

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

**TESE DE DOUTORADO**

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR SOBRE O MÚSCULO  
ESQUELÉTICO – AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR**

**Liliana Carolina Ramírez Ramírez**

**SÃO CARLOS  
2011**

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

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR SOBRE O MÚSCULO  
ESQUELÉTICO – AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR**

**Liliana Carolina Ramírez Ramírez**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Fisioterapia da  
Universidade Federal de São Carlos, como  
parte dos requisitos para obtenção do  
Título de Doutor em Fisioterapia.**

**Orientadora: Profa. Dra. Tania de Fátima  
Salvini.**

**SÃO CARLOS  
2011**

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

R173ea

Ramírez Ramírez, Liliana Carolina.

Efeito da inflamação articular sobre o músculo esquelético : avaliação morfológica e molecular / Liliana Carolina Ramírez Ramírez. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
95 f.

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

1. Fisioterapia. 2. Inflamação. 3. Expressão gênica. 4. Músculo estriado. 5. Plasticidade muscular. I. Título.

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

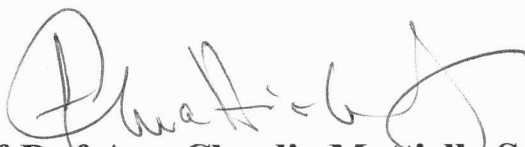
## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da banca examinadora para defesa de tese de doutorado de LILIANA CAROLINA RAMIREZ RAMIREZ, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 29 de novembro de 2011

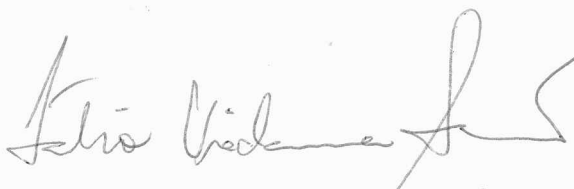
Banca Examinadora:



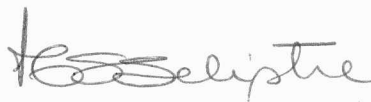
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tania de Fátima Salvini**  
(UFSCar)



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Claudia Mattiello Sverzut**  
(USP)



**Prof. Dr. Fábio Viadanna Serrão**  
(UFSCar)



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo**  
(UFSCar)



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anna Raquel Silveira Gomes**  
(UFPR)

Este trabalho está dedicado ao meu marido Omar por sua paciência e exemplo de companheirismo verdadeiro; ao nosso amado Nicolás por todas as alegrias que tem trazido a nossas vidas; à minha mãe, por sua infinita dedicação e seu admirável exemplo de coragem e amor incondicional, e a todas a pessoas que de uma ou outra maneira fizeram possível atingir esta meta.

## **AGRADECIMENTOS**

Quando estava na graduação e pensava na idéia de fazer estudos de pós-graduação parecia para mim um impossível, pois eu sabia que na Colômbia não havia cursos de mestrado focados em fisioterapia, e eu via essa possibilidade um pouco longe, devido principalmente à dificuldade econômica da época, e só de pensar em ter que sair do meu país para estudar não parecia fazer muito sentido. Pouco a pouco as coisas foram melhorando, uma professora da graduação veio ao Brasil para estudar e quando voltou deixou semeado em mim esse desejo de seguir seus passos, assim a possibilidade de estudar no Brasil foi surgindo. Depois de um tempo tive a fortuna de conhecer à Tania em Bogotá, e daí tudo começou a parecer uma realidade, e quando eu já percebi estava em São Carlos, começando meu mestrado. Meu plano inicial era apenas fazer mestrado, mas surgiu também a possibilidade de fazer o doutorado, e graças a Deus hoje estou aqui concluindo este processo. Para mim é claro que todos os fatos que me levaram finalmente a este momento da minha vida têm relação direta com o amor de Deus, cada situação e cada pessoa que cruzou por meu caminho e contribuiu para que eu pudesse atingir minhas metas são a manifestação de seu amor e de seu poder sobre minha vida, e é por isso que em primeiríssimo lugar devo dar graças a Deus, por todas as bênçãos, por todas as pessoas que sempre tem colocado no meu caminho para me guiar, ajudar, me ensinar, para e fazer minha vida melhor e mais feliz. Ao meu Deus eu devo tudo!

Todos os agradecimentos que vem a seguir são apenas consequência do primeiro, assim, eu agradeço a toda minha família, mas em especial a minha mãe, quem mesmo com os temores que seu coração mantinha cada vez que eu pegava um avião para vir ao Brasil

ou voltar para a Colômbia, tem sempre acreditado em mim e seu exemplo de “tenacidade” tem sido um grande estímulo para tudo na minha vida.

Sou muito grata com a Tania, ainda mais na realização do meu doutorado, pois nesta fase não recebi apenas o apoio para minha formação acadêmica, mas também neste momento quando meu estudo de doutorado cruzou-se com meu estudo avançado de maternidade, recebi seu apoio, e graças a isso pude curtir melhor esta nova fase da minha vida, pude curtir ainda mais do presente maravilhoso de ser mãe. Tania eu agradeço de todo coração seu apoio e solidariedade, Nicolás é também muito grato com você... muito obrigada mesmo!

Meu muito obrigada para meu marido Omar, por seu apoio constante, por seu amor e por toda essa solidariedade, embora tenha sido muito difícil estar afastados durante minha permanência no Brasil, sempre senti sua companhia ainda desde a distância, eu amo você!

Embora ainda não consiga ler nem entender meus agradecimentos (sei que um dia vai ler este documento), quero dizer muito obrigada meu Nicolás, desde que você chegou à minha vida me deu a energia necessária para continuar meu projeto de doutorado e escrever minha tese, acho que você sabe muito da ubiquitina e da expressão de genes, pois desde o meu ventre leu e escreveu comigo os artigos, graças a você meu doutorado tem o “plus” de ter sido o momento em que dei a luz o melhor que a vida me deu, te amo muito Nicolás ! Todos os dias peço a Deus que te abençoe e que me deixe ver você chegar longe, muito longe ...

Agradeço muito a todo o pessoal do laboratório Gabriel, Sabrina, Chris e Teresa, todos com seu próprio jeito deixam uma lembrança muito boa e especial para mim.

Especialmente quero agradecer ao Thiago, você foi muito importante para a conclusão do meu doutorado, aprendi muito com você, sei que dei muito trabalho também, mas no final das contas, o que importa são as coisas positivas do nosso convívio que muitas vezes não foi apenas assuntos científicos e sérios demais, também vivemos momentos de descontração muito bons, e esses são os momentos que levarei por sempre comigo junto com o aprendizado vivenciado, muito obrigada.

Também agradeço especialmente ao João, suas contribuições foram chaves para minha tese, gostei muito ter trabalhado de perto com você, de seu caráter bem humorado e de sua constante disposição e solidariedade.

Muito obrigada Paulinha, por ter sido sempre essa mão amiga disposta a ajudar, muito obrigada por ter estado aí quando Nicolas chegou à minha vida, você é uma pessoa muito fácil de querer e apreciar, você com sua alegria e companhia (embora pouca para meu gosto kkkk ) mitigou um pouco a solidão que sentia por ter ao Omar e a minha família longe, sobretudo quando Nicolas já estava na minha vida; esperamos (Nicolás, Omar e eu) ter você na Colômbia para dar um pouco em troca de tudo isso que você me deu, embora eu saiba que não será fácil compensá-la, você foi demais, mas eu prometo fazer meu melhor esforço.

Agradeço também à Marcela, graças por ter compartilhado comigo e ter deixado eu partilhar também sentimentos profundos, nossas conversas foram muito importantes, gostei muito de ter conhecido você e ter vivenciado momentos além do acadêmico e profissional, acho que sua força espiritual é muito bonita e especial, levarei sempre boas lembranças de você.



Obrigada María Cristina, por seu constante apóio e porque sempre torceu para que eu pudesse vir ao Brasil, além disso, porque foi você que abriu o caminho que eu consegui andar, e por isso eu sou muito grata.

Obrigada também aos meus amigos José e Jesús, foi muito bom ter conhecido vocês e viver momentos com alguns “toques” colombianos em São Carlos, espero poder rever vocês na Colômbia, em Bucaramanga, Sincelejo ou Popayán ou em qualquer outro lugar do nosso país.

Agradeço também à Esperanza, que me recebeu em sua casa quando voltei ao Brasil para fazer o doutorado, obrigada por esses bons momentos que compartilhamos.

Quero agradecer também as minhas amigas que desde a Colômbia sempre torceram por mim, graças a vocês sempre mantive o caderno atualizado kkkkk, -nossas conversas (assuntos sérios e outros não tanto ...) pelo skype , msn ou através de *e-mails* sempre foram muito motivadoras: Aminta, Paula Camila, Carolina, Claudia, Ingry, Aura, muito obrigada!!

Agradeço à UIS, a todas as pessoas que trabalharam contra o relógio para que eu pudesse sair da Colômbia e vir ao Brasil a fazer meu doutorado, eu desejo poder retornar com muita produtividade acadêmica esses esforços visando o crescimento da Escola e da profissão na Colômbia.

Não posso deixar de agradecer à FAPESP pelo apoio financeiro fornecido, tomara que um dia nosso país tenha uma instituição como a FAPESP que apoie o desenvolvimento científico e tecnológico, isso seria um grande logro, obrigada Nossa Senhora da FAPESP!

Graças também a todo o pessoal do PPG-Ft, por todo o apoio fornecido, obrigada Kelly, professores Stela, Jamami e Rosana; sou muito grata também com a professora Heloisa Araújo e com todo o pessoal do seu laboratório, graças por ter tido sempre a disposição para partilhar seu espaço de trabalho com nós.

Em geral agradeço a todo o Brasil, a todo o povo brasileiro por ter me recebido com os braços abertos e ter me apoiado ainda desde o primeiro momento em que desembarquei do avião e precisei pegar o ônibus, quando quase não entendia o português e quando menos ainda entendiam meu portunhol... só tenho boas lembranças deste país que me deu muitas coisas boas, espero retornar um dia em companhia de minha família para que meu filho conheça o país que deu muito a sua mãe e a ele próprio desde os primeiros dias de sua vida...

Graças infinitas !!!!

## RESUMO

A inflamação articular é uma causa frequente de limitação nas atividades de vida diária da população. Geralmente essa afecção afeta também os músculos que estão funcionalmente relacionados à articulação inflamada. A possível relação entre a inflamação articular e a expressão de genes relacionados à atrofia muscular, diferenciação e crescimento muscular e com o controle da massa em músculos funcionalmente relacionados à articulação inflamada, ainda não foram estudadas. O objetivo desta tese foi avaliar o efeito da inflamação aguda e crônica da articulação tíbio-társica induzida por carragenina, sobre a expressão de genes musculares relacionados à atrofia (atrofina-1 e MuRF-1), diferenciação e crescimento (MyoD), regulação da massa muscular (miostatina), e fatores pró-inflamatórios (TNF-alfa, p38MAPK e NFkB) nos músculos TA e sóleo de rato. Foram também avaliadas a expressão da proteína TNF-alfa e a área de secção transversa (AST) das fibras musculares. Ratos *Wistar* foram distribuídos em três períodos experimentais 2, 7 e 15 dias. Em cada período experimental os animais foram distribuídos em 4 grupos: Controle, inflamação, sham, imobilização. Foram realizadas análises da AST nos músculos TA e sóleo, da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real para todos os genes, e análise da expressão da proteína TNF-alfa com as técnicas Western blot e imunofluorescência. A inflamação articular gerou mudanças nos níveis de RNAm dos genes relacionados com a atrofia muscular, diferenciação e crescimento, regulação da massa muscular e de fatores pró-inflamatórios no músculo TA e sóleo de ratos, nos dias 2, 7 e 15. A inflamação articular também aumentou a expressão da proteína TNF-alfa apenas no músculo TA no dia 7. A AST das fibras musculares foi reduzida no TA nos dia 7, e no músculo sóleo nos dias 7 e 15. Em conclusão, em ambos os músculos TA e sóleo, a

inflamação articular aguda estimulou a via molecular envolvida na atrofia muscular, sem redução na AST das fibras. Contrariamente, a inflamação articular crônica levou a um padrão de resposta diferente segundo o músculo analisado. No músculo TA, a redução na AST das fibras esteve relacionando com a atividade da via proteolítica, enquanto no sóleo, a atrofia muscular ocorreu sem aumento na expressão de genes relacionados com a clássica via de degradação de proteína. Estes resultados sugerem que no músculo sóleo a atrofia pode ter sido regulada por outra via diferente da ubiquitina-proteosoma; indicando a importância que possui a redução da síntese proteica no controle do conteúdo total de proteína no músculo esquelético. Os resultados desta tese têm relevância clínica e orientam sobre a importância de utilizar recursos terapêuticos visando diminuir o efeito deletério que se sucedem nos músculos relacionados com uma articulação inflamada.

**Palavras-chave:** músculo esquelético, inflamação articular, expressão gênica, derrame articular.

## **ABSTRACT**

The joint inflammation is a frequent cause of activity limitation in daily life of the population. Usually, this condition also affects the muscles that are functionally related to the inflamed joint. The possible relationship between joint inflammation and the expression of genes related to muscle atrophy, differentiation and growth and muscle mass control in muscles functionally related to the inflamed joint, has not been studied. The aim of this thesis was to evaluate the effect of the tibiotarsical joint inflammation, induced by carrageenan, on the expression of genes related to muscle atrophy (atrogin-1 and MuRF-1), growth and differentiation (MyoD), muscle mass regulation (myostatin), and pro-inflammatory factors (p38MAPK, NFkB and TNF-alpha); and the expression of TNF-alpha protein in the tibialis anterior (TA) and soleus rat muscle. Changes in the muscle fiber cross-sectional area (CSA) were also evaluated. Wistar rats were randomly divided into four periods (2 days, 7 days and 15 days) and were assigned into four groups within each experimental period: Control, Sham, Inflammation and Immobilization. Real-time polymerase chain reaction, Western blot, immunofluorescence and muscle fiber CSA analyses were performed. The joint inflammation altered the mRNA levels of genes related to muscle atrophy, growth and differentiation, muscle mass regulation and pro-inflammatory factors in TA and soleus rat muscle after 2, 7, and 15 day. The joint inflammation increased the TNF-alpha protein expression only in the TA muscle at 7 days. The muscle fiber CSA was reduced in the TA at 7 days and, in the soleus muscle at 7 and

15 days. In both muscles TA and soleus, acute joint inflammation was able to stimulate the molecular pathway related to muscle atrophy with no reduction in AST fibers. Conversely, the chronic joint inflammation led to a differential response according to the muscle studied. In the TA muscle, the muscle fiber CSA reduction was related to the proteolytic pathway, while in the soleus, the muscle atrophy occurred without overexpression of genes related to the classical proteolysis pathway. These results suggest that, in soleus muscle, the atrophy could be mediated by other pathway than the ubiquitin-proteasome; suggesting the importance of the decreased protein synthesis in the reduction of protein content in the skeletal muscle. In addition, joint effusion also induced changes in gene expression, although without changes in the muscle fiber CSA. The results of this thesis have clinical relevance and indicate the importance of therapeutic interventions with the attempt to reduce the deleterious effects on muscles related to an inflamed joint.

**Key-words:** skeletal muscle, joint inflammation, gene expression, joint effusion.

## SUMÁRIO

	<i>P</i>
<b>1. APRESENTAÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2. CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2. MANUSCRITO I</b>	<b>33</b>
<b>3. MANUSCRITO II</b>	<b>62</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>96</b>
<b>ANEXOS</b>	

## 1. APRESENTAÇÃO

Esta tese é composta pelos produtos acadêmicos obtidos no projeto de doutorado desenvolvido durante o período de Março de 2009 a Novembro de 2011. Este projeto constituiu a continuação do meu projeto de mestrado no qual foi avaliado o efeito de 2 dias de inflamação articular induzida por carragenina sobre a expressão gênica e a área de secção transversa (AST) dos músculos tibial anterior (TA) e sóleo de ratos.

Diante dos resultados obtidos no trabalho de mestrado foram levantadas algumas questões importantes como por exemplo: qual seria a resposta observada no músculo após períodos de tempo maiores? Quais genes poderiam estar envolvidos na adaptação do músculo na condição estudada? Poderia ocorrer também alguma modificação na expressão da proteína e não apenas na expressão gênica?

Assim, com o intuito de ter uma visão mais completa da adaptação do músculo esquelético funcionalmente relacionado à articulação inflamada, e visando dar respostas a tais questões, surgiu a necessidade de avaliar períodos maiores (7 e 15 dias) de tempo após a indução da inflamação articular, bem como de complementar os resultados obtidos no trabalho de mestrado através da análise da expressão de outros genes considerados como importantes fatores mediadores da resposta inflamatória (*Tumor Necrosis Factor-alpha*, *Nuclear Factor kappa B*, *Mitogenic Activated Protein Kinase*) e que poderiam estar envolvidos na adaptação muscular.

Por-tanto, o projeto de doutorado consistiu na avaliação dos efeitos da inflamação articular sobre o músculo esquelético mediante análise da expressão gênica, da expressão da proteína, e da AST das fibras nos músculos (TA) e sóleo, após 2, 7 e 15 dias da indução da inflamação com carragenina na articulação tíbio-társica de ratos. Os músculos analisados foram selecionados levando em consideração a relação funcional com a articulação inflamada e suas diferenças morfológicas e metabólicas (TA músculo Tipo II; sóleo músculo tipo I) que levou a pensar na possibilidade de ter diferentes achados segundo o tipo de músculo.

Como produtos acadêmicos do projeto foram obtidos dois manuscritos, cada um deles contendo os resultados observados em cada músculo analisado.



Vale salientar que a proposta de pesquisa foi fortalecida graças ao trabalho em equipe do nosso laboratório de Plasticidade Muscular sob orientação da Profa. Tania, o que permitiu não apenas o apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto, como também a consecução da minha bolsa de doutorado, viabilizando ainda mais dar resposta às questões levantadas que deram origem ao meu doutorado.

Devido à natureza sucinta dos manuscritos que conformam a tese e visando contextualizar melhor ao leitor com os seus conteúdos, esta tese apresenta na sua primeira parte os principais tópicos que fundamentaram o desenvolvimento do projeto de doutorado. A segunda parte da tese esta composta pelos manuscritos em sua versão em português, e por fim na parte final em anexo, encontram-se os artigos em inglês na versão final publicada e submetida (TA e sóleo respectivamente) em periódicos indexados.

## **2. CONTEXTUALIZAÇÃO**

### Estrutura do músculo esquelético

A estrutura de um tecido reflete na sua função, e no caso do músculo não poderia ser diferente. O músculo tem como principal função gerar força ou produzir movimento, portanto, sua estrutura está direcionada para que possa cumprir essas funções de forma eficiente. Para compreender melhor as mudanças que ocorrem no músculo em resposta a padrões diferentes de atividade, é necessário conhecer sua estrutura básica.

Os músculos do corpo estão compostos por unidades funcionais chamadas sarcômeros, e cada um deles contém as proteínas miofibrilares miosina (filamento grosso) e actina (filamento delgado). -Pelo menos quatro isoformas de miosina tem sido descritas em ratos, cada uma delas com características fisiológicas diferentes que determinam os tipos de fibras que conformam o tecido muscular.<sup>1</sup>

### **Tipos de fibras musculares**

Inicialmente, de modo geral os músculos foram classificados como rápidos ou lentos segundo sua velocidade de encurtamento e as diferenças morfológicas observadas. A análise histológica demonstrou uma relação entre a atividade da ATPase e a velocidade de encurtamento da fibra, dando origem à clássica classificação das fibras musculares como tipo I e tipo II. Hoje em dia, a classificação das fibras pode ser realizada mediante três métodos diferentes: coloração histoquímica para ATPase de miosina, determinação das

isoformas da cadeia pesada de miosina e a identificação bioquímica de enzimas metabólicas.<sup>1,2,3</sup>

A partir dessas técnicas são obtidas as três classificações apresentadas na Tabela 1.

<b>Coloração para ATPase de Miosina</b>	<b>Isoforma cadeia pesada de miosina</b>	<b>Análise bioquímica</b>	<b>Características</b>
I	Tipo I	Oxidativa de contração lenta (SO)	Diâmetro pequeno, velocidade de contração lenta, vermelhas pelo alto conteúdo de mioglobina, elevada resistência à fadiga e capacidade oxidativa alta e baixa capacidade glicolítica.
IIA	Tipo IIa	Oxidativa rápida (FOG)	Diâmetro intermédio, velocidade de contração rápida, conteúdo intermédio de mioglobina, resistência à fadiga moderadamente alto, elevada capacidade glicolítica e capacidade oxidativa moderadamente elevada.
IIB	Tipo IIx/b (IIB)	Glicolítica rápida (FG)	Diâmetro grande, velocidade de contração rápida, baixo conteúdo de mioglobina (brancas), baixa resistência à fadiga, baixa capacidade oxidativa e elevada capacidade glicolítica.

Tabela 1. Classificação das fibras musculares.

Segundo estudos em ratos, as fibras do tipo I (SO) sofrem mais fortemente os efeitos deletérios do uso diminuído como a atrofia muscular decorrente da imobilização, a

microgravidade e a suspensão da pata traseira.<sup>29</sup> Por outro lado, evidências têm mostrado que as fibras do tipo II parecem ser mais sensíveis aos efeitos do envelhecimento e da desnervação.<sup>1,2</sup>

Existe também uma transição do tipo de fibra no músculo, sendo que em presença de condições como a desnervação em um músculo predominantemente composto por fibras do tipo I acontece uma mudança do padrão oxidativo para um padrão mais glicolítico, com aumento no conteúdo das fibras de tipo II.<sup>2,3,4</sup>

Levando em consideração as diferenças já descritas na literatura na adaptação do músculo esquelético segundo o tipo de fibra predominante na sua estrutura, no projeto de doutorado foram selecionados dois músculos de características diferentes: sóleo (tipo I) e TA (tipo II) para serem analisados, pois caberia esperar uma resposta diferenciada neles em resposta à inflamação da articulação tíbio-társica.

