMES applied to the quadriceps on the mRNA levels of these genes in the acute phase after the ACL rupture in rats. The muscle mass and the cross-sectional area of muscle fibers of the quadriceps muscle were also evaluated. Our hypothesis was that NMES

could protect against quadriceps muscle atrophy through reduced expression of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin mRNA levels. To our knowledge this is the first study that has evaluated the molecular pathways of NMES in quadriceps muscle after ACL rupture.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Experimental Design**

Three month old male Wistar rats (n=125; 313.32±30g) were studied. The animals were housed in plastic cages under controlled environmental conditions with free access to water and standard chow. The University Ethics Committee approved the experimental procedures and the study was conducted in accordance with the National Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. This study was divided into five experimental analysis periods: 1, 2, 3, 7 and 15 days after ACL transection. The rats were randomly distributed in five experimental groups of 5 animals for each time period: ACL (surgery and ACL rupture), ACLES (surgery and ACL transection and NMES), Sham (surgery without ACL transection), ShamES (surgery without ACL transection and NMES) and (intact animals).

### **ACL Transection Surgery**

The rats were anaesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (12 mg/kg) and ketamine (95 mg/kg) for the surgical procedures. Under anesthesia, the left knee was shaved and prepared using an iodine solution. The animal was placed in the supine position and a 1-cm midline incision was then made over the anterior left knee exposing the patellar tendon. The joint cavity was exposed using a lateral parapatellar approach with the patella dislocated to the medial side. The ACL was identified with the knee

joint in full flexion and then sectioned with ophthalmological scissors. Afterwards, the anterior drawer test was performed to confirm ACL transection. The peripatellar capsular incision was closed using 4-0 Vicryl sutures and the skin was closed with 5-0 nylon sutures. The sham surgical procedure was identical to the ACL identification procedure but without ACL transection. After surgery the animals were returned to their cages and Paracetamol (13.5mg/100mL) was added to the drinking water for the first 24hs after surgery as postoperative analgesia. The surgical procedure was modified from Stoop et al. (50), in which the patella was laterally instead of medially dislocated.

### **Electrical Stimulation Parameters**

Under anesthesia, NMES was performed immediately after surgery. The skin was shaved, cleaned, and covered with a gel conductor layer. Two electrodes (circular, self-adhesive, 1 cm in diameter each) were placed on the left hindlimb: the first was placed on the inguinal region in the femoral nerve eminence and the second on the distal quadriceps femoral region, 1 cm above of superior border of the patella. The knee was maintained in total extension and the hip in neutral position to prevent any movement due to quadriceps contraction. Each NMES session produced 20 maximal contractions of the quadriceps muscle. One session was applied every day until the end of experiment, beginning with the above-mentioned session immediately after ACL injury. The same procedure was used for the ShamES group.

A Neurodyn® current generator (IBRAMED, Brazil) was used. The NMES parameters were the following: a symmetrical biphasic rectangular pulse with a carrier frequency of 2500 Hz, modulated at 75 bursts per second, a pulse width of 200 $\mu$ s, time ON, 10 s; rise

up 2 s; time OFF, 50 s. The NMES parameters were based on a previously described clinical protocol.<sup>12</sup>

### **Muscle Sample Collection**

After the experimental periods, the animals were anesthetized and weighed. The Vastus Lateralis (VL), Rectus Femoris (RF) and Vastus Medialis (VM) muscles of quadriceps were then carefully isolated, removed and weighed. Each muscle's mass (MM, g) was normalized using body mass (BM, g) to obtain the MM/BM ratio. Each muscle was divided into two parts at the middle of the belly. The proximal fragment was immediately frozen in isopentane (pre-cooled in liquid nitrogen), stored at -80°C and used for measuring muscle fiber CSA. The distal fragment was quick-frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C and used for measuring mRNA levels and for the Western blot evaluation.

### **Muscle Fiber CSA**

Histological serial sections were cut from the middle of the VM, VL and RF muscles in a cryostat microtome (Microm HE 505, Jena, Germany). One histological cross-section (10µm) stained with Toluidine Blue was chosen to measure muscle fiber CSA under a light microscope (Axiolab, Carl Zeiss, Germany) using morphometric analysis software (Axiovision 4.7.1.0, Carl Zeiss, Germany). The CSA for each muscle was obtained by measuring 100 fibers located in the central region of the section. The ratio between muscle fiber CSA and the body mass of each animal (CSA/BM) was then determined for each muscle.

### **RNA Isolation and Analysis**

One frozen fragment of each muscle was homogenized and the total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. The isolated RNA was dissolved in tris-HCl and ethylene-diaminetetracetic acid (TE) pH 7.6 and quantified spectrophotometrically. The purity was assessed by determining the ratio of absorbance at 260 nm to that at 280 nm. The integrity of the RNA, in a 1% agarose gel stained with ethidium bromide (Invitrogen, Carlsbad, CA), was then confirmed by ultra-violet light inspection.

### **Reverse Transcription**

In order to obtain Cdna, we reverse transcribed 1 µg of RNA in a reaction mixture containing 1 µg of cellular RNA, 5x reverse transcription buffer, a dNTP (Promega, Madison, WI) mixture containing 0.2 mmol/L each of dATP, dCTP, dGTP and 0.1 mol/L of dTTP, 1 µl of oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 200U of M-MLV RT enzyme (Promega, Madison, WI), which was incubated at 70°C for 10 min, 42°C for 60 min and then heated to 95°C for 10 min before quick chilling on ice.

### **Oligonucleotide Primers**

The following rat sequences were used: atrogin-1 (forward: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT; reverse: GTTGAATCTTCTGGAATCCAGGAT), MuRF-1 (forward: TGACCAAGGAAAACAGCCACCAG; reverse: TCACTCCTTCTTCTCGTCCAGGATGG), Myostatin (forward: CTACCACGGAAACAATCATTACCA; reverse: AGCAACATTTGGGCTTTCCAT), GAPDH (forward: CCACCAACTGCTTAGCCC; reverse: GCCAAATTCGTTGTCATACC).

## **Real-Time Polymerase Chain Reactions**

The RNA transcript levels for the different experimental and control muscles were analyzed simultaneously and the reactions were carried out in duplicate in a Lightcycler (Rotor Gene 3000, Cobertt Research, San Francisco, USA) using fluorescent dye SYBR green detection (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 180 nM of each primer for a final volume of 50  $\mu$ l. Thermal cycling conditions for atrogin-1, MuRF-1, myostatin and GAPDH included 10 min at 95°C and then 40 cycles each of 15s at 94°C, 30s at 56°C for atrogin-1, at 64°C for MuRF-1, at 60°C for myostatin, and at 56°C for GAPDH, respectively, and 1 min at 72°C, followed by 10 min at 72°C. The data were analyzed using the comparative cycle threshold (Ct) method. The target gene expression was normalized to GAPDH. In addition, negative controls containing RNA without M-MLV RT ensured that the PCR product was not the result of amplified genomic DNA. A blank with water instead of template sample, primers and SYBER green was also analyzed.

## **Western Blot**

Western blotting was performed with rabbit polyclonal antibody against ubiquitin as the primary antibody (1:1000; Cat. No. A-100; Boston Biochem, Cambridge, Massachusetts). The secondary antibody used was alkaline-phosphatase conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1:2000; Cat. No D048701; Dako).

