

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

**ADAPTAÇÕES NEUROMUSCULARES NOS MÚSCULOS
QUADRÍCEPS E TIBIAL ANTERIOR ASSOCIADAS À
OSTEOARTRITE DE JOELHO (RATOS *WISTAR*)**

JONATHAN EMANUEL DA CUNHA

São Carlos
2020

**ADAPTAÇÕES NEUROMUSCULARES NOS MÚSCULOS
QUADRÍCEPS E TIBIAL ANTERIOR ASSOCIADAS À
OSTEOARTRITE DE JOELHO (RATOS *WISTAR*)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Fisioterapia. Área de concentração: Recursos fisioterapêuticos na dor, reparo tecidual e desempenho funcional.

DISCENTE

Jonathan Emanuel da Cunha

ORIENTADORA

Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini

Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos

São Carlos

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de ciências biológicas e da saúde
Programa de Pós-graduação em Fisioterapia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Jonathan Emanuel da Cunha, realizada em 27/03/2020:

Profa. Dra. Tania de Fátima Salvini
UFSCar

Prof. Dr. Anselmo Sigari Moriscot
USP

Profa. Dra. Elen Haruka Miyabara
USP

Profa. Dr. Paula Regina Mendes da Silva Serrão
UFSCar

Profa. Dr. Mariana Árias Avila Vera
UFSCar

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES - 001) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP– Processo nº 2016/24666-6 e 2017/24192-7).

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a você que está dispondo do seu bem mais precioso, o tempo, para poder compartilhar comigo minhas experiências durante este período. No decorrer deste texto não vou apenas descrever sobre minhas conquistas durante o período de doutorado direto, mas deixo registrado aqui uma parte de minha história. Que eu consiga fazer você se sentir feliz ao ler sobre todo caminho percorrido até agora, pois “felicidade é um instante, um segundo, um agora que conseguimos aproveitar ao máximo e queremos que nunca acabe” (Mario Sergio Cortella).

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pela minha família, principalmente meus pais, Edson e Dulci, por me motivarem e não medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Aos meus irmãos Juninho e Dayane por serem meus parceiros e por me incentivar a ir cada vez mais longe.

À minha esposa Débora, por ser minha companheira e me fortalecer nas dificuldades, ser paciente e bondosa e estar sempre ao meu lado. Que todo esforço se torne recompensa e que nossa família seja cada vez mais forte.

Agradeço imensamente minha orientadora Tania Salvini que me acolheu como seu aluno e amigo, assim pude aprender várias lições profissionais e também lições de vida. Me inspiro muito em você, e quero agradecer por me deixar fazer parte da sua equipe e por poder compartilhar com você meus sonhos, meus objetivos e minhas conquistas.

Pelo apoio dos meus colegas de laboratório, principalmente a Germanna que ajudou muito em todas as coletas a as dificuldades diárias dos experimentos e à minha coorientadora Paula Aiello, que me ensinou muito e ajudou nas ideias de execução dos projetos, vocês colaboraram muito na minha formação acadêmica. A todos colegas, também muito especiais, Glauko, Jean, Ana Elisa, Lucas, Angélica, Ivana, e Maíra que compartilharam comigo seu conhecimento e suas perspectivas, a amizade que fortalecemos é o que irei sentir mais falta.

Por todo apoio técnico que recebi da Teresa do DFisio, Paulo DMP e Lara DPsicó e agradeço ao aprendizado obtido na orientação das alunas de iniciação científica Beatriz, Andreza, Lizandra e Dafiner, pois há um aprendizado mútuo quando se ensina.

Por fim, agradeço aos colaboradores Professor Dr. Thiago Russo que muito me ensinou sobre as rotinas de laboratório e esteve por perto como amigo todo período de UFSCar, ao Professor Dr. Fernando Vasilseac, Tiago Cunha e Fernando Cunha que conseguiram trazer toda experiência profissional para melhor execução deste projeto.

RESUMO

A osteoartrite de joelho (OAJ) é uma das doenças que mais causa incapacidade no mundo. Essa doença é caracterizada por danos na cartilagem, estreitamento do espaço articular, sinovite, formação de osteófitos, dor e rigidez articular. O sistema neuromuscular é muito afetado na OAJ, porém, os mecanismos de alterações neuromusculares envolvidos com essa doença são pouco esclarecidos. Assim, esta tese tem dois objetivos principais: 1) Avaliar se há modificações nas junções neuromusculares (JNM) em ratos com OAJ induzida por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA); 2) Verificar se há fibrose muscular na OAJ e correlacionar com atrofia e inflamação muscular. Foram realizados dois estudos, para o primeiro estudo 12 ratos Wistar adultos foram divididos em dois grupos: controle (sem intervenção, n=6) e OAJ (cirurgia de TLCA, n=6), após 59 dias foram realizados os testes funcionais (teste de marcha, dor, edema, temperatura da superfície do joelho). No dia seguinte os animais foram eutanasiados, os músculos quadríceps, tibial anterior (TA) e gastrocnêmio foram retirados pesados e analisados (área transversal das fibras musculares, morfologia da junção neuromuscular e expressão gênica e proteica), o líquido sinovial foi usado para avaliar o número de leucócitos total, contagem diferencial e a articulação do joelho foi usada para avaliar a histologia articular. No segundo estudo 12 Ratos Wistar adultos foram igualmente divididos nos grupos controle e OAJ. 59 dias depois da TLCA foram realizados testes funcionais (teste de marcha, sensibilidade térmica e sensibilidade mecânica), no dia seguinte o músculo TA foi retirado para análises (área de seção transversal, porcentagem de tecido conectivo, expressão gênica e zimografia). Os principais resultados encontrados no primeiro estudo foram a modificação da morfologia da JNM no quadríceps e TA, maior atrofia do TA que no quadríceps, mudanças genéticas e proteicas ligadas a atrofia e à JNM, além de mudanças no teste de marcha e testes funcionais. No segundo foi observado fibrose muscular no TA associada a atrofia e maior expressão de genes ligados a inflamação muscular. Nossos resultados em ambos os estudos ajudam a esclarecer os possíveis mecanismos de atrofia e fraqueza muscular observados na OAJ. Vimos que apesar da maioria dos estudos avaliar apenas o músculo quadríceps, o músculo TA também parece sofrer modificações decorrentes da inflamação articular do joelho, assim novos estudos podem ajudar a compreender ainda melhor os mecanismos remodelamento do TA, colocando em evidência que é preciso um amplo olhar para o tratamento clínico dessa doença.

Palavras chave: Osteoartrite de joelho; junção neuromuscular, atrofia, fibrose, inflamação, tibial anterior.

ABSTRACT

Knee osteoarthritis (KOA) is one of the most disabling diseases in the world. This disease is characterized by cartilage damage, narrowing of the joint space, synovitis, osteophytes formation, joint pain and stiffness. The neuromuscular system is also very affected in KOA, however, the mechanisms of neuromuscular changes involved with this disease are poorly understood. Thus, this thesis has two main objectives: 1) Assess for changes in the neuromuscular junctions (NMJ) in rats with induced KOA anterior cruciate ligament transection (TLCA); 2) Check for KOA muscle fibrosis and correlates with muscle atrophy and inflammation. For the first study, 12 adult Wistar rats that were divided into two groups: control (without intervention, n = 6) and KOA (ALCT surgery, n = 6), after 59 days, functional tests were performed (gait test, pain, edema, knee surface temperature). In the next day the animals were euthanized, the quadriceps, tibialis anterior (TA) and gastrocnemius muscles were removed weighed and analyzed (cross sectional area of the muscle fibers, neuromuscular junction morphology, gene and protein expression), the synovial fluid was used to evaluate the total and differential leukocyte number and joint histology were also analyzed. In the second study 12 adult Wistar rats were equally divided into the control and KOA groups. 59 days after TLCA, functional tests were performed (gait test, thermal threshold and mechanical threshold), the following day the TA muscle was removed for analysis (cross-sectional area, percentage of connective tissue, gene expression and zymography). The main results found in the first study were changes in the morphology of NMJ in the quadriceps and TA, greater atrophy in TA than in the quadriceps, genetic and protein changes linked to atrophy and NMJ, in addition to changes in the gait test and functional tests. In the second study, we found muscle fibrosis in TA associated with atrophy and increased of genes expression linked to muscle inflammation. Our results in both studies help to clarify the possible mechanisms of atrophy and muscle weakness linked with KOA. We have seen that although most of the studies evaluate only the quadriceps muscle, TA muscle also seems to suffer modifications due to joint inflammation of the knee, so new studies may help to understand even better the TA remodeling mechanisms, putting on shows that it takes a broad look at the clinical treatment of this disease.

Keywords: Knee osteoarthritis, neuromuscular junction, muscle atrophy, fibrosis, inflammation, tibialis anterior muscle.

LISTA DE FIGURAS

CONTEXTUALIZAÇÃO:

Figura 1. Vias de sinalização da atrofia muscular. Fonte: Bonaldo & Sandri (2013).

Figura 2. Arquitetura da junção neuromuscular. Fonte: Gonzalez-freire et al. (2014).

ARTIGO 1:

Figura 1. Desenho experimental. Figura representativa das análises e tempo do estudo. OAJ: osteoartrite de joelho, TLCA: transecção do ligamento cruzado anterior.

Figura 2. Morfologia das junções neuromusculares (Técnica de Esterase não Específica). Grupo Controle: quadríceps (A) e TA (C); grupo OAJ: quadríceps (B) e TA (D). Escala de barra: 10 μ m, objetiva = 40X.

Figura 3. Expressão de mRNA nos músculos quadríceps e TA dos grupos controle e osteoartrite de joelho (OAJ) respectivamente: Atrogin-1 (A e B); MuRF-1 (C e D); α -nAChR; (E e F); ϵ -nAChR; (G e H) γ -nAChR; (I e J); MuSK (K e L); Agrin (M e N). *p < 0.05; **p < 0.01, OAJ comparado ao grupo Controle.

Figura 4. Expressão proteica. Expressão das proteínas MuRF-1 e NCAM no músculo quadríceps (QD; A,C,E) e tibial anterior (TA; B,D,F), *p < 0.05, grupo osteoartrite de joelho (OAJ) comparado ao Controle.

Figura 5. Teste de marcha. Área da pata (A): representação do teste no grupo Controle (B) e osteoartrite de joelho (OAJ; C); Largura da pata (D): representação do teste no grupo Controle (E) e OAJ (F); Distância da passada (G): representação do teste no grupo Controle (H) e OAJ (I). **p < 0.01 e *p < 0.05, grupo OAJ comparado ao grupo Controle.

Figura 6. Sinais Inflamatórios. Temperatura superficial do joelho (A); Edema de joelho (B); Neutrófilos (C); Escore Mankin (D); Histologia articular do joelho, representação do grupo Controle (E), representação do grupo OAJ (F) coloração de SafraninaO. Escala de Barra: 50 μ m, objetiva: 20X. **p < 0.01, grupo osteoartrite de joelho (OAJ) comparado ao grupo Controle.

ARTIGO 2:

Figura 1. Linha do tempo dos procedimentos: transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA); osteoartrite de joelho (OAJ); tibial anterior (TA).

Figura 2. Teste de marcha do grupo controle e osteoartrite de joelho (OAJ), n=6/grupo. As imagens a direita são representativas das impressões das patas dos animais usadas para análise. Média \pm EPM. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

Figura 3. Teste de limiar de resposta térmica e teste de limiar de resposta mecânica. Nos grupos controle e osteoartrite de joelho (OAJ), n=6/grupo. Média \pm EPM. **: $p < 0.01$.

Figura 4. Expressão gênica de mRNA por PCR em tempo real no músculo tibial anterior (TA) de ratos Wistar. Grupos controle e osteoartrite de joelho (OAJ), n=6/grupo. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias. Média \pm EPM. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Análise morfométrica das junções neuromusculares (JNM; área, dispersão, perímetro e diâmetro máximo) e da área de secção transversal das fibras musculares (AST) dos músculos quadríceps, gastrocnêmio e tibial anterior (TA). Dados expressos em média± SEM, *p < 0.05, **P < 0.01, grupo osteoartrite de joelho (OAJ) comparado ao grupo Controle.

Tabela suplementar 1. Perda de animais durante os experimentos.

Tabela suplementar 2. Sequência de primers para qPCR.

Tabela suplementar 3. Sistema de Gradação Histológico- Histoquímico de Mankin (Modificado).

ARTIGO 2

Tabela 1. Grupos controle e osteoartrite de joelho (OAJ; massa corporal, área de secção transversal das fibras musculares do tibial anterior e porcentagem de tecido conectivo). Área de secção transversal (AST) das fibras musculares: 100 fibras musculares por animal. **: p<0.01.

Tabela 2. Correlação de Pearson. *: p<0.05, **p<0.01. AST: área de secção transversal das fibras musculares; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; NF-kB: fator nuclear kappa B; MuRF-1: *muscle ring finger – 1*; TWEAK: fator de necrose tumoral ligado ao indutor de apoptose; Fn14: fator de crescimento de fibroblastos 14.

Tabela suplementar 1: Sequência de primers para qPCR no músculo tibial anterior de ratos Wistar. IL-6: Interleucina 6; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; NF-kB: fator nuclear kappa B; MuRF-1: *muscle ring finger – 1*; TWEAK: fator de necrose tumoral ligado ao indutor de apoptose; Fn14: fator de crescimento de fibroblastos 14; PPIA: peptidilprolil isomerase A.

PRINCIPAIS ABREVIATURAS

Ach - acetilcolina
AST - área de secção transversal
Atroginal - *muscle atrophy Fbox1*
cDNA - DNA complementar
CRID - Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias
DNA - ácido desoxirribonucléico
EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético
EPM - erro padrão da média
Fn14 - fator de crescimento de fibroblastos 14
GAPDH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HPR - hipoxantina – guanina fosforibosiltransferase
IL - Interleucina
JNM - junção neuromuscular
LCA - ligamento cruzado anterior
MMP - metaloproteinase
mRNA - RNA mensageiro
MuRF-1 - *muscle ring finger-1*
MuSK - receptor de tirosina quinase
N-CAM - molécula de adesão celular neural
nAChR - receptor nicotínico de acetilcolina
NF- κ B - nuclear factor κ B;
OAJ - osteoartrite de joelho
PBS - solução salina tamponada com fosfato
PPLA - *peptidilprolil isomerase A*
PPLB - *peptidilprolil isomerase B*
qPCR - reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativo
RNA - ácido ribonucleico
SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*
TA - Tibial anterior
TGF- β - fator transformante de crescimento β
TLCA - transecção do ligamento cruzado anterior
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
TWEAK- fator de necrose tumoral ligado ao indutor de apoptose
UFSCar - Universidade Federal de São Carlos
USP - Universidade de São Paulo
 β ACT - beta-citoesquelética actina

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	11
Figura 1.	12
Figura 2.	13
Referências:	14
1. ESTUDO I.	17
Resumo	18
1.1. Introdução	19
1.2. Materiais e métodos	20
1.3. Resultados	25
1.4. Discussão	26
1.5. Conclusão	29
1.6. Figuras e Tabelas	30
1.7. Referências	40
2. ESTUDO II	46
Resumo	47
2.1. Introdução	48
2.2. Materiais e Métodos	49
2.3. Resultados	52
2.4. Discussão	54
2.5. Figuras e Tabelas	57
2.6. Referências	64
3. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADA À TESE	69
4. ANEXOS	72
A – Parecer do Comitê de ética animal	73
B - Artigo 1 completo	74
C - Carta de Submissão Artigo 2	85

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Osteoartrite é uma forma comum de artrite, que atinge grande parte da população mundial e sua incidência tem crescido cada vez mais (CROSS et al., 2014). A doença apresenta alguns sinais e sintomas: danos na cartilagem, estreitamento do espaço articular, sinovite, formação de osteófitos, dor e rigidez articular (SHARMA, 2016). Esse processo inflamatório e degenerativo pode afetar outros tecidos como músculos, ligamentos e osso subcondral (BENNELL; HALL; HINMAN, 2016). Conseqüentemente há redução da qualidade de vida e incapacidade funcional (NEOGI, 2013).

O joelho é a articulação dos membros inferiores mais acometida pela osteoartrite (DULAY; COOPER; DENNISON, 2015). Estima-se que a osteoartrite de joelho (OAJ) acomete mais de 250 milhões de pessoas no mundo (VOS et al., 2012). Modelo de OAJ pós-traumática, como a ruptura do ligamento cruzado anterior (LCA), estão fortemente associadas ao risco de desenvolvimento da OAJ (AJUIED et al., 2014). Já a transecção do LCA (TLCA) em animais promove alterações fisiológicas típicas da OAJ humana (FANG; BEIER, 2014). Por isso, a TLCA tem sido amplamente usada para induzir OAJ pós-traumática em animais.

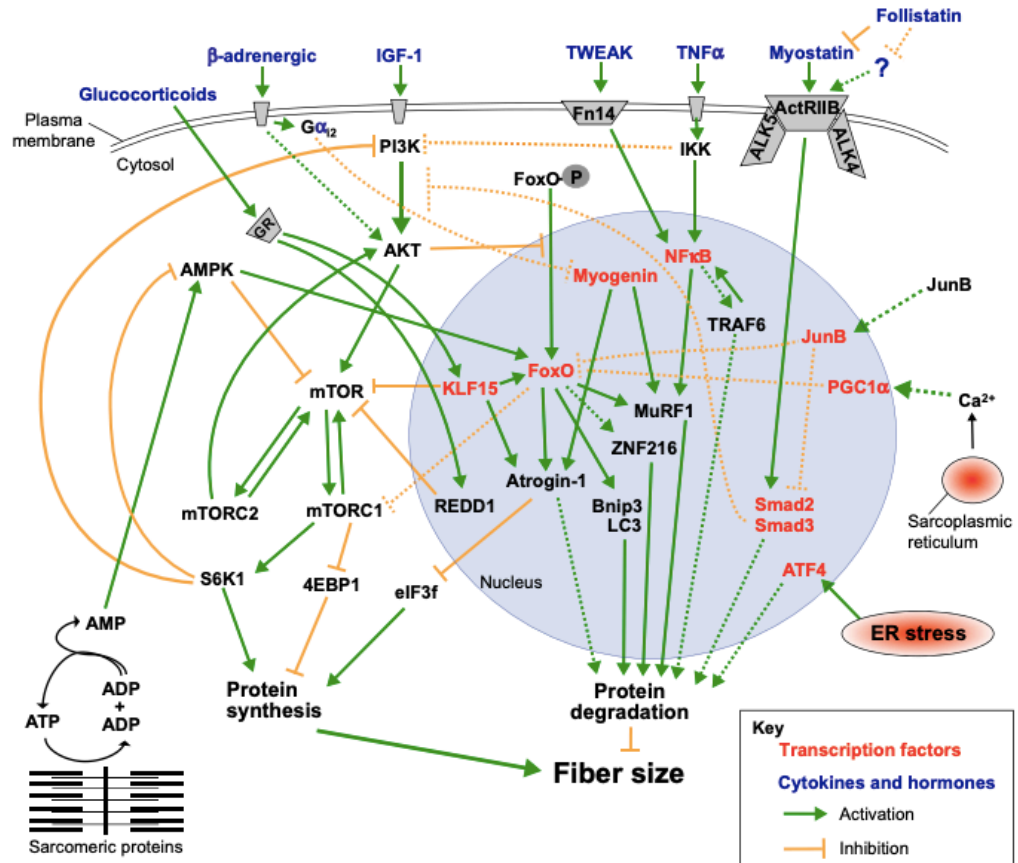
Na OAJ os músculos desempenham um papel fundamental, principalmente para absorver a descarga de peso durante as atividades de vida diária. Além disso, a fraqueza muscular acelera o processo de destruição da cartilagem (ROOS et al., 2011), além de promover alterações biomecânicas no movimento (IGAWA; KATSUHIRA, 2014) e aumentar a sobrecarga articular (AMIN et al., 2009; RICE; MCNAIR; LEWIS, 2011). Uma das principais vias envolvidas com a atrofia é a via ubiquitina-proteassoma. Esse é um sistema complexo que pode ser regulado por diversos mecanismos, Figura 1.

Uma das vias reguladoras da atrofia é mediada pelo fator de necrose tumoral α (TNF α), que ativa o fator nuclear Kappa B (NF- κ B), levando a aumento de *muscle atrophy Fbox-1* (Atrogina1) e *Muscle Ring Finger-1* (MuRF-1), conhecidos como atrogenes, pois o aumento da expressão desses genes está relacionado ao aumento da atrofia (BONALDO; SANDRI, 2013; FOLETTA et al., 2011; GUMUCIO; MENDIAS, 2013).

Sabe-se também que a fibrose muscular tem íntima relação com a atrofia muscular (GARG; CORONA; WALTERS, 2015; MAHDY, 2019). A fibrose é caracterizada por um acúmulo excessivo de componentes da matriz extracelular, principalmente colágeno,

levando a formação de cicatriz (MAHDY, 2019). Visto o importante papel da fibrose muscular na atrofia, é importante avaliar se há esse tipo de alteração relacionado com a fraqueza muscular observada na OAJ.

Figura 1. Vias de sinalização da atrofia muscular.

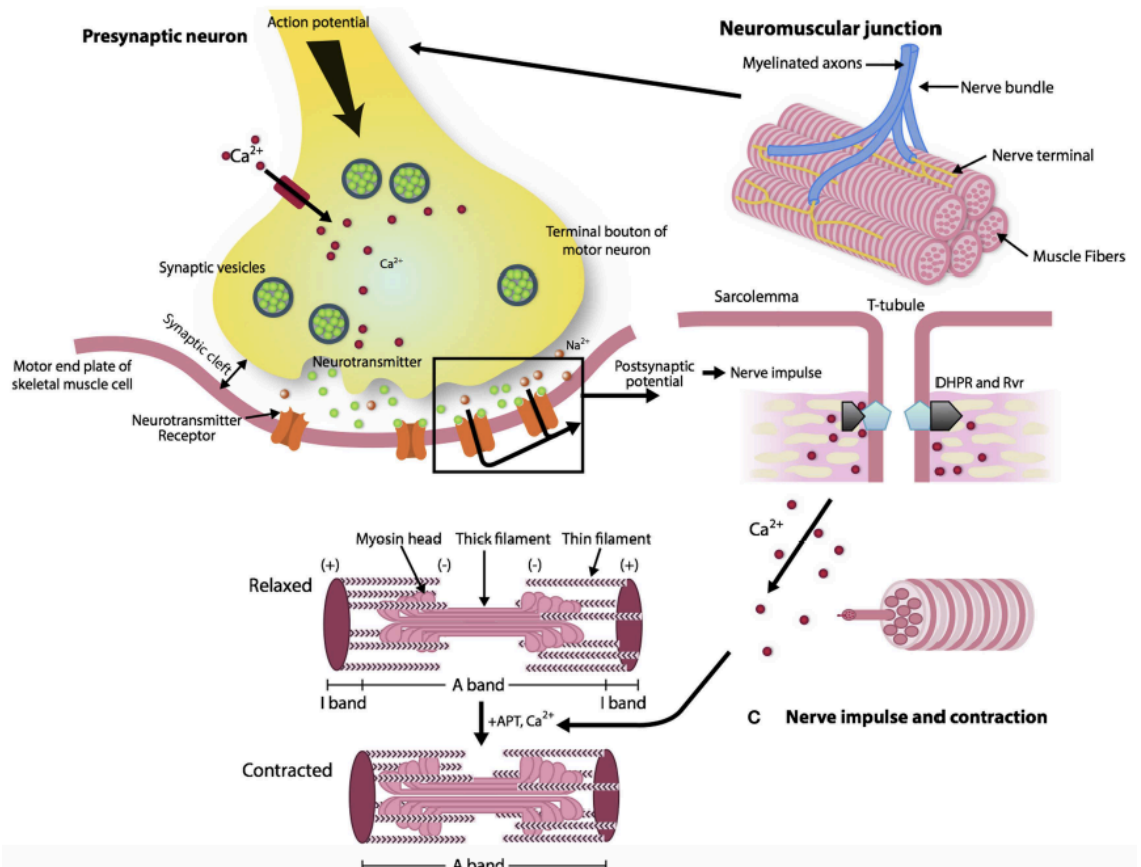


Fonte: Bonaldo & Sandri (2013).

No sistema musculo esquelético estruturas como a junção neuromuscular (JNM) são muito importantes para a dinâmica muscular e podem estar associadas à fraqueza muscular na OAJ (BENNELL; HALL; HINMAN, 2016). A JNM é estrutura complexa, composta por compartimento pré-sináptico, espaço sináptico e membrana pós-sináptica, Figura 2. A JNM converte uma sinapse química para a transmissão de um sinal elétrico do terminal nervoso para a fibra muscular (ENGEL, 2003). O potencial de ação do nervo ocasiona a liberação da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor químico que atua nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) localizados na membrana pós-sináptica, promovendo a contração muscular (WILLMANN; FUHRER, 2002). Modificações nas JNM ou nos nAChR, ligados à contração muscular, comprometem a geração de força e podem levar a fraqueza e atrofia muscular (HUGHES; KUSNER; KAMINSKI, 2006).

Estudos anteriores mostram que diferentes condições podem modificar a arquitetura da JNM, como o envelhecimento (GONZALEZ-FREIRE et al., 2014), miastenia gravis (KALAMIDA et al., 2007), distrofias musculares (MARQUES et al., 2007), doenças cardíacas (SOUZA et al., 2011), e até mesmo o exercício físico (DESCHENES et al., 2000), contudo, não encontramos estudos buscando modificações nas JNM na OAJ.