#### Adaptação do músculo relacionado funcionalmente a uma articulação acometida

Segundo estudos clínicos, músculos que estão funcionalmente relacionados com uma articulação lesada podem sofrer alterações morfológicas e funcionais. Estas modificações musculares parecem estar relacionadas ao tipo de afecção articular. Dentre as doenças estudadas encontram-se: a artrite reumatóide, a osteoartrite, lesões de ligamentos e meniscos e também procedimentos exploratório articulares como a artroscopia.<sup>5,6,7,8</sup>

Uma das alterações funcionais mais comumente observada nos músculos nessas condições é a atrofia. Estudos recentes mostraram que alterações na força muscular em indivíduos com osteoartrite podem não estar relacionadas à dor nem a atrofia muscular, sugerindo assim a presença de um mecanismo muscular

inespecífico gerador da perda de força;<sup>9,10</sup> enquanto que lesões do ligamento cruzado anterior (LCA) evidenciaram modificações no padrão de recrutamento do quadríceps em atividades estáticas e dinâmicas.<sup>11,12</sup>

Uma das possíveis explicações para a diminuição de força nessas afecções parece estar relacionada ao mecanismo de Inibição Muscular Artrogênica (IMA).<sup>13</sup> A IMA é definida como a inibição reflexa contínua da musculatura que circunda uma articulação depois de lesão das estruturas dessa articulação. Segundo alguns autores, um termo mais adequado deveria ser Resposta Muscular Artrogênica, levando em conta que alguns estudos têm mostrado facilitação (aumento do reflexo H) e não inibição da musculatura avaliada.<sup>13</sup>

Estudos de simulação de edema sobre a articulação do tornozelo em humanos têm mostrado facilitação na atividade dos músculos sóleo, TA e fibular longo, indicando que em presença de derrame articular agudo não inflamatório, a excitabilidade dos motoneurônios é facilitada.<sup>14,15</sup> Provavelmente, trata-se de um mecanismo protetor que diminui o estresse sobre os ligamentos e a articulação, diminuindo a dor e melhorando o controle postural e a locomoção. No entanto, esta facilitação não resultou em maior força muscular. Por outro lado, há ainda carência de estudos similares em animais, para avaliar se apresentam resposta similar às observadas em humanos.

Outro tipo de mudança observada em músculos associados a uma articulação lesada são as modificações estruturais e metabólicas. Assim, em presença de instabilidade crônica (> 6 meses) do joelho, secundária à ruptura do LCA foi evidente atrofia no músculo vasto medial do quadríceps no membro acometido e diminuição na atividade glicolítica, quando comparado ao membro contra-lateral não acometido.<sup>8</sup> Condições articulares como meniscopatias e procedimentos como a artroscopia de joelho, mostraram também diminuição na área de secção transversa (AST) do quadríceps.

Em todas as condições articulares previamente mencionadas a presença de inflamação na articulação acometida é um sinal clínico característico.

A seguir é apresentada uma breve descrição do modelo utilizado no projeto de doutorado para induzir a inflamação da articulação tíbio-társica de ratos.

## Modelo inflamatório da carragenina

As carrageninas são conhecidas desde o século XIX, quando eram extraídas de algas vermelhas e utilizadas na cidade irlandesa de “*carrageen*” como agente emulsificante e gelificante em alimentos caseiros. Atualmente o termo “carrageninas” descreve uma classe de galactasas sulfatadas, que ocorrem como constituinte da parede celular de diferentes espécies de algas marinhas vermelhas.<sup>16</sup>

Hoje em dia as carrageninas vêm sendo utilizadas como ferramenta experimental validada para a investigação do processo inflamatório agudo e a hiperalgesia em ratos.<sup>17</sup> A inflamação induzida pela carragenina é um processo complexo que ativa um grande número de mediadores inflamatórios, dentre eles a histamina, prostaglandina I<sub>2</sub>, a IL-6, bradicininas, substância P, óxido nítrico e o *Tumor Necrosis Factor – alpha* (TNF-alfa).<sup>18</sup>

Um estudo recente demonstrou que a resposta inflamatória induzida pela injeção de carragenina intra articular simula uma resposta inflamatória aguda que pode permanecer até uma semana depois de ter sido injetada a substância. Nesse período é observado infiltrado de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos, com um pico no conteúdo destes nas primeiras 24 horas, acompanhado de necrose e exsudado fibrinoso dentro do espaço articular. Depois de uma semana a inflamação apresenta características de tipo crônica, com predomínio de macrófagos y mastócitos, sendo que ainda até quatro semanas depois são observados macrófagos no espaço articular mas, em menor quantidade. Nesta fase é observado também aumento na produção de ácido nítrico e prostaglandinas.<sup>18</sup>

Aproximadamente 8 semanas depois, persiste apenas uma incipiente inflamação tecidual na articulação com alguns macrófagos ainda presentes. Assim, o modelo da carragenina pode ser usado como um modelo de inflamação articular aguda durante as primeiras 24 horas e até uma semana depois, e como modelo de inflamação articular crônica depois de 1-2 semanas.<sup>17</sup>

A inflamação induzida por carragenina na pata traseira de ratos produz aumento precoce do TNF-alfa (3 horas após a injeção); a seguir é observado aumento nas citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 (6 horas após a injeção). Este perfil de liberação temporal das citocinas muda quando a carragenina é injetada no músculo

gastrocnêmio. Neste caso as concentrações de TNF-alfa, IL-1 $\beta$  e IL-6 não apresentam elevação até 24 horas após a injeção.<sup>18</sup>

Segundo a literatura o TNF-alfa, que participam na mediação da resposta inflamatória no modelo da carragenina descrito e por sua vez é um importante mediador molecular da atrofia muscular, um signo clínico comumente observado em pacientes com doenças articulares. Para esclarecer um pouco essa relação, a seguir farei um breve relato sobre generalidades da atrofia muscular e a importância do TNF-alfa como mediador da atrofia no músculo esquelético.

### **Atrofia muscular**

As características presentes no músculo atrofiado têm sido desvendadas graças a estudos com modelos animais de uso diminuído, como a imobilização, suspensão de membro, desnervação e microgravidade.<sup>1,2</sup> Esses modelos geram adaptações musculares parecidas com aquelas que podem ser observadas em pacientes com lesões articulares que cursam com inflamação e restrição do uso do membro.

Está bem descrito que a atrofia muscular é um processo altamente ordenado e regulado, caracterizado de modo geral por diminuição na área de secção transversa (AST) e no conteúdo de proteína do músculo, redução na força, aumento da fadiga, resistência à insulina e transformação das fibras Tipo I em Tipo II.<sup>1,2,3</sup> A atrofia muscular tem sido atribuída à diminuição na síntese e aumento na degradação de mioproteínas,<sup>19,20</sup> sendo que o aumento na degradação da proteína muscular parece ter um papel principal no início da atrofia; embora estudos recentes têm demonstrado grande importância na redução da síntese proteica.<sup>21</sup>

Uma via molecular considerada chave no aumento da proteólise muscular é a via ubiquitina-proteossoma, sendo considerada a mais importante na mediação da atrofia muscular.<sup>22</sup>

A atividade desta via envolve a adição de ubiquitina à proteína específica e o seu encaminhamento e degradação no proteossoma. A adição da ubiquitina precisa da atividade de três enzimas: E1 (ativadora da ubiquitina), E2 (conjugação/transporte da ubiquitina) e

E3 (ligases de ubiquitina). As E3s conferem a especificidade da ligação entre a ubiquitina e o substrato que será degradado pelo proteossoma.<sup>22</sup>

No músculo esquelético têm sido descritos dois genes como os principais responsáveis pela especificidade da ligação da ubiquitina à proteína a ser degradada (E3s): *Muscle Atrophy Fbox* (atrofina-1) e o *Muscle Ring Finger-1* (MuRF1).<sup>22,23,24</sup> Diversos trabalhos têm demonstrado que essas duas ligases de ubiquitina aumentam significativamente em presença de atrofia muscular.<sup>23,24,25,26</sup> Os níveis de RNAm para atrofina-1 aumentam rapidamente antes que a diminuição na massa muscular seja detectada e mantêm sua elevação quando a proteólise é acelerada, sugerindo assim sua importância na iniciação e manutenção da proteólise de diversas etiologias. MuRF1 é supra-regulado nas primeiras 24 horas após desnervação, sugerindo seu papel no início do processo atrófico.<sup>25</sup>

#### **TNF-alfa -e sua relação com a via ubiquitina-proteossoma**

O TNF $\alpha$  é uma citocina sarco-ativa, envolvida na resposta inflamatória e no processo de adaptação do músculo. É produzido por monócitos, macrófagos e outros tipos de células incluindo linfócitos B, T e células musculares.<sup>27</sup> Segundo estudos em humanos e em animais, a concentração elevada de TNF $\alpha$  sanguíneo possui um efeito catabólico.<sup>28</sup>

O papel do TNF $\alpha$  sobre a perda de proteína corporal em condições que geram mudanças imunológicas sistêmicas (envelhecimento, AIDS, câncer, artrite) está bem estabelecido.<sup>28,29</sup> Em presença de inflamação, a circulação de citocinas no plasma sanguíneo, como o TNF $\alpha$ , estimula a degradação de proteínas corporais totais, incluindo proteínas musculares. A injeção de TNF $\alpha$  no músculo de ratos causa degradação de mioproteínas e inibição da diferenciação muscular, indicando um possível papel desta citocina inflamatória na atrofia muscular.<sup>28</sup> Existem evidências que apontam também o papel do TNF $\alpha$  na atrofia muscular por uso diminuído como na imobilização, decorrente do estresse oxidativo tecidual.<sup>30</sup>

O mecanismo pelo qual o TNF-alfa pode levar a indução de atrofia muscular está relacionado com a ativação da via clássica *Nuclear Factor kappa  $\beta$*  (NFk $\beta$ ), e especificamente com o membro desta família, o p65.<sup>31</sup> A ativação da via NFk $\beta$  é considerada necessária na perda de proteína muscular associada a caquexia,



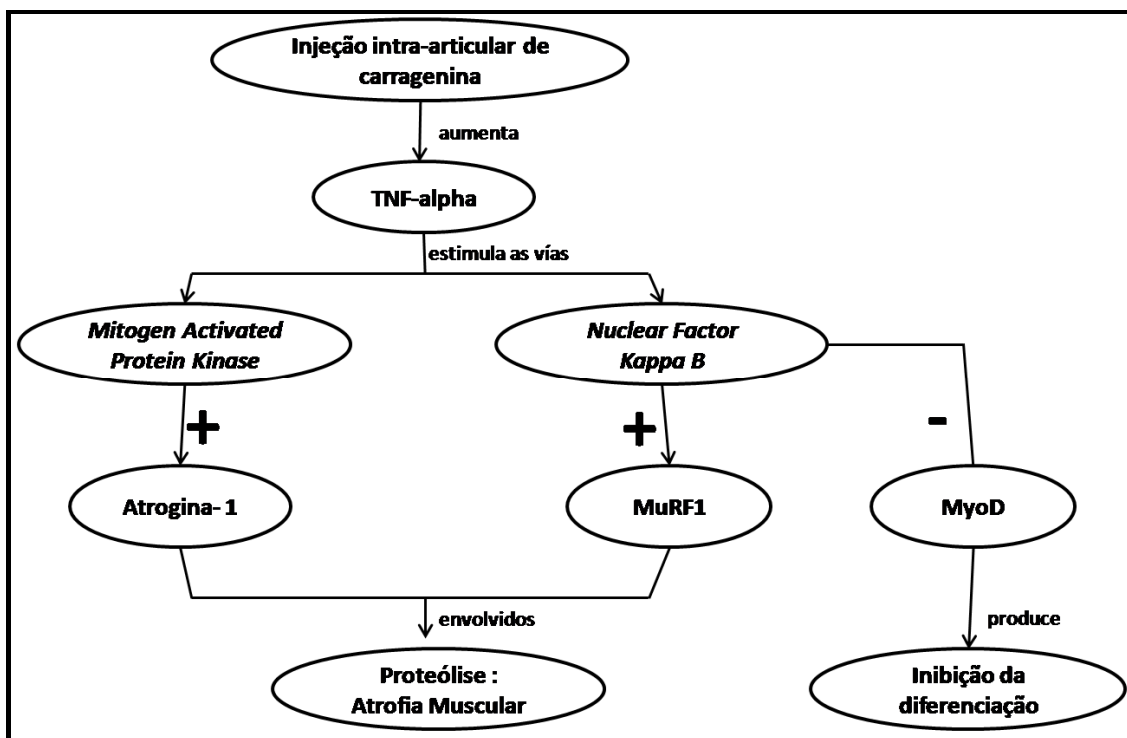
característica de doenças inflamatórias sistêmicas. Acredita-se que o alvo do sinal catabólico neste caso seja a via ubiquitina-proteossoma, já que o aumento na expressão do p65 foi relacionado com aumento na expressão de MuRF1.<sup>31</sup>

Foi também observado que o aumento no TNF $\alpha$  eleva a expressão da atrogina-1 em ratos tratados com injeção peritoneal desta citocina inflamatória, este aumento foi relacionado à ativação de outra via de sinalização da atrofia muscular, o p38 *Mitogen-activated Protein Kinase*.<sup>32</sup> Assim, o TNF-alfa pode estimular a atividade da via ubiquitina – proteossoma através da indução das principais E3 ligases musculares previamente descritas.

Além da relação existente entre TNF-alfa e as E3s, estudos mostraram que a elevação do TNF $\alpha$  foi relacionada também com inibição da diferenciação muscular, devido a aumento na proteólise no proteossoma de outro importante gene muscular, MyoD, o qual foi consequente à ativação da via NF $\kappa$ B.<sup>33</sup> MyoD pertence a uma superfamília de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH) capazes de promover a proliferação e diferenciação do músculo esquelético na miogênese, bem como seus processos adaptativos no músculo adulto, sendo MyoD um dos principais representantes desta família.<sup>34</sup> A regeneração do músculo ocorre constantemente durante o uso normal, mas pode aumentar em presença de lesão ou sobrecarga muscular, ou diminuir em casos de inatividade.<sup>33</sup> Nestes casos MyoD é uma das moléculas responsáveis pela diferenciação miogênica mediante a ativação de células satélites. Como descrito, a expressão gênica de MyoD apresenta uma relação direta com a via ubiquitina-proteossoma através da atividade de citocinas inflamatórias.<sup>33</sup>

Outro gene que em condições de atrofia muscular resulta importante de ser estudado e que tem mostrado uma relação com MyoD é miostatina. Este gene é conhecido também como fator de diferenciação e crescimento 8 (GDF-8).<sup>35</sup> Miostatina é um membro da superfamília do Fator Transformante do Crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), e é considerado regulador negativo do crescimento do músculo esquelético,<sup>35</sup> inibe a proliferação de mioblastos, sem causar aparente diferenciação e aumento de apoptose. Tem sido observado que a miostatina continua a ser expressa no músculo adulto em resposta a diferentes estímulos, entretanto, seus níveis variaram de acordo com o tipo de músculo. Períodos de inatividade do músculo aumentam a expressão da miostatina. Além disso, foi demonstrado que miostatina inibe a atividade de MyoD, reprimindo a miogênese.<sup>36</sup>

Levando em consideração a evidência científica descrita, o estudo dos genes previamente descritos é relevante para compreender o processo de adaptação do músculo esquelético em condições experimentais como a inflamação articular. A seguir na figura 1 é apresentado o resumo sobre o raciocínio que deu base ao planejamento e desenvolvimento do projeto de doutorado.



**Figura 1.** Raciocínio teórico que orientou o planejamento do projeto de doutorado. A partir da injeção intra-articular de carragenina poderia esperar-se um aumento na proteólise da proteína muscular mediada pelo aumento do TNF-alfa que favorece o aumento de fatores envolvidos na principal via de proteólise, as ligases de ubiquitina atrogina-1 e MuRF1. Por sua vez favoreceria a inibição de MyoD.

## REFERÊNCIAS

1. McInston BR, Gardiner PF, McComas AJ. *Skeletal Muscle: Form and Function*. Champaign. Human Kinetics; 2006, Second edition.
2. Lieber R. *Skeletal muscle structural, function, & plasticity*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002, Second edition.
3. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Ther*. 2001;81:1810–1816.
4. Guillot C, Steinberg JG, Delliaux S, Kipson N, Jammes Y, Badier M. Physiological, histological and biochemical properties of rat skeletal muscles in response to hindlimb suspension. *J Electromyogr Kines*. 2006;1-7.
5. Lindehammar H, Londvall B. Muscle involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology*. 2004; 43:1546-1554.
6. Pap G, Machner A, Awiszus F. Strength and voluntary activation of the quadriceps femoris muscle at different severities of osteoarthritic knee joint damage. *J Orthop Res*. 2004; 22:96-103.
7. Suetta C, Aagaard P, Magnusson S, Andersen L, Sipilä S, Rosted A et al. Muscle size, neuromuscular activation, and rapid force characteristics in elderly men and women: effects of unilateral long-term disuse due to hip-osteoarthritis. *J Appl Physiol*. 2007; 102:942-948.
8. Williams G, Barrance P, Snyder-Mackler L, Buchanan T. Altered quadriceps control in people with anterior cruciate ligament deficiency. *Med Sci Sport Exerc*. 2004; 36:1089-1096.

9. Gür H, Çakin N. Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil.* 2003;84:1534-41.
10. Fitzgerald K, Piva S, Irrgang J, Bouzubar F, Starz T. Quadriceps activation failure as a moderator of the relationship between quadriceps strength and physical function in individuals with knee osteoarthritis. *Arthritis & Rheumatism.* 2004;15:40-8.
11. Akima H, Furukawa T. Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial meniscectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2005;13:632-7.
12. Williams G, Barrance P, Snyder-Mackler L, Buchanan T. Altered quadriceps control in people with anterior cruciate ligament deficiency. *Medicine & Science in sport & Exercise.* 2004;1089-96.
13. Palmieri RM, Christopher D, Cordova M, Kinzey S, Stone M, Krause A. The Effect of a simulated knee effusion on postural control in healthy subjects. *Arch Phys Med Rehabil.* 2003;64:1076-9.
14. Hopkins J, Palmieri R. Effects of ankle joint effusion on lower leg function. *Clin J Spor Med.* 2004;14:1-7.
15. Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA, Cordova ML, Porter DA, Edwards JE et al. Arthrogenic muscle response to a simulated ankle joint effusion. *Br J Sports Med.* 2004;38:26-30.
16. Ferreira FR. Estudo comparativo de carragenanas comerciais Kappa, Iota e lamda no processo inflamatório em ratos. Natal, 2005. Dissertação (Mestrado em

Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

17. Radhakrishnana R, Moorec SA, Slukaa KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain*. 2003;104:566-577.
18. Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S, Mitchell D. Cytokine Profiles During Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Rat Muscle and Hind Paw. *The Journal of Pain*. 2007; 8:127-136.
19. Siu PM, Pistillo EE, Always SE. Apoptotic esponses to hindlimb suspensión in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289:1015-26.
20. Eley HL, Tisdale MJ. Skeletal atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(10):7087-97.
21. Calura E, Cagnin S, Raffaello A, LAveder P, Lanfranchi G and Romualdi C. Meta-analysis of expression signatures of muscle atrophy: gene interaction networks in early and late stages. *BMC Genomics*. 2008; 9:630-650.
22. Glickman M and Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*. 2002;82:373-423.
23. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001; 294:1704-7.

24. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:14440-14445.
25. Satchek JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton RV et al. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB*. 2007;21:140-55.
26. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J et al. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *FASEB*. 2004; 18:39-51.
27. Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res*. 2001;2:269-72.
28. Dogra C, Chabgotra H, Wedhas Nia, Qin X, Kumar A. TNF-related inducer of apoptosis (TWEAK) is a potent skeletal muscle-wasting. *FASEB J*. 2007;21:1857-69.
29. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005;37:1974-84.
30. Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trens F, Grenier G. A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol*. 2009;106:2049-59.
31. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Lidov H, Hasselgren GW, et al. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell*. 2004; 119:285-298.
32. Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Reid M. TNF-alpha acts via p38MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*. 2005;19:362-370.
33. Langen RM, Van der Velden JL, Schols A, Jansen-Heininger YM. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J*. 2004;18:227-37.
34. Saborin LA and Rudnick MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*. 2000;57:16-25.

35. McPherron A, Lawer A, Lee S. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature*. 1997; 386:83-90.
36. Spiller MP; Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martin JK, Bass JJ, Sharma M The Myostatin gene is downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Molecular and Cellular Biology*. 2002; 22:7066-82.

**MANUSCRITO I.**

Artigo publicado no *American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2011;90; 930-939.

**A INFLAMAÇÃO ARTICULAR ALTERA A EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA E GERA ATROFIA DO MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR DE RATO****Autores:**

Carolina Ramírez, MS,<sup>1,2</sup> Thiago Luiz Russo, PhD<sup>1</sup>, María Cristina Sandoval, MS, PhD,<sup>1,2</sup> João Luiz Quagliotti Durigan, MS, PhD<sup>1</sup>, Adriana Abbade Dentillo,<sup>1</sup> Marcela Abreu Silva Couto<sup>1</sup>, Tania Fátima Salvini, MS, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brasil.