The muscle samples were homogenized in extraction buffer solution (10ml of extraction buffer solution included 330 $\mu$ l of 100mM potassium phosphate buffer, 100 $\mu$ l of 10mM HEPES, 10 $\mu$ l of 1mM DTT, 100 $\mu$ l of 5mM ethylene-diaminetetraacetic acid EDTA pH 8.0, 30 $\mu$ l of 3mM MgCl<sub>2</sub>, 10% pure glycerol, 40 $\mu$ l of 10% SDS solution, and 1%

phosphatase inhibitor cocktail in MiliQ water). Homogenates were centrifuged at 12,000 x g for 10 min at 4°C and the supernatant was used. Protein concentration was determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, California), with bovine serum albumin as a standard.

Muscle proteins (50µg) were separated on 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a pure nitrocellulose membrane (0,45µm; BIO RAD Cat. No.162-0115). The membranes were stained with Ponceau Solution to confirm the protein amount and then rinsed with Tween Tris-buffered saline solution (TBST) (0.5 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, and 0.1% Tween-20). The membranes were incubated under low agitation overnight at 4°C with the primary antibody diluted in milk/Tween tris-buffered saline solution (0.1% powdered skimmed milk, 0.5M NaCl, 50mM Tris-HCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5). After the primary antibody incubation period, the membranes were washed for 30-min in TBST, incubated with secondary antibodies for 1 hour at room temperature and then washed again for 20 min in TBST and 10 min in Detection Buffer (1M Tris-HCL, 1M NaCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, pH9,5). Labeled proteins were detected through alkaline phosphatase detection with NBT/BCIP solution (ROCHE Diagnostics Cat. No.11681451001). The whole spectrum of bands was determined using Scion Image software (Scion Corp., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) and the membranes were all normalized with the previous Ponceau stain.

### **Statistical Analysis**

Multiple comparisons of mean values were performed using analysis of variance (ANOVA) and a post hoc Tukey test to compare mean values when appropriate. For all comparisons,  $p < 0.05$  was considered significant.

## **RESULTS**

### **Atrogin-1 mRNA levels**

Compared to controls, the ACLES group showed increased mRNA levels of atrogin-1 in all evaluated muscles and in most evaluated periods (Figure 1, A,D,G). The VM muscle showed increased levels in the first seven days (1 day: 9 fold; 2 days: 12 fold; 3 days: 3 fold; 7 days: 4.73 fold, all  $p < 0.01$ , Figure 1A), as did the RF muscle (1 day: 6.2 fold; 2 days: 2.7 fold; 3 days: 8.6 fold; 7 days: 7.6 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1D). An increase was found in the VL muscle in the first seven days (1 day: 9.5 fold; 2 days: 7.5 fold; 3 days: 12 fold; 7 days: 7.3 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1G) and at 15 days the levels were reduced by 85% ( $p < 0.001$ ; Figure 1G).

Compared to ACL, the ACLES group showed changes in mRNA levels of atrogin-1 (Figure 1, A, D, G). The VM showed a reduction on following days (1 day: 1.42 fold; 3 days: 1.64 fold; 15 days: 1.64 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1A). A reduction occurred in the RF at 2 days (1.56 fold;  $p = 0.002$ ) and 3 days (1.8 fold;  $p = 0.003$ ), while at 7 days an increase of 1.37 fold ( $p = 0.01$ ) in mRNA levels of atrogin-1 was found (Figure 1D). The VL showed a reduction in most periods (1 day: 1.26 fold; 2 days: 1.34 fold; 3 days: 2.7 fold, all  $p < 0.05$ ; Figure 1G).

Compared to the control group, the ACL group showed increased mRNA levels of atrogin-1 in all evaluated muscles and in most evaluated periods (Figure 1: A,D,G). The VM muscle showed increased levels in all evaluated periods (1 day: 13 fold; 2 days: 12



fold; 3 days: 5 fold; 7 days: 4 fold; 15 days: 1.63 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1A), as did the RF muscle (1 day: 5.3 fold; 2 days: 4.3 fold; 3 days: 16 fold; 7 days: 5.5 fold; 15 days: 1.6 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1D). Increases were found in the VL muscle in most periods (1 day: 12.1 fold; 2 days: 10.15 fold; 3 days: 33.45 fold; 7 days: 6.19 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1G).

The ACL group also showed higher mRNA levels of atrogen-1 than the Sham group (Figure 1; VM muscle: 1 day: 1.4 fold; 2 days: 1.4 fold; 3 days: 1.8 fold; 15 days: 1.65 fold, all  $p < 0.05$ ; Figure 1A; RF muscle: 1 day: 1.4 fold; 7 days: 1.4 fold, both  $p < 0.05$  Figure 1D; VL muscle: 1 day: 1.6 fold; 2 days: 2 fold; 3 days: 2 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1G).

Higher mRNA levels of atrogen-1 were found in all evaluated muscles of the Sham group than the control group in the first seven days (Figure 1; VM muscle: 1 day: 9 fold; 2 days: 9 fold; 3 days: 3 fold; 7 days, all  $p < 0.01$ ; Figure 1A; RF muscle: 1 day: 3.7 fold; 2 days: 3.63 fold; 3 days: 13 fold; 7 days: 3.7 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1D; VL muscle: 1 day: 7.5 fold; 2 days: 5.16 fold; 3 days: 17 fold; 7 days: 5.18 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1G). However, compared to Sham, NMES reduced the mRNA levels of atrogen-1 in ShamES. There was a 1.82 fold reduction in the VM only at 1 day ( $p = 0.002$ , Figure 1A). There was a reduction in the RF muscle on the first 3 days (1 day: 1.48 fold; 2 days: 2.11 fold; 3 days: 1.49 fold, all  $p < 0.05$ ; Figure 1D). In the VL, mRNA levels of atrogen-1 were reduced 1.38 fold at 3 days ( $p = 0.02$ ; Figure 1G)

The ShamES group's mRNA atrogen-1 levels were altered compared to those of the control group (Figure 1 A, D, G). The VM showed increased levels in the first 3 days (1 day: 4.9 fold; 2 days: 10.3 fold; 3 days: 2.8 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 1A). Increased

levels were found in the RF in most evaluated periods (1 day: 5 fold; 3 days: 7 fold; 7 days: 2.86 fold, all  $p < 0.05$ ; Figure 1D). The VL showed increased levels in the first seven days (1 day: 6.86 fold; 2 days: 3.6 fold; 3 days: 9.8 fold; 7 days: 3.8 fold, all  $p < 0.05$ ; Figure 1G), and an 80% reduction at 15 days ( $p < 0.001$ ; Figure 1G).

### **MuRF-1 mRNA levels**

The ACLES group's mRNA levels of MuRF-1 in the VM and VL muscles were higher in the first seven days than in the control group, as were those in the RF muscles in most evaluated periods (Figure 2 B,E,H). (VM muscle: 1 day: 6.16 fold; 2 days: 7.7 fold; 3 days: 3.8 fold; 7 days: 2 fold, all  $p < 0.05$ , Figure 2B; RF muscle: 1 day: 3.2 fold; 2 days: 1.8 fold; 3 days: 2.2 fold; 7 days: 2.4 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2E; VL muscle: 1 day: 4.2 fold; 2 days: 7 fold; 3 days: 11.5 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2H)

Compared to ACL, NMES reduced the mRNA levels of MuRF-1 in the ACLES group for all evaluated muscles (Figure 2 B, E, H). (VM: 1 day: 1.78 fold; 3 days: 1.6 fold; 7 days: 1.61 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2B; RF: 2 days: 1.64 fold; 3 days: 2.27 fold, both  $p < 0.01$ ; Figure 2E; VL: 1 day: 2.8 fold; 3 days: 2.8 fold, both  $p < 0.01$ ; Figure 2H).