Figura 2. Arquitetura da junção neuromuscular.



Fonte: Gonzalez-freire et al. (2014).

Contudo, não encontramos estudos na literatura investigando a quantidade de tecido conjuntivo na OAJ e suas relações com a atrofia e prejuízos funcionais. Além disso, nenhum estudo buscou avaliar se há modificações nas junções neuromusculares que são fundamentais para a função muscular na osteoartrite de joelho. Com isso, nossa hipótese é que a OAJ leva a modificações nas junções neuromusculares e aumento do tecido conjuntivo e que essas alterações estão associadas a atrofia e prejuízos funcionais em animais.

Referências:

- AJUIED, Adil; WONG, Fabian; SMITH, Christian; NORRIS, Mark; EARNSHAW, Peter; BACK, Diane; DAVIES, Andrew. Anterior cruciate ligament injury and radiologic progression of knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. **The American journal of sports medicine**, [S. l.], v. 42, n. 9, p. 2242–52, 2014.
- AMIN, Shreyasee; BAKER, Kristin; NIU, Jingbo; CLANCY, Margaret; GOGGINS, Joyce; GUERMAZI, Ali; GRIGORYAN, Mikayel; HUNTER, David J.; FELSON, David T. Quadriceps strength and the risk of cartilage loss and symptom progression in knee osteoarthritis. **Arthritis and Rheumatism**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 189–198, 2009.
- BENNEL, K. L.; HALL, M.; HINMAN, R. S. Osteoarthritis year in review 2015: rehabilitation and outcomes. **Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 58–70, 2016.
- BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease Models & Mechanisms**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 25–39, 2013.
- CROSS, Marita et al. The global burden of hip and knee osteoarthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [S. l.], v. 73, n. 7, p. 1323–1330, 2014.
- DESCHENES, M. R.; JUDELSON, D. A.; KRAEMER, William J.; MESKAITIS, V. J.; VOLEK, Jeff S.; NINDL, B. C.; HARMAN, F. S.; DEEVER, D. R. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. **Muscle nerve**, [S. l.], v. 23, n. 10, p. 1576–1581, 2000.
- DULAY, Gurdeep S.; COOPER, C.; DENNISON, E. M. Knee pain, knee injury, knee osteoarthritis & work. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 454–461, 2015.
- ENGEL, Andrew G. **The neuromuscular junction**. 3. ed. New York.
- FANG, Hang; BEIER, Frank. Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. **Nature Reviews Rheumatology**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 413–421, 2014.
- FOLETTA, Victoria C.; WHITE, Lloyd J.; LARSEN, Amy E.; LÉGER, Bertrand; RUSSELL, Aaron P. The role and regulation of MAFbx/atrogen-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, [S. l.], v. 461, n. 3, p. 325–335, 2011.
- GARG, Koyal; CORONA, Benjamin T.; WALTERS, Thomas J. Therapeutic strategies

for preventing skeletal muscle fibrosis after injury. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 6, n. APR, p. 1–9, 2015.

GONZALEZ-FREIRE, Marta; DE CABO, Rafael; STUDENSKI, Stephanie A.; FERRUCCI, Luigi. The Neuromuscular Junction: Aging at the Crossroad between Nerves and Muscle. **Frontiers in Aging Neuroscience**, [S. l.], v. 6, n. AUG, p. 1–11, 2014.

GUMUCIO, Jonathan P.; MENDIAS, Christopher L. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. **Endocrine**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 12–21, 2013.

HUGHES, Benjamin W.; KUSNER, Linda L.; KAMINSKI, Henry J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. **Muscle & Nerve**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 445–461, 2006.

IGAWA, Tatsuya; KATSUHIRA, Junji. Biomechanical analysis of stair descent in patients with knee osteoarthritis. **Journal of Physical Therapy Science**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 629–631, 2014.

KALAMIDA, Dimitra; POULAS, Konstantinos; AVRAMOPOULOU, Vassiliki; FOSTIERI, Efrosini; LAGOUMINTZIS, George; LAZARIDIS, Konstantinos; SIDERI, Anastasia; ZOURIDAKIS, Marios; TZARTOS, Socrates J. Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors: Structure, function and pathogenicity. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 274, n. 15, p. 3799–3845, 2007.

MAHDY, Mohamed A. A. Skeletal muscle fibrosis: an overview. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], v. 375, n. 3, p. 575–588, 2019.

MARQUES, Maria Julia; TANIGUTI, Ana Paula Tiemi; MINATEL, Elaine; NETO, Humberto Santo. Nerve terminal contributes to acetylcholine receptor organization at the dystrophic neuromuscular junction ofmdx mice. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, [S. l.], v. 290, n. 2, p. 181–187, 2007.

NEOGI, Tuhina. The Epidermiology and Impact of Pain in Osteoarthritis. **Osteoarthritis Research Society**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 1145–1153, 2013.

RICE, David A.; MCNAIR, Peter J.; LEWIS, Gwyn N. Mechanisms of quadriceps muscle weakness in knee joint osteoarthritis: The effects of prolonged vibration on torque and muscle activation in osteoarthritic and healthy control subjects. **Arthritis Research and Therapy**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 1–10, 2011.

ROOS, Ewa M.; HERZOG, Walter; BLOCK, Joel a; BENNELL, Kim L. Muscle weakness, afferent sensory dysfunction and exercise in knee osteoarthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 57–63, 2011.

SHARMA, L. **Osteoarthritis year in review 2015: Clinical Osteoarthritis and Cartilage**, 2016.

SOUZA, Paula Aiello Tomé; MATHEUS, Selma Maria Michelin; CASTAN, Eduardo Paulino; CAMPOS, Dijon Henrique Salomé; CICOGNA, Antônio Carlos; CARVALHO, Robson Francisco; DAL-PAI-SILVA, Maeli. Morphological aspects of neuromuscular junctions and gene expression of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) in skeletal muscle of rats with heart failure. **Journal of Molecular Histology**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 557–565, 2011.

VOS, Theo et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, [S. l.], v. 380, n. 9859, p. 2163–2196, 2012.

WILLMANN, R.; FUHRER, C. Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, [S. l.], v. 59, n. 8, p. 1296–1316, 2002.

1. ESTUDO I.

Osteoartrite de joelho induz atrofia e remodelamento da junção neuromuscular nos músculos quadríceps e tibial anterior de ratos

Jonathan Emanuel Cunha¹, PT, MSc; Germanna Medeiros Barbosa¹, PT, MSc; Paula Aiello Tomé de Souza Castro¹, PhD; Beatriz Leite Ferreira Luiz¹, PT; Andreza Cristine Arcari Silva¹, PT; Thiago Luiz de Russo¹, PT, MSc, PhD; Fernando Augusto Vasilceac², MSc, PhD; Thiago Mattar Cunha³, MSc, PhD; Fernando Queiróz Cunha³; Tania Fátima Salvini¹, PT, MSc, PhD.

1 Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; 2 Departamento de Gerontologia Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; 3 Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Artigo publicado no periódico *Scientific Reports* (Fator de impacto: 4,122)

Resumo

A osteoartrite do joelho (OAJ) é comumente associada à fraqueza muscular, porém não está claro quais estruturas estão envolvidas com as alterações musculares na OAJ. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações morfológicas e a expressão de genes e proteínas ligados à atrofia muscular e às junções neuromusculares (JNM) na OAJ, induzida pela transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). Ratos Wistar adultos foram divididos aleatoriamente em 2 grupos ($n = 6$ / grupo): controle (sem intervenção) e OAJ (cirurgia de TLCA no joelho direito). Após 8 semanas, foram analisados os músculos quadríceps, tibial anterior (TA) e gastrocnêmio (área de secção transversal das fibras musculares, morfologia da junção neuromuscular e expressão gênica e proteica). Marcha, dor, edema, temperatura da superfície do joelho, número de leucócitos do líquido sinovial e histologia articular também foram analisados. O grupo OAJ apresentou atrofia nas fibras musculares do quadríceps (15,7%) e TA (33%), com aumento da atrogina-1 e MuRF-1, sem alteração no músculo gastrocnêmio, em comparação com o controle. O grupo OAJ mostrou remodelamento da JNM no quadríceps (redução na área e no perímetro) e uma diminuição no diâmetro da JNM no músculo TA, sem modificações no gastrocnêmio. A expressão do receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR), γ -nAChR aumentou e a do α -nAChR e tirosina quinase específica do músculo (MuSK) diminuiu no quadríceps, com uma diminuição no ϵ -nAChR no TA, em comparação ao controle. A expressão da proteína MuRF-1 aumentou nos músculos quadríceps e TA, sem alterações na expressão da proteína da molécula de adesão celular neural (N-CAM). Houve também comprometimento da marcha, edema, aumento da temperatura superficial do joelho, aumento da migração de leucócitos no líquido sinovial e sinais histológicos compatíveis com a OAJ. Assim, concluímos que a OAJ induzida por TLCA em ratos promove modificações nas JNM e atrofia nos músculos quadríceps e TA, associados a sinais inflamatórios, alterações na marcha e mudança na expressão de genes e proteínas ligados a JNM e a atrofia.

Palavras-chave: Vias de sinalização, receptor de acetilcolina, região sináptica da fibra muscular; unidade motora; placa motora, atrofia muscular; fraqueza muscular; inflamação das articulações.

1.1. Introdução

A osteoartrite do joelho (OAJ) é uma doença comum que afeta mais de 250 milhões de pessoas em todo o mundo (1). É caracterizada por um distúrbio inflamatório crônico, degenerativo (2) que danifica a cartilagem, estreita o espaço intra-articular e pode levar a formação de osteófitos (3). Indivíduos com OAJ apresentam dor, inchaço, rigidez articular e perda de função (4), com declínio na qualidade de vida e na capacidade funcional (5). A transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA) em ratos é considerada um bom modelo para o estudo da OAJ, pois promove alterações semelhantes a OAJ de humanos (6), como erosão profunda da cartilagem articular e formação de osteófitos (7). Além disso, estudos mostraram atrofia das fibras musculares e aumento da expressão de atrogenes, como a atrogina-1 e o *muscle ring finger -1* (MuRF-1), no quadríceps de ratos, 15 dias após a TLCA (8), enquanto em coelhos, a TLCA diminuiu a força extensora do joelho e reduziu o sinal eletromiográfico do quadríceps (9).

A fraqueza muscular é comum na OAJ e considerada fator de risco e progressão para o desenvolvimento da doença (10). As características inflamatórias da OAJ levam a modificações neurais, como inibição do reflexo pré-sináptico, diminuição da ativação do neurônio motor alfa, causando atrofia e redução da força muscular (11). Um dos músculos mais afetados na OAJ é o quadríceps (12), sua fraqueza acelera a destruição da cartilagem (10), promovendo alterações biomecânicas no movimento (13) e aumentando a sobrecarga articular (14,15).

Alterações nas junções neuromusculares (JNM) também podem estar associadas à fraqueza muscular na OAJ, uma vez que são importantes para a função muscular (16), onde sinapses químicas ocorrem entre o neurônio motor e as fibras musculares, mediadas pela acetilcolina. Sabe-se que alterações nas JNM ou nos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), ligadas à contração muscular, comprometem a força, resultando em fraqueza e atrofia muscular (17). Apesar da alta incidência de OAJ e as alterações musculares associadas, nenhum estudo até o momento investigou possíveis alterações das JNM na OAJ que poderiam contribuir para elucidar os mecanismos associados à fraqueza e atrofia muscular.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar possíveis alterações nas JNM associadas a alterações musculares e funcionais em ratos com OAJ induzida por TLCA.

1.2. Materiais e métodos

Todos os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (Protocolo número 9197020816). Profissionais treinados e cegados em relação a identidade dos grupos experimentais realizaram todos os procedimentos.

Desenho e período experimental.

Ratos Wistar (dois meses de idade, peso médio de $214,41 \pm 20$ g) foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos ($n = 6$ / grupo): a) controle (sem cirurgia) e b) OAJ (submetido à TLCA). O tamanho da amostra foi determinado com base em dados de um estudo piloto, usando a área de seção transversal (AST) das fibras musculares e a área das JNM dos músculos quadríceps e TA como os desfechos primários. Considerando um valor alfa de 0,05 e poder de 95%, o tamanho da amostra foi calculado em 5 animais por grupo (Software GPower 3.1). No caso de uma possível perda durante os procedimentos experimentais, 8 animais foram alocados para cada grupo. Dois animais de cada grupo morreram durante os experimentos e as causas de morte estão descritas na Tabela suplementar 1. Os ratos foram alojados em gaiolas (dois animais por gaiola) em condições livres de patógenos a $24 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ sob um ciclo de luz reversa (12 h claro / 12 h escuro), com livre acesso a comida e água padrão de ratos. Todos os animais foram submetidos a testes in vivo um dia antes do sacrifício (59 dias após a TLCA) e a coleta dos tecidos foi realizada no dia seguinte (60 dias após a TLCA). O desenho experimental e o período do estudo estão descritos na Figura 1.

OAJ induzida por TLCA.

Foi utilizado um modelo adaptado de OAJ induzida por TLCA. Os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (12 mg / kg de xilazina e 95 mg / kg de ketamina). O joelho direito foi raspado e preparado com solução de iodo. Uma incisão parapatelar medial proporcionou acesso ao espaço articular, em seguida a patela foi deslocada lateralmente com a pata em extensão. Posteriormente, foi realizado uma lesão da cápsula articular e houve a TLCA, utilizando tesoura oftalmológica. Em seguida, foi realizado o teste da gaveta anterior (livre deslocamento da tibia em relação ao fêmur) para confirmar a TLCA (8,18). Os animais foram devolvidos as gaiolas e foi adicionado

paracetamol (13,5 mg / 100 mL) na água potável durante as primeiras 48 horas após a cirurgia como analgesia pós-operatória. Utilizamos apenas o grupo controle sem intervenção cirúrgica, porque relatos anteriores encontraram desgaste articular semelhante a OAJ nos grupos SHAM (cirurgia do joelho sem TLCA) (8,19).

Coleta de amostras musculares.

Os músculos quadríceps, tibial anterior (TA) e gastrocnêmio foram removidos e pesados. Cada músculo foi dividido em três partes. O fragmento proximal foi imerso em isopentano (pré-resfriado em nitrogênio líquido), armazenado a -80 ° C e utilizado para medir a AST. O fragmento medial foi utilizado para a técnica de esterase inespecífica. O fragmento distal foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido, armazenado a -80 ° C e usado para medir os níveis de mRNA e de proteínas.

AST das fibras musculares.

Cortes seriados histológicos foram obtidos dos músculos quadríceps, TA e gastrocnêmio em micrótomo criostático (Leica, CM1860, Alemanha). Os cortes histológicos (10 µm) foram corados com azul de toluidina após montagem padrão de lâmina, foram medidas as AST sob um microscópio óptico (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha). A análise morfométrica foi feita utilizando software Image J (versão 1.43u, Instituto nacional de Saúde, EUA). A AST de cada músculo foi obtida medindo 100 fibras localizadas na região central da secção. O índice percentual de atrofia foi calculado pela diferença na proporção entre a área de secção transversal das fibras musculares do grupo controle e a área de secção transversal das fibras musculares OAJ. O índice de atrofia foi calculado pelo peso de cada músculo (g) e normalizado usando a massa corporal (BM; g) para obter a razão MM/BM dos grupos controle e OAJ (8).

Análise da JNM – técnica de esterase inespecífica.

Os músculos quadríceps, TA e gastrocnêmio foram cortados longitudinalmente na região do terminal motor (contendo o ponto motor). O material resultante foi submetido à técnica de esterase inespecífica (20) para caracterizar a JNM.

Análise morfométrica.

O diâmetro máximo, área total e o perímetro foram medidos em 30 junções com um microscópio óptico (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha). Dois avaliadores

cegados e experientes analisaram as imagens com o software Image J (versão 1.43u, Instituto Nacional de Saúde, EUA) (21,22).

Análise da expressão do mRNA por PCR em tempo real.

O RNA total foi extraído de amostras de músculo quadríceps e TA nos grupos controle e OAJ para análise de mRNA usando o TRIzol Reagent (Life Technologies, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado usando um espectrofômetro Bioreserch BioPhotometer (Eppendorf® Hamburg, Alemanha), que também determinou a pureza do RNA, absorvância a 260 nm (quantidade de RNA) e 280 nm (quantidade de proteína). Somente as amostras com razões 260/280 > 1,8 foram usadas. A integridade do RNA foi avaliada por coloração com brometo de etídio (Invitrogen) com base nos RNAs ribossômicos 28s e 18s. O RNA extraído foi tratado com DNase I, Grau de Amplificação (Sigma Aldrich, AMPD1) para eliminar qualquer possível contaminação com DNA genômico das amostras. A transcrição reversa de mRNA foi realizada usando o kit de síntese de cDNA iScript™ (Bio-Rad, CA), seguindo as diretrizes do fabricante. Os níveis de expressão dos mRNAs foram avaliados por métodos quantitativos PCR em tempo real (qPCR) usando o sistema de detecção de PCR em tempo real (CFX 96, Touch™, versão 3.0, Bio-Rad, CA). As amostras de cDNA correspondentes ao mRNA dos genes analisados foram amplificadas por SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, CA) e os primers foram projetados usando o software Primer Express® (3.0.11, Applied Biosystems, EUA) a partir de sequências publicadas no GenBank (www.pubmed.com) e sintetizado por Life Technologies (EUA) (Tabela Suplementar 2). Os níveis de expressão foram normalizados por gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), *peptidilprolil isomerase A* (PPLA), *peptidilprolil isomerase B* (PPLB), beta-citoesquelética actina (bACT) e hipoxantina – guanina \fosforibosiltransferase (HPR), foi utilizado o normalizador mais estável em todas as amostras PPLA. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (23).

Expressões proteicas por análise de western blot.

Amostras de proteínas (contendo 80 µg de proteína) foram coletadas dos músculos quadríceps e TA. Em seguida foram separadas em géis de SDS/PAGE (12% em peso/vol) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpos anti-MuRF-1 (IgG, policlonal, 1: 500, 40Kda, Gene-Tex, EUA) e anti-NCAM

(IgG, policlonal, 1: 1000, 200Kda, Merck, EUA) e normalizadas usando α -Tubulina (IgG, monoclonal, 1: 1000, 50Kda, Sigma, EUA). Os blots foram visualizados em uma solução de ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido) e expostos em um sistema de imagem ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). Por fim as imagens foram analisadas conforme recomendação do sistema (24,25).

Teste de marcha.

As patas traseiras dos ratos foram pintadas com tinta, em seguida, os animais foram liberados para caminhar em uma pista de 60 cm de comprimento e 7 cm de largura, coberta com papel branco. Uma câmara escura foi colocada no final da pista para atrair os animais. Após a conclusão do teste, o papel foi digitalizado em 300 dpi para análise (26). A medida ao redor da pata foi definida como área da pata (cm^2), a distância entre o primeiro e o quinto dedo da pata foi definido como largura da pata (cm), a distância da mesma pata traseira entre duas etapas foi considerado comprimento da passada (cm), a distância horizontal entre a pata esquerda e direita, foi definido como base (cm), a distância entre o terceiro dedo do pé e o calcanhar como comprimento da pata (cm) e o ângulo da pata foi definido como o ângulo da através das duas patas traseiras ($^\circ$). As medidas foram quantificadas pelo software ImageJ (versão 1.43u, National Institutes of Health, EUA).

Edema

Três medidas de espessura da articulação do joelho foram realizadas, com animais sob anestesia (2,0 L / m, isoflurano a 2%), utilizando um paquímetro digital eletrônico (*Mitutoyo Absolute Digimatic* 150 mm, Japão). Os resultados foram expressos em mm (25).

Temperatura superficial do joelho.

Os animais foram aclimatados em um quarto escuro (15 min; $24^\circ \text{C} \pm 1$). A termografia foi usada para quantificar a temperatura da pele do joelho nos grupos OAJ e controle usando uma câmera térmica infravermelha (FLIR Systems® T420, EUA), colocada em um tripé a 50 cm do joelho do animal. As imagens foram analisadas no software Flir Tools, e os resultados expressos em ($^\circ\text{C}$).

Migração de leucócitos ex vivo.

A migração de leucócitos foi determinada pela análise do líquido sinovial do joelho, conforme descrito anteriormente (27,28). As cavidades articulares foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 5 mL contendo ácido etilenodiaminotetraacético 1 mM (EDTA) e depois diluídas para um volume final de 50 mL com PBS/EDTA para avaliar a migração de leucócitos. O número total de leucócitos foi contado em uma câmara de Neubauer utilizando uma solução de Turk. Os resultados foram expressos como o número de leucócitos por cavidade articular. Para a contagem diferencial de células o líquido sinovial foi colocado em lâminas coradas em citocentrífuga (Rosenfeld - Cytospin 4; Shandon, Pittsburgh, EUA). A contagem diferencial de células foi realizada em um microscópio óptico e os resultados foram expressos como o número (média \pm EPM) de tipo de leucócitos por cavidade articular. Para esta análise, usamos apenas 4 animais do grupo OAJ (27).

Limiar de retirada da pata.

A hipernocicepção da articulação femorotibial foi avaliada utilizando um medidor eletrônico de Von Frey (Insight® EFF-301). Os animais foram aclimatados (30 min) em gaiolas acrílicas com piso de grade de arame (12 \times 10 \times 17 cm de altura). Um investigador treinado (cego para alocação dos grupos) aplicou uma pressão perpendicular à superfície plantar da pata traseira direita. Quando a pata foi retirada, a intensidade da força aplicada foi registrada automaticamente. Os resultados do limiar mecânico são expressos em gramas/força (g/F) (27,29).

Avaliação histológica da articulação do joelho.

Foi utilizado um protocolo histológico padrão. Os joelhos foram fixados (formaldeído a 4% por 2 dias) e descalcificados (EDTA a 10%). As amostras foram embebidas em parafina para formar blocos. Cortes histológicos (10 μ m) foram obtidos usando um micrótomo (Leica RM-2245, Alemanha). As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina (HE-Merck, Darmstadt, Alemanha) e 0,1% Safranin-O (Merck, Darmstadt, Alemanha) (30,31) e examinadas em microscópio óptico (\times 100; Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha). Dois avaliadores cegados e experientes avaliaram os danos na cartilagem usando o escore de Mankin modificado (32), tabela suplementar 3.

Análise estatística.

As variáveis contínuas foram apresentadas como média \pm erro padrão da média (EPM). Como todas as variáveis tiveram distribuição normal ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, foi realizado um teste t independente. As análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS, versão 23.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA). As figuras foram plotadas no software GraphPad Prism, versão 5.0. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

1.3. Resultados

Análise morfométrica.

60 dias após a TLCA (Figura 1), o grupo OAJ mostrou uma diminuição na AST do quadríceps (controle $383,7 \pm 22,04 \mu\text{m}^2$ vs OAJ $319,4 \pm 12,54 \mu\text{m}^2$; $p = 0,029$) e TA (controle $425,2 \pm 27,68 \mu\text{m}^2$ vs OAJ $292,7 \pm 27,16 \mu\text{m}^2$; $p = 0,006$; Tabela 1). A JNM do quadríceps exibiu uma diminuição na área ($p = 0,001$) e perímetro ($p = 0,001$) no grupo OAJ em comparação ao controle, enquanto o TA apresentou apenas uma diminuição no diâmetro máximo da JNM ($p = 0,014$) no grupo OAJ em comparação ao controle. Não foram detectadas alterações nas junções neuromusculares no músculo gastrocnêmio (Tabela 1). Em ambos, grupo controle e OAJ, a JNM mostrou poucos ramos do tipo “pretzel”, com características morfológicas normais. Isso significa um número normal de dobras juncionais que garantem a localização de nAChRs e a propagação do potencial da placa para gerar contração muscular (33). No entanto, no músculo quadríceps, houve uma clara redução na disseminação de JNM no grupo OAJ (Figura 2B) em comparação ao controle (Figura 2A). Já o músculo TA mostrou apenas uma diminuição no diâmetro máximo da JNM (Figura 2D).

Análise por PCR em tempo real (qPCR) da expressão gênica.

Foi observado um aumento na expressão de atrogina-1 ($p = 0,001$) e MuRF-1 ($p = 0,011$) no quadríceps do grupo OAJ em comparação ao controle. Além disso, a expressão de α -nAChR ($p = 0,016$) e tirosina-quinase específica do músculo (MuSK) ($p = 0,031$) diminuiu e a expressão de γ -nAChR ($p = 0,001$) no músculo quadríceps do grupo OAJ aumentou em relação ao grupo controle (Figura 3). Para o TA, houve um aumento na expressão da atrogina-1 ($p = 0,013$) e MuRF-1 ($p = 0,001$) e um declínio na ϵ -nAChR ($p = 0,046$) no grupo OAJ comparado ao controle (Figura 3).

Expressões proteicas por análise de western blot.

Um aumento na proteína MuRF-1 foi encontrado nos quadríceps do grupo OAJ (controle $0,94,2 \pm 0,16$ vs OAJ $1,56 \pm 0,18$; $p = 0,03$) e TA (controle $0,75 \pm 0,12$ vs OAJ $1,12 \pm 0,10$; $p = 0,04$) comparados ao grupo controle (Figura 4). Não foi encontrada diferença na proteína da molécula de adesão celular neural (NCAM) nos músculos quadríceps (controle $1,15 \pm 0,14$ vs OAJ $1,01 \pm 0,10$; $p = 0,47$) e TA (controle $0,82 \pm 0,10$ vs OAJ $0,97 \pm 0,07$ $p = 0,28$), (Figura 4).

Teste de marcha.