<sup>2</sup>Escola de Fisioterapia, Universidade Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander, Colômbia.



## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a área de secção transversa (AST); expressão gênica (atrofina-1, MuRF1, MyoD, miostatina, p38MAPK, NFκB, TNF- α); e proteína do TNF- α no músculo tibial anterior após inflamação da articulação tíbio-társica. **Métodos:** Ratos Wistar foram distribuídas aleatoriamente em três períodos experimentais (2, 7 e 15 dias), e depois foram distribuídas em quatro grupos para cada período: Controle, Sham, Inflamação e Imobilização. Foram realizadas as análises de reação em cadeia da polimerase, Western blot, imunofluorescência e a medida da AST das fibras. **Resultados:** No dia 2, o grupo Inflamação teve aumento na expressão de atrofina-1, MuRF1 e miostatina; com redução na expressão de MyoD. No dia 7, o grupo Inflamação apresentou aumento na expressão gênica de atrofina-1, MuRF1, NFκB, p38MAPK, MyoD, miostatina e TNF-α bem como da proteína TNF-α, e redução na AST da fibra muscular. No dia 15, a expressão gênica e da proteína estiveram em níveis basais sem redução na AST. Os grupos Imobilizados tiveram um padrão de expressão parecido com aquele observado no grupo Inflamação em todos os períodos analisados, com aumento na expressão de atrofina-1, MuRF1, NFκB e TNF- α, e diminuição na AST das fibras musculares. O grupo Sham no dia 2, apresentou aumento na expressão de miostatina e atrofina-1; e no dia 7, aumento na expressão de MyoD e miostatina. **Conclusão:** A inflamação articular estimulou a expressão de fatores musculares relacionados à atrofia muscular, crescimento, diferenciação e regulação da massa, acompanhado de atrofia muscular.

**Palavras-chave:** músculo esquelético, doença articular, expressão gênica, reabilitação.

## INTRODUÇÃO

Estudos clínicos têm mostrado que músculos relacionados a uma articulação lesada sofrem alterações morfológicas e funcionais.<sup>1-3</sup> Dentre as doenças estudadas estão a artrite reumatóide, osteoartrite, lesões de ligamentos e meniscos, e procedimentos exploratórios articulares como a artroscopia.<sup>1-4</sup> Todas estas condições têm como sinal comum a inflamação.

A inflamação é uma resposta celular e humoral que ocorre após uma lesão com o objetivo de restaurar o tecido até seu estado pré-lesado. Esta resposta pode ser do tipo aguda ou crônica.<sup>5</sup> Músculos que encontram-se relacionados a uma articulação inflamada podem apresentar atrofia muscular como resposta de adaptação.<sup>3,4</sup> A atrofia muscular é um processo estritamente regulado e organizado que produz redução na área de secção transversa (AST) das fibras musculares<sup>5</sup>, redução no conteúdo de proteína e da força,<sup>6</sup> aumento da fadiga e na resistência à insulina<sup>3</sup> e transformação das fibras tipo I em tipo II.<sup>6-7</sup>

Apesar de haver indícios mostrando que a inflamação articular pode causar atrofia em músculos funcionalmente relacionados a uma articulação acometida, os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo ainda não estão esclarecidos. Um modelo animal de inflamação útil para o estudo deste assunto é a injeção intra-articular de carragenina, considerado uma ferramenta experimental válida para investigar o processo inflamatório e a hiperalgesia em ratos.<sup>8</sup> Um estudo prévio mostrou que a carragenina aumenta os níveis de citocinas inflamatórias, como o *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF-  $\alpha$ ),<sup>9</sup> um fator chave capaz de ativar vias de atrofia muscular.<sup>7,12</sup> Além disso, tem sido demonstrado que o aumento de TNF-  $\alpha$ , por sua vez, leva ao aumento na expressão de *Muscle Ring Finger-1*

(MuRF1)<sup>10</sup> e *Muscle Atrophy Fbox* (MAFbx/Atrogina-1),<sup>11</sup> dois genes importantes relacionados com a via ubiquitina-proteossoma e a atrofia muscular em ratos e humanos.<sup>7,12-15</sup> Segundo modelos animais, o aumento na expressão de MuRF1 e MAFbx/Atrogina-1 pode acontecer através da via *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK) e *Nuclear Factor kappa B-dependent* (NFκB), respectivamente.<sup>7,10,11</sup>

Estudos prévios comprovaram que modelos animais de atrofia muscular (como a imobilização, desnervação, suspensão da pata traseira e inanição) aumentam o acúmulo de RNAm de atrogina-1 e MuRF1, assim como durante doenças sistêmicas que acompanham-se de caquexia em humanos. Portanto, há evidência de um processo comum envolvido na degradação protéica e a atrofia muscular independente da sua etiologia.<sup>13-15</sup>

Por outro lado, um membro da família das MAPK, o p38, é considerado regulador do metabolismo muscular. Um estudo *in vitro* mostrou que quando células musculares diferenciadas são estimuladas com TNF- $\alpha$ , há aumento na expressão gênica de p38 e de atrogina-1. Além disso, quando o p38 foi inibido farmacologicamente, o aumento do acúmulo do RNAm de atrogina-1 foi bloqueado.<sup>10</sup> Igualmente, o dímero p65/p50 pertencente à família de fatores de transcrição NFκB tem sido associado com a atrofia muscular. Este dímero quando ativado é translocado até o núcleo da célula, ligando-se a regiões específicas de DNA, regulando a expressão de MuRF1.<sup>11</sup> Assim, o aumento na expressão de NFκB tem sido associado com o aumento no RNAm de MuRF1 e a degradação de proteínas musculares.<sup>11</sup>

Outros fatores envolvidos na regulação muscular e que estão relacionados com a via ubiquitina-proteossoma são os fatores regulatórios miogênicos (MRFs). MRFs são um

grupo de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH), sendo MyoD um de seus membros mais importantes.<sup>18</sup> MyoD estimula a proliferação e a diferenciação miogênica, e participa no processo de adaptação do músculo esquelético adulto.<sup>16</sup> Existe uma interação entre atrogina-1 e MyoD, na qual o aumento na expressão de atrogina-1 promove a degradação de MyoD, e através deste mecanismo a atrogina-1 pode regular a diferenciação muscular.<sup>17</sup>

Outro gene importante envolvido no controle da massa muscular e que poderia participar também na resposta do músculo esquelético relacionado funcionalmente a articulação inflamada é miostatina. Este gene é um regulador negativo do crescimento muscular, sendo capaz de inibir a proliferação de mioblastos sem aumentar a apoptose.<sup>8</sup> Miostatina é expressa no músculo em desenvolvimento e no músculo adulto em resposta a diferentes estímulos, e sua expressão pode estar aumentada em músculos imobilizados, ou reduzida em músculos alongados, estimulados eletricamente ou desnervados.<sup>18</sup> Além disso, um estudo prévio mostrou que o aumento na regulação de miostatina associa-se com aumento na expressão de MyoD.<sup>19</sup>

Apesar da evidência clínica sugerir que os músculos relacionados com uma articulação lesada podem ser mais sensíveis à atrofia e perda de força,<sup>1-4</sup> os mecanismos moleculares envolvidos na adaptação muscular e as possíveis mudanças na AST das fibras musculares dos músculos funcionalmente relacionados com uma articulação inflamada ainda não estão claros na literatura. A investigação deste tópico possui relevância clínica e poderia fornecer novo conhecimento sobre o tratamento e a recuperação dos músculos relacionados funcionalmente a uma articulação inflamada. A nossa hipótese é que a

inflamação tíbio-társica em ratos ativa vias de atrofia no músculo tibial anterior (TA) que está funcionalmente relacionado a esta articulação lesada. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da inflamação na articulação tíbio-társica sobre os níveis de RNAm de genes relacionados com a atrofia (atrofina-1 e MuRF1), diferenciação e crescimento (MyoD), regulação da massa (miostatina), e -fatores pró-inflamatórios (p38MAPK, NFκB e TNF- α) e a expressão da proteína TNF- α no músculo TA de ratos. Alterações na AST da fibra muscular também foram avaliadas.

## **MÉTODOS**

### **Cuidado dos animais e grupos experimentais**

O estudo foi desenvolvido segundo recomendações do *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* e foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade (número do protocolo 049/2007). Foram utilizados sessenta ratos Wistar (310±12 g, 3 meses de idade). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições ambientais controladas, com livre acesso a água e ração. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: 2 dias (n=20), 7 dias (n=20) e 15 dias (n=20). A seguir foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos para cada período experimental: Controle (n=5), Sham (n = 5), Inflamação (n = 5) e Imobilização (n = 5). O grupo Imobilização foi usado como referência para comparar os possíveis efeitos da restrição da pata traseira decorrente da inflamação.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xilazina (12mg/kg) e cetamina (95 mg/kg) para a realização de todos os procedimentos experimentais. Após serem pesados e anestesiados, os animais do grupo inflamação receberam 0,03 ml de  $\iota$ -carragenina a 3% (Sigma Chemical Company - St. Louis, USA) na articulação tibio-társica direita, dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) conforme proposto por Wang et al.<sup>20</sup> Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento para a injeção de 0,03 ml de solução salina. Após a injeção os animais permaneceram agrupados nas gaiolas durante 48 horas, sob as condições já mencionadas e sem restrições na sua atividade. O grupo Imobilização foi imobilizado seguindo as recomendações de Coutinho et al. (2002),<sup>21</sup> com a articulação tibio-társica direita imobilizada em posição neutra para evitar o possível efeito do alongamento ou encurtamento sobre os músculo analisados. A posição neutra foi definida como a disposição da pata traseira relaxada com o animal anestesiado. Após os procedimentos experimentais, os animais permaneceram agrupados nas gaiolas durante 2, 7 ou 15 dias sem restrições na sua atividade, exceto no grupo Imobilização.

Após o período experimental correspondente (2, 7 e 15 dias), o músculo TA direito foi retirado. Cada músculo foi pesado e dividido ao meio com um corte transversal no seu ventre. A porção proximal foi dividida de novo ao meio, congelada em nitrogênio líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Forma Scientific, Marietta, OH); os fragmentos foram usados para a análise do RNAm e da expressão de proteína. O fragmento distal foi pré-congelado em isopentano em nitrogênio líquido e armazenado em freezer à  $-86^{\circ}\text{C}$  e usados para análise da imunofluorescência e para a medida da AST das fibras musculares. Após a retirada dos músculos, os animais foram eutanasiados com overdose de anestesia.

### **Avaliação da AST das fibras musculares**

De todos os músculos foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados (10  $\mu\text{m}$ ), em micrótomo criostato (Microm 505 HE), os quais foram corados com azul de toluidina 1% Borax (TB) para avaliação morfológica. A morfometria da área de secção transversa das fibras musculares foi realizada em microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipado com câmera digital (Sony DSC S75, Tokyo, Japão). Da região central do ventre de cada músculo, foram escolhidas aleatoriamente, 100 fibras para mensuração da AST usando o software Axiovision 3.0.6 SP4 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

### **Isolamento do RNA**

A extração de RNA foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad CA), conforme instruções do fabricante. O RNA isolado foi diluído em tris-HCl e ácido T.E pH 7,6, a concentração das amostras foi determinada por espectrofotometria. Para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (razões estiveram entre 1,8 – 2,0). A integridade do RNA ribossômico 18 e 28S das amostras foram avaliadas por eletroforese e coradas com brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### **Transcrição Reversa (RT)**

Um micrograma de RNA total foi usado para realizar a transcrição reversa (RT) e sintetizar cDNA. A reação de RT foi realizada em um termociclador da seguinte forma:

1µg RNA, 5x de buffer para Transcriptase Reversa e mix dNTPs (Promega, Madison, WI) contendo 0,2mmol L<sup>-1</sup> de dATP, dCTP, dGTP e 0,1mol L<sup>-1</sup> de dTTP; 1 µl de primer oligo (dT) (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 200 U da enzima M-MLV (Promega, Madison, WI). A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e por fim aquecida a 95°C por 10 minutos antes de um rápido resfriamento no gelo.

### **Análise da reação em cadeia da polimerase em tempo real**

Os níveis de RNA transcritos para todos os grupos experimentais e controle foram realizados simultaneamente. A amplificação dos cDNAs de todos os grupos experimentais foi realizada em duplicata no *Lightcycler* (Rotor Gene 3000, Cobert Research, San Francisco, USA) usando como sinal da fluorescência o SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 180 nM de cada primer (senso e antisenso) em uma solução com volume final de 50µl. As condições de ciclagem ocorreram conforme a padronização de cada primer<sup>18,19</sup>. Após a reação de PCR, foi determinado o início da fase de amplificação exponencial (*Ct*, *cycle threshold*) de cada amostra, o qual foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica, com o gene GAPDH usado como controle interno para a normalização dos dados. Na figura 2 o valor do controle foi arbitrariamente estabelecido como 1. Controles negativos com RNA e sem a enzima M-MLV RT, garantiram que os produtos da PCR não resultaram de amplificação do DNA genômico. Foi realizado também um controle contendo apenas água, primer e SYBR Green.



### **Oligonucleotídeos primers**

Os primers utilizados para atrogina-1 (*GenBank* AF441120), GAPDH (*GenBank*, AF106860), miostatina (*GenBank* AF019624), foram construídos utilizando-se o software *Primer Express 2,0* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Os primers utilizados para a amplificação dos produtos foram: GAPDH Fw-GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG, Rv-GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA; atrogin-1 Fw-TACTAAGGAGCGCCATGGATACT, Rv-GTTGAATCTTCTGGATCCAGGAT; MuRF1 Fw-TGTCTGGAGGTC-GTTTCCG, Rv-ATGCCGGTCCATGATCACTT; miostatina Fw-CTACCACGGAAACAATCATTACCA, Rv-AGCAACATTTGGGCTTTCCAT; MyoD Fw-GGAGACATCCTCAAGCGATGC, Rv-AGCACCTGGTAAATCGGATTG; p38MAPK Fw-AGCTGAACAAGACAATCTGGGA, Rv-CATAGGCGCCA-GAGCCC; NFκB Fw-CATTGAGGTGTATTTACGG, Rv-GGCAAGTGGCCATTGTGTTC.

### **Análise por Western blot**

As proteínas musculares foram extraídas em um tampão de lise (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4; Triton X-100 1% w/v; deoxicolato de sódio 0,25%; cloreto de sódio 150 mM; fluoruro de fenilmetil-sulfonilo 1 mM; aprotinin 1 µg/ml; leupeptin 1 µg/ml; ortovanadato de sódio 1 mM; fluoruro de sódio 1 mM). Quantidades iguais de proteína foram separadas em um gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram coradas com Ponceau S para confirmar a transferência das proteínas e a seguir banhadas com TBST. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti TNF-

$\alpha$  (1:300, Santa Cruz Biotechnology, sc-80383). Após incubação, foram banhadas em TBST e incubadas com o anticorpo secundário anti-goat IgG (KPL, 14-13-06; 1:2000, 0,1% de leite em pó em TBST). O sinal foi detectado usando um filme quimioluminescente (High performance chemiluminescence film, Amersham, UK).

### **Imunofluorescência**

Foi utilizado o anticorpo primário anti *rabbit* TNF-  $\alpha$  (diluição 1:200, catálogo no. NBP1-19532; Novus Biologicals, Littleton, USA), e foi utilizado como anticorpo secundário *rhodamine red goat anti-rabbit* IgG (diluição 1:200, catálogo no. Rb394; Molecular Probes, Eugene, OR). Os cortes musculares usados para análise de imunofluorescência foram fixados com paraformaldehydo 4% (Sigma P6148) em phosphate buffer 0,2 M (PB) durante 10 minutos a temperatura ambiente, bloqueados com glicina 0,1 M em PB durante 5 minutos, e permeabilizados em Triton 0,2% X-100-PB durante 10 minutos. A seguir, os cortes foram incubados em soro bovino 1% (bovine serum albumin 1%; BSA) durante 20 minutos a temperatura ambiente para bloquear ligações não específicas e incubados *overnight* com o anticorpo primário (diluído em BSA 1%) a 4°C. Posteriormente, os cortes foram imergidos em PB 0,1 M (3 banhos de 10 minutos cada), e incubados em quarto escuro com o anticorpo secundário (diluído em BSA 1%) durante 2 horas. A seguir os cortes foram novamente imergidos em PB 0,1 M (3 banhos de 10 minutos cada) e as lâminas montadas usando *Vectashield* contendo 4,6-diamidino-2-phenylindole - DAPI (catálogo no. H-1200; Vector Laboratories). Cortes usados como controle negativo não foram incubados com o anticorpo primário; os resultados foram

somente considerados como marcação positiva unicamente se os controles negativos não apresentaram imunorreactividade. As análises foram realizadas mediante fotografias (20x de aumento) dos cortes corados usando microscópio para fluorescência (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipado com filtro de *rodhamina* e câmara digital (Sony DSC s75, Tokyo, Japan).

### **Análise estatística**

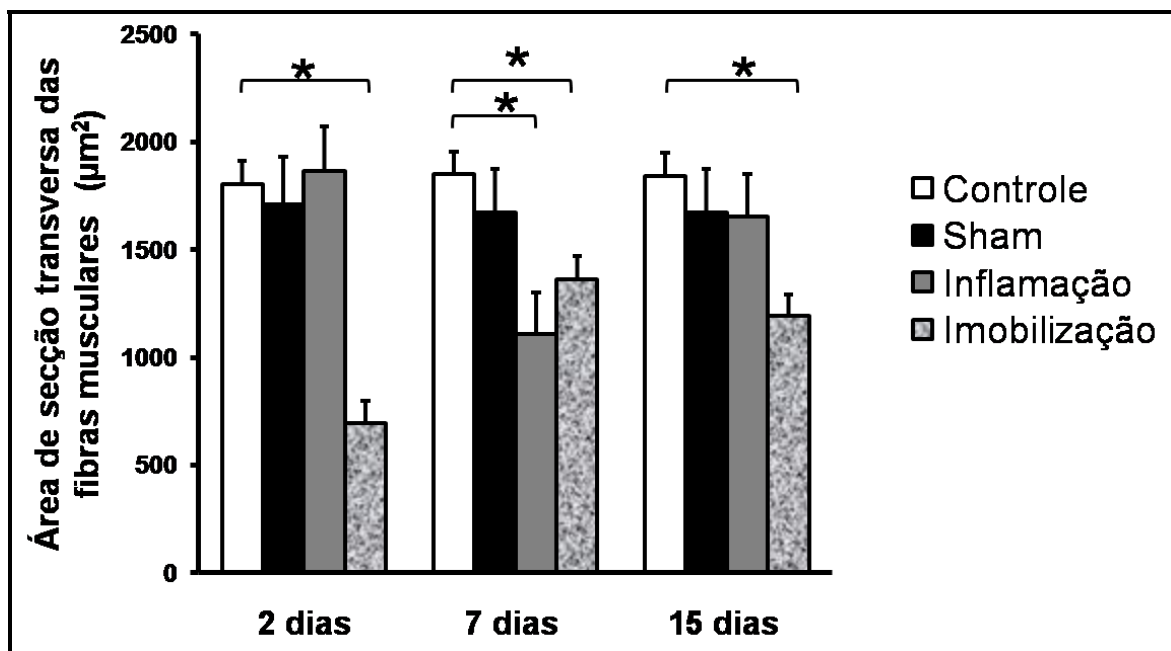
A análise estatística foi realizada usando o software STATISTICA 5.5. Os testes Shapiro-Wilk's e Levene's foram aplicados para avaliar a normalidade e a homogeneidade dos resultados. O ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Tukey's foi aplicado para comparações entre os grupos ou mediante o teste Kruskal-Wallis seguido do teste Newman-Keuls segundo a natureza dos dados. Para todos os testes  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **RESULTADOS**

### **AST das fibras musculares**

Apenas o grupo Imobilização apresentou redução significativa ( $p < 0,05$ ) na AST das fibras no dia 2 comparado ao Controle ( $697 \mu\text{m}^2 \pm 220$ ;  $1702 \mu\text{m}^2 \pm 110$ , respectivamente; Fig 1). No dia 7, os grupos Inflamação e Imobilização apresentaram redução na AST das

fibras musculares ( $1110 \mu\text{m}^2 \pm 154$ ;  $1360 \mu\text{m}^2 \pm 198$ , respectivamente) comparado ao Controle ( $1849 \mu\text{m}^2 \pm 220$ ;  $p < 0,01$ ); porém, sem diferença entre eles (Fig 1). No dia 15, apenas o grupo Imobilização apresentou redução da AST ( $1195 \mu\text{m}^2 \pm 189$ ) comparado ao Controle ( $p < 0,05$ ; Fig 1).



**Figura 1.** Área de secção transversa das fibras do músculo TA de rato para os grupos Controle, Sham, Inflamação e Imobilização no dia 2, 7 e 15. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP. \*  $p < 0,05$  vs. Controle.

### Expressão gênica

**Atrogina-1.** Nossos dados mostraram aumento na expressão de atrogina-1 no dia 2 nos grupos Inflamação, Imobilização e Sham (14,7-vezes, 11,6-vezes e 7,2-vezes respectivamente), comparado ao Controle (Fig 2A). Este aumento na expressão foi mantido

no dia 7 ( $p < 0,01$ ); porém, os níveis de RNAm diminuíram até 7,31-vezes no grupo Inflamação ( $p < 0,01$ ) e 2,67-vezes no grupo Imobilização ( $p < 0,01$ ; Fig 2A). No dia 15, quantidades elevadas de atrogina-1 foram observadas apenas no grupo Imobilização (Fig 2A).