The mRNA levels of MuRF-1 were higher in all evaluated muscles and most periods in the ACL group than the control group (Figure 2 B, E, H) (VM muscle: 1 day: 11 fold; 2 days: 7.2 fold; 3 days: 6.4 fold; 7 days: 3.2 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2B; RF muscle: 1 day: 2.5 fold; 2 days: 3 fold; 3 days: 5.1 fold; 7 days: 2.7 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2E; VL muscle: 1 day: 12 fold; 2 days: 7 fold; 3 days: 33 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2H).

Greater mRNA levels of MuRF-1 were also found in the ACL group than in Sham in all evaluated muscles (Figure 2 B, E, H). (VM muscle: 1 day: 2 fold; 3 days: 2.5 fold, both

p<0.01; Figure 2B; RF muscle: 1 day: 2 fold; 3 days: 1.8 fold, both p<0.01; Figure 2E; VL muscle: 1 day: 1.6 fold; 2 days: 1.6 fold; 3 days: 1.5 fold, all p<0.01; Figure 2H).

Compared to the control group, the ShamES group showed increased mRNA levels of MuRF-1 in all evaluated muscles (Figure 2 B, E, H). (VM muscle: 1 day: 3 fold; 2 days: 6 fold; 3 days: 2.6 fold; 7 days: 1.83 fold, all p<0.01; Figure 2B; RF muscle: 1 day: 2.6 fold; 2 days, 1.81 fold, both p<0.01; Figure 2E; VL muscle: 1 day: 7 fold; 2 days: 5 fold; 3 days: 6.3 fold, all p<0.01; Figure 2H). ShamES levels were reduced by 1.8 fold in the VM muscle at 1 day compared to Sham (p=0.01; Figure 2B). This also occurred in the RF muscle at 3 and 7 days (2.5 fold, p<0.001; 2.2 fold, p<0.009 respectively; Figure 2E) and in the VL muscle at 3 days (3.5 fold p<0.001; Figure 2H). The mRNA levels of MuRF-1 were higher in ShamES than in Sham only for the RF muscle at 1 day (2 fold, p=0.02; Figure 2E).

Higher mRNA levels of MuRF-1 were found in Sham than in control (Figure 2 B, E, H). (VM muscle: 1 day: 5.6 fold; 2 days: 6 fold; 3 days: 2.5 fold; 7 days: 2.6 fold, all p<0.01; Figure 2B; RF muscle: 2 days: 2.3, fold; 3 days: 2.8 fold; 7 days: 2.2 fold, all p<0.01; Figure 2E; VL muscle: 1 day: 7.5 fold; 2 days: 4.3 fold; 3 days: 22 fold, all p<0.01; Figure 2H).

### **Myostatin mRNA levels**

The ACLES group showed higher mRNA levels of myostatin than the control group in all evaluated muscles during the first seven days (Figure 2, C, F, I). The VM muscle had higher levels at 3 and 7 days (3 days 3.6 fold; 7 days: 2.3 fold, both p<0.01; Figure 2C), but at 15 days its levels were 50% below basal values (p<0.001, Figure 2C). RF muscle levels were increased in the first 7 days (1 day: 1.6 fold; 2 days: 4.2 fold; 3 days: 2.8

fold; 7 days: 5.3 fold, all  $p < 0.05$ , Figure 2F). In the VL muscle, increased mRNA levels of myostatin were found at 2, 3 and 7 days (2 days: 5 fold; 3 days: 1.7 fold; 7 days: 2.7 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2I). At 15 days, mRNA levels of myostatin in the ACLES group were 80% below basal values for VL ( $p < 0.001$ ; Figure 2I).

Compared to the ACL group, the application of NMES in the ACLES group reduced mRNA levels of myostatin (Figure 2 C, F, I). (VM muscle: 1 day: 1.9 fold; 2 days: 2.4 fold; 3 days: 1.6 fold; 7 days: 1.77 fold, all  $p < 0.01$ , Figure 2C; RF muscle: 1 day: 1.7 fold; 2 days: 1.38 fold; 3 days: 1.7 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2F; VL muscle: 7 days: 1.79 fold; 15 days: 9 fold, both  $p < 0.01$ ; Figure 2I).

The mRNA levels of myostatin were also higher in the ACL group than in the control group in all evaluated muscles (Figure 2, C, F, I). (VM muscle: 1 day: 3 fold; 2 days: 2.6 fold; 3 days: 6.4 fold; 7 days: 4 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2C; RF muscle: 1 day: 2.7 fold; 2 days: 6 fold; 3 days: 4.7 fold; 7 days: 5.2 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2F; VL muscle: 2 days: 4 fold; 3 days: 2 fold; 7 days: 5 fold, all  $p < 0.01$ , Figure 2I). At 15 days mRNA levels of myostatin were 70% below basal values in the VM muscle ( $p < 0.001$ ; Figure 2C).

The ShamES group also showed higher mRNA levels of myostatin than the control group (Figure 2, C, F, I). (VM muscle: 3 days: 2.6 fold; 7 days: 2 fold, both  $p < 0.05$ ; Figure 2C; RF muscle: 2 days: 3.6 fold; 3 days: 2.3 fold; 7 days: 4.5 fold, all  $p < 0.01$ ; Figure 2F; VL muscle: 2 days: 4 fold,  $p < 0.001$ ; Figure 2I). At 15 days mRNA levels of myostatin were 60% below basal values in the VM muscle ( $p < 0.001$ ; Figure 2C).

Compared to the Sham group, NMES reduced mRNA levels of myostatin in ShamES (Figure 2, C, F, I). (VM muscle: 1 day: 2.35 fold; 2 days: 2.4 fold, both  $p < 0.01$ ; Figure

2C; RF muscle: 1 day: 2 fold; 3 days: 1.66 fold, both  $p<0.01$ ; Figure 2F; VL muscle: 3 days: 1.73 fold; 15 days: 4.4 fold, both  $p<0.01$ ; Figure 2I).

There were higher mRNA levels of myostatin in the Sham group than the control group in all evaluated muscles in most evaluated periods (Figure 2, C, F, I). The VM muscle showed increased mRNA levels of myostatin in the first 7 days (1 day: 2.8 fold; 2 days: 2,7fold; 3 days: 2,5 fold; 7 days: 2,7 fold, all  $p<0.01$ ; Figure 2C), but at 15 days it was 70% ( $p<0.001$ ) downregulated. The RF muscle displayed increased mRNA levels of myostatin in the first 7 days (1 day: 2.5 fold; 2 days: 4 fold; 3 days: 3.8 fold; 7 days: 3,8 fold, all  $p<0.01$ ;Figure 2F). In the VL muscle, there were increases from 2 days until 7 days (2 days: 3.5 fold; 3 days: 2.3 fold; 7 days: 3 fold, all  $p<0.05$ ; Figure 2I).

### **Polyubiquitinated Proteins**

In order to evaluate the rapid increase and higher levels of ubiquitin ligase gene expression, which occurred mainly in the first three days in all groups, we evaluated the ubiquitin accumulation levels on the third day. Accordingly, an accumulation of ubiquitinated proteins was observed in all evaluated muscles of all groups compared to the control group (Figure 3).

### **Muscle mass**

Compared to the control group, NMES prevented muscle mass loss in the ACLES group at 3 days in the VM and VL, at 7 days in the RF and at 15 days in the RF and VL muscles (Figure 4). However, reductions in muscle mass were found in the VM (7 days: 23%,  $p=0.004$ ; 15 days: 20%,  $p=0.01$ ; Fig 4 A) and VL muscles (7 days: 16.5%,  $p=0.01$ ; Fig 4 F).