O grupo OAJ reduziu a área da pata ($p = 0,001$) e a largura da pata ($p = 0,023$), com um declínio no comprimento da passada ($p = 0,016$) em comparação com o grupo controle (Figura 5).

Sinais inflamatórios.

O diâmetro articular aumentou no grupo OAJ em relação ao controle ($11,1 \pm 0,21$ mm vs $10,0 \pm 0,12$ mm, respectivamente; $p = 0,005$; Figura 6A). O grupo OAJ mostrou um aumento na temperatura superficial do joelho em comparação ao controle ($36,56 \pm 0,07^\circ\text{C}$ vs $35,82 \pm 0,14^\circ\text{C}$, respectivamente; $p = 0,001$), Figura 6B. Houve também um aumento na migração de leucócitos no líquido sinovial do grupo OAJ em comparação ao controle ($10,20 \pm 1,86 \times 10^3$ / i.a. vs $0,0 \pm 0 \times 10^3$ / i.a., respectivamente; $p = 0,002$; Figura 6C). A contagem diferencial revelou uma maior concentração de macrófagos no líquido sinovial em comparação com neutrófilos e linfócitos (Figura 6D).

Encontramos um declínio no limiar de dor pelo teste de Von Frey no grupo OAJ em comparação ao controle ($46,82 \pm 0,69$ g/F vs $60,63 \pm 2,25$ g/F, respectivamente; $p = 0,001$), Figura 6E. O grupo OAJ apresentou escore histológico de Mankin mais alto do que o grupo controle ($4,16 \pm 1,07$ vs $0,66 \pm 0,21$, respectivamente; $p = 0,028$; Figura 6F e tabela complementar 3). A Figura 6G e 6H mostram uma diferença no conteúdo de proteoglicano, evidenciado pela intensidade do corante (vermelho), além da descontinuidade na superfície da articulação no grupo OAJ.

1.4. Discussão

Este estudo forneceu uma nova contribuição, mostrando alterações nas JNM associadas atrofia muscular no quadríceps e no TA de ratos com OAJ. As alterações mais

significativas da JNM (diminuição da área e perímetro) foram observadas no quadríceps, que exibiu uma atrofia de 15,7% nas fibras musculares. Embora o TA demonstrou maior atrofia muscular (33%), as alterações nas JNM foram menores que no quadríceps e restritas a um aumento no diâmetro máximo. A expressão aumentada de MuRF-1 (34) e a autofagia muscular (35) têm sido sugeridas como possíveis mecanismos associados às alterações da JNM. Nosso estudo também encontrou que um aumento na expressão de MuRF-1 e atrogina-1 pode estar associado a alterações nas JNM. Sabe-se que o MuRF-1 e a atrogina-1 são os principais sinalizadores da atrofia muscular em diferentes modelos experimentais (36,37). Identificamos um aumento na expressão proteica do MuRF-1 nos músculos quadríceps e TA, em consonância com o aumento da expressão gênica, confirmando a atrofia na OAJ em modelo de TLCA. Além de estar envolvido na atrofia muscular, estudos recentes sugerem que o MuRF-1 é um importante mediador na regulação da quantidade de nAChR na JNM (34,38), e também pode estar ligado ao NCAM, um regulador da estabilidade sináptica relacionado à neurotransmissão (39,40). No entanto, o grupo OAJ não apresentou alterações na expressão proteica de NCAM, que pode ser mais sensível apenas em casos mais graves como desnervação muscular (41,42). Contudo, o aumento na expressão da proteína MuRF-1 observada neste modelo pode estar relacionado à atrofia muscular e alterações na JNM.

A maioria dos estudos com OAJ concentra-se em observar alterações no quadríceps, pois ele está diretamente relacionado à articulação do joelho e exibem atrofia muscular (43-45), redução da força (14,46) e declínio funcional (15,47). Além da atrofia muscular, também observamos que o quadríceps apresentou maiores alterações na JNM. Com relação à expressão do mRNA no quadríceps, observamos um aumento na subunidade gama do receptor de acetilcolina (γ -nAChR), que normalmente é expresso na fase embrionária (48), mas também em doenças musculares como a desnervação (49). Houve também um declínio na expressão da subunidade alfa (α -nAChR), responsável pelo fluxo de acetilcolina na membrana pós-sináptica (50), bem como o MuSK, um gene que inicia a diferenciação pós-sináptica e desempenha um importante papel de agrupamento dos nAChR (51). Os resultados do presente estudo mostram intensa remodelação da JNM no quadríceps, associados a OAJ. A atrofia das fibras musculares e a inibição muscular artrogênica, que diminuem a ativação do quadríceps pela inibição aferente do neurônio motor α (11,52), podem ser importantes mecanismos associados às alterações das JNM identificadas nesse músculo. Outro possível mecanismo pode ser a remodelação do terminal nervoso, modulando a liberação de acetilcolina e levando à

adaptação da JNM (53,54). No entanto, outros estudos são necessários para avaliar os mecanismos envolvidos na remodelação da JNM observados no presente estudo.

O músculo TA é pouco pesquisado na OAJ. Encontramos apenas um estudo que avaliou o TA de camundongos 4 e 8 semanas após a indução da OAJ, exibindo um declínio na força, 40% na taxa de relaxamento e menor expressão de ATP, mas sem alterações na área transversal das fibras musculares (55). Por outro lado, alguns estudos sobre o TA mostraram prejuízo na função em indivíduos com OAJ (56,57) e relatam um declínio na força excêntrica nos dorsiflexores do tornozelo (58). No entanto, não há evidências claras sobre os mecanismos de atrofia do TA em indivíduos com OAJ. Acreditamos que a maior atrofia observada em nosso estudo possa estar relacionada ao desuso, como descrito para o quadríceps (46), devido à compensação muscular (13) ou porque o TA é um músculo monoarticular que pode ser mais afetado pela atrofia (59). Visto a atrofia significativa e as alterações da JNM observadas no músculo TA, acreditamos que esse músculo merece ser estudado mais detalhadamente na OAJ. Estudos futuros sobre adaptações do TA na OAJ podem fornecer novas evidências científicas à prática clínica e reabilitação desse músculo.

A ausência de alterações neuromusculares no músculo gastrocnêmio observadas indica que a OAJ afeta principalmente os músculos extensores do joelho, como o quadríceps (9,15), e os músculos que contribuem para desacelerar o movimento durante atividades funcionais, como o músculo TA (60,61). Nossos resultados corroboram essa hipótese.

Nossos achados mostraram padrão de marcha prejudicado no grupo OAJ, como observado em estudos semelhantes (26,62). Estudos recentes associaram déficits da marcha a uma diminuição da AST do músculo gastrocnêmio de ratos (63) e extensor longo dos dedos de camundongos (64). Além disso, alterações na marcha também foram associadas ao aumento da dor em camundongos com OAJ (65). Estas alterações no padrão de marcha dos animais são semelhantes às alterações funcionais observadas em indivíduos com OAJ (66). Nossos resultados indicam uma ligação entre os padrões alterados da marcha e as alterações neuromusculares identificadas pela atrofia e redução da morfometria das JNM nos músculos quadríceps e TA de ratos com OAJ. O limiar de retirada da pata diminuiu no grupo OAJ. Esse resultado corrobora um estudo recente que encontrou limiar de dor reduzido associado à fraqueza muscular após TLCA (29). Outro estudo recente mostrou a presença de hiperalgesia mecânica persistente em um modelo OAJ (67). Nossos resultados reforçam a evidência de que a dor está relacionada às

alterações inflamatórias e neuromusculares observadas na OAJ. Encontramos também um aumento de leucócitos (73% de macrófagos) no líquido sinovial do grupo OAJ. A maior quantidade de macrófagos indica uma inflamação crônica presente do líquido sinovial na OAJ, contribuindo para a destruição de cartilagem e favorecendo o crescimento de osteófitos (68,69), além disso, estudos recentes classificaram a OAJ em subgrupos relacionados a macrófagos (70). Além do aumento de leucócitos no líquido sinovial, observamos aumento em outros sinais, como aumento da temperatura da superfície do joelho e inchaço, reforçando o papel da inflamação na patogênese da OAJ.

1.5. Conclusão

A OAJ induzido por TLCA em ratos promove remodelamento da JNM e atrofia dos músculos quadríceps e TA, associados a sinais inflamatórios e alterações na marcha e na expressão de genes e proteínas musculares.

1.6. Figuras e Tabelas

Figura 1. Desenho experimental. Figura representativa das análises e tempo do estudo. OAJ: osteoartrite de joelho, TLCA: transecção do ligamento cruzado anterior.

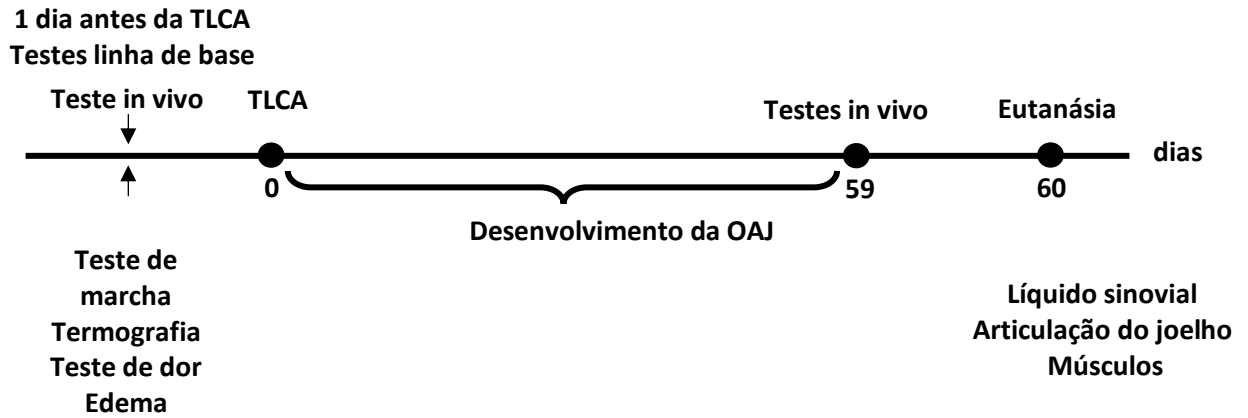
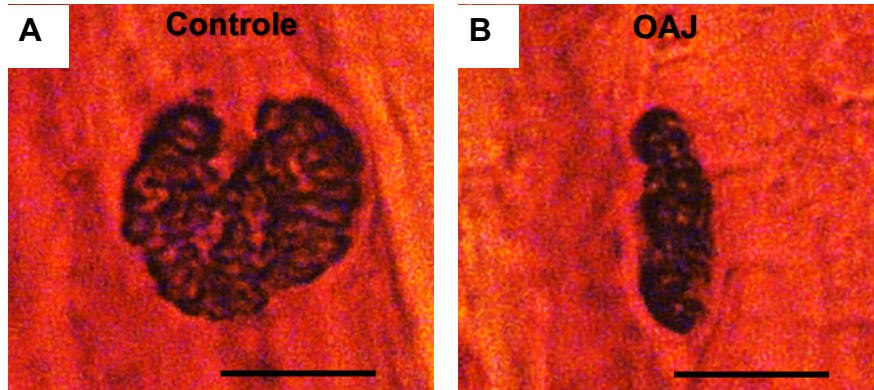


Figura 2. Morfologia das junções neuromusculares (Técnica de Esterase não Específica). Grupo Controle: quadríceps (A) e tibial anterior (C); grupo osteoartrite de joelho (OAJ): quadríceps (B) e tibial anterior (D). Escala de barra: 10 μ m, objetiva = 40X.

Quadríceps



Tibial anterior

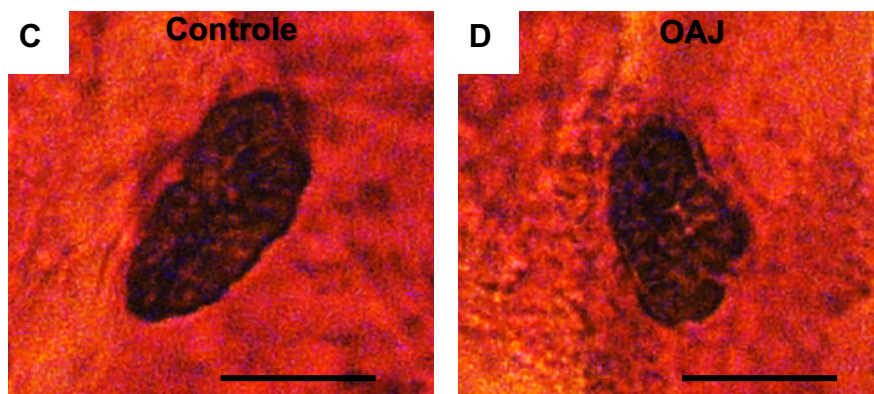


Figura 3. Expressão de mRNA nos músculos quadríceps e tibial anterior dos grupos controle e osteoartrite de joelho (OAJ) respectivamente: Atrogin-1 (A e B); MuRF-1 (C e D); α -nAChR; (E e F); ϵ -nAChR; (G e H) γ -nAChR; (I e J); MuSK (K e L); Agrin (M e N). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, OAJ comparado ao grupo Controle.

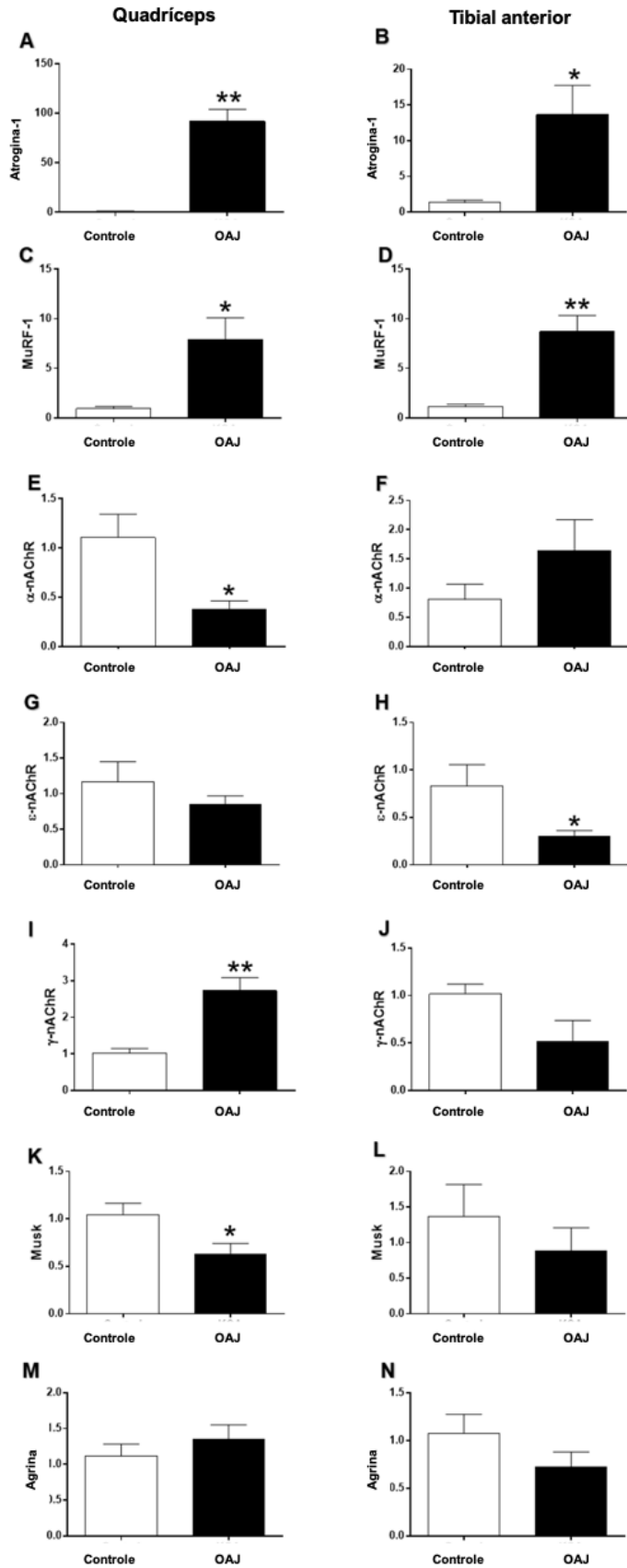


Figura 4. Expressão proteica. Expressão das proteínas MuRF-1 e NCAM no músculo quadríceps (QD; A,C,E) e tibial anterior (TA; B,D,F), *p < 0.05, grupo osteoartrite de joelho (OAJ) comparado ao Controle.

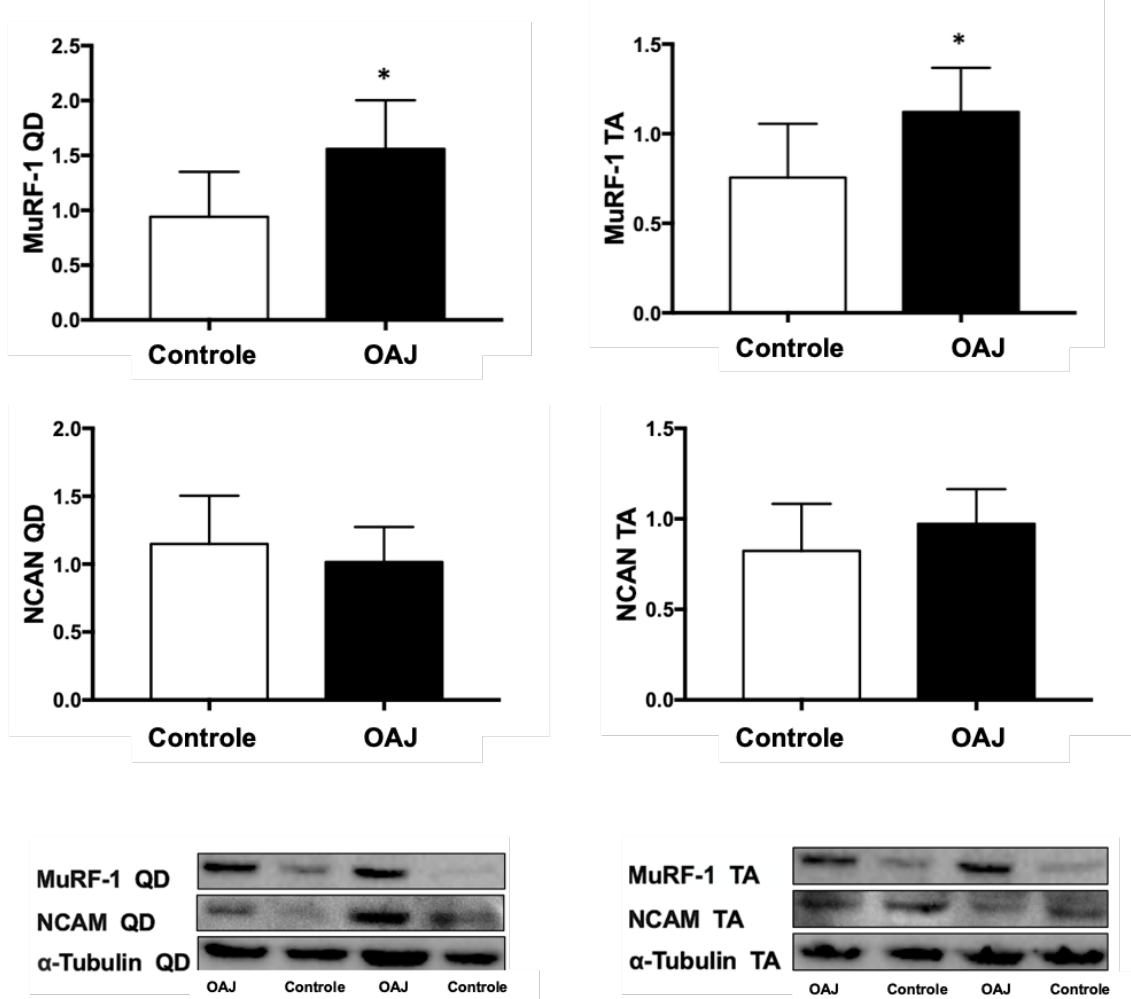


Figura 5. Teste de marcha. Área da pata (A): representação do teste no grupo Controle (B) e osteoartrite de joelho (OAJ; C); Largura da pata (D): representação do teste no grupo Controle (E) e OAJ (F); Distância da passada (G): representação do teste no grupo Controle (H) e OAJ (I). ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$, grupo OAJ comparado ao grupo Controle.

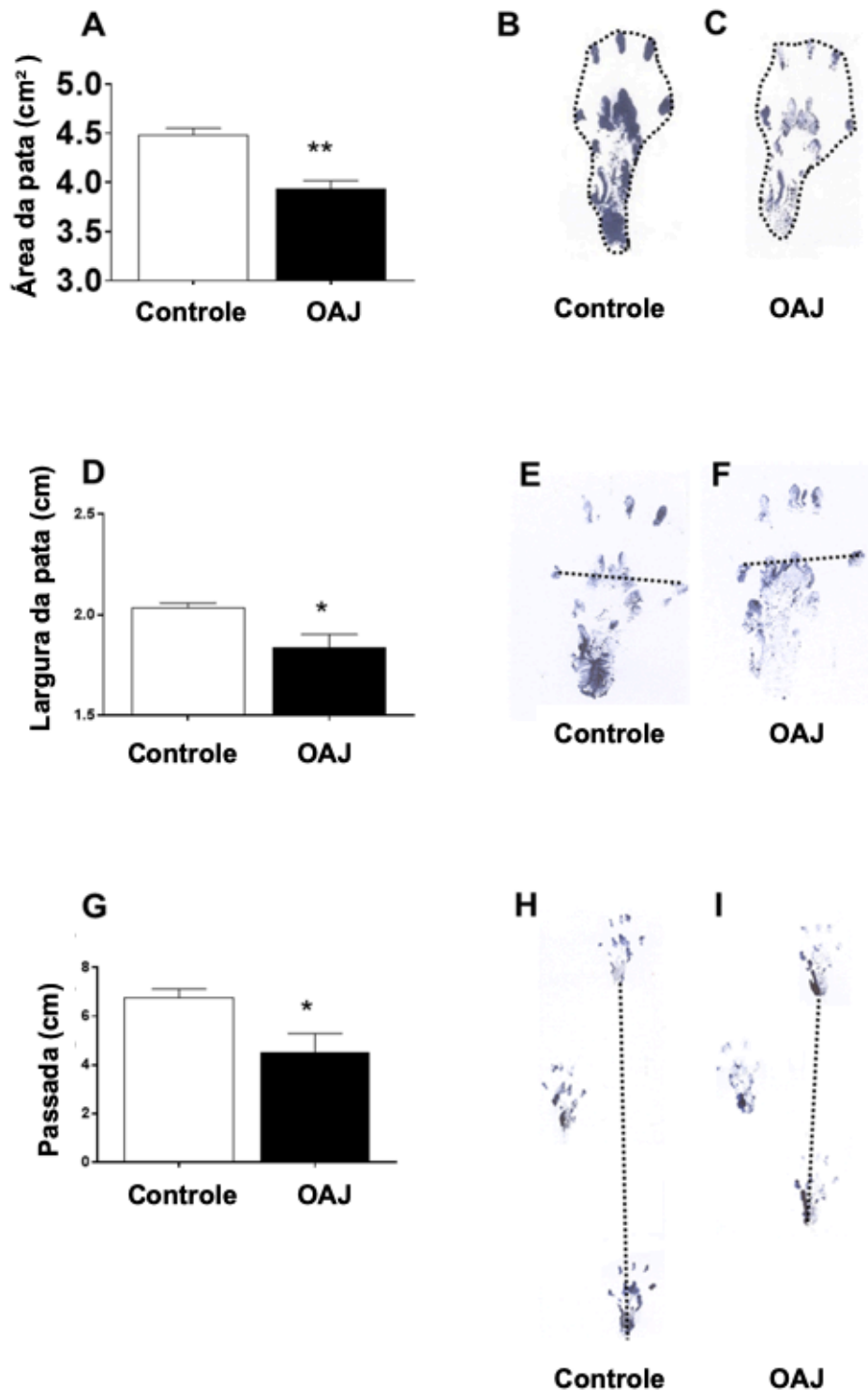


Figura 6. Sinais Inflamatórios. Temperatura superficial do joelho (A); Edema de joelho (B); Neutrófilos (C); Escore Mankin (D); Histologia articular do joelho, representação do grupo Controle (E), representação do grupo OAJ (F) coloração de SafraninaO. G) e grupo OAJ (H). OAJ = osteoartrite do joelho; ▲ = superfície articular com células normais; ↑ = superfície articular com irregularidades; Δ = hiper celularidade difusa; # Redução da coloração de Safranin O indicando redução severa em proteoglicanos. Barra de escala = 50 μm, ampliação de 20X. ** p <0,01 e * p <0,05, grupo KOA comparado ao controle.