**MuRF1.** A expressão gênica de MuRF1 aumentou no dia 2 nos grupos Inflamação e Imobilização (7,7-vezes e 10-vezes, respectivamente) comparados ao Controle (Fig 2B). Esse aumento na expressão permaneceu até o dia 7 em ambos os grupos (9,7-vezes e 4,8-vezes, respectivamente). No dia 15, a expressão gênica de MuRF1 esteve em níveis basais no grupo Inflamação, enquanto que o aumento na expressão foi mantido no grupo Imobilização (Fig 2B).

**NFκB.** No dia 2, a expressão gênica de NFκB aumentou 6,1-vezes no grupo Imobilização e permaneceu elevada no dia 7 e 15, comparado ao Controle ( $p < 0,01$ ). Contudo, os níveis de RNAm de NFκB diminuíram drasticamente ( $p < 0,01$ ) no dia 7 e 15 (1,9-vezes e 1,7-vezes, respectivamente; Fig 2D) comparado com o dia 2. No grupo Inflamação, a expressão gênica aumentou apenas no dia 7 (2-vezes) e voltou até níveis basais no dia 15 (Fig 2C).

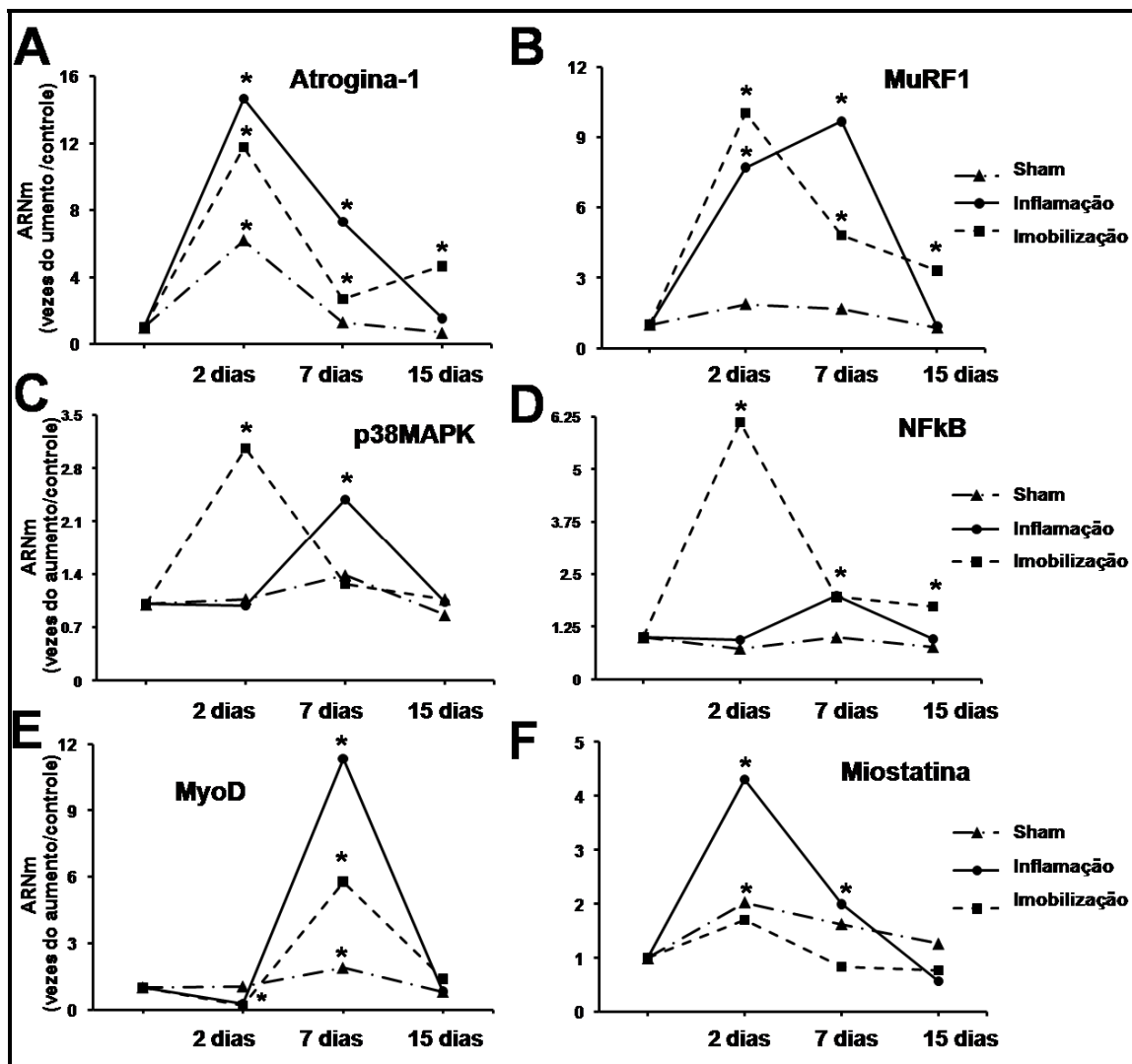
**p38MAPK.** No grupo Imobilização este gene aumentou significativamente sua expressão no dia 2 (3-vezes;  $p < 0,01$ ), e nos dias 7 e 15 a expressão esteve em níveis basais

(Fig 2C). No dia 7 foi registrado aumento na expressão de p38MAPK apenas no grupo Inflamação (2,4-vezes), e a expressão voltou a níveis basais no dia 15 (Fig 2C).

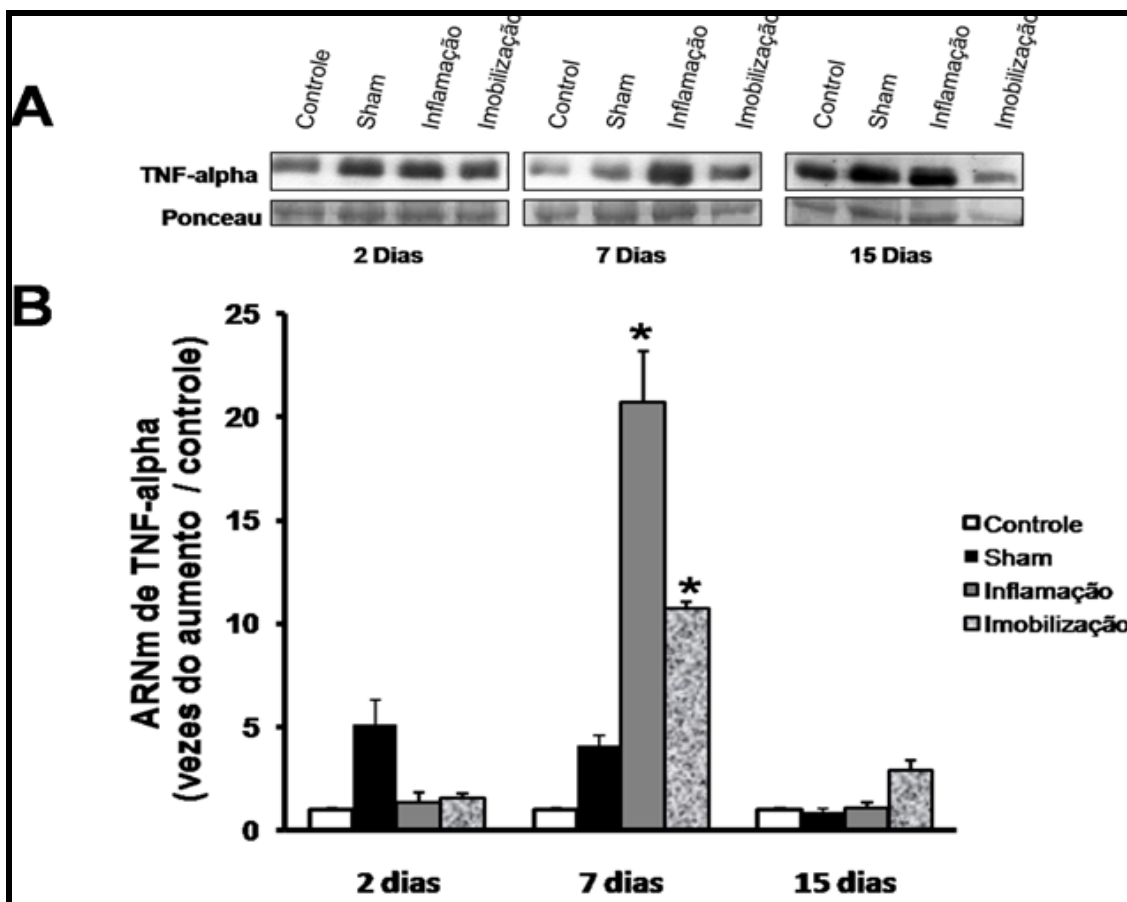
**MyoD.** No dia 2, os níveis de RNAm de MyoD diminuíram ( $p<0,01$ ) nos grupos Inflamação (0,3-vezes) e Imobilização (0,2-vezes), comparados ao Controle (Fig 2E). A expressão gênica de MyoD aumentou drasticamente no dia 7 em ambos os grupos, embora o grupo Inflamação apresentou um maior aumento (11,3-vezes;  $p<0,001$ ; Fig 2E). O grupo Sham também teve aumento na expressão de MyoD no dia 7 (1,9-vezes). No dia 15, a expressão gênica esteve em níveis basais em todos os grupos (Fig 2E).

**Miostatina.** A expressão de miostatina aumentou no dia 2 ( $p<0,005$ ) nos grupos Sham (2,0-vezes) e Inflamação (4,3-vezes; Fig. 2F). Este aumento na expressão foi mantido em ambos os grupos até o dia 7. Entretanto, a expressão no grupo Inflamação foi reduzida (2,0-vezes;  $p<0,001$ ) comparada à expressão no dia 2 (Fig 2F). No dia 15, a expressão de miostatina voltou até níveis basais em todos os grupos experimentais (Fig 2F).

**TNF-  $\alpha$ .** A expressão gênica de TNF-  $\alpha$  aumentou no dia 7 nos grupos Inflamação e Imobilização comparados ao Controle ( $p<0,05$ ), embora o aumento do RNAm fosse maior no grupo Inflamação (20,7-vezes;  $p<0,001$ ) comparado ao grupo Imobilização (10,8-vezes;  $p<0,01$ ) (Fig 3B). No dia 15, a expressão de TNF-  $\alpha$  esteve em níveis basais em todos os grupos (Fig 3B).



**Figura 2.** Expressão gênica de atrogina-1 (A), MuRF1 (B), NFκB (C), p38MAPK (D), MyoD (E) e miostatina (F) no músculo TA dos grupos Sham, Inflamação e Imobilização nos dias 2, 7 e 15. \*  $p < 0,05$  vs. Controle. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP. No dia 7 \* indica a diferença em ambos os grupos Inflamação e Imobilização comparados ao Controle; em E no dia 2 \* representa a diferença significativa em ambos os grupos Inflamação e Imobilização comparados ao Controle; em F no dia 7 \* representa a diferença significativa nos grupos Sham e Inflamação comparados ao Controle.

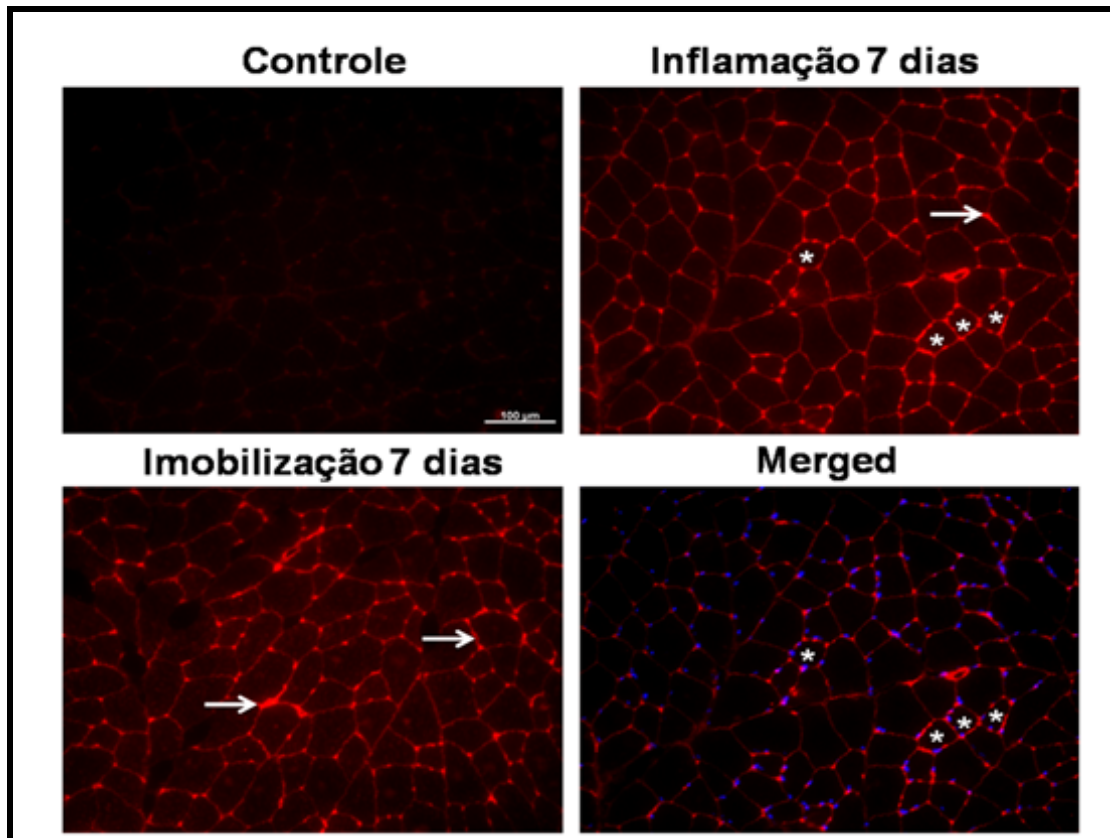


**Figura 3.** (A) Blots representativos do TNF-  $\alpha$  nos grupos Controle, Sham, Inflamação e Imobilização nos dias 2, 7 e 15 são mostrados na fileira superior, com as respectivas bandas coradas com Ponceau S na fileira inferior. (B) Expressão gênica de TNF-  $\alpha$  nos grupos Controle, Sham, Inflamação e Imobilização nos dias 2, 7 e 15 dias. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP; \*  $p < 0,05$  comparado ao Controle.

### Expressão da proteína TNF- $\alpha$

Na Figura 3A são apresentados blots representativos situados acima das respectivas membranas coradas com Ponceau S. A análise qualitativa desses resultados sugerem que no dia 2, a proteína de TNF-  $\alpha$  aumentou em todos os grupos experimentais em relação ao Controle. No dia 7, o grupo Inflamação apresentou um forte aumento nos níveis da proteína





**Figura 4.** Imagens representativas da imunofluorescência do TNF-  $\alpha$  para os grupos Controle, Inflamação 7 dias e Imobilização 7 dias são apresentadas. Setas brancas indicam imunorreatividade do endomísio e o asterisco (\*) designa o TNF-  $\alpha$  expresso principalmente em algumas fibras musculares.

(Fig 3A) em relação ao Controle; os grupos Sham e Inflamação também apresentaram aumento moderado (Fig 3A) da expressão. No dia 15, a expressão da proteína TNF-  $\alpha$  diminuiu no grupo Imobilização, enquanto que os outros grupos apresentaram aumento na expressão em relação ao Controle (Fig 3A).

### **Análise por imunofluorescência para o TNF- $\alpha$**

A análise qualitativa dos resultados mostrou aumento da imunorreatividade em todos os grupos experimentais; contudo, o TNF-  $\alpha$  foi detectado ligeiramente nos grupos Controle (Fig 4). Em geral, o TNF-  $\alpha$  foi detectado na região do endomísio das fibras do músculo TA (setas). O TNF-  $\alpha$  foi mais expresso ao redor de algumas fibras musculares (asterisco), enquanto que em outras fibras musculares o TNF-  $\alpha$  não foi visível. No dia 7, foi observada imunorreatividade nos grupos Inflamação e Imobilização em relação ao Controle (Fig 4). Em algumas fibras musculares, o aumento da reatividade esteve co-localizada com os mionúcleos (Fig 4 – *merged*). O controle negativo não apresentou reatividade.

## **DISCUSSÃO**

### **Efeito da inflamação articular sobre o músculo TA**

Este estudo apresenta novas informações sobre a maneira pela qual a inflamação articular induzida por  $\iota$ -carragenina pode regular a AST das fibras musculares e a expressão gênica e de proteína no músculo TA de rato. Estudos prévios que utilizaram este modelo inflamatório mostraram que 2 dias após da injeção intra-articular é observada uma resposta inflamatória aguda. Esta resposta é posteriormente convertida em uma inflamação crônica com predomínio de macrófagos entre a primeira e a oitava semana de indução da inflamação.<sup>8</sup> De tal modo, no nosso estudo, a resposta molecular observada no grupo

Inflamação nos dias 2 e 7 é a resposta adaptativa do músculo em resposta à inflamação articular aguda e crônica, respectivamente.

Nossos resultados mostraram que no grupo Inflamação a expressão dos genes atrogina-1 e MuRF1 aumentou nos primeiros 2 dias, mas sem redução na AST das fibras musculares (Fig 1; Fig 2A-B). Estes dados sugerem que, embora mediadores moleculares de atrofia muscular fossem ativados, dois dias não foi tempo suficiente para detectar redução alguma na AST das fibras.

No dia 7, o grupo Inflamação teve redução na expressão de atrogina-1 em relação aos níveis detectados no dia 2, no entanto a expressão do gene manteve-se elevada quando comparada ao Controle. A expressão de MuRF1 aumentou no dia 7 comparada ao dia 2. Estas mudanças na expressão de genes relacionados com a atrofia estiveram acompanhadas de redução na AST das fibras musculares (Fig 1; Fig2A-B). A inflamação crônica e os fatores pró-inflamatórios envolvidos nesta fase (7 dias ) podem ter influenciado essa resposta (Fig 2C-D).

Após 7 dias de indução da inflamação articular, houve aumento na expressão gênica de atrogina-1, MuRF1 e dos fatores pró-inflamatórios (NFκB e p38MAPK). Os níveis da proteína TNF-  $\alpha$  também foram elevados. Estes resultados sugerem que a inflamação articular crônica estimula a via do TNF-  $\alpha$ , levando à atrofia<sup>7,8,22</sup> no músculo TA funcionalmente relacionado com a articulação acometida. Deste modo, o TNF-  $\alpha$  poderia supra-regular NFκB e p38MAPK aumentando a expressão de atrogina-1 e MuRF1, respectivamente. Contudo, outros fatores como interferon- $\gamma$ , IL-6, IL-1 poderiam estar envolvidos na resposta molecular descrita. Estudos futuros são necessários para investigar

estes mediadores moleculares e suas interações com as vias da hipertrofia (IGF/IP3/Akt) e fatores de transcrição FOXO.

Após 15 dias da indução da inflamação articular, os genes envolvidos com a atrofia muscular e regulados pela via do TNF-  $\alpha$ , apresentaram expressão basal e a AST das fibras musculares foi recuperada. Estes resultados confirmam a importância desses genes na manutenção do fenótipo da atrofia muscular no músculo esquelético. Do mesmo modo, estes resultados sugerem que a inflamação articular induzida por  $\iota$ -carragenina poderia ser incipiente no dia 15. Novos estudos que utilizem outro tipo de carragenina, como a lambda-carragenina,<sup>8,23</sup> poderiam contribuir na verificação da expressão de genes e proteínas envolvidos em uma inflamação articular de longa duração.

Por outro lado, a diminuição na expressão de MyoD no dia 2 no grupo Inflamação pôde estar relacionada com o aumento na expressão de atrogina-1. Um estudo prévio demonstrou uma interação existente entre atrogina-1 e MyoD<sup>17</sup> e indicou que nessa interação MyoD é ubiquitinada por atrogina-1, levando à degradação de MyoD proteosoma. Contraditoriamente, a interação atrogina-1/MyoD não foi observada no dia 7 (Fig. 2A-2E), onde o aumento na expressão de atrogina-1 esteve acompanhada de aumento na regulação de MyoD. Este resultado poderia ter relação com a atrofia muscular detectada no dia 7, pois tem sido hipotetizado que a expressão de MyoD poderia estar elevada na presença de atrofia muscular. O aumento na expressão de MyoD seria uma tentativa do músculo para prevenir a atrofia muscular, como sugerido pelo aumento observado na expressão de MyoD no músculo desnervado.<sup>24</sup> No nosso estudo, a expressão de MyoD no

grupo Inflamação esteve em níveis basais no dia 15, quando não foi detectada atrofia muscular.

Finalmente, o aumento na expressão de miostatina no dia 2, sugere uma relação entre miostatina e MyoD. Em músculos de ratos imobilizados tem sido observado um aumento na expressão de miostatina, junto com uma redução na expressão de MyoD. O aumento na expressão de miostatina produz inabilidade dos mioblastos para sair do ciclo celular, afetando deste modo a diferenciação miogênica.<sup>25</sup> O acréscimo na expressão de miostatina no grupo Inflamação no dia 7 sugere também que este gene pode estar relacionado com a atrofia muscular. O aumento nos níveis de miostatina estão associados com perda da massa do músculo esquelético em diversas condições como AIDS, exposição à microgravidade durante vôos espaciais e suspensão da pata traseira.<sup>26</sup> Nossos resultados sugerem que a atrofia muscular induzida por uma inflamação articular crônica se relaciona também com o aumento na expressão de miostatina.