The ACL group's muscle mass was lower than the control group for all evaluated muscles, showing the following reductions: VM muscle (3 days: 21%; 7 days: 22%; 15 days: 19%, all  $p<0.01$ ; Figure 4A), RF muscle (7 days: 20%; 15 days: 22%, both  $p<0.05$ ; Figure 4B) and VL muscle (3 days: 15%; 7 days: 23%; 15 days: 25%, all  $p<0.05$ ; Figure 4C).

The Sham group presented the following reductions in muscle mass: VM muscle (3 days: 21%; 7 days: 21%, both  $p<0.01$ ; Figure 4A), RF muscle (7 days: 20%,  $p<0.001$ , Figure 4B) and VL muscle (3 days: 15%; 7 days: 26%, both  $p<0.01$ ; Figure 4C). In ShamES, NMES prevented the loss of muscle mass.

### **Muscle Fiber CSA**

NMES only prevented the early reduction of muscle fiber CSA in ACL VM at 3 days, showing the following reductions compared to the control group: (VM: 7 days, 46%; 15 days, 36%, both  $p<0.01$ ; Figure 4D; VL: 7 days: 40%; 15 days: 35% both  $p<0.01$ ; Figure 4F).

In the ACL group, the first reductions in CSA appeared at 3 days in the VM muscle and at 7 days in the VL muscle (VM muscle: 3 days: 35%; 7 days: 29%; 15 days: 40%, all  $p<0.01$ , Figure 4D; VL muscle: 7 days: 31%; 15 days: 34%, both  $p<0.01$ ; Figure 4F).

In the Sham group, reductions in CSA compared to the control group were found at 3 and 7 days in the VM muscles, and only at 7 days in the VL muscle (VM muscle: 3 days: 33%; 7 days: 26%, both  $p<0.01$ , Figure 4D; VL muscle: 7 days: 32%,  $p=0.003$ , Figure 4F). In ShamES, NMES prevented CSA reduction in the VL throughout the experiment, but only at 3 days in VM, with a 29% reduction compared to the control group at 7 days: ( $p=0.01$ ; Figure 4D).

## Discussion

The results of this study provide new information about the effects of NMES on the molecular pathways involved in quadriceps atrophy after ACL rupture in a rat model. They were characterized by reduction or inhibition of increased mRNA levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin, which, in agreement with our hypothesis, was also associated with inhibited early reduction of quadriceps muscle mass and muscle fiber CSA. Moreover, similar results were found in the ShamES group, in which the treatment prevented or minimized increases in the evaluated genes in the quadriceps. It should also be pointed out that, due to the increased levels of the evaluated genes found in all groups, the surgical procedure alone to the capsular ligament is enough to trigger increased levels of these genes in mRNA and to induce atrophic adaptations in quadriceps muscle. Moreover, unlike the ACL and ACLES group, muscle mass and muscle fiber CSA had been restored by the 15<sup>th</sup> day after surgery in the Sham and ShamES groups for all evaluated muscles, showing that ACL rupture is a restricting factor for the restoration of muscle mass in the evaluated period, even after an NMES protocol.

We showed that all surgical procedures triggered an increase in mRNA levels of atrogen-1 and MuRF-1 in all evaluated muscles, although the ACL group showed the highest levels, which might be due to the injured ligament itself. Nevertheless the joint inflammation occurring after knee injuries or pathologies (osteoarthritis, ligament and meniscus injuries, and arthroscopy) is probably related to the results observed in this acute phase after surgery.<sup>2,17,23,24</sup>

During the acute inflammatory phase after ACL rupture, increased levels of inflammatory cytokines as interleukin-6 and tumor necrosis alpha (TNF- $\alpha$ ) have been demonstrated in the synovial liquid of both humans and rats, as well as in the quadriceps muscle of rats after a saline injection into the knee.<sup>14,24,51</sup> Thus, the increased mRNA levels of atrogen-1 and MuRF-1 observed in the present study could be the result of exposure to inflammatory cytokines from the injured joint, since it has been demonstrated that TNF- $\alpha$  upregulates atrogen-1 expression with components of Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) family such as p38 MAPK.<sup>21,32</sup> Likewise, TNF- $\alpha$  and nuclear factor- $\kappa\beta$ , another inflammatory cytokine, upregulate transcription factors that directly modulate MuRF-1 expression in skeletal muscle.<sup>29</sup> More recently, Ramirez demonstrated increased mRNA levels of TNF- $\alpha$ , MuRF-1 and Atrogen-1 in the tibialis anterior muscle of rats submitted to ankle inflammation.<sup>42</sup>

NMES has been used in an attempt to minimize or prevent the muscle atrophy in many conditions, such as denervated muscle, spinal cord injury and quadriceps atrophy after ACL rupture.<sup>5,33,47</sup> Few studies have shown the effects of NMES for inhibiting muscle atrophy. In a denervated rat model, 200 contractions per day with a rest interval of 8 hours between each session was able to inhibit muscle fiber atrophy<sup>9,10</sup> and molecular changes<sup>28</sup> in the EDL muscle of two-month-old rats. Implanted electrodes were used in these studies rather than surface electrodes, which are recommended for clinical NMES protocols. Due the limitation to use implanted electrodes, this study's protocol has not been previously tested in clinical trials.

Despite the daily NMES procedure applied to the ACLES group, which began as soon as surgical procedures ended and continued throughout the evaluation period, increased mRNA levels of atrogen-1 and MuRF-1 were not prevented in the first week,



although the procedure helped minimize them in all evaluated muscles. Studies evaluating NMES and atrogenes expression have shown that its level could be minimized or even enhanced in response to stimulus periodicity (daily or on alternating days) in denervated rat muscle, or minimized in hindlimb suspended rats with spinal cord injury using implanted electrodes.<sup>18,26,33</sup> Russo et al., using surface electrodes similar to ours, demonstrated lower levels of atrogen-1 after NMES in denervated muscle.<sup>45</sup> Thus, the modulation of atrogenes by means of NMES depends on different factors including both the parameters (number of sessions, frequency, pulse amplitude, intensity) and the method used to provide treatment (superficial or implanted electrodes).

It was also expected that the NMES in the ShamES group would inhibit increased mRNA levels of atrogenes in the Sham group in the first days after surgery but, as in the ACLES group, the stimulus only minimized mRNA levels. Thus, we believe that the contractions provoked by NMES alone were insufficient to inhibit these increases, possibly due to the AMI that was found to occur after joint capsule distension and injuries, which inhibits the full activation of the quadriceps.<sup>23</sup> Furthermore, studies applying NMES after ACL rupture have demonstrated that voluntary contractions favor a greater recruitment of motor units, which was recently shown to improve the quadriceps of subjects after ACL reconstruction.<sup>19</sup> Thus one of the main limitations of this study was the infeasibility of associating voluntary contractions with NMES and surface electrodes in rats.

In order to evaluate the effects of rapid increases in atrogenes expression, the levels of ubiquitinated proteins were evaluated in all muscles at 3 days. As expected, an accumulation of ubiquitinated proteins had occurred in all evaluated muscles of the

ACL and Sham groups. However, the levels of ubiquitinated protein remained elevated, despite attenuated atrogenes levels in some periods, until the third day in all evaluated muscles of NMES groups. Surprisingly, the loss of muscle mass was prevented during this period in all muscles, as was CSA in the VM. Accordingly, as observed in different models of atrophy, it is known that an accumulation of ubiquitinated protein can also result from reductions in accelerated proteolysis that have been promoted by proteasome inhibition.<sup>20,53</sup> Thus, we suppose that the accumulation of ubiquitinated protein in the NMES groups could have occurred due to increased atrogenes levels associated with lower proteolysis rates, thus delaying muscle mass loss in the VM and VL muscles during this period.