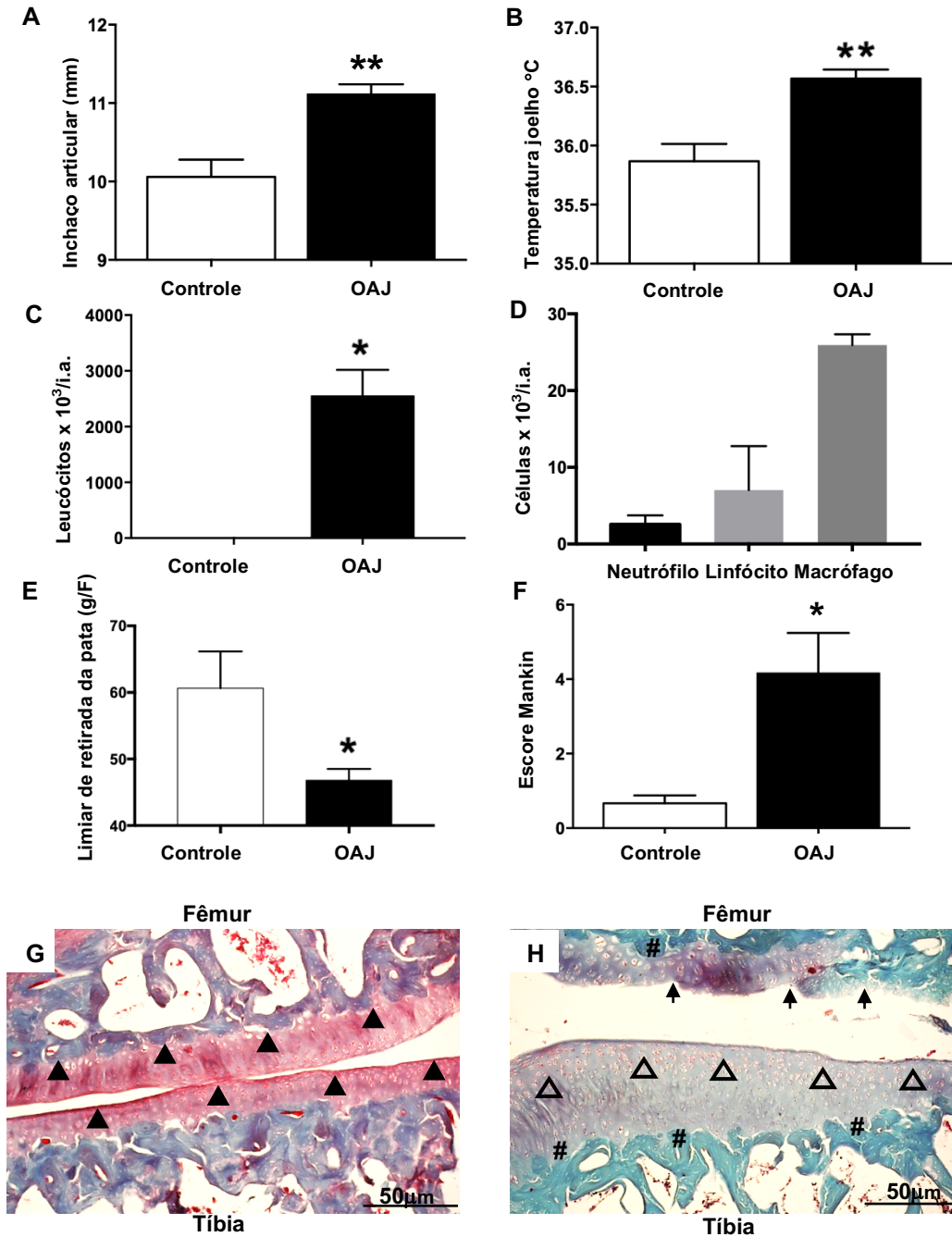


Tabela 1: Análise morfométrica das junções neuromusculares (JNM; área, perímetro e diâmetro máximo) e da ares de secção transversal das fibras musculares (AST), dos músculos quadríceps, gastrocnêmio e tibial anterior. Dados expressos em média (\bar{x}) \pm erro padrão da média (EPM), *p < 0.05, **P < 0.01, grupo osteoartrite de joelho (OAJ) comparado ao grupo controle.

Parâmetros morfométricos	Controle ($\bar{x} \pm EPM$)	OAJ ($\bar{x} \pm dp$)	Teste t (p)
Quadríceps			
Área da JNM (μm^2)	560,70 \pm 80	346,72 \pm 68	**0,001
Perímetro da JNM (μm)	315,10 \pm 23	263,45 \pm 21	**0,002
Diâmetro máximo da JNM (μm)	1194,96 \pm 15	1123,66 \pm 13	0,410
AST das fibras musculares (μm^2)	383.7 \pm 22	319.4 \pm 12	*0.029
Gastrocnêmio			
Área da JNM(μm^2)	624,08 \pm 17	617,27 \pm 60	0,929
Perímetro da JNM (μm)	130,81 \pm 11	131,85 \pm 11	0,877
Diâmetro máximo da JNM (μm)	1145,31 \pm 80	1110,04 \pm 15	0,626
AST das fibras musculares (μm^2)	425.2 \pm 25	430.0 \pm 52	0.935
Tibial anterior			
Área da JNM (μm^2)	634,88 \pm 86	613,04 \pm 82	0,664
Perímetro da JNM (μm)	356,80 \pm 86	340,62 \pm 82	0,397
Diâmetro máximo da JNM (μm)	1371,53 \pm 13	1143,46 \pm 12	*0,014
AST das fibras musculares (μm^2)	425.2 \pm 27	292.7 \pm 27	**0.006

Tabela suplementar 1. Perda dos animais durante os experimentos

Perda dos animais durante os experimentos		
Razoes da perda	n: grupo Controle	n: grupo OAJ
Morte durante a cirurgia	0	1
Morte durante a evolução da OAJ	2	1

Tabela suplementar 2 Sequência dos primers para qPCR.

Genes	Sequência
HPRT	Foward: CTCATGGACTGATTATGGACAGGA Reverse: GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGC
GAPDH	Foward: GATGCTGGTGCTGAGTATGTCTG Reverse: GTGGTGCAGGATGCATTGGTGA
β Actina	Foward: GTAACCCGTTGAACCCATT Reverse: CCAT-CCAATCGGTAGTAGCG
Pplb	Foward: TGGCAAATGCTGGACCAAAC Reverse: TGCCTTCTTTCACCTTCCCAA
Ppla	Foward: TGGCAA TGTGGACCAAAC Reverse: TGCCTTCTTTCACCTTCCCAA
Atrogina-1	Foward: TACTAAGGAGC-GCCATGGATACT Reverse: GTTGAATCTTCTGGATC-CAGGAT
MuRF-1	Foward: TGTCTGGAAGGTCGTTTCCG Reverse: ATGCCGGTC-CATGCATCACTT
MuSK	Foward: TAATGTGCAAAAGGAAGACG Reverse: TTACAAAGGAACCAAAGGTG
Agrina	Foward: CTGGGACGAGGACTCAGAAG Reverse: AGGGACACTCTGGCAGCTAA
Rapsyn	Foward: TCCATTGGGGAGAAGAACAG Reverse: TTGTTTTGCAGGCATCTGAG
α AChR	Foward: AGCCGTCA-TAGGTCCAAGTG Reverse: TCCCTTCGATGAGCAGAACT
ε AChR	Foward: CCGAGGTCTTCTCTCCACAG Reverse: ACCACCAAGACGTCACCTTC
γ AChR	Foward: AACGCAAGCCCCTTCTAT Reverse: GAGGATCGCAACTGAGGAGA

Tabela suplementar 3. Sistema de Graduação Histológico- Histoquímico de Mankin (Modificado)

Sistema de classificação Mankin		
Categoria	Subcategoria	Pontuação
Estrutura	Normal	0
	Irregularidades na superfície	1
	Fibrilações e irregularidades na superfície	2
	Fissuras na camada superficial	3
	Fissuras na camada média	4
	Fissuras na camada profunda	5
	Completa desorganização	6
Células	Normal	0
	Hiper celularidade difusa	1
	Clones	2
	Hipo celularidade	3
Coloração por Safranina	Normal	0
	Redução leve	1
	Redução moderada	2
	Redução intensa	3
	Corante não observado	4
Integridade da tidemark	Intacta	0
	Descontínua	1
Total		0 - 14

1.7. Referências

1. Vos, T. *et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2163–2196 (2012).
2. Glyn-Jones, S. *et al.* Osteoarthritis. *Lancet* **386**, 376–387 (2015).
3. Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* **64**, 1697–1707 (2012).
4. Sharma, L. Osteoarthritis year in review 2015 : clinical. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 36–48 (2016).
5. Neogi, T. The Epidemiology and Impact of Pain in Osteoarthritis. *Osteoarthr. Res. Soc.* **21**, 1145–1153 (2013).
6. Fang, H. & Beier, F. Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 413–21 (2014).
7. Loeser, R. F. *et al.* Disease Progression and Phasic Changes in Gene Expression in a Mouse Model of Osteoarthritis. *PLoS One* **8**, 1–15 (2013).
8. Delfino, G. B. *et al.* Quadriceps muscle atrophy after anterior cruciate ligament transection involves increased mRNA levels of atrogen-1, muscle ring finger 1, and myostatin. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **92**, 411–419 (2013).
9. Herzog, W., Longino, D. & Clark, A. The role of muscles in joint adaptation and degeneration. *Langenbeck's Arch. Surg.* **388**, 305–315 (2003).
10. Roos, E. M., Herzog, W., Block, J. a & Bennell, K. L. Muscle weakness, afferent sensory dysfunction and exercise in knee osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 57–63 (2011).
11. Hurley, M. V. & Newham, D. J. The influence of arthrogenous muscle inhibition on quadriceps rehabilitation of patients with early, unilateral osteoarthritic knees. *Rheumatology* **32**, 127–131 (1993).
12. Terracciano, C. *et al.* Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos. Int.* **24**, 1095–1100 (2013).
13. Igawa, T. & Katsuhira, J. Biomechanical Analysis of Stair Descent in Patients with Knee Osteoarthritis. *J. Phys. Ther. Sci.* **26**, 629–631 (2014).
14. Amin, S. *et al.* Quadriceps strength and the risk of cartilage loss and symptom progression in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 189–198 (2009).
15. Rice, D. A., McNair, P. J. & Lewis, G. N. Mechanisms of quadriceps muscle

- weakness in knee joint osteoarthritis: The effects of prolonged vibration on torque and muscle activation in osteoarthritic and healthy control subjects. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R151 (2011).
16. Nudell, B. M. & Grinnell, a D. Regulation of synaptic position, size, and strength in anuran skeletal muscle. *J. Neurosci.* **3**, 161–176 (1983).
 17. Hughes, B. W., Kusner, L. L. & Kaminski, H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve* **33**, 445–461 (2006).
 18. Stoop, R. *et al.* Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthr. Cartil.* **9**, 308–315 (2001).
 19. Dias, C., Vasilceac, F., Durigan, J., Medeiros, A. & Mattiello, S. Analysis of local and systemic TNF- α and IL1- α expression in the acute phase of knee osteoarthritis of rats. *Cytokine J.* **66**, 164–165 (2014).
 20. Lehrer, B. G. M. & Ornstein, L. A Diazo Coupling Method for the Electron Microscopic Localization of Cholinesterase. *Cell* **6**, 399–406 (1959).
 21. Deschenes, M. R. *et al.* Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle nerve* **23**, 1576–1581 (2000).
 22. Pissulin, C. N. A. *et al.* GaAs laser therapy reestablishes the morphology of the NMJ and nAChRs after injury due to bupivacaine. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **167**, 256–263 (2017).
 23. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 24. Ramirez, C. *et al.* Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **90**, 930–939 (2011).
 25. Quadros, A. U. *et al.* Dynamic weight bearing is an efficient and predictable method for evaluation of arthritic nociception and its pathophysiological mechanisms in mice. *Sci. Rep.* **5**, 14648 (2015).
 26. Ruan, M. Z. C., Patel, R. M., Dawson, B. C., Jiang, M.-M. & Lee, B. H. L. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. *Osteoarthr. Cartil.* **21**, 1355–1364 (2013).
 27. Pinto, L. G. *et al.* Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1 β production. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 235

- (2015).
28. Talbot, J. *et al.* CCR2 expression in neutrophils plays a critical role in their migration into the joints in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 1751–1759 (2015).
 29. Silva, J. M. *et al.* Muscle wasting in osteoarthritis model induced by anterior cruciate ligament transection. *PLoS One* **13**, 1–17, (2018).
 30. Pastoureau, P. C., Hunziker, E. B. & Pelletier, J. Cartilage , bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, S106–S112 (2010).
 31. Renner, A. F. *et al.* Muscle Stretching after Immobilization Applied at Alternate Days Preserves Components of Articular Cartilage. **54**, 132–138 (2013).
 32. Gerwin, N., Bendele Z, A. M., Glasson, S. & Carlson, C. S. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 24–34 (2010).
 33. Engel, A. G. & Franzini-Armstrong, C. *Myology*. (2004).
 34. Rudolf, R. *et al.* Regulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by MuRF1 connects muscle activity to endo/lysosomal and atrophy pathways. *Age (Omaha)*. **35**, 1663–1674 (2013).
 35. Carnio, S. *et al.* Autophagy Impairment in Muscle Induces Neuromuscular Junction Degeneration and Precocious Aging. *Cell Rep.* **8**, 1509–1521 (2014).
 36. Bonaldo, P. & Sandri, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* **6**, 25–39 (2013).
 37. Gumucio, J. P. & Mendias, C. L. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. *Endocrine* **43**, 12–21 (2013).
 38. Rodrigues, A. C. Z. *et al.* The Sympathetic Nervous System Regulates Skeletal Muscle Motor Innervation and Acetylcholine Receptor Stability. *Acta Physiol* **30**, 0–2 (2018).
 39. Enriquez-barreto, L., Palazzetti, C., Brennaman, L. H. & Maness, P. F. Neural cell adhesion molecule, NCAM , regulates thalamocortical axon pathfinding and the organization of the cortical somatosensory representation in mouse. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **5**, 1–13 (2012).
 40. Chattopadhyaya, B., Baho, E., Huang, Z. J., Schachner, M. & Cristo, G. Di. Neural Cell Adhesion Molecule-Mediated Fyn Activation Promotes GABAergic Synapse Maturation in Postnatal Mouse Cortex. *The Journal of Neuroscience* **33**, 5957–

- 5968 (2013).
41. Pinheiro-Dardis, C. M., Erbereli, B. T., Gigo-Benato, D., Castro, P. A. T. S. & Russo, T. L. Electrical stimulation delays reinnervation in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* **56**, 108–118 (2017).
 42. Hendrickse, P., Galinska, M., Hodson-tole, E. & Degens, H. An evaluation of common markers of muscle denervation in denervated young-adult and old rat gastrocnemius muscle. *Exp. Gerontol.* **106**, 159–164 (2018).
 43. Herzog, W. & Longino, D. The role of muscles in joint degeneration and osteoarthritis. *J. Biomech.* **40**, 54–63 (2007).
 44. Goodman, S. M. *et al.* 2017 American College of Rheumatology/American Association of Hip and Knee Surgeons Guideline for the Perioperative Management of Antirheumatic Medication in Patients With Rheumatic Diseases Undergoing Elective Total Hip or Total Knee Arthroplasty. *J. Arthroplasty* **32**, 2628–2638 (2017).
 45. Neill, T. W. O., McCabe, P. S. & Mcbeth, J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol* **32**, 312-326 (2018).
 46. Felson, D. T. *et al.* Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann. Intern. Med.* **133**, 635–46 (2000).
 47. Serrao, P. R. M. S., Gramani-Say, K., Lessi, G. C. & Mattiello, S. M. Knee extensor torque of men with early degrees of osteoarthritis is associated with pain, stiffness and function. *Rev. Bras. Fisioter.* **16**, 289–294 (2012).
 48. Missias, A. C., Chu, G. C., Klocke, B. J., Sanes, J. R. & Merlie, J. P. Maturation of the Acetylcholine Receptor in Skeletal Muscle: Regulation of the AChR γ -to- ϵ Switch. *Dev. Biol.* **179**, 223–238 (1996).
 49. Hesselmanns, L. F. G. M., Jennekens, F. G. I., Van Den Oord, C. J. M., Veldman, H. & Vincent, A. Development of innervation of skeletal muscle fibers in man: Relation to acetylcholine receptors. *Anat. Rec.* **236**, 553–562 (1993).
 50. Dani, J. A. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev NeuroBiol* **124**, 3–19 (2015).
 51. Stochlic, L., Cartaud, A. & Cartaud, J. The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: New partners, new functions. *BioEssays* **27**, 1129–1135 (2005).
 52. Palmieri-Smith, R. M. & Thomas, A. C. A neuromuscular mechanism of posttraumatic osteoarthritis associated with ACL injury. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **37**,

- 147–153 (2009).
53. Khan, M. A. S. *et al.* Nonsurgically induced disuse muscle atrophy and neuromuscular dysfunction upregulates alpha7 acetylcholine receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **92**, 1–8 (2014).
 54. Melroy-Greif, W. E., Stitzel, J. A. & Ehringer, M. A. Nicotinic acetylcholine receptors: upregulation, age-related effects and associations with drug use. *Genes, Brain Behav.* **15**, 89–107 (2016).
 55. van der Poel, C., Levinger, P., Tonkin, B. A., Levinger, I. & Walsh, N. C. Impaired muscle function in a mouse surgical model of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 1047–1053 (2016).
 56. Resende, R. A., Kirkwood, R. N., Deluzio, K. J., Morton, A. M. & Fonseca, S. T. Mild leg length discrepancy affects lower limbs, pelvis and trunk biomechanics of individuals with knee osteoarthritis during gait. *Clin. Biomech.* **38**, 1–7 (2016).
 57. Levinger, P. *et al.* Relationship between foot function and medial knee joint loading in people with medial compartment knee osteoarthritis. *J. Foot Ankle Res.* **6**, 33 (2013).
 58. Gonçalves, G. H. *et al.* Ankle strength impairments associated with knee osteoarthritis. *Clin. Biomech.* **46**, 33–39 (2017).
 59. Andersen, J. L., Schjerling, P. & Saltin, B. Muscle, genes and athletic performance. *Scientific American* **283**, 48–55 (2000).
 60. Cornwall, M. W. & Mcpoil, T. G. The Influence of Tibialis Anterior Muscle Activity on Rearfoot Motion during Walking. *Foot Ankle Int.* **15**, 75–79 (1994).
 61. Mündermann, A., Dyrby, C. O. & Andriacchi, T. P. Secondary gait changes in patients with medial compartment knee osteoarthritis: Increased load at the ankle, knee, and hip during walking. *Arthritis Rheum.* **52**, 2835–2844 (2005).
 62. Adães, S. *et al.* Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* **16**, 01–17 (2014).
 63. Pingel, J. *et al.* Injection of high dose botulinum- toxin A leads to impaired skeletal muscle function and damage of the fibrillar and non-fibrillar structures. *Sci. Rep* **7**, 1–14 (2017).
 64. Yin, Z. *et al.* Progressive Motor Deficit is Mediated by the Denervation of Neuromuscular Junctions and Axonal Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant (P301S) Tau Protein. *J. Alzheimers. Dis.* **60**, S41–S57 (2017).

65. Makii, Y. *et al.* Orthopaedic Surgery Alteration of gait parameters in a mouse model of surgically induced knee osteoarthritis. **26**, 1–7 (2018).
66. Jacobs, B. Y. *et al.* The Open Source GAITOR Suite for Rodent Gait Analysis. *Sci. Rep* **8**, 1–14 (2018).
67. Tsai, H.-C., Chen, T.-L., Chen, Y.-P. & Chen, R.-M. Traumatic osteoarthritis-induced persistent mechanical hyperalgesia in a rat model of anterior cruciate ligament transection plus a medial meniscectomy. *J. Pain Res* **11**, 41–50 (2017).
68. Bondeson, J., Blom, A. B., Wainwright, S., Hughes, C. & Caterson, B. The Role of Synovial Macrophages and Macrophage-Produced Mediators in Driving Inflammatory and Destructive Responses in Osteoarthritis. **62**, 647–657 (2010).
69. Lange-brokaar, B. J. E. De *et al.* Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthr. Cartil.* **20**, 1484–1499 (2012).
70. Wood, M. J. *et al.* Macrophage proliferation distinguishes 2 subgroups of knee osteoarthritis patients Find the latest version: Macrophage proliferation distinguishes 2 subgroups of knee osteoarthritis patients. **4**, 0–12 (2019).

2. ESTUDO II

Fibrose e inflamação estão associadas a atrofia do músculo tibial anterior de ratos com osteoartrite de joelho

Jonathan Emanuel Cunha¹, PT; Thiago Luiz de Russo¹, MSc, PhD; Germanna Medeiros Barbosa¹, MSc, PhD; Paula Aiello Tomé Souza Castro¹; PT, PhD; Thiago Mattar Cunha², MSc, PhD; Fernando Queiróz Cunha², MSc, PhD; Tania Fátima Salvini¹, MSc, PhD.

1 Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil; 2 Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Artigo em revisão no periódico *Muscle & Nerve* (Fator de impacto: 2,496)

Resumo

A fraqueza e atrofia muscular, comuns na osteoartrite do joelho (OAJ), podem acelerar a destruição da cartilagem e aumentar a incapacidade e a dor. No entanto, os mecanismos de atrofia muscular envolvidos com a OAJ não são totalmente claros. Este estudo teve como objetivo investigar as vias moleculares envolvidas na fibrose muscular, inflamação e atrofia muscular em modelo animal de OAJ induzida por transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA). Doze ratos Wistar machos foram randomizados em dois grupos OAJ (cirurgia TLCA na pata traseira direita) e controle (sem intervenção). Após 59 dias, os animais realizaram testes funcionais (limiar de resposta térmica, limiar de retirada da pata e teste de marcha). No dia seguinte, os animais foram sacrificados e o músculo tibial anterior (TA) foi dissecado e pesado. O TA foi utilizado para avaliação da área transversal das fibras musculares (AST), porcentagem de tecido conjuntivo (fibrose), zimografia (Metaloproteinase - MMP) e expressão gênica de TNF- α , IL-6, NF- κ B, miostatina, MuRF-1, atrogina1, TWEAK e Fn14. O músculo TA do grupo OAJ mostrou uma redução na AST (26,2%) e aumentou a porcentagem de tecido conjuntivo sem diferença na zimografia. Houve uma regulação positiva de TNF- α , NF- κ B, miostatina, MuRF-1, atrogina1, TWEAK e Fn14. O limiar de resposta térmica e o limiar de retirada da pata foram significativamente elevados no grupo OAJ em comparação ao controle. O teste da marcha mostrou uma redução na área e largura da pata e um aumento no ângulo da pata no grupo OAJ em comparação ao controle. Concluímos que o aumento de fibrose associada à atrofia muscular pode estar ligada a déficits funcionais. Também vimos que o TWEAK pode ser um importante marcador para fibrose, atrofia e inflamação na OAJ. Portanto, nossos resultados sugerem que o músculo TA é fortemente afetado em ratos com OAJ e indica que esse músculo poderia ser mais investigado nessa doença, devido à sua importância na biomecânica e reabilitação da marcha.

Palavras chave: Doença musculoesquelética, fraqueza muscular, prejuízos funcionais, dor, vias inflamatórias.

2.1. Introdução

A osteoartrite de joelho (OAJ) é uma doença comum, que afeta cerca de 250 milhões de pessoas no mundo (1). Um de seus fatores de risco mais comum é a lesão do ligamento cruzado anterior do joelho (LCA) (2). A transecção do LCA (TLCA) tem sido usada, em modelo animal, por induzir alterações semelhantes à OAJ em humanos (3,4,5,6). A TLCA induz alterações metabólicas nos condrócitos, respostas adaptativas na articulação e ativação de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), fator nuclear kappa B (NF- κ B) (5,7,8) e interleucinas (IL) 1b, 6, 10 e 17 (5).

Sabe-se que comprometimentos musculares associados a OAJ estão intimamente ligados à destruição da cartilagem (10). Há evidências de que a fraqueza do músculo quadríceps na OAJ pode acelerar o processo de destruição da cartilagem articular (11), modificar a biomecânica (12), aumentar a sobrecarga articular (11,13) e levar a perda de função (10,14). Um estudo recente (6) identificou que a atrofia no músculo quadríceps em ratos com OAJ, induzida por TLCA está associada à redução da área da junção neuromuscular e a alterações na expressão de genes (atrofina-1, MuRF-1, nAChR e MuSK) e de proteínas musculares (MuRF-1) e da junção neuromuscular (NCAM). Alterações similares foram observadas no músculo tibial anterior (TA), exceto a atrofia das fibras musculares, mais acentuada no TA do que no quadríceps (6). Também foi relatado um declínio da força, taxa de relaxamento e expressão de ATP no TA de camundongos com OAJ induzida por TLCA (15). Apesar das alterações do TA associadas à OAJ e de sua importância na estabilidade do tornozelo e da marcha, ele ainda é pouco estudado nessa doença.

Um dos principais mecanismos associados à atrofia muscular é a fibrose (16). A fibrose é um acúmulo excessivo de componentes da matriz extracelular, principalmente colágeno, caracterizando aumento do tecido conjuntivo, que comumente reduz a função muscular (17). Estudos recentes indicam que a fibrose e a atrofia muscular estão associadas ao fator de necrose tumoral ligado ao indutor de apoptose (TWEAK) e seu receptor fator de crescimento de fibroblastos 14 (Fn-14) (18-20). Estudos prévios indicam uma forte ligação do TWEAK/Fn14 a doenças inflamatórias crônicas (21-23). Recentemente, foi observado que a concentração de TWEAK e MMP-1 no líquido sinovial em humanos está relativamente mais alto em estágios iniciais da OAJ e os níveis diminuem com a progressão da doença (24).

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de fibrose e os níveis de TWEAK/Fn-14 no músculo TA de ratos com OAJ, induzida por TLCA. Foram analisadas as possíveis correlações entre esses fatores com a inflamação e a atrofia muscular, bem como a testes funcionais. A hipótese foi que os níveis de TWEAK/Fn14 também estão associados à atrofia e a inflamação muscular na OAJ.