### **Efeito da imobilização sobre o músculo TA**

A imobilização aumentou a expressão de atrogina-1 and MuRF1, como previsto para um modelo de desuso. Ambos os genes estiveram elevados em todos os períodos experimentais (2, 7 e 15 dias), e essa elevação esteve associada com a presença de atrofia muscular. A expressão de atrogina e MuRF1 esteve em concordância com estudos prévios, que confirmaram que a expressão desses dois genes é essencial para a proteólise

muscular.<sup>12-15</sup> O aumento no estresse oxidativo decorrente da imobilização poderia ter desencadeado as respostas moleculares apresentadas neste grupo e induzir a atividade de vias de sinalização tipo NFkB y/o FOXO, aumentando deste modo a proteólise através da via ubiquitina-proteossoma.<sup>27</sup>

No dia 7, a expressão de MyoD no grupo Imobilização foi parecido com o padrão observado no grupo Inflamação, e os mecanismos envolvidos puderam ser similares a aqueles já descritos.

Nosso estudo não detectou aumento na expressão gênica de miostatina no músculo imobilizado. Este resultado coincide com o trabalho de Wojcik et al. (2008)<sup>28</sup> que avaliou o possível papel que a miostatina cumpre na atrofia das fibras do tipo II no músculo humano. No seu trabalho, os níveis de RNAm de miostatina não aumentaram; contudo, a proteína de miostatina foi detectada por análises de imunocitoquímica e immunoblotting. Possivelmente o aumento de miostatina detectado apenas no nível da proteína foi influenciado pela regulação da miostatina num nível da tradução e/ou pós-tradução.<sup>28</sup>

### **Efeito da injeção intra-articular de solução salina no músculo TA**

No grupo Sham foram detectadas mudanças na expressão de MyoD, atrogina-1 e miostatina. Relatos prévios mostraram que a injeção de salina na articulação tíbio-társica em ratos, não gera uma resposta inflamatória.<sup>29</sup> Portanto, acreditamos que as mudanças detectadas no grupo Sham podem ter resultado de uma resposta muscular artrogênica (RMA) decorrente do derrame articular. A RMA é desencadeada pelo aumento na tensão da

cápsula articular. Estudos em humanos apontaram que a RMA pode alterar a excitabilidade dos motoneurônios alfa (MN- $\alpha$ ) de músculos associados funcionalmente com a articulação, sem lesão articular alguma.<sup>30</sup> A redução na excitabilidade dos MN- $\alpha$  de músculos relacionados com uma articulação com derrame articular poderia estar associada com aumento na atividade das terminações de Ruffini de adaptação lenta na cápsula articular. A ativação destes receptores estimula interneurônios inibitórios Ib, que produzem inibição dos MN-  $\alpha$  no músculo agonista.<sup>30</sup>

Segundo estudos prévios, nossos resultados podem sugerir que nos dias 2 e 7, o derrame articular inibe os MN- $\alpha$  no músculo TA e regula a expressão de genes associados com o controle da massa, como miostatina e atrogina-1, mas sem redução na AST das fibras musculares. Estudos futuros são necessários para analisar os mecanismos neurais envolvidos na redução da atividade dos MN- $\alpha$  e as adaptações moleculares de músculos quando existe derrame articular.

### **Limitações do estudo e implicações clínicas**

A restrição do movimento e a distensão na cápsula podem ter influenciado os resultados obtidos no grupo inflamação, provavelmente potencializando o efeito da inflamação principalmente nos primeiros dias. Estudos futuros deverão fazer a avaliação da dor e seu efeito sobre o movimento durante o processo inflamatório, relacionando esses achados com a adaptação do músculo. Também, este trabalho demonstrou apenas a atrofia do músculo em geral, sendo que possíveis diferenças na atrofia dos diferentes tipos de fibras musculares podem ter sido perdidas.

Embora este estudo tenha sido desenvolvido em animais, possui relevância clínica e indica a importância de intervenções terapêuticas na fase aguda da inflamação articular com o intuito de reduzir os efeitos deletérios sobre os músculos relacionados com a articulação acometida. No entanto, são necessários estudos futuros em humanos para avaliar esta hipótese.

Em conclusão, nosso estudo confirmou que a inflamação articular ativa o programa proteolítico nos músculos funcionalmente relacionados com essa articulação. Além disso, a atrofia muscular foi detectada depois de 7 dias de ter induzido a inflamação, e foi observado recuperação da massa no dia 15 quando o programa proteolítico já estava normalizado.



**REFERÊNCIAS**

1. Gür H and Çakin N: Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:1534-41
2. Hurley MV: The effects of joint damage on muscle function, proprioception and rehabilitation. *Man Ther* 1997;2:11-7
3. Stockmar C, Lill H, Trapp A, et al: Fiber type related changes in the metabolic profile and fiber diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochem* 2006;108:3335-42
4. Akima H, Furukawa T: Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial menisectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005;13:632-7
5. Serhan C, Ward P, Gilroy D: *Fundamentals of Inflammation*, edition 1. Cambridge University Press; 2010, p 1-13
6. Lieber R: *Skeletal muscle structural, function & plasticity*, edition 2. Lippincott Williams & Wilkins, 2002, p 225-55
7. Glass DJ: Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37:1974-84
8. Radhakrishnana R, Moorec SA, Slukaa KA: Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 2003;104:566-77
9. Nishikori T, Irie K, Suganuma T, et al: Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 2002; 451:327-33

10. Li YP, Chen Y, John J, et al: TNF-alpha acts via p38MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 2005;19:362-70
11. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, et al: IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004;119:285-98
12. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al: Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:14440-5
13. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al: Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704-7
14. Satchek JM, Hyatt JP, Raffaello A, et al: Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J* 2007;21:140-55
15. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, et al: Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. *J Nutr* 1999;129(Suppl):227S-37S
16. Saborin LA, Rudnick MA: The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 2000;57:16-25
17. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, et al: Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2005;280:2847-56
18. Russo TL, Peviani SM, Durling JL, et al: Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2010;31:45-57

19. Peviani S, Silveira A, Carreira R, et al: Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve* 2007;35:363-70
20. Wang Y, Huang C, Cao Y, et al: Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. *Life Sci* 2000;67:261-7
21. Coutinho AL, Gomes A, Franca CN et al: A new model for the immobilization of rat hind limb. *Braz J Biol Res* 2004;37:1473-80
22. Langen RM, Van der Velden JL, Schols A, et al: Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J* 2004;18:227-37
23. Loram LC, Fuller A, Fick LG, et al: Cytokines profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *The Journal of Pain* 2007;8:127-36
24. Ishido M, Kami M, Masuhara M: In vivo expression patterns of MyoD, p21 and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:484-93
25. Spiller MP; Kambadur R, Jeanplong F, et al: The Myostatin gene is downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol* 2002;22:7066-82
26. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, et al: Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Meta* 2003: 285:363-71
27. Kondo H, Miura M, Itokawa Y. Oxidative estress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand* 1991;142:527-32

28. Wojcik S, Nogalska A, Engel WK, et al: Myostatin and its precursor protein are increased in the skeletal muscle of patients with Type-II muscle fibre atrophy. *Folia Morphol* 2008;67;1-7
29. Saricaoglu F, Dal D, Atilla P, et al: Effect of intraarticular injection of lornoxicam on the articular cartilage & synovium in rat. *Indian J Med Res* 2008;127:362-365
30. Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA, et al: Arthrogenic muscle response to a simulated ankle joint effusion. *Br J Sports Med* 2004;38:26-30

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos a Teresa F. F. Piassi pelo apoio técnico fornecido.

**MANUSCRITO II.**

---

Artigo submetido ao *Journal of Muscle Research and Cell Motility*.

Carolina Ramírez, MS,<sup>1,2</sup> Thiago Luiz Russo, PhD,<sup>1</sup> Gabriel Borges Delfino, MS,<sup>1</sup> Sabrina  
Messa Peviani PhD<sup>1</sup>, Carolina Carmona Alcântara,<sup>1</sup> Tania Fátima Salvini, MS, PhD<sup>1</sup>

**A inflamação articular crônica produz atrofia muscular sem aumento na expressão de atrogenes no  
músculo sóleo de rato**

<sup>1</sup>Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo,  
Brasil.

<sup>2</sup>Escola de Fisioterapia, Universidade Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander,  
Colômbia.

## RESUMO

Condições inflamatórias articulares são comuns na população geral, estudos clínicos têm demonstrado que alterações morfológicas e funcionais ocorrem nos músculos relacionados à articulação lesada. Os mecanismos moleculares envolvidos nas adaptações dos músculos relacionados com a articulação inflamada e suas possíveis alterações morfológicas ainda não foram estudados. **Objetivo:** Avaliar a área de secção transversa (AST); a expressão gênica (atrogina-1, MuRF1, MyoD, miostatina, p38MAPK, NFκB, TNF-alfa); e a proteína TNF-alfa no músculo sóleo após inflamação da articulação tibio-társica. **Métodos:** Ratos Wistar foram distribuídos aleatoriamente em três períodos experimentais (2, 7 e 15 dias), e a seguir distribuídos em quatro grupos para cada período: Controle, Sham, Inflamação e Imobilização. Foram realizadas as análises de reação em cadeia da polimerase, Western blot, imunofluorescência e a medida da AST das fibras. **Resultados:** No dia 2, o grupo Inflamação teve aumento na expressão de MuRF1 e p38MAPK e o RNAm de NFκB foi reduzido. No dia 7 neste grupo apenas houve redução na expressão de miostatina. Não houve mudança na expressão gênica assim como da proteína do TNF-alfa. No dia 7 e 15 o grupo Inflamação apresentou redução na AST das fibras musculares. O grupo Imobilização no dia 2 apresentou aumento na expressão gênica de atrogina-1, MuRF1, NFκB, MyoD e miostatina, com redução na AST das fibras musculares. Nos dias 7 e 15 foram mantidos níveis elevados de RNAm de miostatina e a redução da AST das fibras musculares. No grupo Sham houve aumento na expressão gênica de miostatina apenas no dia 2, sem mudanças na AST das fibras musculares. **Conclusão:** A inflamação articular aguda induz a expressão de genes envolvidos na via proteolítica sem redução na AST das fibras

musculares. A inflamação crônica gerou atrofia muscular sem aumento na expressão gênica de genes envolvidos na via proteolítica.

**Palavras-chave:** músculo esquelético, doença articular, expressão gênica, reabilitação.

## INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta inata do sistema celular e humoral que ocorre após uma lesão, onde o corpo tenta restaurar o tecido até seu estado pré-lesado; é uma tentativa do organismo para remover o estímulo lesivo e começar o processo de cicatrização (Serhan et al. 2010; Cotran et al. 1998). No sistema músculo-esquelético, a inflamação possui uma função principal na fisiopatologia de condições articulares crônicas como a artrite reumatóide e a osteoartrite (Serhan et al. 2010; Brown et al. 2008), doenças infecciosas (Dubost et al. 2006), e lesões articulares traumáticas como fraturas, lesões de ligamentos e contusões. (Sandoval et al. 2010; Bastian et al. 2011; Sharma and Mafulli 2005).

Para estudar a resposta inflamatória em animais é usada a carragenina, um agente derivado das algas vermelhas que quando injetado no tecido produz inflamação e hiperalgesia. (Radhakrishnana et al. 2003; Bhattacharyya et al. 2008; Loram et al. 2007). Estudos prévios mostraram que a carragenina é capaz de desencadear uma resposta inflamatória aguda após os primeiros dias de ter sido injetada na articulação, e uma resposta inflamatória crônica dominada pela presença de macrófagos (Radhakrishnana et al. 2003) desde a primeira semana e até 8 semanas depois de ter sido injetada. Portanto, a

carragenina é uma ferramenta experimental útil para analisar a resposta inflamatória articular aguda e crônica em ratos. (Radhakrishnana et al. 2003; Loram et al. 2007).

Estudos que usaram carragenina têm focado principalmente na caracterização da resposta inflamatória, na descrição da nocicepção e na análise do perfil das citocinas após da injeção. (Radhakrishnana et al. 2003; Bhattacharyya et al. 2008; Loram et al. 2007; Wang et al. 2000; Omote et al. 2002). Para nosso conhecimento, não há estudos analisando os efeitos que a injeção intra-articular de carragenina tem nos músculos funcionalmente relacionados à articulação inflamada. Estudar este tópico é importante para entender a adaptação do músculo esquelético frente à inflamação articular.

O músculo esquelético é um tecido plástico, sensível a condições de desuso como a imobilização, a suspensão da pata traseira e a desnervação em ratos (Lieber R 2002; Guillot et al. 2006). Estudos clínicos em humanos têm demonstrado que doenças articulares associadas com inflamação, como por exemplo, a artrite reumatóide, a osteoartrite, as lesões ligamentares e de meniscos e a artroscopia (Stockmar et al. 2006; Gür and Çakin 2003; Hurley MV 1997) geram mudanças no músculo, como a presença de atrofia muscular.

A atrofia é um processo regulado e organizado que causa a redução na área de secção transversa (AST) das fibras musculares, no conteúdo da proteína e da força (Lieber R 2002; Stockmar et al. 2006); aumento na resistência à insulina (Lieber R 2002); e transformação de fibras do tipo I em fibras do tipo II (Lieber R 2002; Guillot et al. 2006).

Mudanças moleculares que ocorrem durante a atrofia têm sido demonstradas em ratos e humanos, dentre elas o aumento na expressão de duas ligases de ubiquitina (E3)



pertencentes à via ubiquitina-proteosoma: MAFbx, também conhecida como atrogina-1 e *Muscle Ring Finger-1* (MuRF1) (Gomes et al. 2001; Bodine et al. 2001; Sackeck et al. 2007; Lecker et al. 1999; Zhang et al. 2006). A redução na AST das fibras musculares é acompanhada também por mudanças na regulação de genes como MyoD, relacionada com a diferenciação e crescimento muscular (Ishido et al. 2004; Mozdiak et al. 1999; Walters et al. 2000); miostatina, envolvido na regulação da massa muscular (Wojcik et al. 2008); e fatores pró-inflamatórios como o p38 *Mitogen Activated Protein Kinase* (p38MAPK), *Nuclear Factor kappa B-dependent* (NFκB), e o Fator de Necrose Tumoral (TNF-alfa) (Zhang et al. 2006; McKineell e Rudnicki 2004; Li et al. 2005; Cai et al. 2004).

Segundo estudo prévio, a injeção de carragenina age sobre o TNF-alfa (Nikishori et al. 2002), uma citocina inflamatória que quando elevada tem a capacidade de aumentar a expressão dos genes MuRF1 e atrogina-1 no músculo esquelético de ratos (Cai et al. 2004; Zhang et al. 2006; Li et al. 2005; Glass DJ 2005). O aumento na expressão de MuRF1 e atrogina-1 pode ocorrer pelas vias NFκB (Cai et al. 2004) e MAPK (Li et al. 2005), respectivamente. Assim, partindo da injeção intra-articular de carragenina, as interações gênicas descritas poderiam ser ativadas nos músculos relacionados com a articulação lesada e por sua vez participar na adaptação do músculo decorrente à inflamação articular.

Apesar de que as condições articulares inflamatórias serem comuns na população em geral e estudos clínicos terem demonstrado que existem mudanças morfológicas e funcionais nos músculos relacionados com a articulação lesada (Lindehammar and Londvall 2004; Pap et al. 2004; Suetta et al. 2007; Williams et al. 2004), os mecanismos moleculares envolvidos na adaptação do músculo, e suas possíveis alterações morfológicas

ainda não foram estudadas. A nossa hipótese é que a inflamação articular leva a mudanças moleculares e estruturais no músculo sóleo relacionado à articulação inflamada. Portanto, o objetivo de nosso estudo foi avaliar o efeito da inflamação da articulação tibio-társica sobre a expressão de genes relacionados à atrofia muscular (atrofina-1 and MuRF1), diferenciação e crescimento (MyoD), regulação da massa (miostatina), e de fatores pró-inflamatórios (p38MAPK, NFκB and TNF-alpha); e a expressão da proteína TNF-alfa no músculo sóleo de rato. As possíveis mudanças na AST das fibras musculares foram avaliadas também.

## **MÉTODOS**

### **Cuidado dos animais e grupos experimentais**

O estudo foi desenvolvido segundo recomendações do *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* e foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade (número do protocolo 049/2007). Foram utilizados sessenta ratos Wistar ( $310 \pm 12$  g, 3 meses de idade). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições ambientais controladas, com livre acesso a água e ração standard. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: 2 dias (n=20), 7 dias (n=20) e 15 dias (n=20). A seguir foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos para cada período experimental: Controle (n=5), Sham (n = 5), Inflamação (n = 5) e Imobilização (n = 5). O grupo Imobilização foi

usado como referência para comparar os possíveis efeitos da restrição da pata traseira decorrente da inflamação.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de xilazina (12mg/kg) e cetamina (95 mg/kg) para a realização de todos os procedimentos experimentais. Após serem pesados e anestesiados, os animais do grupo inflamação receberam 0,03 ml de  $\iota$ -carragenina a 3% (Sigma Chemical Company - St. Louis, USA) na articulação tibio-társica direita, dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%) conforme proposto por Wang et al.<sup>20</sup> Os animais do grupo Sham foram submetidos ao mesmo procedimento para a injeção de 0,03 ml de solução salina. Após a injeção os animais permaneceram agrupados nas gaiolas durante 48 horas, sob as condições já mencionadas e sem restrições na sua atividade. O grupo Imobilização foi imobilizado seguindo as recomendações de Coutinho et al. (2002),<sup>21</sup> com a articulação tibio-társica direita imobilizada em posição neutra para evitar o possível efeito do alongamento ou encurtamento sobre o músculo analisado. A posição neutra foi definida como a disposição da pata traseira em repouso com o animal anestesiado. Após os procedimentos experimentais, os animais permaneceram agrupados nas gaiolas durante 2, 7 ou 15 dias sem restrições na sua atividade, exceto no grupo Imobilização.

Após o período experimental correspondente (2, 7 e 15 dias), o músculo sóleo direito foi retirado. Cada músculo foi pesado e dividido ao meio com um corte transversal no seu ventre. A porção proximal foi dividida novamente ao meio e congelada em nitrogênio líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Forma Scientific, Marietta, OH); os fragmentos foram usados para a análise do RNAm e da expressão de proteína. O fragmento distal foi pré-congelado em isopentano em nitrogênio líquido e armazenado em freezer à  $-86^{\circ}\text{C}$  e usados para

análise da imunofluorescência e a medida da AST das fibras musculares. Após a retirada dos músculos, os animais foram eutanasiados com overdose de anestesia.

### **Avaliação da AST das fibras musculares**

De todos os músculos foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados (10  $\mu\text{m}$ ), em micrótomo criostato (Microm 505 HE), os quais foram corados com azul de toluidina 1% Borax (TB) para avaliação morfológica. A morfometria da área de secção transversa das fibras musculares foi realizada em microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipado com câmera digital (Sony DSC S75, Tokyo, Japão). Da região central do ventre de cada músculo, foram escolhidas aleatoriamente 100 fibras para mensuração da AST usando o software Axiovision 3.0.6 SP4 (Carl Zeiss, Jena, Germany).

### **Isolamento do RNA**

A extração de RNA foi obtida utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad CA), conforme instruções do fabricante. O RNA isolado foi diluído em tris-HCl e ácido T.E pH 7,6, a concentração das amostras foi determinada por espectrofotometria. Para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (razões estiveram entre 1,8 – 2,0). A integridade do RNA ribossômico 18 e 28S das amostras foram avaliadas por eletroforese e coradas com brometo de etídio (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### **Transcrição Reversa (RT)**

Um micrograma de RNA total foi usado para realizar a transcrição reversa (RT) e sintetizar cDNA. A reação de RT foi realizada em um termociclador da seguinte forma: 1µg RNA, 5x de buffer para Transcriptase Reversa e mix dNTPs (Promega, Madison, WI) contendo 0,2mmol L<sup>-1</sup> de dATP, dCTP, dGTP e 0,1mol L<sup>-1</sup> de dTTP; 1 µl de primer oligo (dT) (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 200 U da enzima M-MLV (Promega, Madison, WI). A reação foi incubada a 70°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e por fim aquecida a 95°C por 10 minutos antes de um rápido resfriamento no gelo.

### **Análise em tempo real da reação em cadeia da polimerase**

Os níveis de RNA transcritos para todos os grupos experimentais e controle foram realizados simultaneamente. A amplificação dos cDNAs de todos os grupos experimentais foi realizada em duplicata no *termociclador* (Rotor Gene 3000, Cobert Research, San Francisco, USA) usando como sinal da fluorescência o SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 180 nM de cada primer (senso e antisenso) em uma solução com volume final de 50µl. As condições de ciclagem ocorreram conforme a padronização de cada primer<sup>18,19</sup>. Após a reação de PCR, foi determinado o início da fase de amplificação exponencial (*Ct, cycle threshold*) de cada amostra, o qual foi utilizado como dado para a análise da expressão gênica, com o gene GAPDH utilizado como controle interno para a normalização dos dados. Na figura 2 o valor do controle foi arbitrariamente estabelecido

como 1. Controles negativos com RNA e sem a enzima M-MLV RT, garantiram que os produtos da PCR não resultaram de amplificação do DNA genômico. Foi realizado também um controle contendo apenas água, primer e SYBR Green.