The positive effects of muscle contraction during the early phases of atrophy are more related to continued early phase protein synthesis than to reduced degradation, which becomes more prevalent subsequently.<sup>11</sup> Accordingly, it has been demonstrated that total muscle protein breakdown rates and 20S proteasome peptidase activities remained largely unchanged after a high-resistance exercise bout, despite increased rates of ubiquitin-conjugation immediately post-exercise, suggesting that this may be an important mechanism involved in the muscle remodeling response to high-resistance exercise.<sup>38</sup>

Exercise as a therapeutic modality can attenuate the loss of muscle mass even with higher levels of ubiquitinated protein and ubiquitin ligases, as has been demonstrated by Dupont-Versteegden et al. in a hindlimb suspension muscle disuse model.<sup>11</sup> Additionally, muscle mass loss could be prevented during increased mRNA levels of atrogen-1 by decreasing mRNA levels of myostatin, which may suppress the catabolic process by stimulating the anabolic pathway.<sup>1</sup>

Our data revealed altered mRNA levels of myostatin in all evaluated muscles in most evaluated periods. The main finding was that NMES inhibited myostatin mRNA in the first 2 days in the VM for both ACLES and ShameS. In the latter group, there was also inhibition in the VL at 3 and 7 days and in the RF on the first day. Regarding the ACL and Sham groups, higher mRNA levels of myostatin occurred when atrogen-1 and mRNA levels of MuRF-1 were diminishing or low, especially in the VL. When NMES did not inhibit myostatin mRNA, its levels were minimized. Thus, we believe that the myostatin response to NMES could also have influenced muscle mass maintenance in the VM and VL at 3 days and in the RF at 7 days. Nevertheless, further studies evaluating hypertrophic pathways in the quadriceps muscle after ACL rupture would be necessary to verify this hypothesis.

Accordingly, it was demonstrated that myostatin targets and inhibits the phosphorylation of the protein kinase AKT, also known as PKB, inducing proteolysis through increased levels of atrogen-1 in a FoxO1 dependent way.<sup>36</sup> Moreover, AKT inhibition by myostatin compromises the hypertrophic Akt/mTOR/p70S6K pathway.<sup>54</sup> Thus, we infer that myostatin could have a pivotal role after the ACL rupture, signaling protein breakdown through FoxO-1 downstream targets (i.e., atrogen-1 and MuRF-1) and impairing protein synthesis by inhibiting the Akt/mTOR/p70S6K pathway.

Although there were augmented levels of atrogen-1, MuRF-1 and myostatin from the first day in all evaluated muscles in the ACL and Sham groups, a reduction in muscle mass and CSA was first noticed at 3 and 7 days in the VM and VL respectively, with a reduction in RF mass beginning at 7 days. The same pattern occurred in the NMES groups, in which CSA reduction was first observed at 7 days in the VM and VL of ACLES, and at 7 days in the VM of ShameS. This sudden increase in atrogenes

expression followed by later changes in muscle mass and CSA was similar to the results of Sacheck et al.<sup>46</sup> in different models of muscle wasting as well as to other studies on muscle atrophy and atrogenes expression<sup>4,6</sup>.

Unlike the Sham and ShamES group, the animals from the ACL and ACLES groups had not recovered muscle mass or muscle fiber CSA in all muscles at 15 days. This could also be related to reduced gamma motor neuron activation after ACL rupture, which results in attenuation of Ia afferents that might cause a prolonged disuse of fast-twitch fibers innervated by high threshold motoneurons, thus limiting full muscle activation.<sup>27</sup> Moreover, the previous increases in atrogen-1 and MuRF-1 levels in VL, VM and RF in the ACLES and ACL groups and the augmented levels of atrogen-1 in RF and VM at 15 days in ACL group might have influenced the lack of quadriceps muscle mass recovery.

The RF is the only bi-articular muscle in the quadriceps, acting also as hip flexor. We believe that this dual function could have led to a greater muscle activity level than was present in the VL and VM muscles, preventing (despite the higher atrogenes levels) both muscle mass loss, which was observed only on the 7<sup>th</sup> day, and CSA reduction. Furthermore, NMES was effectively preserved RF muscle mass. Our results agree with previous studies showing that the VM and VL are the most affected muscles in the quadriceps after ACL injury.<sup>15, 34</sup> Moreover, Okuyama et al.<sup>(40)</sup> demonstrated increased levels of HSP72 only in the VM and VL muscles after ACL transection in a rat model. This study also attributed the lack of increased HSP72 levels in RF muscle to its bi-articular function.

We would like to point out that at 15 days the muscle mass and muscle fiber CSA reduction percentages in the VM and VL muscles of the ACL group remained close to the values found at 3 and 7 days in these muscles. Additionally, in every evaluated period, NMES caused a greater reduction in muscle mass and CSA than was observed in the ACL and Sham groups. These results indicate that the muscle mass reduction occurred during the first week and continued in the following days, despite NMES intervention. Thus, we might presume, based on these results, that the problem of quadriceps mass and CSA recovery in the first two weeks after ACL rupture could also be related to poor protein synthesis associated with previously sustained elevated atrogene levels. This assumption is reinforced by the fact that muscle mass recovery can occur while protein degradation rates are still elevated, as has been observed in septic rats.<sup>37</sup>

This study provides new information about the effects of NMES on the molecular mechanisms involved in quadriceps muscle atrophy after ACL rupture. This knowledge could help to improve rehabilitation interventions aiming to minimize the loss of muscle mass after ACL rupture and knee surgery.

## References

1. Adams GR, Haddad F, Bodell PW, Tran PD, Baldwin KM. Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats. *J Appl Physiol.* 2007 Nov;103(5):1644-54. Epub 2007 Sep 13.
2. Akima H, Furukawa T: Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial meniscectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005;13:632-7.

3. Arangio GA, Chen C, Kalady M, Reed JF 3rd. Thigh muscle size and strength after anterior cruciate ligament reconstruction and rehabilitation. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1997 Nov;26(5):238-43.
4. Bajotto G, Sato Y, Kitaura Y, Shimomura Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles *Eur J Appl Physiol.* 2011 Jan 11.
5. Baldi JC, Jackson RD, Moraille R, Mysiw WJ. Muscle atrophy is prevented in patients with acute spinal cord injury using functional electrical stimulation. *Spinal Cord* 1998;36:463–469.
6. Baptista IL, Leal ML, Artioli GG, Aoki MS, Fiamoncini J, Turri AO, Curi R, Miyabara EH, Moriscot AS. Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of ubiquitin ligases. *Muscle Nerve.* 2010 Jun;41(6):800-8.
7. Barker T, Leonard SW, Hansen J, Trawick RH, Ingram R, Burdett G, Lebold KM, Walker JA, Traber MG. Vitamin E and C supplementation does not ameliorate muscle dysfunction after anterior cruciate ligament surgery. *Free Radic Biol Med.* 2009 Dec 1;47(11):1611-8.
8. Carlson CJ, Booth FW, Gordon SE. Skeletal muscle myostatin mRNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol.* 1999 Aug; 277(2 Pt 2):R601-6.
9. Dow DE, Cederna PS, Hassett CA et al (2004) Number of contractions to maintain mass and force of a denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 30:77-86.