2.2. Materiais e Métodos

Todos os procedimentos e experimentos foram realizados de acordo com o Guia de cuidados e uso de animais de laboratório, e foi aprovado pelo comitê de ética animal (Protocolo número 9197020816). Todos os procedimentos foram conduzidos por profissionais cegados em relação a alocação dos grupos experimentais.

Desenho e período experimental

O tamanho da amostra foi determinado a priori com base em dados de um estudo piloto, com a área transversal das fibras musculares e a porcentagem de tecido conjuntivo do músculo TA como desfechos primários. Considerando um valor alfa de 0,05, poder $(1-\beta) = 95\%$ (Software GPower 3.1), resultando em 5 animais por grupo. No caso de uma possível perda durante os procedimentos experimentais, 6 animais foram alocados para cada grupo.

Doze ratos Wistar (dois meses de idade, peso médio de $208 \pm 6,6g$) foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos ($n = 6$ por grupo): a) controle (sem cirurgia) e b) OAJ (submetido à TLCA na pata traseira direita).

Os ratos foram alojados em gaiolas (dois animais por gaiola) em condições livres de patógenos a $24^\circ C \pm 1^\circ C$ sob um ciclo de luz reversa (12 h claro / 12 h escuro), com livre acesso à comida e água padrão. Todos os animais foram submetidos a testes in vivo 59 dias após a TLCA e foram sacrificados no dia seguinte para coleta do músculo TA (Figura 1).

OAJ induzida por TLCA

Resumidamente, os ratos foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (12 mg / kg de xilazina e 95 mg / kg de ketamina). Uma incisão no lado medial do tendão patelar proporcionou acesso ao espaço articular. Posteriormente, a lesão da cápsula articular e a TLCA foram realizados com tesoura oftalmológica. Em seguida, foi realizado

o deslocamento da tíbia em relação ao fêmur (teste de gaveta anterior) para confirmar a TLCA, método adaptado de Stoop et al., 2001. Ao retornar da anestesia os animais voltaram para as gaiolas e paracetamol (13,5 mg / 100 ml) foi adicionado à água como analgesia pós-operatória. Utilizamos apenas o grupo controle sem intervenção cirúrgica, porque estudos anteriores encontraram desgaste articular semelhante a OAJ nos grupos SHAM (lesão capsular sem TLCA) (25,26). Além disso, estudos recentes de nosso laboratório mostraram importantes resultados comparando apenas o grupo controle com o grupo OAJ (5,6,27).

Teste de marcha.

Após pintar as patas traseiras dos ratos (tinta atóxica), eles foram liberados para caminhar em uma pista (60cm comprimento x 7cm largura), coberta por um papel branco que foi depois digitalizado em 300 dpi, atraídos por uma câmara escura. Foram consideradas as seguintes medidas: Área da pata (medida ao redor da pata -cm²); largura da pata (distância entre o primeiro e o quinto dedo – cm); passada (distância da mesma pata traseira entre duas passadas – cm); base (distância horizontal entre a pata esquerda e direita – cm); comprimento da pata (distância entre o terceiro dedo do pé e o calcanhar - cm); ângulo da pata (ângulo através das patas traseiras - °). As medidas das patas foram quantificadas pelo software ImageJ (versão 1.43u, National Institutes of Health, EUA) (6,28).

Limiar de retirada da pata

Para avaliar a hipernocicepção articular (femorotibial) foi utilizado um medidor eletrônico de pressão von Frey (Insight® EFF-301). Após aclimatação (30 min), em gaiolas acrílicas com piso de grade de arame (12 x 10 x 17 cm de altura), um avaliador treinado aplicou pressão perpendicular à superfície plantar da pata traseira direita. O registro do limiar de pressão suportado foi registrado automaticamente (g/F) quando os animais retiravam, lambiam ou coçavam a pata (29,30).

Limiar de resposta térmica

Os ratos foram aclimatados (30 min) antes do teste. Em seguida, um animal de cada vez foi colocado no equipamento (Hotplate, Insight®) a 55°C, por um período máximo de 45 segundos ou até o período de latência para resposta dos membros

posteriores (agitação, salto ou lambida). A tentativa foi gravada (por uma câmera). Os resultados foram expressos pelo tempo de resposta em segundos (27,28).

Coleta de amostras musculares

O músculo tibial anterior (TA) foi isolado, removido, pesado e dividido em duas partes. O fragmento proximal foi imerso em isopentano (pré-resfriado em nitrogênio líquido), armazenado a -80 ° C e usado para medir a AST das fibras musculares e a porcentagem de tecido conjuntivo. O fragmento distal foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido, armazenado a -80°C e usado para medir o RNA mensageiro (mRNA) e para análise de MMPs por zimografia.

Medidas histológicas

Cortes seriados histológicos foram obtidos do músculo TA em um micrótomo criostato (Leica, CM1860, Alemanha). As lâminas foram montadas com cortes seriados de 10 µm. As lâminas foram coradas com azul de toluidina para medir a AST das fibras musculares e coradas com o kit tricrômico de Masson para análise do tecido conjuntivo (HT15; Sigma – Aldrich, St. Louis, MO). As imagens foram examinadas sob um microscópio óptico (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Alemanha) e para análise morfométrica foi utilizado software Image J (versão 1.43u, National Institutes of Health, EUA). A AST foi obtida medindo 100 fibras localizadas na região central da seção. A quantificação da porcentagem de tecido conjuntivo foi calculada dividindo-se o número total de pontos coincidentes nas interseções lineares no tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) pelo número total de pontos em uma grade com uma área total de 10.800 µm² contendo 168 intersecções em linha reta. Os resultados foram expressos no número total de fibras musculares e percentual de tecido conjuntivo (31).

Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR.

O RNA total foi extraído do músculo TA de amostras dos grupos controle e OAJ, utilizando o reagente TRIzol (Life Technologies, EUA). Para quantificar o RNA foi utilizado um espectrofômetro Bioresearch BioPhotometer (Eppendorf® Hamburg, Alemanha). A pureza do RNA foi avaliada medindo a absorvância a 260/280 nm com uma relação superior a 1,8. O RNA extraído foi tratado com DNase I (Sigma Aldrich, AMPD1) para eliminar qualquer possível contaminação com DNA genômico das amostras. Foi utilizado o kit de síntese de cDNA iScript™ (Bio-Rad, CA) para

transcrição reversa, seguindo as recomendações do fabricante. Por fim, foi avaliado os níveis de expressão de mRNAs por PCR em tempo real (qPCR - CFX 96 Touch™, versão 3.0, Bio-Rad, CA). Os primers foram projetados pelo software Primer Express® (3.0.11 - Applied Biosystems, CA, EUA) seguindo sequências do GenBank (www.pubmed.com) e sintetizado por Life Technologies (EUA) (Tabela Suplementar 1). Os níveis de expressão foram normalizados pela *peptidilprolil isomerase A* (PPIA), cuja expressão foi constante entre todas as amostras. Foi utilizado o método comparativo de avaliação relativa da expressão $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ (32).

Zimografia

Amostras de proteínas (80 µg) foram coletadas dos músculos TA para extração de proteínas. As proteínas foram extraídas seguindo protocolo prévio (6). Posteriormente foi realizado eletroforese em duplicata. A análise de zimografia foi realizada de acordo com a metodologia previa (33). A massa molecular dos géis foi determinada comparando com a massa molecular da proteína de referência Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os dados foram expressos como concentração MMP2. A análise quantitativa de densitometria das bandas de proteínas nos géis de zimografia foi realizada usando o software Image Lab ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Hercules, CA).

Análise estatística.

As variáveis contínuas foram apresentadas como média ± erro padrão da média (EPM). Como todas as variáveis tiveram distribuição normal ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Shapiro-Wilk, então foi realizado um teste t independente utilizando o software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences* - versão 23.0 - SPSS Inc., EUA). As figuras foram plotadas no software Prism8 (versão 8.0 – GraphPad Prism, California, EUA). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para comparar a correlação, foi utilizado o teste de correlação de Pearson, devido a distribuição dos dados ser normal. O intervalo (positivo e negativo) adotado foi: $< 0,5$ correlação insignificante, 0,5 a 0,7 correlação moderada, 0,7 a 0,9 correlação forte e 0,9 a 1 correlação muito forte (34).

2.3. Resultados

Para todas as análises foram utilizados 6 animais por grupo. Não houve perda de animais durante os procedimentos.

Teste de marcha

O grupo OAJ diminuiu a área da pata ($5,98 \pm 0,74$ OAJ vs $4,83 \pm 0,76$ controle; $p = 0,02$) e a largura da pata ($2,09 \pm 0,17$ OAJ vs $1,92 \pm 0,30$ controle; $p = 0,01$). Houve um aumento no ângulo da pata ($12,17 \pm 3,45$ OAJ vs $28,26 \pm 5,86$ controle; $p = 0,001$) no grupo OAJ em comparação ao controle (Figura 2). Não foram encontradas diferenças nas demais variáveis.

Limiar de nocicepção da pata e limiar de resposta térmica

Encontramos uma diminuição do limiar nociceptivo no grupo OAJ em relação ao controle ($3,19 \pm 0,36$ OAJ vs $1,58 \pm 0,08$ controle; $p = 0,001$), houve também uma diminuição no limiar térmico no grupo OAJ em relação ao grupo controle ($60,71 \pm 10,90$ OAJ vs $12,21 \pm 0,35$ controle; $p = 0,001$; Figura 3).

Área de secção transversal e porcentagem de tecido conjuntivo

O grupo OAJ apresentou atrofia de 26,26% na área de secção transversal (AST) das fibras musculares do TA comparado ao grupo controle ($307,2 \pm 13,91$ vs $416,6 \pm 13,56$, respectivamente, $p = 0,001$; Tabela 1). O músculo TA do grupo OAJ também apresentou um aumento na porcentagem de tecido conjuntivo em comparação ao grupo controle ($16,92 \pm 2,43\%$ vs $5,33 \pm 1,69\%$, respectivamente, $p = 0,002$; Tabela 1).

Expressão gênica (qPCR)

Houve aumento da expressão gênica de atrogina1 ($p=0,006$; aumento de cerca de 16 vezes), MuRF-1 ($p=0,005$; aumento aproximado de 7 vezes), miostatina ($p=0,002$; aumentou cerca de 17 vezes), TNF- α ($p=0,02$), NF- κ b ($p=0,004$; aumentou cerca de 10 vezes), TWEAK ($p = 0,001$; aumentou aproximadamente 10 vezes) e Fn14 ($p = 0,03$; aumentou aproximadamente 8 vezes) no tibial anterior do grupo OAJ em comparação ao controle (Figura 4). Não houve diferença entre os grupos para IL-6 ($p = 0,12$) (Figura 4).

Zimografia

A atividade de MMP-2 (72KDa) foi detectada nos dois grupos. No entanto, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos (OAJ: $554,17 \pm 84,71$ vs controle: $572,35 \pm 61,80$, $p = 0,92$). A atividade da MMP-9 não foi detectada nos dois grupos.

Correlação de Pearson

A AST das fibras musculares mostrou correlação negativa moderada a forte com a porcentagem de tecido conjuntivo ($r=-0,620$), MuRF-1 ($r=-0,665$), atrogina1 ($r=-0,806$), miostatina ($r=-0,707$), TWEAK ($r=-0,823$) e Fn14 ($r=-0,666$). Houve uma correlação positiva moderada a forte entre a porcentagem de tecido conjuntivo com TWEAK ($r=0,598$) e Fn14 ($r=0,793$; Tabela 2).

Além disso, foram observadas correlações positivas fortes ou muito fortes entre NF- κ B e TNF α ($r=0,810$), miostatina ($r=0,938$) e TWEAK ($r=0,851$). TWEAK mostrou fortes correlações positivas com TNF α ($r=0,848$), MuRF-1 ($r=0,708$), miostatina ($r=0,883$) e Fn14 ($r=0,820$; Tabela 2).

Encontramos correlação moderada entre a área da pata vs AST ($r=0,637$), ângulo da pata vs AST ($r=0,611$), área da pata vs TWEAK ($r=-0,610$) e área da pata vs Fn14 ($r=-0,828$; Tabela 2).

Houve correlações moderadas a fortes do limiar térmico e do limiar de retirada da pata com todas as variáveis (Tabela 2).

2.4. Discussão

Os achados deste estudo sugerem uma relação entre atrofia, porcentagem de tecido conjuntivo e expressão gênica de citocinas inflamatórias (TNF α , NF- κ B e TWEAK). Sabe-se que na OAJ há aumento de citocinas, como o TNF α e NF κ B, no líquido sinovial (5,8,35). Também foi demonstrado um aumento de citocinas inflamatórias associadas à atrofia muscular em animais (36) e diminuição da força em humanos (8,37,38).

Foi relatado que um aumento no TNF α plasmático pode levar à degradação de proteínas corporais (39). O TNF tem importante papel na atrofia muscular, quando ligado ao NF- κ B, que ativa a via ubiquitina do proteassoma, aumentando a expressão de MuRF-1 e atrogina1 (40). Além disso, sabe-se que os macrófagos secretam IL1b, o que induz uma falha na transmissão sináptica e pode levar à atrofia muscular (41). Assim, o aumento

de citocinas pró-inflamatórias podem regular a atrofia e levar a alterações neuromusculares no TA em um modelo animal de OAJ.

Nossos resultados sugerem, pela primeira vez, que a via TWEAK/Fn14 também está associada à atrofia, aumento da porcentagem de tecido conjuntivo e inflamação muscular na OAJ. Estudos anteriores demonstraram que TWEAK/Fn14 podem levar à atrofia (33,42) e parece envolvido com inflamação e erosão óssea na artrite reumatoide e na OAJ (43). Um estudo recente mostrou uma associação entre os níveis de TWEAK e MMP1 no líquido sinovial com a severidade da OAJ em humanos (24). Embora estudos anteriores mostrem que TWEAK/Fn14 possam ser importantes marcadores em doenças crônicas (22), tumores (44) e até atrofia (19,20), as vias do TWEAK/Fn14 na OAJ ainda são pouco claras.

Embora o quadríceps seja alvo na OAJ (11,13,45). Nossos resultados sugerem que músculos não ligados diretamente à articulação do joelho, como o TA, podem ser fortemente acometidos por essa doença. Previamente foram relatadas alterações neuromusculares (redução força, taxa de relaxamento e diminuição do ATP) no TA de camundongos com OAJ (15). Recentemente um estudo em ratos com OAJ observou redução do diâmetro máximo de placas motoras e maior expressão do receptor nicotínico de acetilcolina ϵ (ϵ nAChR) com grande atrofia no músculo TA (6). Esses resultados indicam uma relação entre a atrofia do músculo TA na OAJ com fatores neuromusculares.

A perda de função é uma condição comum na OAJ que contribui para a incapacidade (46). Da mesma forma, as mudanças no padrão de marcha observadas neste estudo, corroborando com a hipótese que existem alterações no comportamento motor envolvidas neste modelo de OAJ. Neste sentido, já foi descrito que o mecanismo de inibição muscular artrogênica sobre o quadríceps está relacionado à fraqueza muscular na OAJ (47-49). A disfunção da alça motora gama (48) e atividade cortical anormal, com maior recrutamento do córtex motor para tarefas básicas (50,51), são mecanismos neurais que poderiam influenciar nos achados deste trabalho.

Também vimos que existe uma associação moderada entre área de impressão da pata durante a marcha com atrofia do TA, sugerindo que a atrofia desse músculo pode estar relacionada com as perdas funcionais, como observado em outros grupos musculares de indivíduos com OAJ (52). Os resultados de correlação entre as citocinas inflamatórias e o limiar mecânico e de sensibilidade térmica fortalecem a hipótese de que a presença de fatores inflamatórios no músculo TA podem aumentar a sensibilidade distal em animais com OAJ.

Em conclusão, o TWEAK pode ser um importante marcador para alterações neuromusculares na OAJ, assim como observado em outras doenças crônicas. A maior fibrose, atrofia muscular e inflamação muscular pode potencialmente levar a prejuízos funcionais. Nossos resultados mostraram que o músculo TA é fortemente afetado em ratos com OAJ, indicando que seria interessante esse músculo ser mais investigado nessa doença, devido à sua importância na biomecânica e reabilitação da marcha.

2.5. Figuras e Tabelas

Figura 1. Linha do tempo dos procedimentos: transecção do ligamento cruzado anterior (TLCA); osteoartrite de joelho (OAJ); tibial anterior (TA).

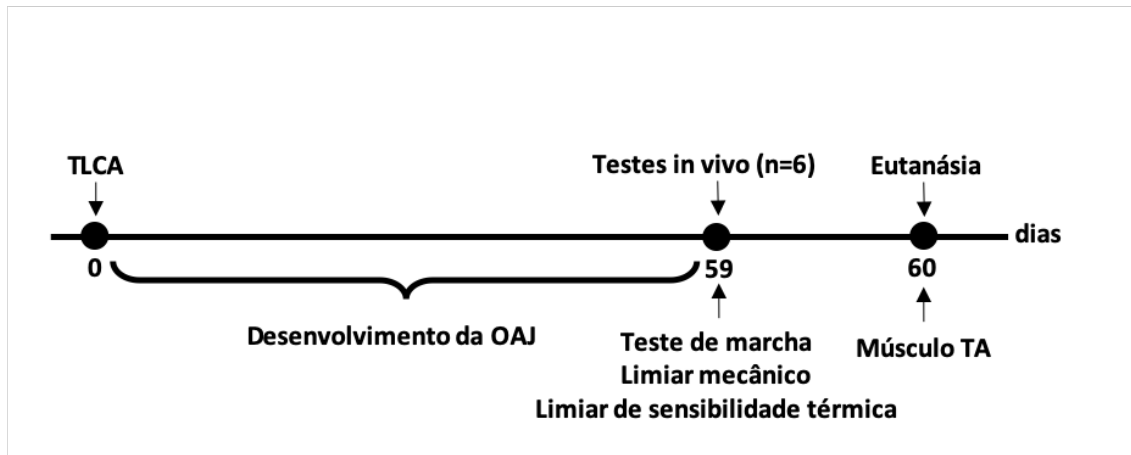


Figura 2. Teste de marcha do grupo controle e osteoartrite de joelho (OAJ), n=6/grupo. As imagens a direita são representativas das impressões das patas dos animais usadas para análise. *: p<0.05, **p<0.01.

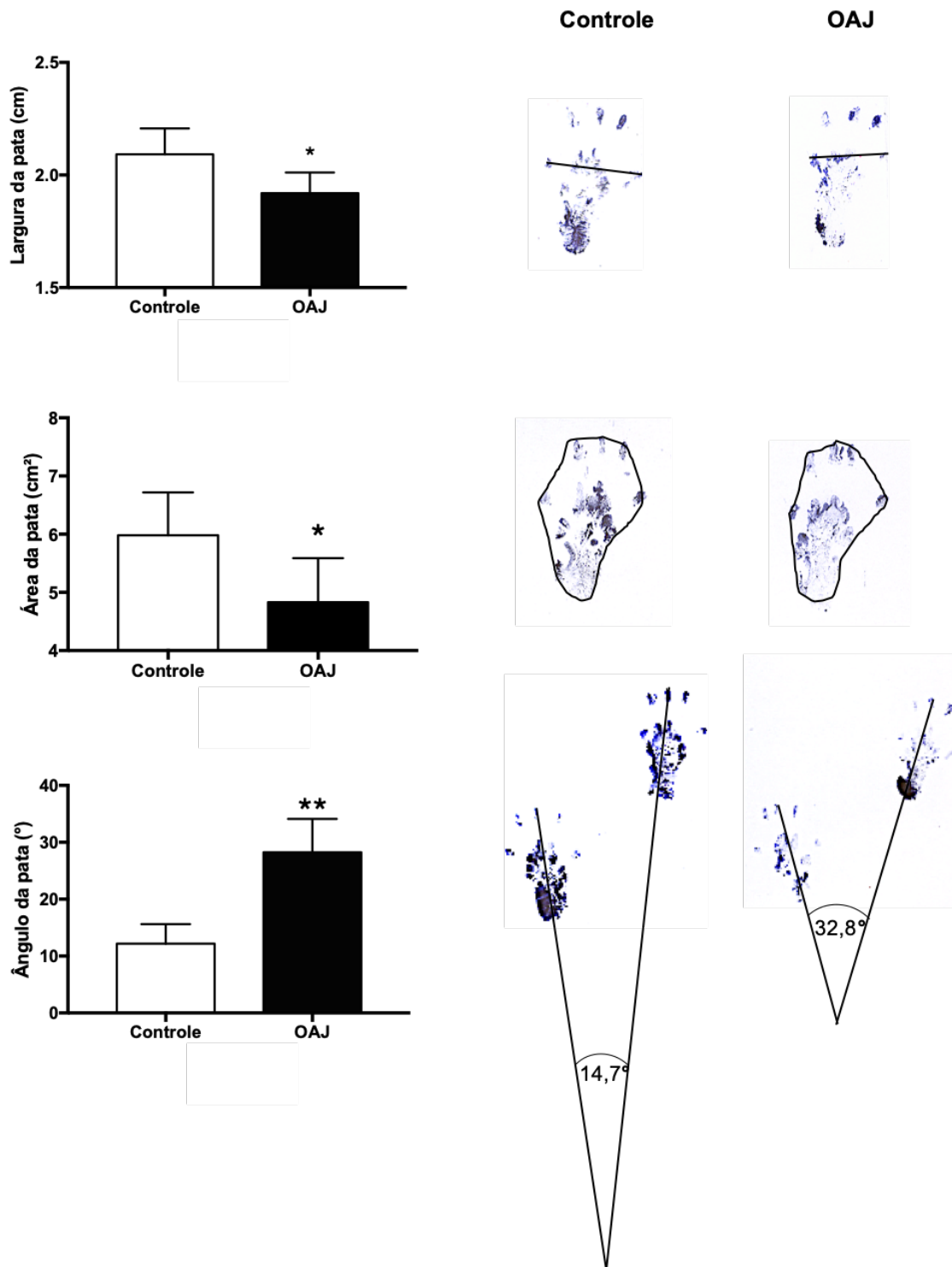


Figura 3. Teste de limiar de resposta térmica e teste de limiar de resposta mecânica nos grupos controle e osteoartrite de joelho (OAJ), n=6/grupo. **: p<0.01.

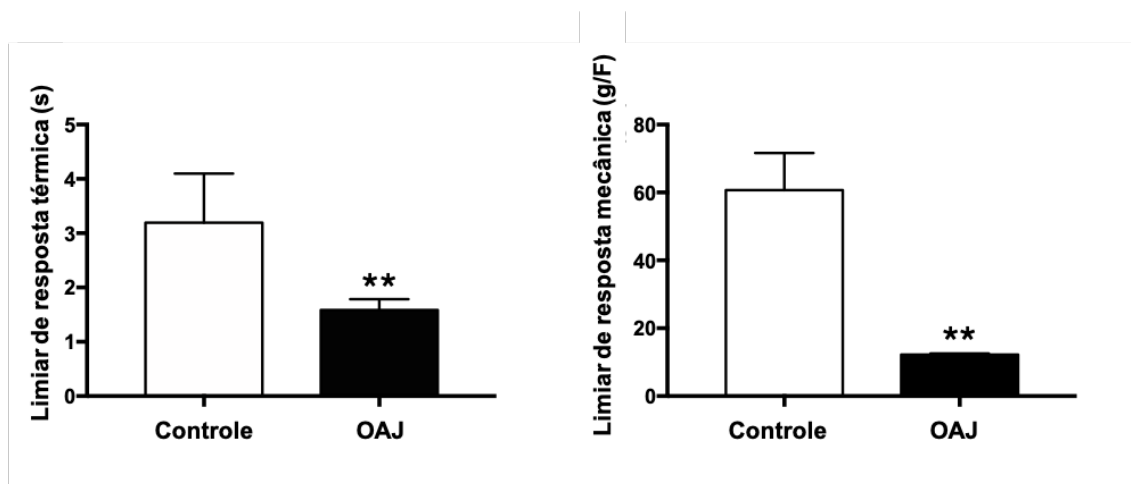


Figura 4. Expressão gênica de mRNA por PCR em tempo real no músculo tibial anterior (TA). Grupos controle e osteoartrite de joelho (OAJ), n=6/grupo. Os resultados estão expressos em unidades arbitrárias. *: p<0.05, **: p<0.01.