### **Oligonucleotídeos primers**

Os primers utilizados para atrogina-1 (*GenBank* AF441120), GAPDH (*GenBank*, AF106860), miostatina (*GenBank* AF019624), foram construídos utilizando-se o software *Primer Express 2,0* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*). Os primers utilizados para a amplificação dos produtos foram: GAPDH Fw-GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG, Rv-GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA; atrogin-1 Fw-TACTAAGGAGCGCCATGGATACT, Rv-GTTGAATCTTCTGGATCCAGGAT; MuRF1 Fw-TGTCTGGAGGTC-GTTTCCG, Rv-ATGCCGGTCCATGATCACTT; miostatina Fw-CTACCACGGAAACAATCATTACCA, Rv-AGCAACATTTGGGCTTTCCAT; MyoD Fw-GGAGACATCCTCAAGCGATGC, Rv-AGCACCTGGTAAATCGGATTG; p38MAPK Fw-AGCTGAACAAGACAATCTGGGA, Rv-CATAGGCGCCA-GAGCCC; NFκB Fw-CATTGAGGTGTATTTACGG, Rv-GGCAAGTGGCCATTGTGTTC.

### **Western blot**

As proteínas musculares foram extraídas em um tampão de lise (Tris-HCl 50 mM; pH 7,4; Triton X-100 1% w/v; deoxicolato de sódio 0,25%; cloreto de sódio 150 mM;

fluoruro de fenilmetil-sulfonilo 1 mM; aprotinin 1 µg/ml; leupeptin 1 µg/ml; ortovanadato de sódio 1 mM; fluoruro de sódio 1 mM). Quantidades iguais de proteína foram separadas em um gel SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram coradas com Ponceau S para confirmar a transferência das proteínas e a seguir banhadas com TBST. As membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti TNF- $\alpha$  (1:300, Santa Cruz Biotechnology, sc-80383). Após incubação, foram banhadas em TBST e incubadas com o anticorpo secundário anti-goat IgG (KPL, 14-13-06; 1:2000, 0,1% de leite em pó em TBST). O sinal foi detectado usando um filme quimioluminescente (High performance chemiluminescence film, Amersham, UK).

### **Imunofluorescência**

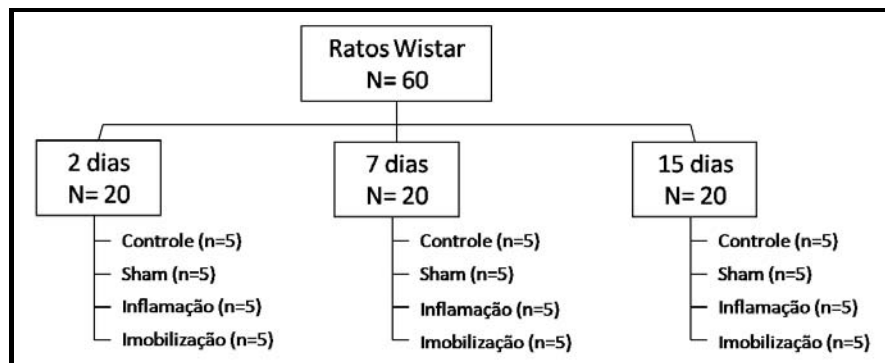
Foi utilizado o anticorpo primário anti *rabbit* TNF- $\alpha$  (diluição 1:200, catálogo no. NBP1-19532; Novus Biologicals, Littleton, USA), e foi utilizado como anticorpo secundário *rhodamine red goat anti-rabbit* IgG (diluição 1:200, catálogo no. Rb394; Molecular Probes, Eugene, OR). Os cortes musculares usados para análise de imunofluorescência foram fixados com paraformaldehyde 4% (Sigma P6148) em phosphate buffer 0,2 M (PB) durante 10 minutos a temperatura ambiente, bloqueados com glicina 0,1 M em PB durante 5 minutos, e permeabilizados em Triton 0,2% X-100-PB durante 10 minutos. A seguir, os cortes foram incubados em soro bovino 1% (bovine serum albumin 1%; BSA) durante 20 minutos a temperatura ambiente para bloquear ligações não específicas e incubados *overnight* com o anticorpo primário (diluído em BSA 1%) a 4°C. Posteriormente, os cortes foram imersos em PB 0,1 M (3 banhos de 10 minutos cada), e

incubados em quarto escuro com o anticorpo secundário (diluído em BSA 1%) durante 2 horas. A seguir os cortes foram novamente imergidos em PB 0,1 M (3 banhos de 10 minutos cada) e as lâminas montadas usando *Vectashield* contendo 4,6-diamidino-2-phenylindole (catálogo no. H-1200; Vector Laboratories). Cortes usados como controle negativo não foram incubados com o anticorpo primário; os resultados foram somente considerados como marcação positiva unicamente se os controles negativos não apresentaram imunorreatividade. As análises foram realizadas mediante fotografias (20x de aumento) dos cortes corados usando microscópio para fluorescência (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) equipado com filtro de *rodhamina* e câmara digital (Sony DSC s75, Tokyo, Japan).

### **Análise estatística**

A análise estatística foi realizada usando o software STATISTICA 5.5. Os testes Shapiro-Wilk's e Levene's foram aplicados para avaliar a normalidade e a homogeneidade dos resultados. O ANOVA *one-way* seguida pelo teste de Tukey's foi aplicado para comparações entre os grupos ou mediante o teste Kruskal-Wallis seguido do teste Newman-Keuls segundo a natureza dos dados. Para todos os testes  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.





**Figura 1.** Distribuição dos grupos experimentais usados no estudo.

## RESULTADOS

### AST das fibras musculares

A AST das fibras musculares foi reduzida apenas no grupo Imobilização no dia 2, comparado ao Controle ( $p < 0.05$ ; Tabela 1), esta redução foi mantida até os dias 7 e 15. O grupo Inflamação apresentou redução da AST das fibras musculares nos dias 7 e 15 comparado ao Controle ( $p < 0.01$ ). Não foram detectadas mudanças no grupo Sham comparado ao Controle (Tabela 1).

### Expressão gênica

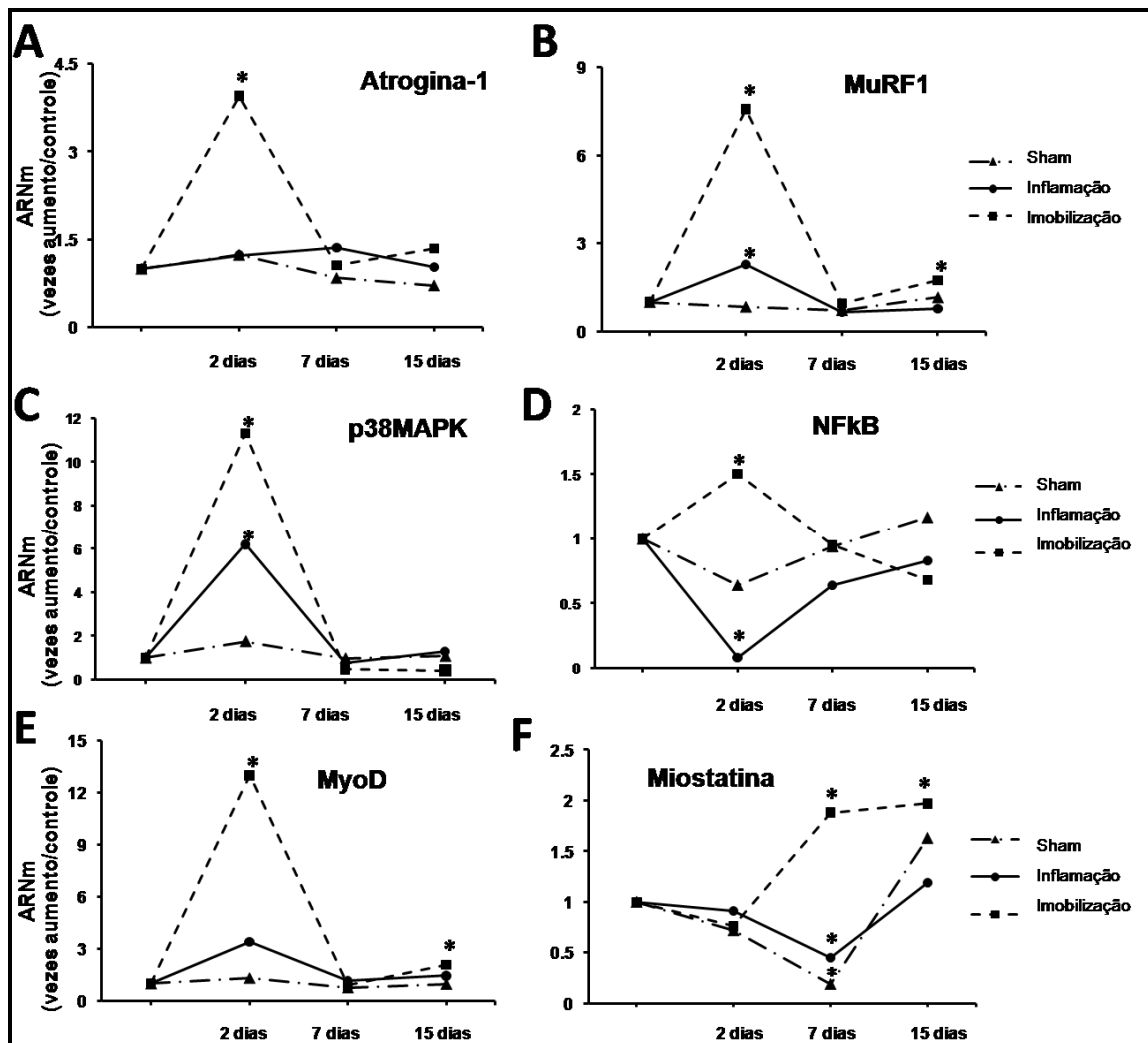
**Atrogina-1.** No dia 2 atrogina-1 aumentou (3.6-vezes) apenas no grupo Imobilização comparado ao Controle ( $p < 0.05$ ). No dia 7 e 15 a expressão deste gene esteve em níveis basais em todos os grupos (Fig. 2A).

**MuRF1.** No dia 2 os níveis de RNAm do MuRF1 aumentaram nos grupos Inflamação (2.3-vezes) e Imobilização (7.6-vezes) comparados ao Controle ( $p < 0.001$ ). Nos dias 7 e 15 esse aumento na expressão retornou a níveis basais no grupo Inflamação (Fig. 2B).

<b>Grupo</b>	<b>2 dias</b>	<b>7 dias</b>	<b>15 dias</b>
	<b>(n=20)</b>	<b>(n=20)</b>	<b>(n=20)</b>
<b><i>Controle</i></b>			
<b>(n=5)</b>	<b>1925 ± 94.5</b>	<b>2063 ± 140.3</b>	<b>1990 ± 350.2</b>
<b><i>Sham</i></b>			
<b>(n=5)</b>	<b>1878 ± 270.8</b>	<b>1863 ± 373.3</b>	<b>1652 ± 130.7</b>
<b><i>Inflamação</i></b>			
<b>(n=5)</b>	<b>1974 ± 320.3</b>	<b>904 ± 162.6*</b>	<b>1362 ± 250.5*</b>
<b><i>Imobilização</i></b>			
<b>(n=5)</b>	<b>1358 ± 110.1*</b>	<b>1087 ± 150.6*</b>	<b>1323 ± 280.1*</b>

**Tabela 1.** Área de secção transversa das fibras ( $\mu\text{m}^2$ ) no músculo sóleo nos dias 2, 7 e 15. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP. \*  $p < 0.05$  vs. Controle.

**p38MAPK.** No dia 2 p38MAPK aumentou nos grupos Sham (2.7-vezes), Inflamação (6.2-vezes) e Imobilização (11.3-vezes) comparados ao Controle ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2C). A expressão do gene voltou a níveis basais em todos os grupos nos dias 7 e 15 (Fig. 2C).



**Figura 2.** Expressão gênica de atrogina-1 (A), MuRF1 (B), NFκB (C), p38MAPK (D), MyoD (E) e miostatina (F) no músculo sóleo dos grupos Sham, Inflamação e Imobilização nos dias 2, 7 e 15. \*  $p < 0,05$  vs. Controle. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP.

**NFκB.** No dia 2 este gene apresentou redução na expressão no grupo Inflamação (0.08-vezes) e aumento no grupo Imobilização (1.5-vezes) comparado ao Controle ( $p < 0.05$ ). Nos dias 7 e 15, a expressão esteve em níveis basais em todos os grupos (Fig. 2D).

**MyoD.** Apenas o grupo Imobilização teve aumento na expressão de MyoD (15-vezes) no dia 2, e nos períodos consecutivos a expressão voltou até níveis basais. (Fig. 2E).

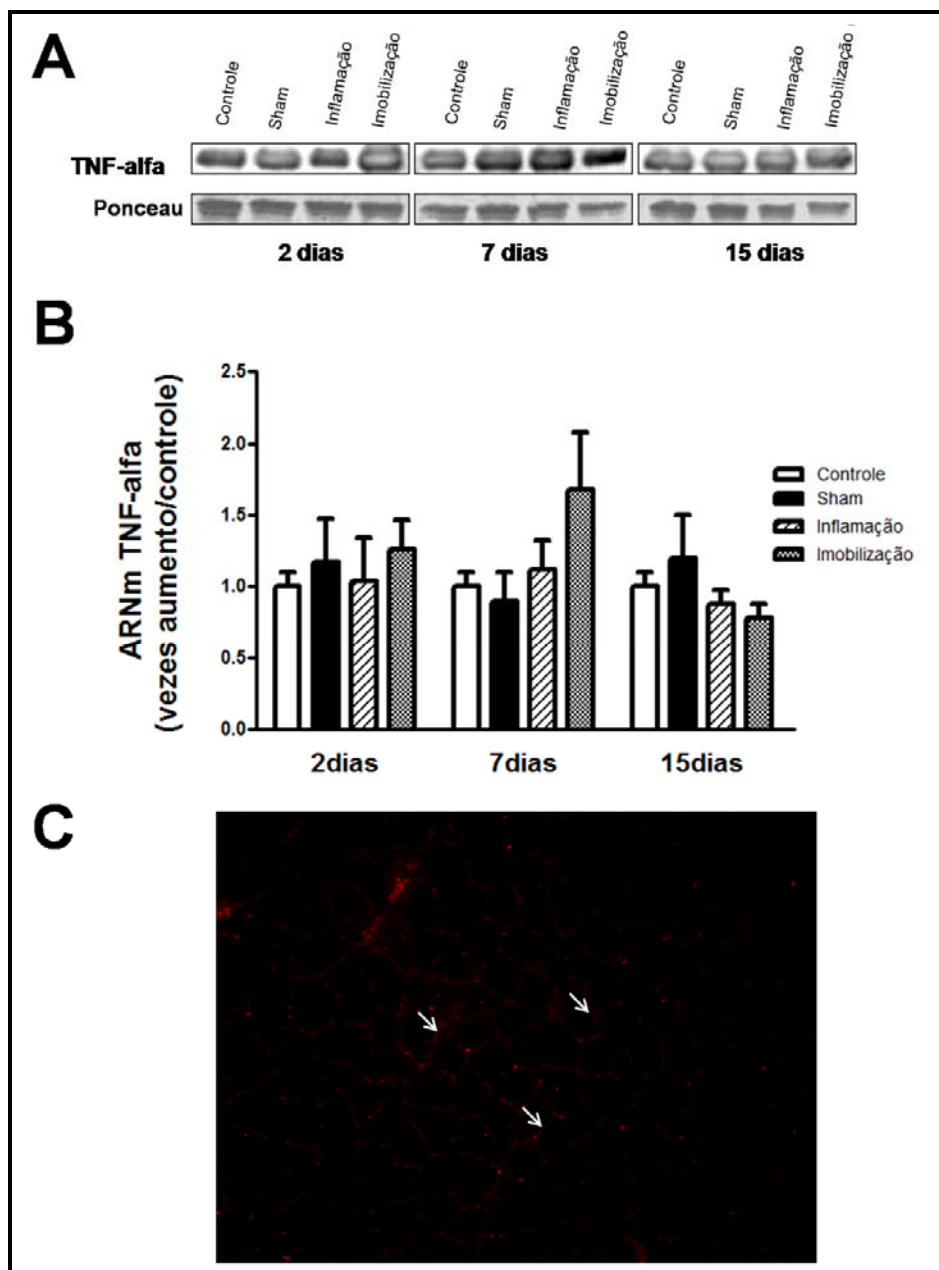
**Miostatina.** No dia 7 houve redução na expressão de miostatina no grupo Inflamação (0.4-vezes) e Sham (0.2-vezes), e no dia 17 a expressão voltou a níveis basais em ambos os grupos (Fig. 2F). No grupo Imobilização a expressão de miostatina aumentou (1.9-vezes) comparada ao Controle ( $p < 0.05$ ; Fig. 2F) e manteve-se elevada (1.9-vezes) até o dia 15 (Fig. 2F).

**TNF-alfa** A expressão gênica e a quantidade de proteína de TNF-alfa não foram alteradas em grupo algum (Fig. 3A e 3B). Este achado foi confirmado pela análise qualitativa por imunofluorescência (Fig. 3C).

## **DISCUSSÃO**

### **Resposta muscular à inflamação articular crônica**

Nosso estudo fornece novas informações sobre a adaptação do músculo esquelético relacionado com uma articulação inflamada mediante injeção de ι-carragenina. Com relação à expressão gênica, observamos que a inflamação articular altera a expressão de alguns genes envolvidos na via de degradação protéica, mas esta mudança não foi suficiente para induzir atrofia muscular nos primeiros dias. O aumento na expressão de



**Figura 3.** (A) Blots representativos do TNF- alfa grupos Controle, Sham, Inflamação e Imobilização nos dias 2, 7 e 15 são mostrados na fileira superior, com as respectivas bandas coradas com Ponceau S na fileira inferior. (B) Expressão gênica de TNF- alfa nos grupos Controle, Sham, Inflamação e Imobilização nos dias 2, 7 e 15 dias. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP; \*  $p < 0,05$  comparado ao Controle. (C) Imagem representativa da imunofluorescência do TNF-alfa no músculo sóleo. Setas brancas indicam imunorreatividade do endomísio ao TNF-alfa detectada em todos os grupos experimentais.

MuRF1 detectado no grupo Inflamação apenas no dia 2 sem a presença de atrofia muscular sugere que na condição experimental estudada este gene poderia estar relacionado com o início da adaptação muscular à inflamação articular.

A atrofia é uma modificação muscular complexa que ocorre em resposta a diferentes estímulos, tem a ver com vias de sinalização que aceleram a degradação de proteínas, como a via ubiquitina-proteosoma. (MacKineell and Rudnicki 2004; Adams et al. 2008; Glickman and Ciechanover 2002). Todavia, em nosso estudo na fase de inflamação crônica (7 and 15 days), a expressão de dois genes envolvidos na ubiquitinação específica do músculo, como atrogina-1 e MuRF1, não foi aumentada. O mesmo padrão foi observado na expressão de NFkB, p38MAPK e TNF-alfa, que são importantes mediadores da degradação de proteínas musculares (Zhang et al. 2006; Li et al. 2005; Cai et al. 2004; Dogra et al 2007).

Portanto, em nosso estudo, a atrofia muscular detectada no sóleo nos dias 7 e 15 após a indução da inflamação sugerem que esta resposta pode ter sido regulada através de vias moleculares diferentes da ubiquitina-proteosoma, como por exemplo, vias envolvidas na regulação da tradução e na apoptose. Segundo Oishi et al. (2008) há um aumento significativo de núcleos apoptóticos no músculo sóleo atrofiado de ratos submetidos a suspensão da pata traseira, sugerindo com isso que neste músculo a resposta apoptótica seja um fator chave na indução da atrofia muscular. Estudos futuros são necessários para investigar a resposta apoptótica no músculo esquelético relacionado com uma articulação inflamada.

Nossos resultados mostraram que a expressão de miostatina e a AST das fibras musculares foram reduzidas no dia 7. Em humanos, tem sido observada redução na expressão de miostatina associada à hipertrofia muscular, sugerindo um papel importante da miostatina na regulação da massa muscular (Ryan et al. 2010). Ma et al. (2003) identificaram que a atrofia muscular pode estar associada com aumento na expressão de miostatina. Portanto, o papel que teve a mudança na expressão de miostatina detectada em nosso estudo não ficou claro.

O RNAm e o conteúdo de proteína do TNF-alfa não foram alterados no grupo Inflamação. TNF-alfa é uma citocina associada à atrofia muscular. Esta citocina aumenta a proteólise muscular, e inibe a síntese de proteína mediante alterações no início da tradução (Adams et al. 2008; Dogra et al. 2007; Lang and Frost 2007; Lang et al. 2002). Nossos resultados indicam que a atrofia muscular do sóleo devida à inflamação articular pode ter sido consequência de uma redução na síntese de proteína ou mediada por outros fatores pró-inflamatórios, como por exemplo a IL-6, que é elevada também na inflamação induzida por carragenina<sup>10</sup> e que é expressa preferencialmente em fibras de contração lenta (Plomgaard et al. 2005). Segundo Phillips e Leeuwenburgh (2005), a expressão de TNF-alfa é específica do tipo de fibra. Estes autores não observaram diferenças nos níveis de expressão gênica de TNF-alfa nem no conteúdo de proteína no músculo sóleo de ratos submetidos à restrição calórica, enquanto que, detectaram elevada expressão de TNF-alfa no músculo TA.

Em nosso trabalho, a expressão de NFκB no dia 2 no grupo Inflamação foi inesperadamente reduzida. Um estudo prévio reportou redução deste fator pró-inflamatório

em ratos com desuso muscular devido à imobilização (Li et al. 2008), contudo o significado desta redução ainda não foi esclarecida na literatura.