10. Dow DE, Faulkner JA, Dennis RG (2005) Distribution of rest periods between electrically generated contractions in denervated muscles of rats. *Artif Organs* 29:432-435.
11. 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*. 2006 Jul;101(1):202-12.
12. Fitzgerald GK, Piva SR, Irrgang JJ. A modified neuromuscular electrical stimulation protocol for quadriceps strength training following anterior cruciate ligament reconstruction. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2003; 33: 492-501.
13. Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2000 Aug;89(2):823-39.
14. Galbán CJ, Ling SM, Galbán CJ, Taub DD, Gurkan I, Fishbein KW, Spencer RG. Effects of knee injection on skeletal muscle metabolism and contractile force in rats. *Osteoarthritis Cartilage*. 2007 May; 15(5):550-8.
15. Gerber C, Hoppeler H, Claassen H, Robotti G, Zehnder R, Jakob RP. The lower extremity musculature in chronic symptomatic instability of the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg Am*. 1985;67:1034–1043.
16. Gerber JP, Marcus RL, Dibble LE, Greis PE, Burks RT, LaStayo PC. Effects of early progressive eccentric exercise on muscle structure after anterior cruciate ligament reconstruction. *J Bone Joint Surg Am*. 2007 Mar;89(3):559-70.

17. Gür H and Çakin N: Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:1534-41
18. 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*. 2006 Feb;100(2):433-41. Epub 2005 Oct 20.
19. Hasegawa S, Kobayashi M, Arai R, Tamaki A, Nakamura T, Moritani T. Effect of early implementation of electrical muscle stimulation to prevent muscle atrophy and weakness in patients after anterior cruciate ligament reconstruction. *J Electromyogr Kinesiol*. 2011 Feb 17.
20. Hobler SC, Tiao G, Fischer JE, Monaco J, Hasselgren PO. Sepsis-induced increase in muscle proteolysis is blocked by specific proteasome inhibitors. *Am J Physiol*. 1998 Jan;274(1 Pt 2):R30-7.
21. Hong Li & Shweta Malhotra & Ashok Kumar. Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy *J Mol Med* 2008;86:1113–1126.
22. Hopkins JT, Ingersoll CD, Krause BA, Edwards JE, Cordova ML. Effect of knee joint effusion on quadriceps and soleus motoneuron pool excitability. *Med Sci Sports Exerc*. 2001 Jan;33(1):123-6.
23. Hurley MV: The effects of joint damage on muscle function, proprioception and rehabilitation. *Man Ther* 1997;2:11-7.
24. Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee*. 2003 Mar;10(1):93-6.



25. Kim KM, Croy T, Hertel J, Saliba S. Effects of neuromuscular electrical stimulation after anterior cruciate ligament reconstruction on quadriceps strength, function, and patient-oriented outcomes: a systematic review. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2010 Jul;40(7):383-91.
26. Kim SJ, Roy RR, Kim JA, Zhong H, Haddad F, Baldwin KM, Edgerton VR. Gene expression during inactivity-induced muscle atrophy: effects of brief bouts of a forceful contraction countermeasure. *J Appl Physiol.* 2008 Oct;105(4):1246-54. Epub 2008 Jul
27. Konishi Y, Fukubayashi T, Takeshita D. Mechanism of quadriceps femoris muscle weakness in patients with anterior cruciate ligament reconstruction. *Scand J Med Sci Sports.* 2002 Dec;12(6):371-5.
28. Kostrominova TY, Dow DE, Dennis RG et al (2005) Comparison of gene expression of 2-mo denervated, 2-mo stimulated-denervated, and control rat skeletal muscles. *Physiol Genomics* 22:227-243.
29. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med.* 2004 Jul;82(7):434-48.
30. Lake DA. Neuromuscular electrical stimulation. An overview and its application in the treatment of sports injuries. *Sports Med.* 1992 May;13(5):320-36.
31. Lalani R, Bhasin S, Byhower F, Tarnuzzer R, Grant M, Shen R, Asa S, Ezzat S, Gonzalez-Cadavid NF. Myostatin and insulin-like growth factor-I and -II expression in the muscle of rats exposed to the microgravity environment of the NeuroLab space shuttle flight. *J Endocrinol.* 2000 Dec;167(3):417-28

32. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Mann DL, Reid MB. TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*. 2005 Mar;19(3):362-70.
33. Lima SC, Caierão QM, Peviani SM, Russo TL, Somazz MC, Salvini TF, Teodori RM, Minamoto VB. Muscle and nerve responses after different intervals of electrical stimulation sessions on denervated rat muscle. *Am J Phys Med Rehabil*. 2009 Feb;88(2):126-35.
34. Lorentzon R, Elmquist LG, Sjöström M, Fagerlund M, Fuglmeyer AR. Thigh musculature in relation to chronic anterior cruciate ligament tear: muscle size, morphology, and mechanical output before reconstruction. *Am J Sports Med*. 1989 May-Jun;17(3):423-9.
35. McCarthy JJ, Esser KA. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2010 May;13(3):230-5
36. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, Smith H, Sharma M, Kambadur R. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2006;209:501–514.
37. Minnaard R, Wagenmakers AJ, Combaret L, Attaix D, Drost MR, van Kranenburg GP, Schaart G, Hesselink MK. Ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic activity remains elevated after zymosan-induced sepsis in rats while muscle mass recovers. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Oct;37(10):2217-25.

38. Minnaard R. The acute effect of high-resistance exercise on rat muscle protein breakdown and ubiquitin-proteasome pathway activity. In Minnaard, R. Muscle wasting; the role of the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy and remodelling. MD Maastricht, Netherlands: Universiteit Maastricht. 2006 p.142 <http://www.nutrim.unimaas.nl/uk/04.html>
39. Natri A, Jarvinen M, Latvala K, Kannus P. Isokinetic muscle performance after anterior cruciate ligament surgery: long-term results and outcome predicting factors after primary surgery and late-phase reconstruction. *Int J Sports Med* 1996;17:223-8.
40. Okuyama R, Honda M, Fujiya H, Goto K, Sugiura T, Akema T. Expression of heat shock protein 72 in rat quadriceps muscles following anterior cruciate ligament resection. *J Orthop Sci.* 2003;8(2):213-7.
41. Prodromos CC, Han Y, Rogowski J, Joyce B, Shi K. A meta-analysis of the incidence of anterior cruciate ligament tears as a function of gender, sport, and a knee injury-reduction regimen. *Arthroscopy.* 2007 Dec;23(12):1320-1325.e6
42. Ramírez C, Russo TL, Sandoval MC, Durigan JLQ, Dentillo AA, Couto MAS, Salvini TF. Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation.* Nov 2011 90 (11):930-939.
43. Reardon KA, Davis J, Kapsa RM, Choong P, Byrne E. 2001. Myostatin, insulin like growth factor-1, and leukemia inhibitory factor mRNAs are upregulated in chronic human disuse muscle atrophy. *Muscle Nerve* 24(7):893–899.

44. Reid MB. Response of the ubiquitin-proteasome pathway to changes in muscle activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Jun;288(6):R1423-31
45. Russo TL, Peviani SM, Durigan JL, Gigo-Benato D, Delfino GB, Salvini TF. Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil*. 2010 Jul;31(1):45-57.
46. Satchek JM, Hyatt JPK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, Lecker SH, Goldberg AL. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J*. 2007;21, 140–155.
47. Snyder-Mackler L, Delitto A, Bailey SL, Stralka SW. Strength of the quadriceps femoris muscle and functional recovery after reconstruction of the anterior cruciate ligament. A prospective, randomized clinical trial of electrical stimulation. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77:1166-1173
48. Stevens JE, Mizner RL, Snyder-Mackler L. Neuromuscular electrical stimulation for quadriceps muscle strengthening after bilateral total knee arthroplasty: a case series. *J Orthop Sports Phys Ther*. 2004 Jan;34(1):21-9.
49. Stockmar C, Lill H, Trapp A, Josten C, Punkt K. Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochem*. 2006;108(5):335-42.
50. Stoop R, Buma P, Van Der Kraan P, Hollander AP, Billingham RC, Poole AR, Van Den Berg WB. Differences in type II collagen degradation between peripheral and

central cartilage of rat stifle joints after cranial cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2121-31.