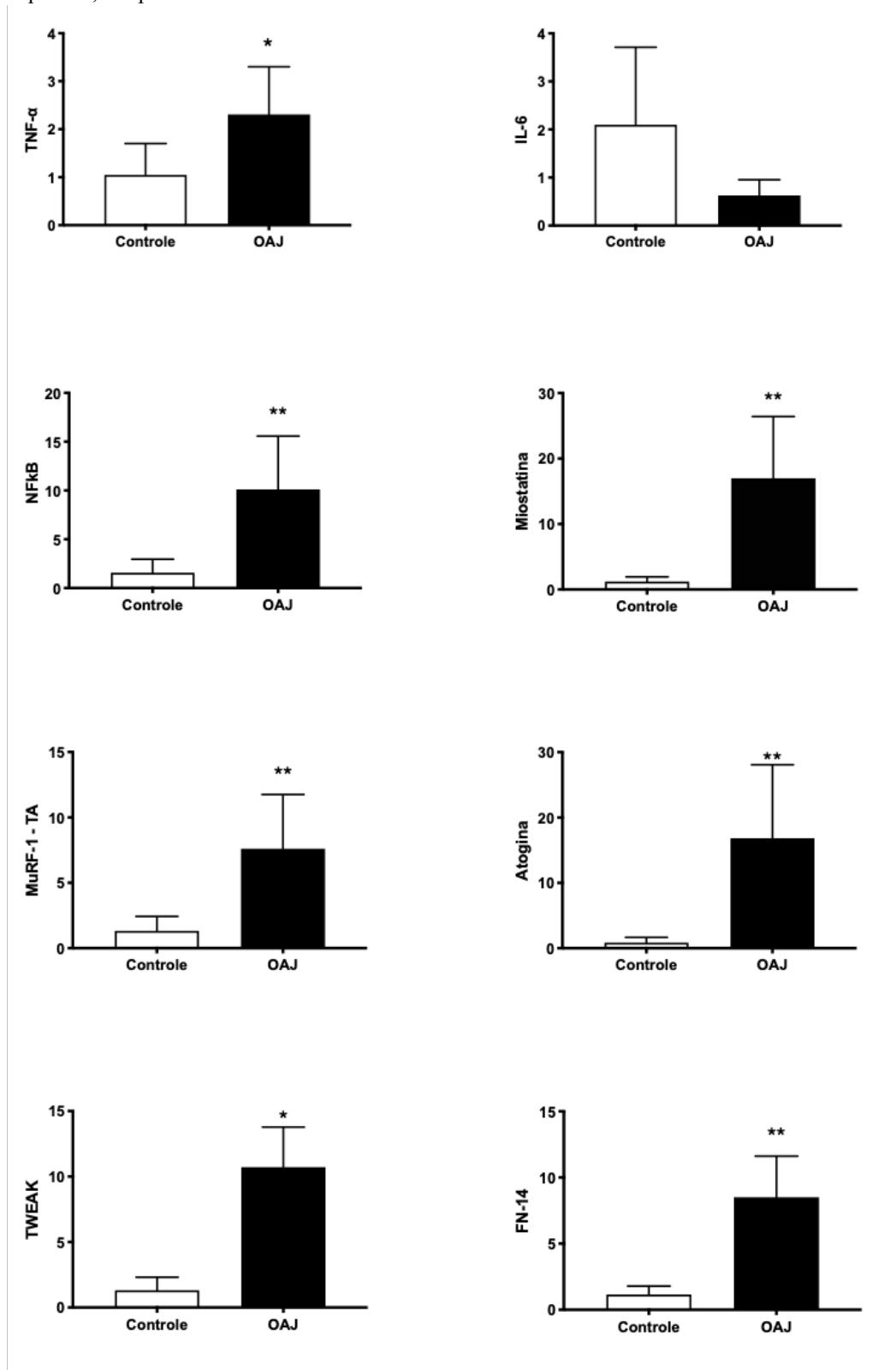


Tabela 1. Dados dos animais e análises histológicas. Massa corporal final dos animais, massa do músculo, área de secção transversal das fibras musculares e porcentagem de tecido conjuntivo do músculo tibial anterior. *: p<0,05, **: p<0,01, grupos controle e osteoartrite de joelho (OAJ) respectivamente, AST: área de secção transversal.

Grupos	AST (μm^2)	Tecido conjuntivo (%)	Zimografia (densidade)
Controle	416,6.70 \pm 13,56	5,33 \pm 1,69	554,17 \pm 84,71
OAJ	**307,2 \pm 13,91	**16,92 \pm 2,43	572,35 \pm 61,80

Tabela 2. Correlação de Pearson.

	AST	Tecido conectivo	MMP2	TNF α	IL6	NF- κ B	MuRF1	Atrogina1	Miostatina	TWEAK	Fn14	Limiar mecânico	Limiar térmico	Largura da pata	Área da pata	Ângulo da pata
AST	1															
Tecido conectivo	-0,620*	1														
MMP2	-0,092	-0,299	1													
TNF α	-0,544	0,270	-0,199	1												
IL6	0,702*	-0,465	0,005	-0,355	1											
NF- κ B	-0,702*	0,351	-0,139	0,810**	-0,457	1										
MURF1	-0,665*	0,521	-0,064	0,585*	-0,424	0,873**	1									
Atrogina1	-0,806**	0,388	0,005	0,618*	-0,499	0,880**	0,807**	1								
Miostatina	-0,707*	0,478	-0,338	0,830**	-0,480	0,938**	0,812**	0,816**	1							
TWEAK	-0,823**	0,598*	-0,112	0,848**	-0,565	0,851**	0,708**	0,777**	0,883**	1						
Fn14	-0,666*	0,793**	-0,103	0,535	-0,471	0,547	0,605*	0,433	0,617*	0,820**	1					
Limiar mecânico	0,825**	-0,779**	0,064	-0,677*	0,637*	-0,709**	-0,700*	-0,711**	-0,764**	-0,910**	-0,844**	1				
Limiar térmico	0,642*	-0,639*	0,061	-0,726**	0,265	-0,731**	-0,706*	-0,591*	-0,677*	-0,781**	-0,695*	0,763**	1			
Largura da pata	0,591	-0,004	-0,610*	-0,483	0,257	-0,559	-0,473	-0,491	-0,358	-0,556	-0,401	0,475	0,563	1		
Área da pata	0,637*	-0,545	-0,190	-0,249	0,474	-0,404	-0,488	-0,312	-0,391	-0,610*	-0,828**	0,568	0,482	0,525	1	
Ângulo da pata	-0,611*	0,409	0,480	0,131	-0,405	0,369	0,338	0,443	0,201	0,529	0,567	-0,594	-0,518	-0,672*	-0,686*	1

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$. AST: área de secção transversal; TNF- α : Tumor Necrosis Factor -Alpha; NF- κ B: nuclear factor κ B; MuRF-1: muscle ring finger - 1; TWEAK: tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis; Fn14: fibroblast growth factor-inducible 14.

Tabela suplementar 1. Sequência de primers para qPCR. IL-6: Interleucina 6; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; NF- κ B: fator nuclear kappa B; MuRF-1: *muscle ring finger – 1*; TWEAK: fator de necrose tumoral ligado ao indutor de apoptose; Fn14: fator de crescimento de fibroblastos 14; PPIA: peptidilprolil isomerase A.

IL-6	Foward: AGAGGAGACTTCACAGAGGA Reverse: CCAGTTTGGTAGCATCCATC
TNF- α	Foward: CCTCCCTCT CATCAGTTCTA Reverse: CAGAGAGGAGGT TGA CTTTC
NF- κ B	Forward: CATTGAGGTGTATTTACGG Reverse: GGCAAGTGGCCATTGTGTTC
Miostatina	Foward: CTACCACGGAAACAATCATTACCA Reverse: AGCAACATTTGGGCTTTCCAT
Atrogina-1	Foward: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT Reverse: GTTGAATCTTCTGGATCCAGGAT
MuRF-1	Foward: TGTCTGGAAGGTTCGTTCCG Reverse: ATGCCGGTCCATGCATCACTT
TWEAK	Foward: GCTACGACCGCCAGATTGGG Reverse: GCCAGCACACCGTTCACCAG
Fn-14	Foward: AAGTGCATGGACTGCGCTTCTT Reverse: GGAAACTAGAAACCAGCGCCAA
PPIA	Foward: TGGCAAATGCTGGACCAAAC Reverse: TGCCTTCTTTCACCTTCCCAA

2.6. Referências

1. Hunter, D. J. & Bierma-Zeinstra, S. Osteoarthritis. *Lancet* **393**, 1745–1759 (2019).
2. Poulsen, E. *et al.* Knee osteoarthritis risk is increased 4-6 fold after knee injury—a systematic review and meta-analysis. *Br. J. Sports Med.* **53**, 1454–1463 (2019).
3. Stoop, R. *et al.* Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthr. Cartil.* **9**, 308–315 (2001).
4. Fang, H. & Beier, F. Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 413–21 (2014).
5. Barbosa, G. M. *et al.* Clinical-like cryotherapy improves footprint patterns and reduces synovial inflammation in a rat model of post-traumatic knee osteoarthritis. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
6. Cunha, J. E. *et al.* Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
7. Kapoor, M., Martel-Pelletier, J., Lajeunesse, D., Pelletier, J. P. & Fahmi, H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 33–42 (2011).
8. Mabey, T. & Honsawek, S. Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J. Orthop.* **6**, 95–105 (2015).
9. Herzog, W., Longino, D. & Clark, A. The role of muscles in joint adaptation and degeneration. *Langenbeck's Arch. Surg.* **388**, 305–315 (2003).
10. Alnahdi, A. H., Zeni, J. A. & Snyder-Mackler, L. Muscle Impairments in Patients With Knee Osteoarthritis. *Sports Health* **4**, 284–292 (2012).
11. Rice, D. A., McNair, P. J. & Lewis, G. N. Mechanisms of quadriceps muscle weakness in knee joint osteoarthritis: The effects of prolonged vibration on torque and muscle activation in osteoarthritic and healthy control subjects. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R151 (2011).
12. Igawa, T. & Katsuhira, J. Biomechanical Analysis of Stair Descent in Patients with Knee Osteoarthritis. *J. Phys. Ther. Sci.* **26**, 629–631 (2014).
13. Amin, S. *et al.* Quadriceps strength and the risk of cartilage loss and symptom progression in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 189–198 (2009).

14. De Zwart, A. H. *et al.* Factors associated with upper leg muscle strength in knee osteoarthritis: A scoping review. *J. Rehabil. Med.* **50**, 140–150 (2018).
15. van der Poel, C., Levinger, P., Tonkin, B. A., Levinger, I. & Walsh, N. C. Impaired muscle function in a mouse surgical model of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 1047–1053 (2016).
16. Mahdy, M. A. A. Skeletal muscle fibrosis: an overview. *Cell Tissue Res.* **375**, 575–588 (2019).
17. Lieber, R. L. & Ward, S. R. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 4. structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **305**, (2013).
18. Kumar, A., Bhatnagar, S. & Paul, P. K. TWEAK and TRAF6 regulate skeletal muscle atrophy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **15**, 233–239 (2012).
19. Sato, S., Ogura, Y. & Kumar, A. TWEAK/Fn14 signaling axis mediates skeletal muscle atrophy and metabolic dysfunction. *Front. Immunol.* **5**, 1–10 (2014).
20. Tajrishi, M. M., Zheng, T. S., Burkly, L. C. & Kumar, A. Cytokine & Growth Factor Reviews The TWEAK-Fn14 pathway: A potent regulator of skeletal muscle biology in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* **25**, 215–225 (2014).
21. Cheng, E., Armstrong, C. L., Galisteo, R. & Winkles, J. A. TWEAK/Fn14 axis-targeted therapeutics: Moving basic science discoveries to the clinic. *Front. Immunol.* **4**, 1–14 (2013).
22. Bertin, D., Stephan, D., Khrestchatisky, M. & Desplat-Jégo, S. Is TWEAK a biomarker for autoimmune/chronic inflammatory diseases? *Front. Immunol.* **4**, 1–5 (2013).
23. Du, Y. Y. *et al.* Regulatory Tweak/Fn14 signaling pathway as a potent target for controlling bone loss. *Biomed. Pharmacother.* **70**, 170–173 (2015).
24. Hwang, I. Y. *et al.* Synovial fluid levels of TWEAK and matrix metalloproteinase 1 in patients with osteoarthritis, and associations with disease severity. *J. Orthop. Surg.* **26**, 1–7 (2018).
25. Delfino, G. B. *et al.* Quadriceps muscle atrophy after anterior cruciate ligament transection involves increased mRNA levels of atrogen-1, muscle ring finger 1, and myostatin. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **92**, 411–419 (2013).
26. Dias, C. N. K., Vasilceac, F. A., Durigan, J. L. Q., Medeiros, A. I. de & Mattiello, S. M. Analysis of local and systemic TNF- α and IL1- α expression in the acute

- phase of knee osteoarthritis of rats. *Cytokine* **66**, 164–165 (2014).
27. Barbosa, G. M. *et al.* Thirty days after anterior cruciate ligament transection is sufficient to induce signs of knee osteoarthritis in rats: pain, functional impairment, and synovial inflammation. *Inflamm. Res.* **69**, 279–288 (2020).
 28. Ruan, M. Z. C., Patel, R. M., Dawson, B. C., Jiang, M.-M. & Lee, B. H. L. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. *Osteoarthr. Cartil.* **21**, 1355–1364 (2013).
 29. Pinto, L. G. *et al.* Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1 β production. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 1–13 (2015).
 30. Silva, J. M. de S. *et al.* Muscle wasting in osteoarthritis model induced by anterior cruciate ligament transection. *PLoS One* **13**, 1–17 (2018).
 31. Sabadine, M. A., Russo, T. L., Luna, G. F. & Oliveira Leal, A. M. Effects of mesenchymal stromal cells on type 1 diabetes mellitus rat muscles. *Muscle and Nerve* **58**, 583–591 (2018).
 32. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 33. Pinheiro-Dardis, C. M. & Russo, T. L. Electrical Stimulation Based on Chronaxie Increases Fibrosis and Modulates TWEAK/Fn14, TGF- β /Myostatin, and MMP Pathways in Denervated Muscles. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **96**, 260–267 (2017).
 34. Mukaka, M. M. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med. J.* **24**, 69–71 (2012).
 35. Choi, Jo, Park, Kang & Park. NF-B Signaling Pathways in Osteoarthritic Cartilage Destruction. *Cells* **8**, 734 (2019).
 36. Xu, J. *et al.* Knee muscle atrophy is a risk factor for development of knee osteoarthritis in a rat model. *J. Orthop. Transl.* (2019).
 37. Levinger, P. *et al.* Association between skeletal muscle inflammatory markers and walking pattern in people with knee osteoarthritis. *Arthritis Care Res.* **63**, 1715–1721 (2011).
 38. Maly, M. R., Marriott, K. A. & Chopp-Hurley, J. N. Osteoarthritis year in review 2019: rehabilitation and outcomes. *Osteoarthr. Cartil.* **28**, 249–266 (2020).
 39. Chen, D. *et al.* Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Res.* **5**, 16044 (2017).

40. Krishnasamy, P., Hall, M. & Robbins, S. R. The role of skeletal muscle in the pathophysiology and management of knee osteoarthritis. *Rheumatol. (United Kingdom)* **57**, 22–33 (2018).
41. Mukund, K. & Subramaniam, S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **12**, 1–46 (2020).
42. Mittal, A. *et al.* The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice. *J. Cell Biol.* **188**, 833–849 (2010).
43. Dharmapatni, A. A. S. S. K. *et al.* TWEAK and Fn14 expression in the pathogenesis of joint inflammation and bone erosion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **13**, 1–10 (2011).
44. Hu, G., Zeng, W. & Xia, Y. TWEAK/Fn14 signaling in tumors. *Tumor Biol.* **39**, 1–9 (2017).
45. Spinoso, D. H., Bellei, N. C., Marques, N. R. & Navega, M. T. Quadriceps muscle weakness influences the gait pattern in women with knee osteoarthritis. *Adv. Rheumatol.* **58**, 1–6 (2018).
46. Sharma, L. Osteoarthritis year in review 2015 : clinical. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 36–48 (2016).
47. Hurley, M. V. & Newham, D. J. The influence of arthrogenous muscle inhibition on quadriceps rehabilitation of patients with early, unilateral osteoarthritic knees. *Rheumatology* **32**, 127–131 (1993).
48. Rice, D. A., McNair, P. J., Lewis, G. N. & Dalbeth, N. Quadriceps arthrogenic muscle inhibition: The effects of experimental knee joint effusion on motor cortex excitability. *Arthritis Res. Ther.* **16**, 1–7 (2014).
49. Callaghan, M. J., Parkes, M. J., Hutchinson, C. E. & Felson, D. T. Factors associated with arthrogenous muscle inhibition in patellofemoral osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **22**, 742–746 (2014).
50. Baumeister, J., Reinecke, K., Schubert, M. & Weiß, M. Altered electrocortical brain activity after ACL reconstruction during force control. *J. Orthop. Res.* **29**, 1383–1389 (2011).
51. Sonnery-Cottet, B. *et al.* Arthrogenic muscle inhibition after ACL reconstruction: A scoping review of the efficacy of interventions. *Br. J. Sports Med.* **53**, 289–298 (2019).
52. Gonçalves, G. H. *et al.* Ankle strength impairments associated with knee

osteoarthritis. *Clin. Biomech.* **46**, 33–39 (2017).

3. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADA À TESE

3.1. Artigos completos publicados

- _Ferreira J.P.; Sartor C.D.; Leal A.M.O.; Sacco I.C.N.; Sato T.O.; Ribeiro I.L.; Soares A.S.; **Cunha J.E.**; Salvini T.F. The effect of peripheral neuropathy on lower limb muscle strength in diabetic individuals - *Clinical Biomechanics*. DOI: 10.1016/j.clinbiomech.2017.02.003.
- **Cunha, J.E.**; Barbosa, G.M.; Castro P.A.T.S.; Luiz B.L.F.; Silva, A.C.A; Russo T.L.R.; Vasilceac, F.A.; Cunha, T.M.; Cunha F.Q.; Salvini, T.F. Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/s41598-019-42546-7
- _Dantas, OL; Breda CC; Serrao, PRMS; Aburquerque-Sendín F; Jorge AES; **Cunha JE**; Barbosa GM; Durigan, JLQ; Salvini TF. Short-term cryotherapy and placebo improve pain and physical function in individuals with knee osteoarthritis - a randomized placebo controlled trial - *Physical Therapy Journal*. DOI: 10.1016/j.jphys.2019.08.004
- _Barbosa, G.M.; **Cunha, J.E.**; Cunha, T.M.; Martinho, L.B.; Castro P.A.T.S.; Oliveira, F.F.B.; Cunha F.Q.; Ramalho. F.S.; Salvini, T.F. Clinical-like cryotherapy improves patterns and reduce synovial inflammation in a rat model of post-traumatic knee osteoarthritis. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/s41598-019-50958-8
- _Barbosa, G.M.; **Cunha, J.E.**; Cunha, T.M.; Russo, T.L.; Cunha, T.M.; Castro P.A.T.S.; Oliveira, F.F.B.; Cunha F.Q.; Ramalho. F.S.; Salvini, T.F. Thirty days after anterior cruciate ligament transection is sufficient to induce signs of knee osteoarthritis in rats: pain, functional impairment, and synovial inflammation. *Inflammation Research*. DOI: 10.1007/s00011-020-01317-1

3.2. Artigos completos submetidos

- _Castro, PAT; **Cunha, JE**; Barbosa, GM; Machanocker, DH; Cunha, TM; Perez, RS; Oliveira, FFB; Ramalho, FS; Russo, TL; Cunha, FQ; Salvini, TF. Clinical-like cryotherapy in acute arthritis of the knee improves inflammation signs, pain, joint swelling and motor performance in mice. Em revisão (*Scientific Reports*; Manuscript Number: SREP-19-20743), 2019.
- _Castro, PAT; Barbosa, GM; **Cunha, JE**; Machanocker, DH; Cunha, TM; Luna, GF; Russo, TL; Cunha, FQ; Salvini, TF. Effect of cryotherapy on inflammatory signs, the neuromuscular signaling pathway and the pathway of atrophy / skeletal muscle weakness in mice with acute knee arthritis. Em processo de submissão para o *Jornal Arthritis Research & Therapy*, 2020.
- _Castro, PAT; Machanocker, DH; Luna, GF; Cunha, TM; Barbosa, GM; **Cunha, JE**; Russo, TL; Cunha, FQ; Salvini, TF. Studies on joint swelling, joint nociception, neutrophil migration and nerve-muscle interface pathways in the acute knee arthritis induced by the aia model in mice. Em processo de submissão para o *Jornal Plos One*, 2020.

3.3. Resumos publicados em anais

- _Castro, P.A.T.S.; Barbosa, G.M.; **Cunha, J.E**; Cunha, T.M.; Cunha, F.Q.; Salvini, T.F. A crioterapia reduz a hipernocicepção mecânica e a resposta inflamatória em camundongos com artrite aguda do joelho. Modalidade: pôster. I Congresso Internacional e II Congresso Brasileiro da ABRAFITO, Brasília. Revista Inspirar – movimento & saúde (ISSN 2175-537X). Suplemento 1. Vol. 9. Nº3. Ed43. Pág 244, JUL/AGO/SET, 2017.

- Barbosa, G.M.; **Cunha, J.E.**; Martinho, L.B.; Machanocker, D.H.; Castro, P.A.T.S.; Salvini, T.F. A crioterapia não altera a nocicepção, função e inflamação na osteoartrite do joelho de ratos induzida por transecção do ligamento cruzado anterior. Modalidade: pôster. I Congresso Internacional e II Congresso Brasileiro da ABRAFITO – Brasília. Revista Inspirar – movimento & saúde (ISSN 2175-537X). Suplemento 1. Vol. 9. Nº3. Pág 64 Ed43. JUL/AGO/SET, 2017.
- Luiz, B.L.F.; Martinho, L.B.; Barbosa, G.M.; Castro, P.A.T.S.; **Cunha, J.E.**; Silva, A.C.A.; Salvini, T.F. Sinais e sintomas inflamatórios da osteoartrite do joelho de rato induzida por transecção do ligamento cruzado anterior. Modalidade: pôster. XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar, São Carlos, São Paulo, 2018. Publicado nos Anais do XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar (ISBN: 978-85-94099-04-4).
- Martinho, L.B.; Barbosa, G.M.; Luiz, B.L.F.; **Cunha, J.E.**; Silva, A.C.A.; Castro, P.A.T.S.; Salvini, T.F. A crioterapia reduz a inflamação sinovial no joelho de rato com osteoartrite. Modalidade: pôster. XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar, São Carlos, São Paulo, 2018. Publicado nos Anais do XXV Simpósio de Fisioterapia da UFSCar (ISBN: 978-85-94099-04-4).
- **Cunha, J.E.**; Barbosa, G.M.; Castro, P.A.T.S.; Russo, T.L.; Vasilceac, F.A.; Cunha, T.M.; Salvini, T.F. Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats. OARSI World Congress on Osteoarthritis. Toronto/Canadá. Osteoarthritis and Cartilage 27 (2019) S373 – S516.
- Barbosa, G.M.; **Cunha, J.E.**; Castro, P.A.T.S.; Cunha, T.M.; Oliveira, F.F.B.; Cunha, F.Q.; Ramalho, F.S.; Salvini, T.F. Clinical-like Cryotherapy Improves gait function and reduces synovial inflammation in rats with knee osteoarthritis. OARSI World Congress on Osteoarthritis. Toronto/Canadá. Osteoarthritis and Cartilage 27 (2019) S373 – S516.
- **Cunha, J.E.**; Barbosa, G.M.; Castro, P.A.T.S.; Cunha, T.M.; Salvini, T.F. Osteoartrite do joelho induz atrofia e remodelamento da junção neuromuscular de rato após a transecção do ligamento cruzado anterior. Pôster eletrônico. II Congresso Internacional e III Congresso Brasileiro da ABRAFITO – Belo Horizonte/MG. In: Anais do Congresso Internacional e Congresso Brasileiro da ABRAFITO, 2019.
- Barbosa, G.M.; **Cunha, J.E.**; Cunha, T.M.; Castro, P.A.T.S.; Martinho, L.B.; Salvini, T.F. Trinta dias após a transecção do ligamento cruzado anterior são suficientes para induzir a dor, déficits funcionais e aumento de sinais inflamatórios relacionados a osteoartrite do joelho de rato. II Congresso Internacional e III Congresso Brasileiro da ABRAFITO – Belo Horizonte/MG. Pôster eletrônico. In: Anais do Congresso Internacional e Congresso Brasileiro da ABRAFITO, 2019.

3.4. Coorientação de iniciação científica

- Beatriz de Oliveira Leite - Iniciação científica com bolsa FAPESP - sinais e sintomas inflamatórios da osteoartrite de joelho de rato induzida por transecção do ligamento cruzado anterior.
- Andreza Cristina Arcari - Iniciação científica sem bolsa – Correlação entre a densidade de massa muscular por densitometria óssea e área de secção transversa em ratos com osteoartrite de joelho.

3.5. Bancas

- _Salvini, T. F.; Carvalho, C.; **Cunha, JE**. Participação em banca de Carolina Carreira Breda. O efeito da crioterapia de curto prazo no controle da dor, na função e qualidade de vida em indivíduos em fase final de osteoartrite de joelho- série de casos. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia) - Universidade Federal de São Carlos UFSCar.
- _Simões, N. V. N.; **Cunha, J. E.**; Back C. G. N. Participação em banca de Joenildo Vicente Arnulfo. O efeito do exercício físico em pacientes com diabetes mellitus, uma revisão da literatura. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia) - Universidade Federal de São Carlos.
- _**Cunha, J. E.**; Castro, P. A. T. S.; Tim, C. Participação em banca de Beatriz Leite Ferreira Luiz Sinais e sintomas da osteoartrite de joelho induzida por transecção do ligamento cruzado anterior. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia) - Universidade Federal de São Carlos.
- _Simões, N. V. N.; **Cunha, J. E.**; Vera, M. A. A. Participação em banca de Marcelo Evandro Milani. Fisioterapia nas lesões de isquiotibiais de jogadores de futebol - Revisão da literatura. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia) - Universidade Federal de São Carlos.
- _Dantas, L. O.; Jorge, A. E. S.; **Cunha, J. E.** Participação em banca de Maria Paula Perruchi. Efeito da crioterapia no limiar de dor a pressão em indivíduos com osteoartrite de joelho - Ensaio clínico randomizado. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia) - Universidade Federal de São Carlos.
- _Russo, T. L.; **Cunha, J. E.**; Silva, S. M. Participação em banca de Joao Victor Almeida Monção. Efeito agudo da crioterapia na espasticidade e na marcha de indivíduos hemiparéticos crônicos. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Fisioterapia) - Universidade Federal de São Carlos UFSCar.
- _**Cunha, J. E.** Participação em banca de I Encontro Científico. I Encontro Científico do Curso de Especialização em Fisioterapia Neurofuncional. 2018. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Fisioterapia Neurofuncional) - Universidade Federal de São Carlos.