### **Resposta muscular à imobilização**

No grupo Imobilização no dia 2, foi detectada redução na AST das fibras musculares e aumento na expressão de atrogina-1, MuRF1, p38MAPK e NFκB. Esta resposta confirma o papel principal que possui a via ubiquitina-proteosoma e a degradação de proteína na fase inicial da atrofia nos músculos submetidos a desuso (Bodine et al. 2001; Satchek et al. 2007; Gomes et al. 2001). O aumento na expressão destes genes podem ter sido influenciado pelo elevado estresse oxidativo decorrente da imobilização (Caron et al. 2009; Kondo et al. 1991).

O aumento na expressão de MyoD no dia 2 no grupo Imobilização pode estar relacionado com uma mudança de fibras do tipo I em fibras do tipo II, como reportado durante atrofia de músculos de contração lenta (Lieber 2002; Wheeler et al. 1999). Wheeler et al. (1999), usando o modelo de suspensão da pata traseira, identificaram aumento na expressão de MyoD e de MHC IIB ( proteína chave nas mudanças de fenótipo das fibras musculares) no músculo sóleo de ratos no 1º e 4º dia, respectivamente. Essa relação temporal entre MyoD e MCH IIB sugere que MyoD é requerida para a expressão de MCH IIB no músculo sóleo, com o objetivo de mudar a fibra muscular de tipo lenta para rápida, ativando-se deste modo o programa miogênico na fase inicial do desuso (Wheeler et al. 1999).



Nosso trabalho mostrou que após 7 e 15 dias de imobilização não houve aumento na expressão de genes pertencentes a via proteolítica. Todavia, a AST das fibras musculares manteve-se reduzida (Tabela 1). Este padrão foi parecido com o detectado no grupo Inflamação. Segundo Calura et al. (2008), a degradação de proteína ocorre na fase inicial em resposta ao estímulo atrofico; esta resposta é depois ocultada por processos biológicos de adaptação do músculo à atrofia. Assim, em nosso estudo, a via clássica associada com a degradação de proteínas foi ativada antes do dia 7, sendo que no dia 7 e 15, outras vias moleculares podem ter sido responsáveis pela atrofia muscular observada.

Um mecanismo potencialmente envolvido na resposta descrita pode ser a redução na síntese de proteína. Um estudo prévio mostrou que a taxa de síntese de proteína no músculo sóleo diminui depois de descarga ou desnervação (Thomason et al. 1989), diferente de resultados observados nos músculos de contração rápida, nos quais a atrofia induzida por desnervação está caracterizada por um aumento na síntese de proteína, implicando em uma contribuição cada vez maior da degradação protéica durante a atrofia do músculo tipo II (Goldspink 1976; Hornberger et al. 2001). Alguns mediadores moleculares envolvidos na regulação da síntese protéica como p70s6k, eIF-2 $\alpha$  e eEF-2 podem estar envolvidos na redução do conteúdo total de proteína no músculo sóleo, contudo, nossos dados não foram suficientes para apoiar essa hipótese. Estudos futuros analisando a regulação da síntese de proteína durante a imobilização são necessários.

Nossos resultados mostraram que a expressão de miostatina foi elevada nos dias 7 e 15 no grupo Imobilização. Tem sido descrito que em presença de um estímulo atrofico, como a imobilização, ocorre aumento na expressão de miostatina e redução na expressão de

MyoD (Spiller et al. 2002). Nossos resultados sugerem que o aumento na expressão da miostatina poderia induzir atrofia muscular no músculo sóleo.

### **Resposta muscular ao derrame articular**

No grupo Sham, as mudanças detectadas na expressão gênica indicam que o derrame articular pode levar a alterações moleculares no músculo funcionalmente relacionado à articulação lesada, embora o significado dessas mudanças não foram claras. Um mecanismo que poderia mediar essa resposta é a chamada resposta muscular artrogênica (RMA). A RMA é produzida por um aumento na tensão no interior da cápsula articular, essa tensão pode aumentar ou diminuir a magnitude do reflexo-H nos músculos funcionalmente relacionados à articulação, embora sem lesão articular alguma. (Palmieri et al. 2004). A inibição do reflexo-H no derrame articular poderia levar a inibição dos motoneurônios alfa no músculo agonista e facilitação dos motoneurônios alfa no grupo muscular antagonista (Palmieri et al. 2004; Takada et al. 2000). Deste modo, em nosso estudo o derrame articular na articulação tibio-társica pode ter levado à ativação das unidades motoras do músculo sóleo, e por sua vez, estimular a expressão gênica que foi detectada. Entretanto, estudos futuros poderão investigar esta hipótese utilizando mensurações como a EMG e o reflexo-H.

Em conclusão, nossos resultados mostraram que a inflamação articular aguda pode induzir a expressão de alguns genes relacionados à via proteolítica sem redução na AST das fibras musculares. Por outro lado, a inflamação articular crônica levou a atrofia muscular

sem aumento na expressão de genes envolvidos na via proteolítica, como atrogina-1, MuRF1, NFκB, p38MAPK e TNF-alfa. Este padrão foi similar com aquele observado depois de 7 e 15 dias de imobilização. Estes resultados sugerem que no músculo sóleo, a atrofia muscular decorrente a inflamação articular e imobilização depois de 7 dias pode estar mediada por outras vias diferentes da via ubiquitina-proteosoma, e chama a atenção sobre a importância que possui o controle da síntese de proteína na redução do conteúdo protéico no músculo sóleo. Este estudo, Apesar de ter sido realizado em animais, possui relevância clínica, pois demonstra a importância de controlar a resposta inflamatória articular aguda com recursos terapêuticos que visem prevenir os efeitos deletérios que causam a inflamação articular crônica sobre os músculos funcionalmente relacionados à articulação inflamada.

**Agradecimentos**

Este projeto recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, número do processo 07/5474-3). C Ramirez, TL Russo e Delfino G foram bolsistas da FAPESP (números dos processos 08/10663-9, 08/05237-0 e 08/03499-8, respectivamente); Peviani S foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa Nacional de Pós-Doutorado (CAPES/PNPD, número do processo 23038.039396/2008-19). Os autores são gratos a Teresa F. F. Piassi pelo apoio técnico fornecido.

**REFERÊNCIAS**

Adams V, Manger N, Gasch A, Krohne C, Gielen S, Hirner S et al (2008) Induction of MuRF1 is essential for TNF- $\alpha$  induced loss of muscle function in mice. *J Mol Biol* 384:48-59

Akima H, Furukawa T (2005) Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial menisectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 13:632-637

Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L (2011) Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol* 2: 34-40

Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobacman JK (2008) Carrageenan-induced NF $\kappa$ B activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27. *Bioch et Biophysica Acta* 1780:973-982

Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA et al (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294:1704-1707

Brown KK, Heitmeyer SA, Hookfin EB, HSieh L, Buchalova M, Taiwo YO, et al (2008) p38 MAPK kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with Osteoarthritis. *Journal of Inflammation* 5:22-27

Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Lidov H, Hasselgren GW, et al (2004) IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119:285-298

Calura E, Cagnin S, Raffaello A, LAveder P, Lanfranchi G and Romualdi C (2008) Meta-analysis of expression signatures of muscle atrophy: gene interaction networks in early and late stages. *BMC Genomics* 9:630-650

Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trens F, Grenier G (2009) A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol* 106:2049-59

Cotran RS, Kumar V, Collins T (2005) Robbins: Pathologic Basis of Disease. W.B Saunders, Philadelphia

Coutinho AL, Gomes A, Franca CN and Salvini TF (2004) A new model for the immobilization of rat hind limb. *Braz J Biol Res* 37:1473-1480

Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin Xuezhong, Wegedal JE, Kumar A (2007) TNF-related weak inducer of apoptosis is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J* 21:1857-1869

Dubost JJ, Soubrier M, Sauvezie B (2000) Pyogenic arthritis in adults. *Joint Bone Spine* 67:11-21

Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1974-1984

Glickman MH e Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for sake of construction. *Physiol Rev* 82:373-428

Goldspink DF (1976) The effect of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *Biochem J* 71:80

Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14440-14445

Granado M, Priego T, Martín A, Villanúa MA, López-Calderon A (2005) Ghrelin receptor agonist GHRP-2 prevents arthritis-induced increase in E3 ubiquitin-ligating enzymes MuRF1 and MAFbx gene expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:1007–1014

Guillot C, Steinberg JG, Delliaux S, Kipson N, Jammes Y, Badier M (2006) Physiological, histological and biochemical properties of rat skeletal muscles in response to hindlimb suspension. *J Electromyogr Kines* 2:276–283

Gür H and Çakin N (2003) Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 84:1534-1541

Hill M, Goldspink G (2003) Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J Physiol* 549:409-418

Hornberger TA, Hunter BR, Kandarian SC and Esser Karyn (2001) Regulation of translation factors during hindlimb unloading and Denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:179-187

Hurley MV (1997) The effects of joint damage on muscle function, proprioception and rehabilitation. *Manual Therapy* 2:11-17

Ishido M, Kami K, Masuhara M (2004) In vivo expression patterns of MyoD, p21 and RB proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:484-493

Jokelainen K, Thomas P, Lindros K and Nanji A (1998) Acetaldehyde inhibits NF-kappaB activation through IkappaBalpha preservation in rat Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 30;253:834-836

Jones SW, Hill R, Krasney P, O'Conner B, Greenhaft PL (2004) Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 18:1025-1027

Kondo H, Miura M and Itokawa Y (1991) Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand* 142:527-528

Land CH, Frost RA, Nairn AC, McLean DA, Vary TC (2002) TNF- $\alpha$  impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:336-347

Lang CH, Frost RA (2007) Sepsis-induced suppression of skeletal muscle translation initiation mediated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Metabolism Clinical and Experimental* 56:49-57



Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL (1999) Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. *J Nutr* 129:227S-237S

Li H, Malhotra S and Kumar A (2008) Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med* 86:113-1126

Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Reid M (2005) TNF-alpha acts via p38MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 19:362-370

Lieber R (2002) Skeletal muscle adaptation to decreased use. In: *Skeletal muscle structural, function & plasticity*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia

Lindehammar H, Londvall B (2004) Muscle involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 43:1546-1554

Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S and Mitchell D (2007) Cytokines profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *The Journal of Pain* 8:127-136

Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N (2003) Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Meta* 285:363-371

McKineell IW and Rudnicki MA (2004) Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell* 119:907-910

Mozdiak PE, Greaser ML, Schultz E (1999) Myogenin, MyoD and myosin heavy chain isoform following hindlimb suspension. *Avia Space Environ Med* 70:511-516

Nishikori T, Irie K, Suganuma T, Ozaki M, Yoshioka T (2002) Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 451:327-233

Oishi Y, Ogata T, Yamamoto K, Terada M, Ohira T, Ohira Y, et al (2008) Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiol* 192:381–395

Omote K, Kawamata T, Nakayama Y, Yamamoto H, Kawamata M, Namiki A (2002) Effects of a Novel Selective Agonist for Prostaglandin Receptor Subtype EP4 on Hyperalgesia and Inflammation in Monoarthritic Model. *Anesthesiology* 97:170–176

Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA, Cordova ML, Porter DA, Edwards JE et al (2004) Arthrogenic muscle response to a simulated ankle joint effusion. *Br J Sports Med* 38:26-30

Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA (2004) The Hoffmann Reflex: Methodologic considerations and applications for use in sports medicine and athletic training research. *Journal of Athletic Training* 39:268-77

Pap G, Machner A, Awiszus F (2004) Strength and voluntary activation of the quadriceps femoris muscle at different severities of osteoarthritic knee joint damage. *J Orthop Res* 22:96-103

Peviani S, Silveira A, Carreira R, Moriscot A, Salvini T (2007) Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve* 35:363-370

Phillips T, Leeuwenburgh C (2005) Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long caloric restriction. *FASEB J* 19:668-70

Plomgaard P, Penkowa M, Pedersen BK (2005) Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles. *Exerc Immunol Rev* 11:53-63

Radhakrishnana R, Moorec SA, Slukaa KA (2003) Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 104:566-577

Russo T, Peviani S, Marques C, Gigo-Benato D, Salvini T (2007) Electrical stimulation based on Chronaxie reduces atrogin-1 and Myod gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 35:87-97

Russo TL, Peviani SM, Duringan JL, Gigo-Benato, Delfino GB, Salvini TF (2010) Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 31:45-57

Ryan AS, Ivey FM, Prior S, Li G, Hafer-Macko C (2011) Skeletal muscle hypertrophy and muscle myostatin reduction after resistive Training in Stroke Survivors. *Stroke* 42:416-420

Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton RV et al (2007) Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J* 21:140-155

Sandoval MC, Ramírez C, Camargo DM, Salvini TF (2010) Effect of high-voltage pulsed current plus conventional treatment on acute ankle sprain. *Brazilian Journal of Physical Therapy* 14:193-200

Serhan C, Ward P and Gilroy D (2010) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, Cambridge

Sharma P, Maffulli N (2005) *Tendon Injury and Tendinopathy: Healing and Repair*. *J. Bone Joint Surg Am* 87:187-202

Spiller MP; Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martin JK, Bass JJ, Sharma M (2002) The Myostatin gene is downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Molecular and Cellular Biology* 22:7066-82

Stockmar C, Lill H, Trapp A, Josten C, Punkt K (2006) Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochem* 108:335-3342

Suetta C, Aagaard P, Magnusson S, Andersen L, Sipilä S, Rosted A et al (2007) Muscle size, neuromuscular activation, and rapid force characteristics in elderly men and women: effects of unilateral long-term disuse due to hip-osteoarthritis. *J Appl Physiol* 102:942-948

Takada Y, Miyahara T, Tanaka T, Ohyama T, and Nakamura Y (2000) Modulation of H Reflex of Pretibial Muscles and Reciprocal Ia Inhibition of Soleus Muscle During Voluntary Teeth Clenching in Humans. *J Neurophysiol* 83:63-2070

Thomason DB, Biggs RB and Booth FW (1989) Protein metabolism and beta – myosin heavy mRNA in unweight soleus muscle. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 257:300-305

Walters EH, Stickland NC, Loughna PT (2000) The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil* 21: 647-653

Wang Y, Huang C, Cao Y, Han Y (2000) Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. *Life Sciences* 67;261-267

Wheeler MT, Snyder EC, Patterson MN and Swoap SJ (1999) An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is regulated for gene expression in fast muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 276:1069-1078

Williams G, Barrance P, Snyder-Mackler L, Buchanan T (2004) Altered quadriceps control in people with anterior cruciate ligament deficiency. *Med Sci Sport Exerc* 36:1089-1096

Wojcik S, Nogalska A, Engel WK, Askanas V (2008) Myostatin and its precursor protein are increased in the skeletal muscle of patients with Type-II muscle fibre atrophy. *Folia Morphol* 67;1-7

Zhang P, Chen X, Fan M (2006) Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses* 69:310-321

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram que a inflamação da articulação tíbio-társica regula diferentemente a expressão de genes relacionados à atrofia, diferenciação e crescimento, controle da massa e fatores pró-inflamatórios em músculos de contração lenta (sóleo) e rápida (TA).

A inflamação articular parece acometer principalmente os músculos de contração lenta, pois o músculo TA no dia 15 recuperou sua AST, enquanto que músculo o sóleo permaneceu atrofiado nesse período.

O fato da expressão do TNF-alfa ter sido detectada apenas no músculo TA sugere que o efeito catabólico desta citosina inflamatória é maior nos músculos de contração rápida, como tem sido observado na atrofia muscular decorrente a condições sistêmicas como AIDS, câncer e diabetes.

O derrame articular parece afetar principalmente os músculos de contração rápida, pois o músculo TA apresentou aumento na expressão de genes relacionados à atrofia (miostatina e atrogina-1) no dia 2, enquanto que no sóleo, foi detectada redução de miostatina no dia 7. Além disso, o efeito negativo do derrame articular sobre o músculo ocorre apenas na fase aguda (dia 2).

**ANEXOS**



## Authors:

Carolina Ramírez, MS  
Thiago Luiz Russo, PhD  
María Cristina Sandoval, MS, PhD  
Adriana Abbade Dentillo, PT  
Marcela Abreu Silva Couto, PT  
João Luiz Quagliotti Durigan, MS, PhD  
Tania Fátima Salvini, MS, PhD

Inflammation

## ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

## Affiliations:

From the Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil (CR, TLR, MCS, AAD, MASC, JLQD, TFS); and School of Physical Therapy, Industrial University of Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia (CR, MCS).

## Correspondence:

All correspondence and requests for reprints should be addressed to: Tania F. Salvini, MS, PhD, Department of Physical Therapy, Federal University of São Carlos, CxP 676, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil.

## Disclosures:

This project was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process 07/5474-3). C. Ramirez, T.L. Russo, and J.L.Q. Durigan were PhD and postdoctoral fellows from FAPESP (process 08/10663-9, 08/05237-0, 08/09408-4, respectively). Financial disclosure statements have been obtained, and no conflicts of interest have been reported by the authors or by any individuals in control of the content of this article.

0894-9115/11/9011-0930/0  
*American Journal of Physical  
Medicine & Rehabilitation*  
Copyright © 2011 by Lippincott  
Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/PHM.0b013e31822dea3c

# Joint Inflammation Alters Gene and Protein Expression and Leads to Atrophy in the Tibialis Anterior Muscle in Rats

## ABSTRACT

Ramirez C, Russo TL, Sandoval MC, Dentillo AA, Couto MAS, Durigan JLO, Salvini TF: Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats. *Am J Phys Med Rehabil* 2011;90:930–939.

**Objective:** The aim of this study was to evaluate the effect of tibiotarsal joint inflammation in rat tibialis anterior muscle through muscle fiber cross-sectional area (CSA) and gene expression (atrogin-1, muscle ring finger-1 [*MuRF1*], myogenic differentiation-1 [*MyoD*], p38 mitogen-activated protein kinase [*p38MAPK*], nuclear factor kappa B-dependent [*NFκB*], tumor necrosis factor- $\alpha$  [*TNF- $\alpha$* ]).

**Design:** Wistar rats were randomly divided into three periods (2, 7, and 15 days) and assigned into four groups within each experimental period: control, sham, inflammation, and immobilization. Real-time polymerase chain reaction, Western blot, immunofluorescence, and muscle fiber CSA analyses were performed.

**Results:** At 2 days, the inflammation group increased atrogin-1, *MuRF1*, and myostatin and reduced *MyoD* expression. At 7 days, the inflammation group increased atrogin-1, *MuRF1*, *NFκB*, *p38MAPK*, *MyoD*, myostatin, and *TNF- $\alpha$*  expression and *TNF- $\alpha$*  protein and reduced muscle fiber CSA. At 15 days, gene and protein expression in the inflammation group returned to basal levels, and CSA values were similar to those in control and sham groups. The immobilization groups have a similar pattern in all experimental periods, with increased atrogin-1, *MuRF1*, *NFκB*, and *TNF- $\alpha$*  gene expression and reduced muscle fiber CSA. The sham group had increased myostatin and atrogin-1 expression at 2 days and increased *MyoD* and myostatin expression at 7 days.

**Conclusions:** Joint inflammation stimulated the expression of muscle factors related to atrophy, growth, differentiation, and mass regulation followed by muscle atrophy.

**Key Words:** Skeletal Muscle, Joint Inflammation, Gene Expression, Rehabilitation

According to clinical studies, morphologic and functional alterations occur in muscles related to an injured joint.<sup>1-3</sup> Many joint diseases have been studied, including rheumatoid arthritis, osteoarthritis, ligament and meniscus injuries, and exploratory joint procedures such as arthroscopy.<sup>1-4</sup> In all of these conditions, inflammation is a common characteristic sign.