51. Takarada Y, Takazawa H, Ishii N. Applications of vascular occlusion diminishes disuse atrophy of knee extensor muscles. *Med Sci Sports Exerc.* 2000 Dec;32(12):2035-9.

52. Tang Z, Yang L, Wang Y, Xue R, Zhang J, Huang W, Chen PC, Sung KL. Contributions of different intraarticular tissues to the acute phase elevation of synovial fluid MMP-2 following rat ACL rupture. *J Orthop Res.* 2009 Feb;27(2):243-8.

53. Tawa NE Jr, Odessey R, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *J Clin Invest.* 1997 Jul 1;100(1):197-203.

54. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009;296:C1258–C1270.

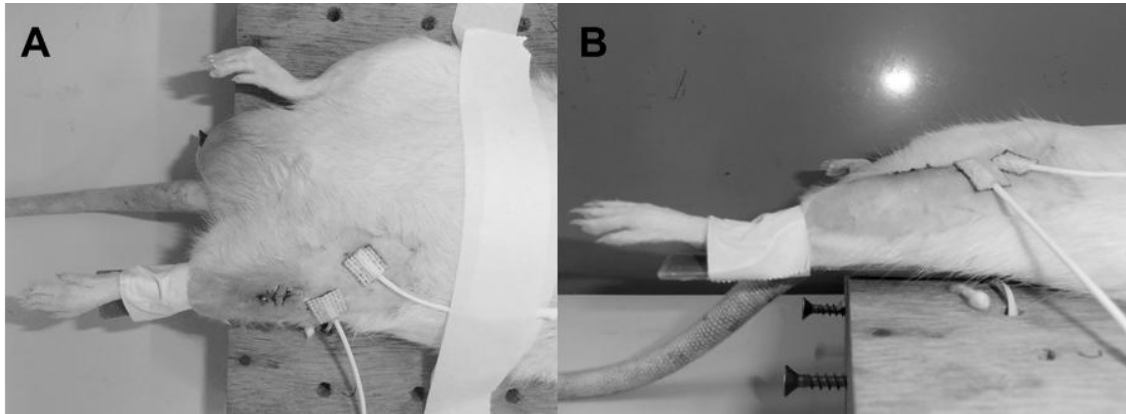
55. van Grinsven S, van Cingel RE, Holla CJ, van Loon CJ. Evidence-based rehabilitation following anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Aug;18(8):1128-44.

56. Williams GN, Snyder-Mackler L, Barrance PJ, Buchanan TS. Quadriceps femoris muscle morphology and function after ACL injury: a differential response in copers versus non-copers. *J Biomech.* 2005 Apr;38(4):685-93.

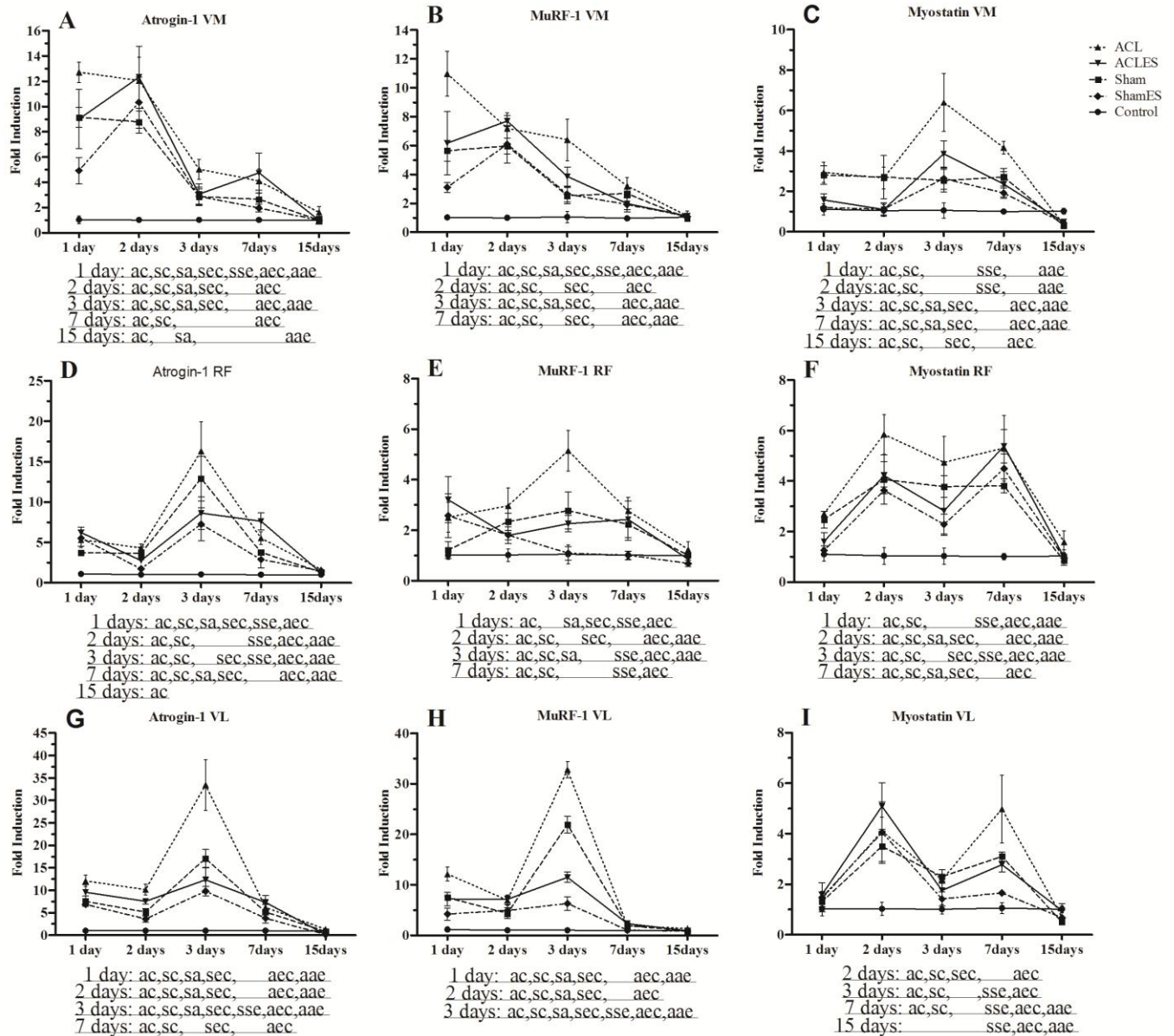
57. Wright RW, Preston E, Fleming BC, Amendola A, Andrich JT, Bergfeld JA, Dunn WR, et al. A systematic review of anterior cruciate ligament reconstruction

rehabilitation: part II: open versus closed kinetic chain exercises, neuromuscular electrical stimulation, accelerated rehabilitation, and miscellaneous topics. *J Knee Surg.* 2008 Jul;21(3):225-34.