4. ANEXOS

A – Parecer do Comitê de ética animal

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ADAPTAÇÕES MORFOLÓGICAS E DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO NEUROMUSCULAR NA OSTEOARTRITE DE JOELHO INDUZIDA POR TRANSECÇÃO DO LIGAMENTO CRUZADO ANTERIOR", protocolada sob o CEUA nº 6197020816, sob a responsabilidade de **Tânia de Fátima Salvini e equipe; Jonathan Emanuel da Cunha; Fernando Augusto Vasileac; Fernando Queiroz Cunha; Paula Aiello Tomé de Souza Castro; Thiago Luis Russo; Tiago Mattar Cunha** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 19/08/2016.

We certify that the proposal "MORPHOLOGICAL AND NEUROMUSCULAR SIGNALING PATHWAYS CHANGES IN KNEE OSTEOARTHRITIS INDUCED BY ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT TRANSECTION", utilizing 60 Isogenic rats (60 males), protocol number CEUA 6197020816, under the responsibility of **Tânia de Fátima Salvini and team; Jonathan Emanuel da Cunha; Fernando Augusto Vasileac; Fernando Queiroz Cunha; Paula Aiello Tomé de Souza Castro; Thiago Luis Russo; Tiago Mattar Cunha** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 08/19/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 06/2016 a 12/2017	Área: Centro de Ciências Biológicas E da Saúde	Origem: Biotério Central da UFSCar
Espécie: Ratos isogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 10 meses N: 30
Linhagem: Wistar		Peso: 100 a 250 g
Origem: Biotério Central da UFSCar		
Espécie: Ratos isogênicos	sexo: Machos	idade: 8 a 10 semanas N: 30
Linhagem: Wistar		Peso: 100 a 250 g

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Knee osteoarthritis induces atrophy and neuromuscular junction remodeling in the quadriceps and tibialis anterior muscles of rats

Received: 14 May 2018
Accepted: 1 April 2019
Published online: 24 April 2019

Jonathan Emanuel Cunha¹, Germanna Medeiros Barbosa¹, Paula Aiello Tomé de Souza Castro¹, Beatriz Leite Ferreira Luiz¹, Andreza Cristine Arcari Silva¹, Thiago Luiz Russo¹, Fernando Augusto Vasilceac², Thiago Mattar Cunha³, Fernando Queiróz Cunha³ & Tania Fátima Salvini¹

Knee osteoarthritis (KOA) is associated with muscle weakness, but it is unclear which structures are involved in the muscle changes. This study assessed morphological alterations and the expression of genes and proteins linked to muscular atrophy and neuromuscular junctions (NMJs) in KOA, induced by anterior cruciate ligament transection (ACLT) in rats. Two groups of rats were assessed: control (without intervention) and KOA (ACLT surgery in the right knee). After 8 weeks, quadriceps, tibialis anterior (TA) and gastrocnemius muscles were analyzed (area of muscle fibers, NMJ, gene and protein expression). KOA group showed atrophy in quadriceps (15.7%) and TA (33%), with an increase in atrogen-1 and muscle RING-finger protein-1 (MuRF-1). KOA group showed quadriceps NMJ remodeling (reduction area and perimeter) and decrease in NMJ diameter in TA muscle. The expression of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) γ -nAChR increased and that of α -nAChR and muscle specific tyrosine kinase (MuSK) declined in the quadriceps, with a decrease in ϵ -nAChR in TA. MuRF-1 protein expression increased in quadriceps and TA, with no changes in neural cell adhesion molecule (NCAM). In conclusion, ACLT-induced KOA promotes NMJ remodeling and atrophy in quadriceps and TA muscles, associated with inflammatory signs and changes in muscle gene and protein expression.

Knee osteoarthritis (KOA) is a common disease that affects more than 250 million people worldwide¹. It is a chronic, degenerative, inflammatory disorder² that damages cartilage, narrows the intra-articular space and forms osteophytes³. Individuals with KOA exhibit pain, swelling, joint stiffness and loss of function⁴, with a decline in quality of life and functional capacity⁵. Anterior cruciate ligament transection (ACLT) in rats is considered a good model for studying KOA, since it promotes similar changes in human KOA⁶, such as deep erosion of joint cartilage and osteophyte formation⁷. Furthermore, studies have identified muscle fiber atrophy and increased atrogen expression, such as atrogen-1 and muscle RING-finger protein-1 (MuRF-1), in the quadriceps of rats, 15 days after ACLT⁸, while in rabbits, ACLT decreased knee extensor strength and reduced the electromyographic signal of quadriceps⁹.

Muscle weakness is common in KOA and considered a risk factor for disease development and progression¹⁰. The inflammatory characteristics of KOA lead to neural modifications such as pre-synaptic reflex inhibition, decreasing alpha motor neuron activation, causing atrophy and reducing muscle strength¹¹. One of the most affected muscles in KOA are the quadriceps¹², and their weakness accelerates cartilage destruction¹⁰ by promoting biomechanical changes in movement¹³ and raising joint overload^{14,15}.

Changes in neuromuscular junctions (NMJs) may also be associated with muscle weakness in KOA, given that they are important for muscle function¹⁶. Chemical synapses occur between the motor neuron and muscle fibers, mediated by acetylcholine. Changes in NMJs or nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), linked to muscle contraction, are known to compromise strength, resulting in muscle weakness and atrophy¹⁷. Despite the high incidence of KOA and associated muscle alterations, no studies to date have investigated possible NMJ changes in

¹Physical Therapy Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil. ²Gerontology Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, Brazil. ³Pharmacology Department, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to T.F.S. (email: tania@ufscar.br)

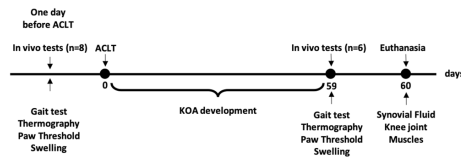


Figure 1. Experimental design. Representative figure of time and analyzes of the study. KOA = knee osteoarthritis, ACLT = anterior cruciate ligament transection.

Morphometric parameters	Control	KOA	p
Quadriceps			
NMJ Total area (μm^2)	560.70 \pm 80	346.72 \pm 68	**0.001
NMJ Perimeter (μm)	315.10 \pm 23	263.45 \pm 21	**0.002
NMJ Maximum diameter (μm)	1194.96 \pm 15	1123.66 \pm 13	0.410
Muscle fiber CSA (μm^2)	383.7 \pm 22	319.4 \pm 12	*0.029
Tibialis anterior			
NMJ Total area (μm^2)	634.88 \pm 86	613.04 \pm 82	0.664
NMJ Perimeter (μm)	356.80 \pm 86	340.62 \pm 82	0.397
NMJ Maximum diameter (μm)	1371.53 \pm 13	1143.46 \pm 12	*0.014
Muscle fiber CSA (μm^2)	425.2 \pm 27	292.7 \pm 27	**0.006
Gastrocnemius			
NMJ Total area (μm^2)	624.08 \pm 17	617.27 \pm 60	0.929
NMJ Perimeter (μm)	130.81 \pm 11	131.85 \pm 11	0.877
NMJ Maximum diameter (μm)	1145.31 \pm 80	1110.04 \pm 15	0.626
Muscle fiber CSA (μm^2)	425.2 \pm 25	430.0 \pm 52	0.935

Table 1. Morphometric analysis of neuromuscular junctions and cross-sectional area muscle fiber of the quadriceps, tibialis anterior and gastrocnemius muscles. Abbreviations: KOA = Knee osteoarthritis, NMJ = Neuromuscular junction, CSA = Cross-sectional area muscle fiber. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$, KOA group compared to controls.

KOA that could contribute to elucidating the mechanisms associated with muscle weakness and atrophy. As such, the aim of this study was to assess the possible alterations in NMJs associated with muscle and functional changes in rats with ACLT-induced KOA.

Results

Morphometric analysis. 60 days after ACLT (Fig. 1), the KOA group showed a decrease in the cross-sectional area (CSA) of the quadriceps (control $383.7 \pm 22.04 \mu\text{m}^2$ vs KOA $319.4 \pm 12.54 \mu\text{m}^2$; $p = 0.029$) and TA (control $425.2 \pm 27.68 \mu\text{m}^2$ vs KOA $292.7 \pm 27.16 \mu\text{m}^2$; $p = 0.006$; Table 1).

The NMJ of the quadriceps exhibited a decline in the area and perimeter ($p = 0.001$) in the KOA group compared to controls, while the TA only demonstrated a decline in the maximum NMJ diameter ($p = 0.014$) in the KOA group compared to controls. No changes in neuromuscular junctions were detected in the gastrocnemius muscle (Table 1).

In both the control and KOA groups, the NMJ showed fewer type pretzel branches, with normal morphological characteristics. This means a normal number of junctional folds that ensure the localization of nAChRs and the propagation of plaque potential to generate muscle contraction¹⁸. However, in the quadriceps muscle, there was a clear reduction in the spread of NMJs in the KOA group (Fig. 2B) compared to controls (Fig. 2A). The TA muscle showed a decrease in the maximum diameter (Fig. 2D) of the NMJ.

Real-time (qPCR) PCR analysis of gene expression. An increase in atrogin-1 ($p = 0.000$) and MuRF-1 ($p = 0.011$) expression was observed in the quadriceps of the KOA group compared to controls. Moreover, α -nAChR ($p = 0.016$) and muscle-specific tyrosine kinase (MusK) ($p = 0.031$) expression declined and γ -nAChR ($p = 0.001$) expression in the KOA group rose in relation to controls (Fig. 3). For the TA, there was an increase in atrogin-1 ($p = 0.013$) and MuRF-1 ($p = 0.001$) expression, and a decline in ϵ -nAChR ($p = 0.046$) in the KOA group compared to controls (Fig. 3).

Protein expressions by western blot analysis. An increase in MuRF-1 protein was found in KOA quadriceps (control $0.94.2 \pm 0.16$ vs KOA 1.56 ± 0.18 ; $p = 0.03$) and TA (control 0.75 ± 0.12 vs KOA 1.12 ± 0.10 ; $p = 0.04$) muscles compared to controls (Fig. 4). No difference was found in neural cell adhesion molecule (NCAM) protein in KOA quadriceps (control 1.15 ± 0.14 vs KOA 1.01 ± 0.10 ; $p = 0.47$) and TA (control 0.82 ± 0.10 vs KOA 0.97 ± 0.07 $p = 0.28$) muscles compared to controls (Fig. 4). The complete blots are described in Supplementary Figure 2.

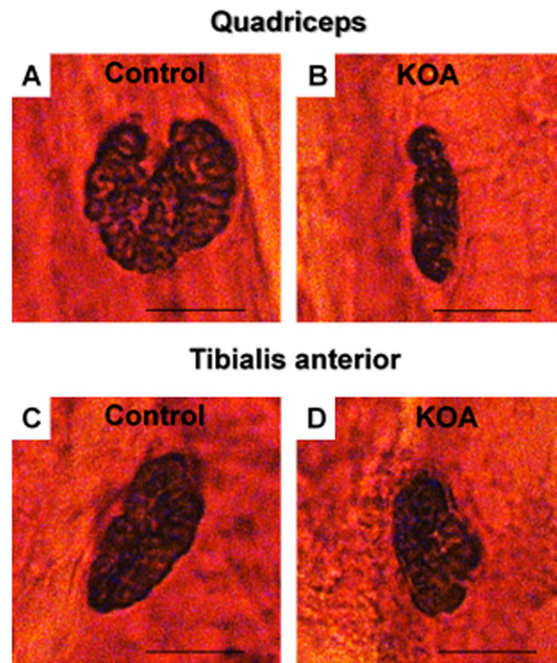


Figure 2. Morphology of neuromuscular junctions (Nonspecific Esterase Technique). Control group: quadriceps (A) and TA (C); KOA group: quadriceps (B) and TA (D). Abbreviations: KOA = Knee osteoarthritis group. Scale bar: 10 μ m, 40X magnification.

Gait test. KOA reduced paw area ($p=0.000$) and width ($p=0.023$), with a decline in stride length ($p=0.016$) compared to the control group (Fig. 5 and Supplementary Table 2).

Inflammatory signs. Joint swelling rose in the KOA group in relation to controls (11.1 ± 0.21 mm vs 10.0 ± 0.12 mm, respectively; $p=0.005$; Fig. 6A). The KOA group showed an increase in the skin temperature of the knee compared to controls ($36.56 \pm 0.07^\circ\text{C}$ vs $35.82 \pm 0.14^\circ\text{C}$, respectively; $p=0.001$), Fig. 6B. There was also a rise in leukocyte migration in the synovial fluid of the KOA group compared to controls ($10.20 \pm 1.86 \times 10^3/\text{i.a.}$ vs $0.0 \pm 0 \times 10^3/\text{i.a.}$, respectively; $p=0.002$; Fig. 6C). The differential count revealed a higher concentration of macrophages without synovial fluid compared to neutrophils and lymphocytes (Fig. 6D).

We found a decline in pain threshold in the Von Frey test in the KOA group compared to controls (46.82 ± 0.69 g/F vs 60.63 ± 2.25 g/F, respectively; $p=0.0002$), Fig. 6E. The KOA group showed a higher Mankin histological score than that of controls (4.16 ± 1.07 vs 0.66 ± 0.21 , respectively; $p=0.028$; Fig. 6F and Supplementary Table 3). Figure 6G,H show a difference in proteoglycan content, evidenced by dye intensity (red), in addition to discontinuity on the joint surface in the KOA group.

Discussion

This study provided a novel contribution, showing changes in NMJs associated with quadriceps and TA muscle atrophy in rats with KOA. The most significant NMJ changes (decreased area and perimeter) were observed in the quadriceps, which exhibited 15.7% atrophy in muscle fibers. Although the TA demonstrated greater muscle atrophy (33%), alterations in the NMJs were smaller than in the quadriceps and restricted to an increase in diameter. Increased MuRF-1 expression¹⁹ and muscle autophagy²⁰ have been suggested as possible mechanisms associated with NMJ alterations. Our study also found an increase in MuRF-1 and atroglin-1 expression could be associated with NMJ changes. It is known that MuRF-1 and atroglin-1 are the main signalers of muscle atrophy in different experimental models^{21,22}. We identified an increase in the protein expression of MuRF-1 in the quadriceps and TA muscles, in line with increased genetic expression, indicating ACLT-induced atrophy in the KOA model. In addition to being involved in muscle atrophy, recent studies suggest that MuRF-1 is an

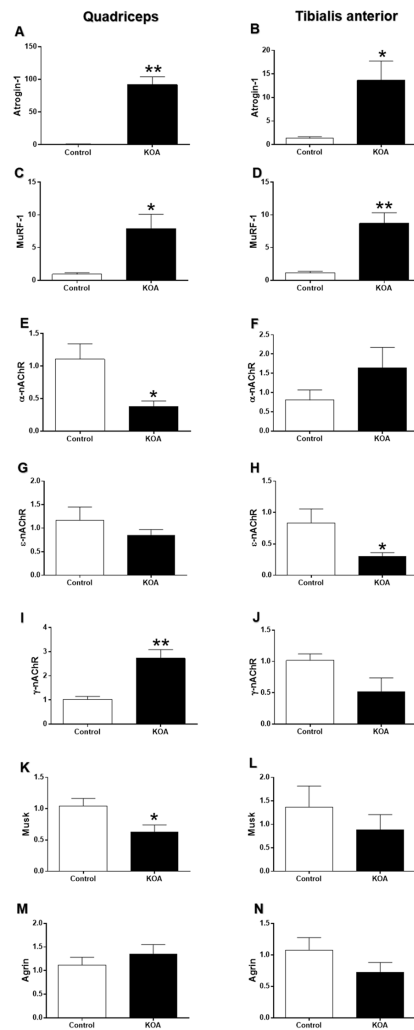


Figure 3. Gene expression analysis. mRNA expression in the quadriceps and TA muscles of control and KOA groups, respectively: Atrogin-1 (A,B); MuRF-1 (C,D); α-nAChR; (E,F); ε-nAChR; (G,H) γ-nAChR; (I,J); MusK (K,L); Agrin (M,N). Abbreviations: KOA = Knee osteoarthritis. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, KOA group compared to controls.

important mediator in regulating the amount of nAChRs in the NMJ^{19,23}, and may also be linked to NCAM, a regulator of synaptic stability related to neurotransmission^{24,25}. However, the KOA group showed no changes in the protein expression of NCAM, which may be more sensitive only in cases of muscle denervation^{26,27}. However, the increase in MURF-1 protein expression observed in this model may be related to both muscle atrophy and NMJ changes.

Most studies with KOA focus on observing changes in quadriceps, since they are directly related to the knee joint and exhibit muscle atrophy^{28–30}, reduced strength^{14,31} and functional decline^{15,32}. In addition to muscle atrophy, the quadriceps showed greater NMJ alterations. With respect to mRNA expression in the quadriceps, we

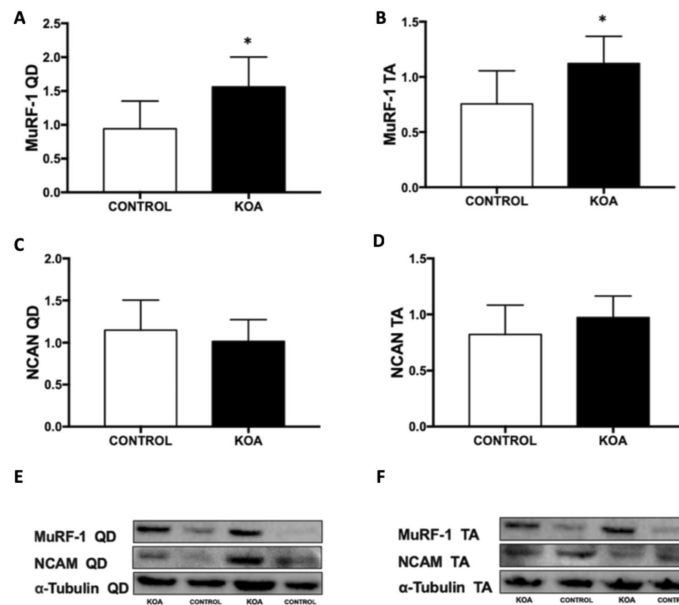


Figure 4. Protein Expression: Protein Expression of MuRF-1 and NCAM in the quadriceps (A,C,E) and TA (B,D,F) muscles. Abbreviations: KOA = Knee osteoarthritis group, QD = quadriceps muscle, TA = Tibialis anterior muscle, * $p < 0.05$, KOA group compared to controls.

observed an increase in the gamma subunit of the acetylcholine receptor (γ -nAChR), which is normally expressed in the embryonic phase³³, but also in muscle diseases such as denervation³⁴. There was also a decline in alpha subunit (α -nAChR) expression, responsible for acetylcholine flow into the postsynaptic membrane³⁵, as well as MuSK, a gene that initiates post-synaptic differentiation and plays an important clustering role and maintains nAChR³⁶. The results of the present study show intense remodeling in the NMJs of quadriceps associated with KOA. Muscle fiber atrophy and arthrogenic muscle inhibition, which decreases quadriceps activation by afferent inhibition of the α motor neuron^{11,37}, may be important mechanisms associated with the NMJ changes identified in this muscle. Another possible mechanism may be nerve terminal withdrawal, modulating the release of acetylcholine and leading to adaptation of the NMJs^{38,39}. However, other studies are needed to assess the mechanisms involved in NMJ remodeling observed in the present study.

The TA muscle is little researched in KOA. We found only one study that assessed the TA of mice 4 and 8 weeks after KOA induction, exhibiting a decline in strength, 40% decrease in relaxation rate and less ATP expression, but with no alterations in the cross-sectional area of muscle fibers⁴⁰. On the other hand, some studies on the TA of individuals with KOA assess function^{41,42} and report a decline in eccentric strength in ankle dorsiflexors⁴³. However, there is no clear evidence about the TA atrophy mechanisms in individuals with KOA. We believe that the greater atrophy observed in our study may be related to disuse, as described for quadriceps³¹, due to muscle compensation¹³, or because TA is a monoarticular muscle that may be more affected by atrophy⁴⁴. Given the significant atrophy and NMJ alterations observed in the TA muscle, we believe that this muscle deserves to be more thoroughly studied in the KOA. Future studies on TA adaptations in the KOA may provide new scientific evidence to clinical practice and rehabilitation of this muscle.

The absence of neuromuscular changes in the gastrocnemius muscle observed here indicates that the KOA affects primarily the knee extensor muscles such as the quadriceps^{9,15} and those that contribute to decelerate movement during functional activities such as the TA muscle^{45,46}. Our results corroborate this hypothesis.

Our findings showed impaired gait pattern in the KOA group, as observed in similar studies^{47,48}. Recent studies have associated gait deficits with a decrease in the CSA of the gastrocnemius muscle of rats⁴⁹ and long extensor of mouse fingers⁵⁰. In addition, changes in gait were also associated with increased KOA pain in mice⁵¹. Changes in the gait pattern of animals are similar to the functional changes observed in individuals with KOA⁵². Our results show a correlation between altered gait patterns and the neuromuscular changes identified by atrophy and fewer NMJs in the quadriceps and TA muscles of rats with KOA.

The paw withdrawal threshold declined in the KOA group. This result corroborates a recent study that found reduced pain threshold associated with muscle weakness after ACLT⁵³. Another recent study showed the presence

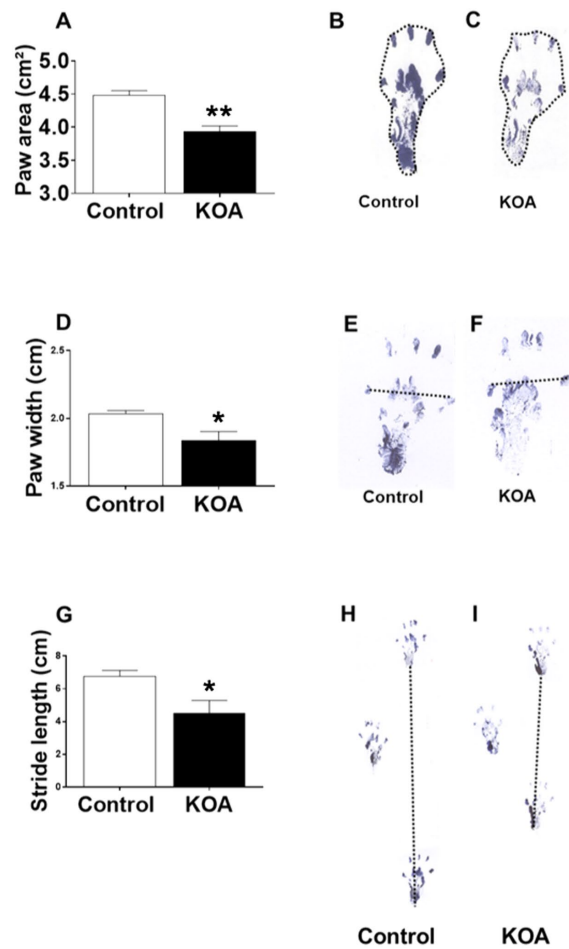


Figure 5. Gait test. Paw area (A): representation of the test in the control group (B) and KOA (C); Paw width (D): representation of the test in the control group (E) and KOA (F); Stride length (G): representation of the test in the control group (H) and KOA (I). Abbreviations: KOA = Knee osteoarthritis group. ** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$, KOA group compared to controls.

of persistent mechanical hyperalgesia in a KOA model⁵⁴. Our results strengthen the evidence that pain is related to the inflammatory and neuromuscular changes observed in the KOA.

We found an increase in leukocytes (73% macrophages) in the synovial fluid of the KOA group. Our results corroborate earlier studies indicating that macrophages are the main component of synovial fluid cells in KOA, contributing to the destruction of cartilage and osteophyte growth^{55,56}. Recent studies have also classified the KOA into subgroups related to macrophages⁵⁷. In addition to increased leukocytes in the synovial fluid, we observed increases in other signs, thereby strengthening the role of inflammation in the pathogenesis of KOA, such as greater knee surface temperature and swelling.

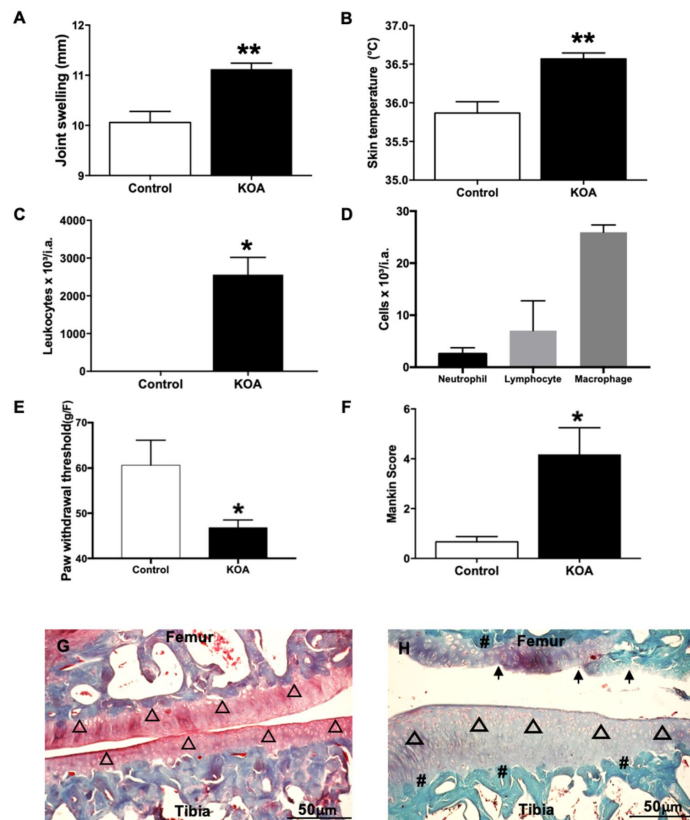


Figure 6. Inflammatory signs. Joint swelling (A); Knee skin temperature (B); Leukocytes in synovial fluid (C); Differential cell count (D); Paw withdrawal threshold (E); Mankin score (F); Joint histology of the knee Safranin-O staining, representation of the control (G) and KOA group (H). KOA = Knee osteoarthritis; ▲ = joint surface with normal cells; † = joint surface with irregularities; Δ = diffuse hypercellularity; ♯ Reduction of Safranin O staining indicating severe reduction in proteoglycans. Scale bar = 50 μm, 20X magnification. **p < 0.01 and *p < 0.05, KOA group compared to control.

Materials and Methods

All experiments and procedures were performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. National Institute of Health and approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of Sao Carlos Federal University (Protocol number 9197020816). Trained professionals blinded to the identity of the experimental groups conducted all procedures.

Experimental design and period. Rats Wistar (two months old, average weight of 214.41 ± 20 g) were randomly distributed into two groups (n = 6 per group): a) control (without surgery) and b) KOA (submitted to ACLT). Sample size was determined based on data from a pilot study, with muscle fiber cross-sectional area and NMJ area for quadriceps and TA muscles as the primary outcomes. Considering an alpha value of 0.05 and power of 95% (Software GPower 3.1), the sample size was calculated to be 5 animals per group. In the event of a possible loss during the experimental procedures, 8 animals were allocated to each group. Two animals from each group died during the experiments and the causes of death are described in Supplementary Table 1.

The rats were housed in cages (two animals per cage) in pathogen-free conditions at 24 ± 1 °C under a reverse light cycle (12 h light /12 h dark), with unrestricted access to standard rat chow and water. All animals

underwent *in-vivo* tests one day before and 59 days after the ACLT and were euthanized the following day. The experimental design and study period are described in Fig. 1.

ACLT-induced KOA. An adapted ACLT-induced KOA model was used. The rats were anesthetized with an intraperitoneal injection (12 mg/kg xylazine and 95 mg/kg ketamine). The right knee was shaved and prepared using an iodine solution. An incision on the medial side of the patellar tendon provided access to the joint space, after which the patella was dislocated laterally with the leg in extension. Afterwards, the joint capsule injury and ACLT were performed with ophthalmic scissors. Next, the anterior drawer test (free displacement of the tibia in relation to the femur) was conducted to confirm the ACLT^{8,58}. The animals were returned to their cages and paracetamol (13.5 mg/100 mL) was added to the drinking water for the first 48 hours after surgery as postoperative analgesia. We used only the control group without surgical intervention because previous reports found joint wear similar to KOA in the sham groups (knee surgery without ACLT)^{8,59}.

Muscle sample collection. The quadriceps, tibialis anterior (TA) and gastrocnemius muscles were isolated, removed and weighed. Each muscle was divided into three parts. The proximal fragment was immersed in Isopentane (pre-cooled in liquid nitrogen), stored at -80°C , and used to measure the cross-sectional area (CSA) of the muscle fibers. The middle fragment was used for the nonspecific esterase technique. The distal fragment was rapidly frozen in liquid nitrogen, stored at -80°C , and used to measure mRNA and protein levels.

Muscle Fiber CSA. Histologic serial cross-sections were obtained from the quadriceps, TA and gastrocnemius muscles in a cryostat microtome (Leica, CM1860, Germany). A histologic cross-section (10 μm) stained with toluidine blue was selected to measure the CSA under a light microscope (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Germany) using morphometric analysis (Image J software, version 1.43u, National Institutes of Health, USA). The CSA of each muscle was obtained by measuring 100 fibers located in the central region of the section. The percentage atrophy index was calculated by the difference in the proportion between the cross-sectional area of muscle fibers from the control group and the cross-sectional area of the KOA muscle fibers. The atrophy index was calculated by the weight of each muscle (g) and normalized using body mass (BM; g) to obtain the MM/BM ratio of the control and KOA groups⁸.

NMJ analysis - nonspecific esterase technique. The surface portions of the quadriceps, TA and gastrocnemius muscles were trimmed to the motor end-plate portion (containing the motor point), which was cut lengthwise into three or four slices. The resulting material was subjected to the nonspecific esterase technique⁶⁰ to characterize the NMJ.

Morphometric analysis. Maximum diameter, total area and perimeter were measured on 30 junctions with a light microscope (Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Germany). Two experienced blinded observers analyzed the images with Image J software (version 1.43u, National Institutes of Health, USA)^{61,62}.

Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR. Total RNA was extracted from quadriceps and TA muscle samples in the control and KOA groups for mRNA analysis using TRIzol Reagent (Life Technologies, USA), according to the manufacturer's recommendations. The RNA was quantified using a Bioresearch BioPhotometer spectrophotometer (Eppendorf[®] Hamburg, Germany), which also determined RNA purity by measuring absorbance at 260 nm (RNA quantity) and 280 nm (protein quantity). Only samples with 260/280 ratios > 1.8 were used. RNA integrity was evaluated by ethidium bromide staining (Invitrogen) based on 28s and 18s ribosomal RNAs. Extracted RNA was treated with DNase I, Amplification Grade (Sigma Aldrich, AMPD1) to eliminate any possible contamination with genomic DNA from the samples. mRNA reverse transcription was performed using the iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, CA), following the manufacturer's guidelines. The expression levels of mRNAs were assessed by quantitative real-time PCR (qPCR) using the CFX 96 Touch[™] Real Time PCR Detection System, version 3.0 (Bio-Rad, CA). The cDNA samples corresponding to the mRNA of the genes analyzed were amplified by SsoFast[™] EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad, CA) and primers were designed using Primer Express[®] 3.0.11 software (Applied Biosystems, CA, USA) from sequences published in GenBank (www.pubmed.com) and synthesized by Life Technologies (USA) (Supplementary Table 5). The expression levels were normalized by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), peptidylprolyl isomerase A (PPLA), peptidylprolyl isomerase B (PPLB), beta cytoskeletal actin (ACTB) and hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT), whose expression was constant among all samples. Relative quantification of gene expression was performed using the comparative $2^{-\Delta\Delta\text{C(T)}}$ method⁶³.

Protein expressions by western blot analysis. Protein samples (containing 80 μg of protein) were collected from the quadriceps and TA muscles. These were separated on SDS/PAGE gels (12% wt/vol) and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were incubated with antibodies against MuRF-1 (IgG, polyclonal, 1:500, 40Kda, Gene-Tex, USA) NCAM (IgG, polyclonal, 1:1000, 200Kda, Merck, USA) and normalized using α -Tubulin (IgG, monoclonal, 1:1000, 50Kda, Sigma, USA). The blots were visualized in an ECL solution (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK) and exposed in a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA)^{64,65}.

Gait test. The hind paws of the rats were brushed with ink. Next, the animals were allowed to run on a 60 cm-long, 7 cm-wide track covered with white paper. A dark chamber was placed at the end of the track to entice

the rats. Upon completion of the test, the paper was scanned at 300 dpi⁴⁷. The measurement around the paw was defined as paw area (cm²), the distance between the first and fifth toes as paw width (cm), the distance of the same hind paw between two steps as stride length (cm), the horizontal distance between the left and right paw as the base (cm), the distance between the third toe and the heel as paw length (cm), and the paw angle as the angle through the hind legs (°). The measures of footsteps were quantified by ImageJ software (version 1.43u, National Institutes of Health, USA).

Joint swelling (edema). Three measures of knee joint thickness were taken under anesthesia (O₂: 2.0 L/m, 2% isoflurane), using an electronic digital caliper (Mitutoyo Absolute Digimatic 150 mm, Japan). The results were expressed in mm⁶⁵.

Knee skin temperature. The animals were acclimated in a dark room (15 min; 24 °C ± 1). Thermography was used to quantify the skin temperature of the knee in both KOA and control groups using an infrared thermal camera (FLIR Systems® T420, USA), placed on a tripod 50 cm from the animal's knee. The images were analyzed in Flir Tools software, and the results expressed in (°C).

Ex-vivo leukocyte migration. Leukocyte migration was determined by synovial fluid, as previously described^{66,67}. The joint cavities were washed twice with 5 µL phosphate-buffered saline (PBS) solution containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and then diluted to a final volume of 50 µL with PBS/EDTA to evaluate leukocyte migration at the indicated time. The total number of leukocytes was counted in a Neubauer chamber diluted in Turk's solution. The results were expressed as the number of leukocytes per joint cavity. Differential cell counts were determined in cytochrome-stained slices (Cytospin 4; Shandon, Pittsburgh, PA, USA). Differential cell counts were performed with a light microscope, and the results were expressed as the number (mean ± SEM) of leukocytes per joint cavity. For this analysis we used only 4 animals from the KOA group⁶⁶.

Paw withdrawal threshold. The articular hypernociception of the femur-tibial joint was evaluated using an Electronic Von Frey meter (*Insight*[®] EFF-301). The animals were acclimated (30 min) in acrylic cages with a wire grid floor (12 × 10 × 17 cm high). A trained investigator (blind to group allocation) applied perpendicular pressure to the plantar surface of the hind paw. When the paw was withdrawn, the intensity of the force applied was automatically recorded. The mechanical threshold results are expressed in grams (g/F)^{55,66}.

Histological assessment of the knee joint. A standard histological protocol was used. Briefly, the knees were fixed (4% formaldehyde for 2 days) and decalcified (10% EDTA). The samples were embedded in paraffin blocks and histological sections were obtained (10 µm) using a microtome (Leica RM-2245, Germany). Samples were stained with hematoxylin and eosin (HE-Merck, Darmstadt, Germany) and 0.1% Safranin-O (Merck, Darmstadt, Germany)^{68,69}, and examined under a light microscope (×100; Axiovision 3.0.6 SP4 - Carl Zeiss, Germany). Two experienced blinded observers evaluated cartilage damage using the Modified Mankin Score⁷⁰, Supplementary Table 4.

Statistical analysis. Continuous variables were presented as mean ± standard error of the mean (SEM). Since all variables were normally distributed (p > 0.05), according to the Shapiro-Wilk test, an independent t-test was performed. Statistical analyses were performed with SPSS, version 23.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). The figures were plotted in GraphPad Prism software, version 5.0. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

Conclusion

ACLT-induced KOA in rats promotes NMJ remodeling and atrophy in quadriceps and TA muscles, associated with inflammatory signs and alterations in gait and muscle gene and protein expression.

Data Availability

The datasets generated and/or analyses conducted during the study are available from the corresponding author.

References

- Vos, T. *et al.* Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2163–2196 (2012).
- Glyn-Jones, S. *et al.* Osteoarthritis. *Lancet* **386**, 376–387 (2015).
- Loeser, R. F., Goldring, S. R., Scanzello, C. R. & Goldring, M. B. Osteoarthritis: A disease of the joint as an organ. *Arthritis Rheum.* **64**, 1697–1707 (2012).
- Sharma, L. Osteoarthritis year in review 2015: clinical. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 36–48 (2016).
- Neogi, T. The Epidemiology and Impact of Pain in Osteoarthritis. *Osteoarthr. Res. Soc.* **21**, 1145–1153 (2013).
- Fang, H. & Beier, F. Mouse models of osteoarthritis: modelling risk factors and assessing outcomes. *Nat. Rev. Rheumatol.* **10**, 413–21 (2014).
- Loeser, R. F. *et al.* Disease Progression and Phasic Changes in Gene Expression in a Mouse Model of Osteoarthritis. *PLoS One* **8**, 1–15 (2013).
- Delfino, G. B. *et al.* Quadriceps muscle atrophy after anterior cruciate ligament transection involves increased mRNA levels of atrogen-1, muscle ring finger 1, and myostatin. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **92**, 411–419 (2013).
- Herzog, W., Longino, D. & Clark, A. The role of muscles in joint adaptation and degeneration. *Langenbeck's Arch. Surg.* **388**, 305–315 (2003).
- Roos, E. M., Herzog, W., Block, J. A. & Bennell, K. L. Muscle weakness, afferent sensory dysfunction and exercise in knee osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **7**, 57–63 (2011).

11. Hurley, M. V. & Newham, D. J. The influence of arthrogenous muscle inhibition on quadriceps rehabilitation of patients with early, unilateral osteoarthritic knees. *Rheumatology* **32**, 127–131 (1993).
12. Terracciano, C. *et al.* Differential features of muscle fiber atrophy in osteoporosis and osteoarthritis. *Osteoporos. Int.* **24**, 1095–1100 (2013).
13. Igawa, T. & Katsuhira, J. Biomechanical Analysis of Stair Descent in Patients with Knee Osteoarthritis. *J. Phys. Ther. Sci.* **26**, 629–631 (2014).
14. Amin, S. *et al.* Quadriceps strength and the risk of cartilage loss and symptom progression in knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **60**, 189–198 (2009).
15. Rice, D. A., McNair, P. J. & Lewis, G. N. Mechanisms of quadriceps muscle weakness in knee joint osteoarthritis: The effects of prolonged vibration on torque and muscle activation in osteoarthritic and healthy control subjects. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R151 (2011).
16. Nudell, B. M. & Grinnell, A. D. Regulation of synaptic position, size, and strength in anuran skeletal muscle. *J. Neurosci.* **3**, 161–176 (1983).
17. Hughes, B. W., Kusner, L. L. & Kaminski, H. J. Molecular architecture of the neuromuscular junction. *Muscle Nerve* **33**, 445–461 (2006).
18. Engel, A. G. & Franzini-Armstrong, C. *Myology* (2004).
19. Rudolf, R. *et al.* Regulation of nicotinic acetylcholine receptor turnover by MuRF1 connects muscle activity to endo/lysosomal and atrophy pathways. *Age (Omaha)* **35**, 1663–1674 (2013).
20. Carnio, S. *et al.* Autophagy Impairment in Muscle Induces Neuromuscular Junction Degeneration and Precocious Aging. *Cell Rep.* **8**, 1509–1521 (2014).
21. Bonaldo, P. & Sandri, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Dis. Model. Mech.* **6**, 25–39 (2013).
22. Gumucio, J. P. & Mendias, C. L. Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia. *Endocrine* **43**, 12–21 (2013).
23. Rodrigues, A. C. Z. *et al.* The Sympathetic Nervous System Regulates Skeletal Muscle Motor Innervation and Acetylcholine Receptor Stability. *Acta Physiol* **30**, 0–2 (2018).
24. Enriquez-barreto, L., Palazzetti, C., Brennaman, L. H. & Maness, P. F. Neural cell adhesion molecule, NCAM, regulates thalamocortical axon pathfinding and the organization of the cortical somatosensory representation in mouse. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **5**, 1–13 (2012).
25. Chattopadhyaya, B., Baho, E., Huang, Z. J., Schachner, M. & Cristo, G. Di. Neural Cell Adhesion Molecule-Mediated Fyn Activation Promotes GABAergic Synapse Maturation in Postnatal Mouse Cortex. *The Journal of Neuroscience* **33**, 5957–5968 (2013).
26. Pinheiro-Dardis, C. M., Erberli, B. T., Gigo-Benato, D., Castro, P. A. T. S. & Russo, T. L. Electrical stimulation delays reinnervation in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* **56**, 108–118 (2017).
27. Hendrickse, P., Galinska, M., Hodson-tole, E. & Degens, H. An evaluation of common markers of muscle denervation in denervated young-adult and old rat gastrocnemius muscle. *Exp. Gerontol.* **106**, 159–164 (2018).
28. Herzog, W. & Longino, D. The role of muscles in joint degeneration and osteoarthritis. *J. Biomech.* **40**, 54–63 (2007).
29. Goodman, S. M. *et al.* American College of Rheumatology/American Association of Hip and Knee Surgeons Guideline for the Perioperative Management of Antirheumatic Medication in Patients With Rheumatic Diseases Undergoing Elective Total Hip or Total Knee Arthroplasty. *J. Arthroplasty* **32**, 2628–2638 (2017).
30. Neill, T. W. O., McCabe, P. S. & Mcbeth, J. Update on the epidemiology, risk factors and disease outcomes of osteoarthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol* **32**, 312–326 (2018).
31. Felson, D. T. *et al.* Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Ann. Intern. Med.* **133**, 635–646 (2000).
32. Serrao, P. R. M. S., Gramani-Say, K., Lessi, G. C. & Mattiello, S. M. Knee extensor torque of men with early degrees of osteoarthritis is associated with pain, stiffness and function. *Rev. Bras. Fisioter.* **16**, 289–294 (2012).
33. Missias, A. C., Chu, G. C., Klocke, B. J., Sanes, J. R. & Merlie, J. P. Maturation of the Acetylcholine Receptor in Skeletal Muscle: Regulation of the AChR γ -to- ϵ Switch. *Dev. Biol.* **179**, 223–238 (1996).
34. Hesselmann, L. F. G. M., Jennekens, F. G. I., Van Den Oord, C. J. M., Veldman, H. & Vincent, A. Development of innervation of skeletal muscle fibers in man: Relation to acetylcholine receptors. *Anat. Rec.* **236**, 553–562 (1993).
35. Dani, J. A. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Structure and Function and Response to Nicotine. *Int Rev Neurobiol* **124**, 3–19 (2015).
36. Strohlic, L., Cartaud, A. & Cartaud, J. The synaptic muscle-specific kinase (MuSK) complex: New partners, new functions. *BioEssays* **27**, 1129–1135 (2005).
37. Palmieri-Smith, R. M. & Thomas, A. C. A neuromuscular mechanism of posttraumatic osteoarthritis associated with ACL injury. *Exerc. Sport Sci. Rev.* **37**, 147–153 (2009).
38. Khan, M. A. S. *et al.* Nonsurgically induced disuse muscle atrophy and neuromuscular dysfunction upregulates alpha7 acetylcholine receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **92**, 1–8 (2014).
39. Melroy-Greif, W. E., Stitzel, J. A. & Ehringer, M. A. Nicotinic acetylcholine receptors: upregulation, age-related effects and associations with drug use. *Genes, Brain Behav.* **15**, 89–107 (2016).
40. van der Poel, C., Levinger, P., Tonkin, B. A., Levinger, I. & Walsh, N. C. Impaired muscle function in a mouse surgical model of post-traumatic osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **24**, 1047–1053 (2016).
41. Resende, R. A., Kirkwood, R. N., Deluzio, K. J., Morton, A. M. & Fonseca, S. T. Mild leg length discrepancy affects lower limbs, pelvis and trunk biomechanics of individuals with knee osteoarthritis during gait. *Clin. Biomech.* **38**, 1–7 (2016).
42. Levinger, P. *et al.* Relationship between foot function and medial knee joint loading in people with medial compartment knee osteoarthritis. *J. Foot Ankle Res.* **6**, 33 (2013).
43. Gonçalves, G. H. *et al.* Ankle strength impairments associated with knee osteoarthritis. *Clin. Biomech.* **46**, 33–39 (2017).
44. Andersen, J. L., Schjerling, P. & Saltin, B. Muscle, genes and athletic performance. *Scientific American* **283**, 48–55 (2000).
45. Cornwall, M. W. & Mcpoil, T. G. The Influence of Tibialis Anterior Muscle Activity on Rearfoot Motion during Walking. *Foot Ankle Int.* **15**, 75–79 (1994).
46. Mündermann, A., Dyrby, C. O. & Andriacchi, T. P. Secondary gait changes in patients with medial compartment knee osteoarthritis: Increased load at the ankle, knee, and hip during walking. *Arthritis Rheum.* **52**, 2835–2844 (2005).
47. Ruan, M. Z. C., Patel, R. M., Dawson, B. C., Jiang, M.-M. & Lee, B. H. L. Pain, motor and gait assessment of murine osteoarthritis in a cruciate ligament transection model. *Osteoarthr. Cartil.* **21**, 1355–1364 (2013).
48. Adães, S. *et al.* Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy* **16**, 01–17 (2014).
49. Pingel, J. *et al.* Injection of high dose botulinum- toxin A leads to impaired skeletal muscle function and damage of the fibrillar and non-fibrillar structures. *Sci. Rep.* **7**, 1–14 (2017).
50. Yin, Z. *et al.* Progressive Motor Deficit is Mediated by the Denervation of Neuromuscular Junctions and Axonal Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant (P301S) Tau Protein. *J. Alzheimers. Dis.* **60**, S41–S57 (2017).
51. Makii, Y. *et al.* Orthopaedic Surgery Alteration of gait parameters in a mouse model of surgically induced knee osteoarthritis. **26**, 1–7 (2018).
52. Jacobs, B. Y. *et al.* The Open Source GAITOR Suite for Rodent Gait Analysis. *Sci. Rep.* **8**, 1–14 (2018).
53. Silva, J. M. *et al.* Muscle wasting in osteoarthritis model induced by anterior cruciate ligament transection. *PLoS One* **13**, 1–17 (2018).

54. Tsai, H.-C., Chen, T.-L., Chen, Y.-P. & Chen, R.-M. Traumatic osteoarthritis-induced persistent mechanical hyperalgesia in a rat model of anterior cruciate ligament transection plus a medial meniscectomy. *J. Pain Res* **11**, 41–50 (2017).
55. Bondeson, J., Blom, A. B., Wainwright, S., Hughes, C. & Caterson, B. The Role of Synovial Macrophages and Macrophage-Produced Mediators in Driving Inflammatory and Destructive Responses in Osteoarthritis. **62**, 647–657 (2010).
56. Lange-brokaar, B. J. E. D. *et al.* Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthr. Cartil.* **20**, 1484–1499 (2012).
57. Wood, M. J. *et al.* Macrophage proliferation distinguishes 2 subgroups of knee osteoarthritis patients Find the latest version: Macrophage proliferation distinguishes 2 subgroups of knee osteoarthritis patients. **4**, 0–12 (2019).
58. Stoop, R. *et al.* Type II collagen degradation in articular cartilage fibrillation after anterior cruciate ligament transection in rats. *Osteoarthr. Cartil.* **9**, 308–315 (2001).
59. Dias, C., Vasilceac, F., Durigan, J., Medeiros, A. & Mattiello, S. Analysis of local and systemic TNF- α and IL1- α expression in the acute phase of knee osteoarthritis of rats. *Cytokine J.* **66**, 164–165 (2014).
60. Lehrer, B. G. M. & Ornstein, L. A Diazo Coupling Method for the Electron Microscopic Localization of Cholinesterase. *Cell* **6**, 399–406 (1959).
61. Deschenes, M. R. *et al.* Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle nerve* **23**, 1576–1581 (2000).
62. Pissulin, C. N. A. *et al.* GaAs laser therapy reestablishes the morphology of the NMJ and nAChRs after injury due to bupivacaine. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **167**, 256–263 (2017).
63. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
64. Ramirez, C. *et al.* Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **90**, 930–939 (2011).
65. Quadros, A. U. *et al.* Dynamic weight bearing is an efficient and predictable method for evaluation of arthritic nociception and its pathophysiological mechanisms in mice. *Sci. Rep.* **5**, 14648 (2015).
66. Pinto, L. G. *et al.* Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1 β production. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 235 (2015).
67. Talbot, J. *et al.* CCR2 expression in neutrophils plays a critical role in their migration into the joints in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* **67**, 1751–1759 (2015).
68. Pastoureaux, P. C., Hunziker, E. B. & Pelletier, J. Cartilage, bone and synovial histomorphometry in animal models of osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, S106–S112 (2010).
69. Renner, A. F. *et al.* Muscle Stretching after Immobilization Applied at Alternate Days Preserves Components of Articular. *Cartilage.* **54**, 132–138 (2013).
70. Gerwin, N., Bendele, Z. A. M., Glasson, S. & Carlson, C. S. The OARSI histopathology initiative e recommendations for histological assessments of osteoarthritis in the rat. *Osteoarthr. Cartil.* **18**, 24–34 (2010).

Acknowledgements

This work was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, 2016/24666-6 and 2015/26567-2), and Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq, 301344/2013-2).

Author Contributions


Study conception and design: Cunha, J.E.; Castro, P.A.T.S. and Salvini, T.F.; data collection: Cunha, J.E.; Barbosa, G.M.; Castro, P.A.T.S.; Luiz, B.L.F. and Arcari, A.C.; data analysis and interpretation: Cunha, J.E.; Castro, P.A.T.S.; Russo, T.L.; Vasilceac, F.A.; Cunha, T.M.; Cunha, F.Q. and Salvini, T.F.; drafting of the manuscript: Cunha, J.E.; Castro, P.A.T.S. and Salvini, T.F.; critical revisions: All authors; Final approval of the article: All authors; Obtaining of funding: Salvini, T.F.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42546-7>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

C - Carta de Submissão Artigo 2

19/03/2020

ScholarOne Manuscripts

 Muscle and Nerve

 Home

 Author

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Muscle and Nerve

Manuscript ID

MUS-20-0181

Title

Fibrosis and inflammation are associated with atrophy in the tibialis anterior muscle of rats with knee osteoarthritis

Authors

Cunha, Jonathan

Russo, Thiago

Barbosa, Germanna

Souza-Castro, Paula

Cunha, Thiago

Cunha, Fernando

Salvini, Tania

Date Submitted

19-Mar-2020

[Author Dashboard](#)