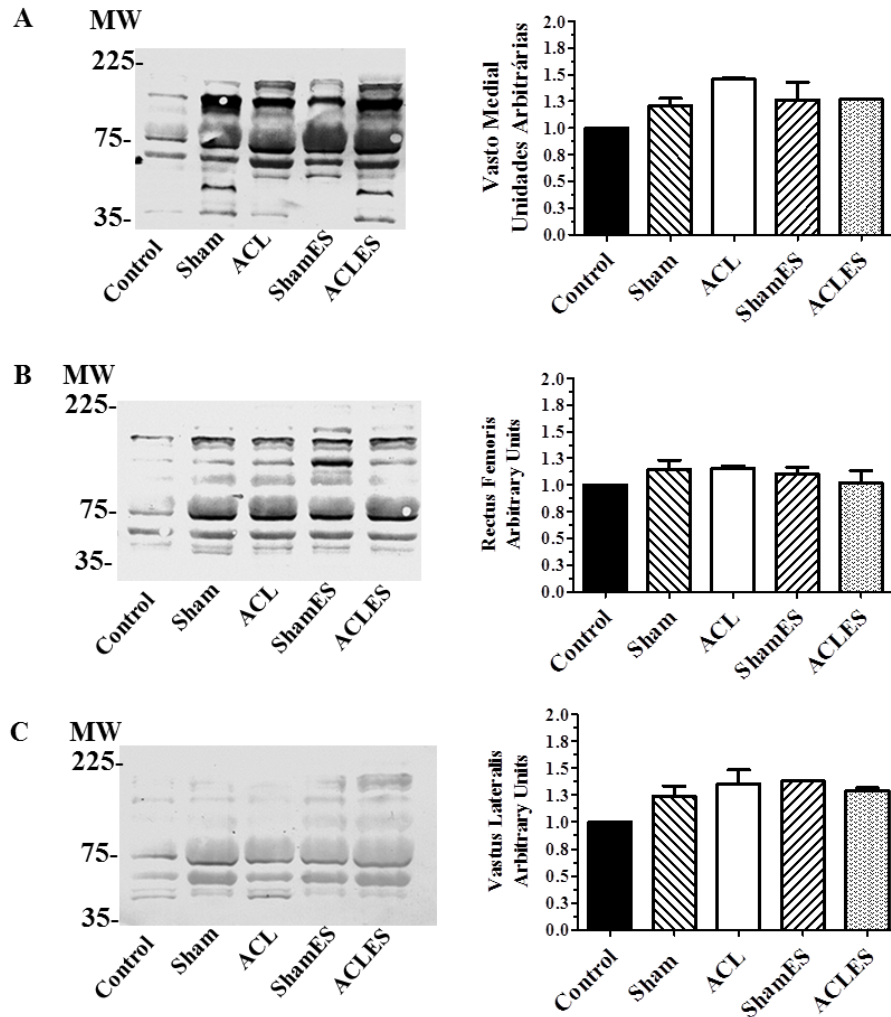
Figure



**Figure 1:** Picture showing the localization of electrodes for electrical stimulation procedure. A - Frontal view. B - Lateral view.

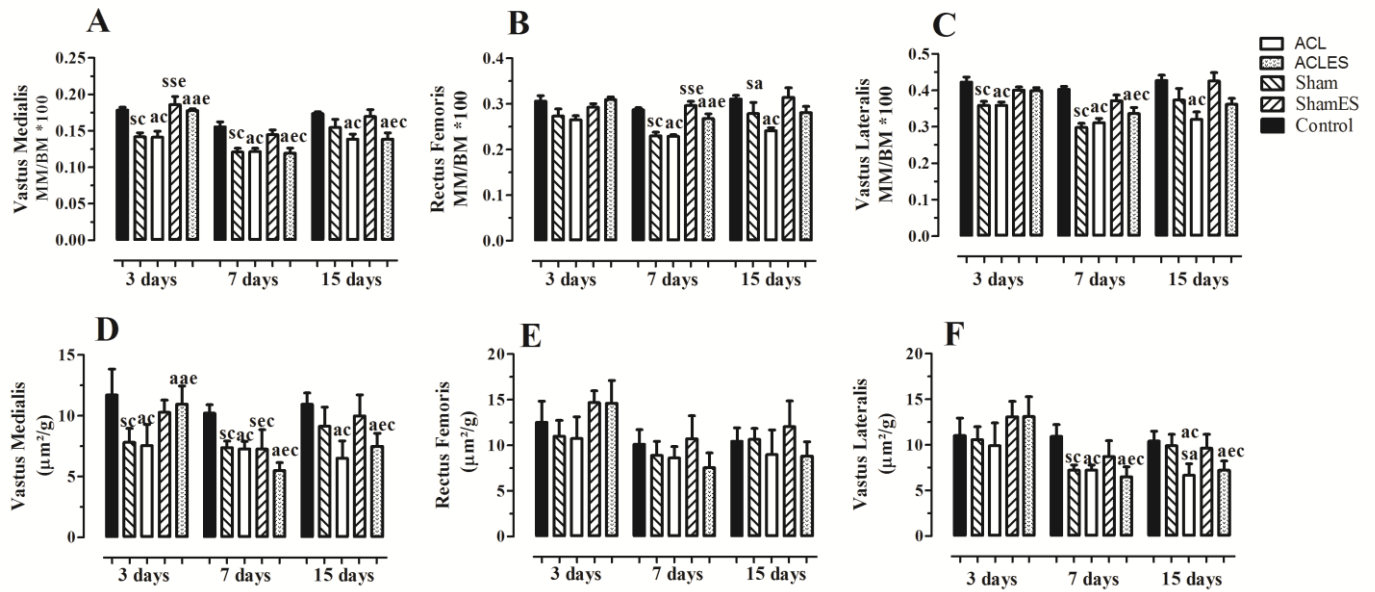


**Figure 2:** The mRNA levels of Atrogin-1 in Vastus Medialis (VM; A), Rectus Femoris (RF; D) and Vastus Lateralis (VL; G) muscles of the quadriceps. The mRNA levels of MuRF-1 in VM (B), RF (E) and VL (H) muscles. The mRNA levels of Myostatin in VM (C), RF (F) and VL (I) muscles. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. aec =  $p < 0,05$ : ACLES compared to Control group; ac =  $p < 0,05$ : ACL compared to Control group; aae =  $p < 0,05$ : ACL compared to ACLES group; sec =  $p < 0,05$ : ShamES compared to control group; sc =  $p < 0,05$ : Sham compared to Control group; sa =  $p < 0,05$ : Sham compared to ACL group; seae =  $p < 0,05$ : sse =  $p < 0,05$ : Sham compared to ShamES group.



**Figure 3:** Western Blots membranes of ubiquitinated protein conjugates at 3 days and respective densitometric optical membranes evaluation (arbitrary units) obtained from Vastus medialis (A), Rectus femoris (B) and Vastus Lateralis (C) muscles of quadriceps. MW: molecular weight.





**Figure 4:** The muscle mass/body mass ratio (MM/BM) and the cross sectional area/body mass ratio ( $\mu\text{m}^2/\text{g}$ ) of Vastus Medialis (A,D), Rectus Femoris (B,E) and Vastus Lateralis (C,F) of rat quadriceps muscles. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. aec=  $p < 0,05$ : ACLES compared to control; ac=  $p < 0,05$ : ACL compared to Control group; aae=  $p < 0,05$ : ACL compared to ACLES; ac=  $p < 0,05$ : ACL compared to Sham group; sec=  $p < 0,05$ : ShamES compared to control; sc =  $p < 0,05$ : Sham compared to Control group; sa=  $p < 0,05$ : Sham compared to ACL group; sse=  $p < 0,05$ : Sham compared to ShamES; sea=  $p < 0,05$ : ShamES compared to ACLES; sc=  $p < 0,05$ : Sham compared to Control group; sa =  $p < 0,05$ : Sham compared to ACL group.