Inflammation consists of cellular and humoral responses after an injury, in which the body attempts to restore the tissue to its preinjury state. This response can be acute or chronic.<sup>5</sup> Muscle atrophy is an adaptation observed frequently in muscles related to joint inflammation.<sup>3,4</sup> Muscle atrophy is a highly regulated and ordered process that results in reduced muscle fiber cross-sectional area (CSA), protein content and force,<sup>6</sup> increased fatigue and insulin resistance,<sup>3</sup> and transformation of type I fibers into type II fibers.<sup>6,7</sup>

Despite the indication that joint inflammation causes atrophy in muscles functionally related to the affected joint, the molecular mechanisms involved in this process remain unclear. An animal model of inflammation useful to the study of this subject is the intra-articular injection of carrageenan. It is considered a valid experimental tool in investigating the inflammatory process and hyperalgesia in rats.<sup>8</sup> According to a previous study, carrageenan increases circulating inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),<sup>9</sup> a key factor that is able to activate muscle atrophy.<sup>7,10</sup> Elevation of TNF- $\alpha$  leads to the upregulation of muscle ring finger-1 (*MuRF1*)<sup>11</sup> and muscle atrophy Fbox (*MAFbx/atrogen-1*),<sup>12</sup> which are two important genes related to the ubiquitin-proteasome pathway and muscle atrophy in rats and humans.<sup>7,10,13-15</sup> According to animal models, upregulation of *MuRF1* and *MAFbx/atrogen-1* occurs through the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Nuclear Factor kappa B-dependent (NF $\kappa$ B) pathways, respectively.<sup>7,11,12</sup>

Early studies established that atrogen-1 and *MuRF1* are induced in animal models of muscle atrophy (i.e., immobilization, denervation, hindlimb suspension, and fasting) and in human muscles during systemic diseases associated with cachexia, providing evidence of a common program for protein degradation and muscle atrophy that is independent of etiology.<sup>13-15</sup> On the other hand, p38, a member of the MAPK family, is thought to be a regulator of muscle metabolism. An in vitro study showed that differentiated muscle cells stimulated by TNF- $\alpha$  had increased expression of p38 and atro-

gin-1. In addition, pharmacologic inhibitors of p38 were able to block atrogen-1 upregulation.<sup>11</sup>

In addition, the p65/p50 dimer is an important part of the NF $\kappa$ B family and is associated with muscle atrophy. This dimer is activated and translocates into the nucleus, where it binds to specific DNA sites and regulates expression of *MuRF1*.<sup>12</sup> Therefore, upregulation of NF $\kappa$ B has been associated with the positive regulation of *MuRF1* and the degradation of muscle proteins.<sup>12</sup>

In addition, other factors that are involved in skeletal muscle regulation are related to the ubiquitin-proteasome pathway and include the myogenic regulatory factors. Myogenic regulatory factors are a group of basic helix-loop-helix transcription factors, and myogenic differentiation-1 (MyoD) is its most important member.<sup>16</sup> MyoD stimulates myogenic proliferation and differentiation and participates in adaptive processes in adult skeletal muscle.<sup>17</sup> Elevated expression of atrogen-1 promotes MyoD degradation, and, through this mechanism, atrogen-1 can regulate muscle differentiation.<sup>18</sup>

Myostatin is another important gene involved in the control of skeletal muscle mass and could be involved in the response of skeletal muscles related to an inflamed joint. This gene is a negative regulator of muscle growth that is able to inhibit myoblast proliferation without increasing apoptosis.<sup>16</sup> Myostatin is expressed in developing and adult muscles in response to different stimuli; it is upregulated in immobilized muscle and is downregulated in stretched or electrically stimulated denervated muscle.<sup>16</sup> Furthermore, a previous study showed that upregulation of myostatin was associated with increased MyoD expression in stretched muscles.<sup>19</sup>

Despite clinical evidence suggesting that muscles related to an injured joint can be more sensitive to atrophy and force loss,<sup>1-4</sup> the molecular mechanisms related to muscle adaptation in the presence of joint inflammation and the possible changes in the CSA of muscle related to the injured joint are unclear. Investigation of this problem is clinically relevant and could provide new information on the treatment and recovery of muscles functionally related to an inflamed joint. Our hypothesis is that tibiotarsal joint inflammation activates muscle atrophy pathways in rat tibialis anterior muscle (TA), which is functionally related to the injured joint. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of tibiotarsal joint inflammation on the messenger RNA (mRNA) levels of genes related to atrophy (atrogen-1 and *MuRF1*), differentiation and growth (MyoD), mass regulation (myostatin), and proinflammatory factors (p38MAPK, NF $\kappa$ B, and TNF- $\alpha$ ) and the

expression of *TNF- $\alpha$*  protein in the rat TA muscle. In addition, changes in the muscle fiber CSA were also assessed.

## METHODS

### Animal Care and Experimental Groups

This study was conducted in accordance with the National Guide for Care and use of Laboratory Animals and with the approval of the University Ethics Committee (protocol number 049/2007). Sixty Wistar rats (body weight,  $310 \pm 12$  g; age, 3 mos) were used. The animals were housed in plastic cages in a room with controlled environmental conditions and had free access to water and standard food. The animals were randomly divided into three experimental periods: 2 days ( $n = 20$ ), 7 days ( $n = 20$ ) and 15 days ( $n = 20$ ). They were further assigned randomly into four groups within each experimental period: control ( $n = 5$ ), sham ( $n = 5$ ), inflammation ( $n = 5$ ), and immobilization ( $n = 5$ ). The immobilization group was used as a reference for comparing the possible effects of hindlimb movement restriction caused by inflammation. The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (12 mg/kg) and ketamine (95 mg/kg) for all experimental procedures. After they were weighed and anesthetized, the animals from the inflammation and sham groups were injected with  $\iota$ -carrageenan or saline solution, respectively, into the right tibiotarsal joint. Joint inflammation was induced using 0.03 ml of 3%  $\iota$ -carrageenan (Sigma Chemical Company, St. Louis, United States) dissolved in saline solution (0.9% NaCl), as described by Wang et al.<sup>20</sup> Briefly, the foot was placed in a neutral position and a 26-gauge needle was introduced into the fossa located distally and medially to the lateral malleolus until it reached the joint capsule. After the needle entered the joint space, as evidenced by the end of resistance, the solution was injected. The sham group was submitted to the same procedure for injection of 0.03 ml of saline solution. The immobilization group was immobilized according to Coutinho et al.,<sup>21</sup> and the right tibiotarsal joint was immobilized in a neutral position to avoid possible stretching or shortening effects on the analyzed muscles. Neutral position was defined by the resting arrangement of the hindlimb with the animal anesthetized. After the experimental procedures, all of the animals remained free in their cages for 2, 7, or 15 days without restriction of their movement, except for the immobilization group.

After the experimental time course (2, 7, and 15 days), the right TA muscle was carefully dis-

sected and removed. The muscle was weighed and then divided in half at the middle belly. The proximal fragment was divided in half again, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  (Forma Scientific, Marietta, OH); the fragments were used for the mRNA and protein expression analyses. Distal fragments of the muscle were frozen in isopentane in liquid nitrogen, stored at  $-86^{\circ}\text{C}$ , and used for histologic, immunofluorescence, and muscle fiber CSA measurements. After muscle removal, animals were euthanized with an overdose of anesthesia.

### Muscle Fiber CSA Analysis

Histologic cross-sections (10  $\mu\text{m}$ ) from the middle belly of each right TA muscle were obtained using a cryostat (Micron HE 505, Jena, Germany), stained with Toluidine Blue/1% Borax and analyzed by light microscopy (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) to evaluate the muscle fiber CSA. Images were obtained using a light microscope equipped with a digital camera (Sony DSCs75, Tokyo, Japan). The CSAs of 100 randomly chosen fibers were measured using Axiovision 3.0.6 SP4 software (Carl Zeiss, Jena, Germany). All measurements were made by a blinded evaluator.

### RNA Isolation and Analysis

One frozen fragment from each right TA muscle was homogenized, and total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations. Extracted RNA was dissolved in Tris-HCl and ethylene-diaminetetracetic acid pH 7.6, and its concentration was quantified spectrophotometrically. RNA purity was assessed by determining the ratio of the absorbance at 260 nm to 280 nm (ratios were between 1.8 and 2.0). The integrity of RNA was confirmed through electrophoretic analysis of the 18S and 28S ribosomal RNAs, which were stained using ethidium bromide (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### Reverse Transcription

One microgram of total RNA was used to synthesize complementary DNA. The reverse transcription reaction mixture contained  $5\times$  first-strand buffer, a dNTP (Promega, Madison, WI) mixture with 0.2 mmol/l each of deoxyadenosine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, and deoxyguanosine triphosphate and 0.1 mol/l of deoxythymidine triphosphate, 1  $\mu\text{l}$  of oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 200 U of Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcription enzyme (Promega, Madison, WI).

The reverse transcription reaction was incubated at 70°C for 10 mins, at 42°C for 60 mins, and at 95°C for 10 mins before quick chilling on ice.

### Analyses by Real-Time Polymerase Chain Reactions

RNA transcript levels for the different experimental and control muscles were analyzed simultaneously, and the reactions were performed in duplicate in a Lightcycler (Rotor Gene 3000; Cobert Research, San Francisco, CA) using SYBR Green fluorescent dye detection (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 180 nM of each primer in a final volume of 50  $\mu$ l. The cycling conditions for the target genes were previously described.<sup>16,19</sup> Data were analyzed using the comparative cycle threshold method described by the manufacturer; glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) was the control gene. In Figure 2, the control levels are arbitrarily set to 1. Negative controls contained RNA but no M-MLV reverse transcription, ensuring that the product of polymerase chain reaction was not a result of amplified genomic DNA. A blank control that only contained water, primers, and SYBR Green was also performed.

### Oligonucleotide Primers

Oligonucleotide primers were designed for *GAPDH* (GenBank, AF106860), atrogen-1 (GenBank AF441120) and myostatin (GenBank AF019624) using the Primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Primers used for the amplification of products were as follows: *GADPH*, Fw-GATGCTGGTCTGAGTATGTCTG, Rv-GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA; atrogen-1, Fw-TACTAAGGAGCGCCATGGATACT, Rv-GTTGAATCTTCTGGATCCAGGAT; *MuRF1*, Fw-TGTCTGGAGTCCGTTTCCG, Rv-ATGCCGGTCCATGATCACTT; myostatin, Fw-CTAC CACGG-AAACAATCATTACCA, Rv-AGCAACATTTGGGCTTTCCAT; MyoD, Fw-GGAGACATCCTC-AAGCGATGC, Rv-AGCACCTGGTAAATCGGATTG; p38MAPK, Fw-AGCTGAACAAGACAATC-TGGGA, Rv-CATAGGCC CCAGAGCCC; NF $\kappa$ B, Fw-CATTGAGGTGTATTTACGG, Rv-GGC-AAGTGGCCATTGTGTTC.

### Western Blot Analysis

Protein was extracted from muscles in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% wt/vol Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM sodium chloride, 1 mM phenyl methylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM sodium fluoride). Equal amounts of protein from each muscle lysate were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide

gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were stained with Ponseau S to confirm protein transfer and then rinsed with Tris buffered saline with Tween (TBST). Membranes were blotted with antibodies against TNF- $\alpha$  (1:300, Santa Cruz Biotechnology, sc-80383). After incubation, the membranes were rinsed in TBST and incubated with a secondary antibody against goat immunoglobulin G (IgG) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD; 14-13-06; 1:2000, 0.1% nonfat dried milk in TBST). Detection of the labeled protein was done using the enhanced chemiluminescence system (Amersham, UK).

### Immunofluorescence Analysis

The primary antibody used for immunostaining was rabbit anti-TNF- $\alpha$  (1:200 dilution, catalog no. NBP1-19532; Novus Biologicals, Littleton, United States), and the secondary antibody was rhodamine red goat anti-rabbit IgG (1:200 dilution, catalog no. Rb394; Molecular Probes, Eugene, OR). The muscle cross-sections used for immunostaining for TNF- $\alpha$  were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma P6148) in 0.2 M phosphate buffer (PB) for 10 mins at room temperature, blocked with 0.1 M glycine in PB for 5 mins, and permeabilized in 0.2% Triton X-100-PB for 10 mins. Subsequently, the sections were incubated in 1% bovine serum albumin for 20 mins at room temperature to block nonspecific binding and were incubated with the primary antibody (diluted in 1% bovine serum albumin) overnight at 4°C. After the slides were washed with 0.1 M PB (3 times for 10 mins each), they were incubated with the secondary antibody (diluted in 1% bovine serum albumin) for 2 hrs in a dark room. The slides were washed in 0.1 M PB (3 times for 10 mins each) and were mounted with Vectashield mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (catalogue no. H-1200; Vector Laboratories). Negative control sections were not incubated with the primary antibody, and experimental results were considered only if these controls did not show immunoreactivity. Analyses were performed by obtaining photomicrographs (20 $\times$  magnification) of the stained sections using a fluorescence microscope (Axiolab; Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a rhodamine filter and a digital camera (Sony DSC s75; Tokyo, Japan).

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using STATISTICA 5.5 statistical software. Shapiro-Wilk and Levene tests were applied to evaluate the normality and homogeneity, respectively, of the results.



One-way analysis of variance, followed by a Tukey test, was performed to compare the groups. Non-parametric data were analyzed using a Kruskal-Wallis test followed by a Newman-Keuls test. For all tests,  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Muscle Fiber CSA

Only the immobilization group showed a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in muscle fiber CSA at 2 days compared with the control ( $697 \pm 220$  and  $1702 \pm 110 \mu\text{m}^2$ , respectively; Fig. 1). At 7 days, both the inflammation and immobilization groups had decreased muscle fiber CSAs ( $1110 \pm 154$  and  $1360 \pm 198 \mu\text{m}^2$ , respectively) compared with the control ( $1849 \pm 220 \mu\text{m}^2$ ;  $P < 0.01$ ); however, there was no difference between them (Fig. 1). At 15 days, only the immobilization group showed reduced muscle fiber CSA ( $1195 \pm 189 \mu\text{m}^2$ ) compared with the control ( $1997 \pm 356 \mu\text{m}^2$ ;  $P < 0.05$ ; Fig. 1).

### Gene Expression

#### Atrogin-1

Our data showed increased expression of atrogin-1 after 2 days in the inflammation, immobilization, and sham groups (14.7-fold, 11.6-fold, and 6.3-fold, respectively) compared with the control group (Fig. 2A). This upregulation remained at 7 days in both the inflammation and immobilization groups ( $P < 0.01$ ); however, mRNA levels decreased to 7.31-fold in the inflammation group ( $P < 0.01$ ) and to 2.67-fold in the immobilization group ( $P < 0.01$ ; Fig. 2A). At 15 days, high levels of atrogin-1 expression were found only in the immobilization group (Fig. 2A).

#### MuRF1 Gene

*MuRF1* gene expression increased at 2 days in both the inflammation and immobilization groups (7.7-fold and 10-fold, respectively) compared with

the control (Fig. 2B), and the expression remained elevated at 7 days in both groups (9.7-fold and 4.8-fold, respectively). After 15 days, *MuRF1* gene expression in the inflammation group returned to basal levels, whereas upregulation was maintained in the immobilization group (Fig. 2B).

#### NF $\kappa$ B Gene

*NF $\kappa$ B* gene expression was increased by 6.1-fold in the immobilization group at 2 days and remained elevated at 7 and 15 days compared with the control group ( $P < 0.01$ ). However, *NF $\kappa$ B* mRNA levels decreased drastically ( $P < 0.01$ ) at 7 and 15 days (1.9-fold and 1.7-fold, respectively, Fig. 2C) compared with 2 days. In the inflammation group, gene expression increased only at 7 days (2-fold) and returned to basal levels at 15 days (Fig. 2C).

#### p38MAPK Gene

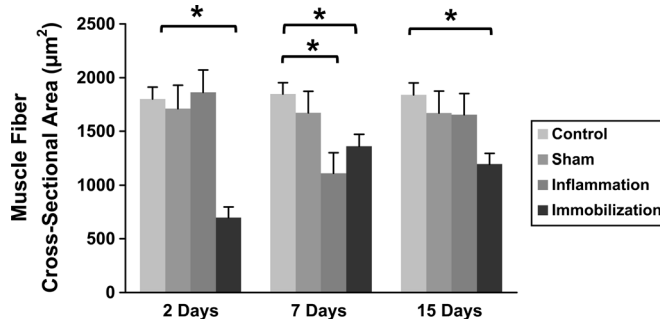
In the immobilization group, this gene was significantly upregulated at 2 days (3-fold;  $P < 0.01$ ), and its expression then decreased to basal levels at 7 and 15 days (Fig. 2D). At 7 days, elevated *p38MAPK* expression was detected only in the inflammation group (2.4-fold), and the expression returned to basal levels after 15 days (Fig. 2D).

#### MyoD Gene

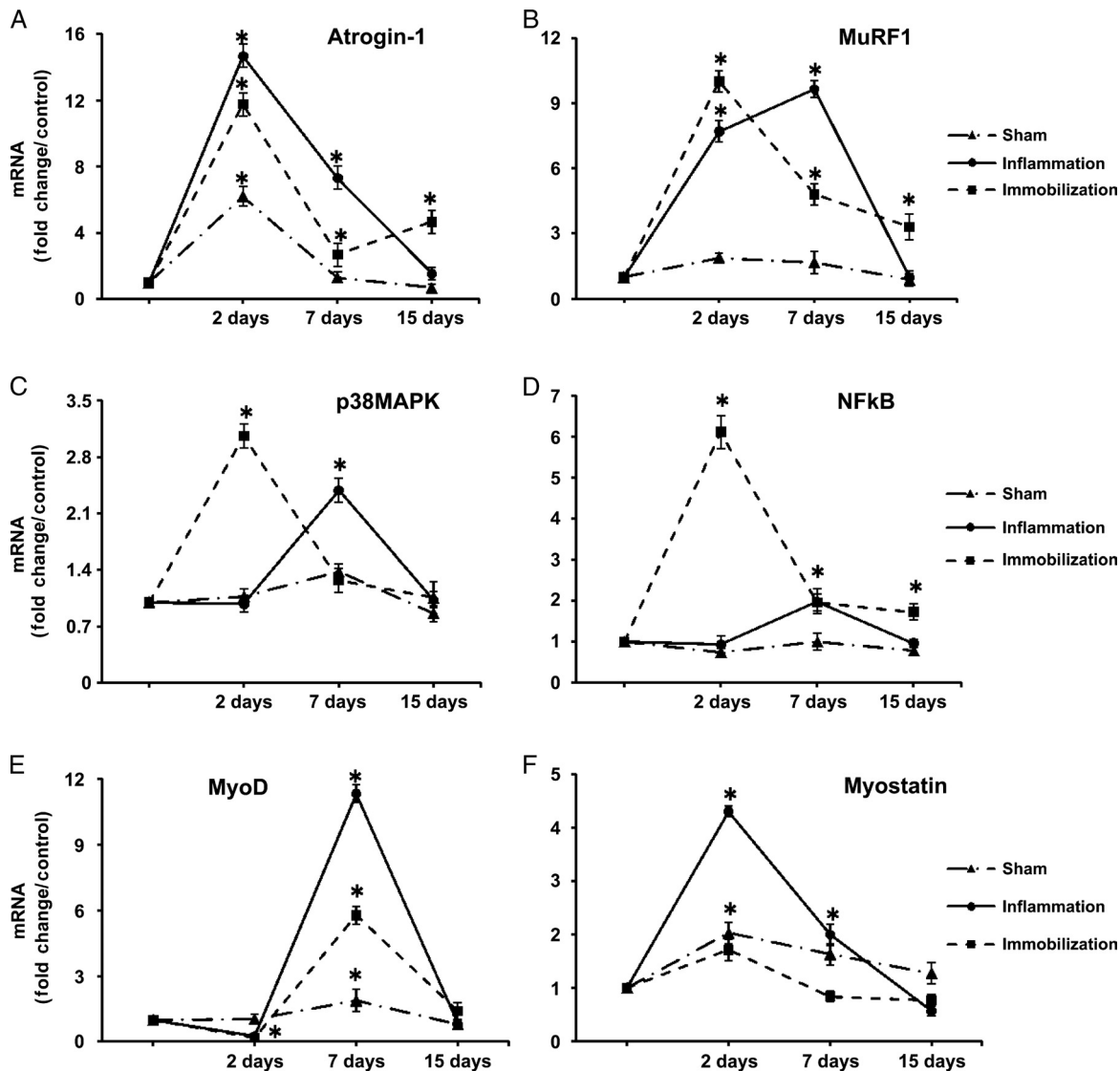
*MyoD* mRNA levels decreased ( $P < 0.01$ ) in the inflammation (0.3-fold) and immobilization groups (0.2-fold) at 2 days compared with the control groups (Fig. 2E). *MyoD* gene expression was increased drastically at 7 days in both groups, although a greater increase was observed in the inflammation group (11.3-fold;  $P < 0.001$ ; Fig. 2E). The sham group also had increased *MyoD* expression at 7 days (1.9-fold). At 15 days, the expression in all groups returned to basal levels (Fig. 2E).

#### Myostatin

Myostatin expression was increased at 2 days ( $P < 0.005$ ) in the sham (2.0-fold) and inflammation



**FIGURE 1** Cross-sectional area of rat tibialis anterior muscle fibers of control, sham, inflammation, and immobilization groups at 2, 7, and 15 days. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  vs. control.



**FIGURE 2** Gene expression of *Atrogin-1* (A), *MuRF1* (B), *NFκB* (C), *p38MAPK* (D), *MyoD* (E), and *myostatin* (F) in the tibialis anterior muscle of the sham, inflammation, and immobilization groups at the 2, 7, and 15 days. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$  vs. control. In (D) at 7 days, \* indicates the difference on both inflammation and immobilization groups compared with control; in (E) at 2 days, \* represents the significant difference on both inflammation and immobilization groups compared with control; and in (F) at 7 days, \* represents the significant difference in both sham and inflammation groups compared with control.

groups (4.3-fold; Fig. 2F). This overexpression remained at 7 days in both groups. However, the expression in the inflammation group was reduced (2.0-fold;  $P < 0.001$ ) when compared with its expression at 2 days (Fig. 2F). At 15 days, myostatin expression returned to basal levels in all experimental groups (Fig. 2F).

### TNF- $\alpha$ Gene

TNF- $\alpha$  gene expression was increased at 7 days in the inflammation and immobilization groups compared with the control group ( $P < 0.05$ ), although the increase in mRNA levels was more pronounced in the inflammation group (20.7-fold;  $P < 0.001$ ) when compared with the immobiliza-

tion group (10.8-fold;  $P < 0.01$ ) (Fig. 3B). After 15 days, TNF- $\alpha$  expression returned to basal levels in all groups (Fig. 3B).

### TNF- $\alpha$ Protein Expression

Representative blots shown in Figure 3A are presented above their respective membranes stained with Ponceau S. Qualitative Western blot analysis showed that, at 2 days, TNF- $\alpha$  protein increased in all of the experimental groups compared with the control group. At 7 days, the inflammation group showed a strong increase in protein levels (Fig. 3A) compared with the control group; the sham and inflammation groups also exhibited a milder increase (Fig. 3A). At 15 days, TNF- $\alpha$  protein expression

decreased in the immobilization group, whereas the other groups presented a slight increase in the expression compared with the control group (Fig. 3A).

### TNF- $\alpha$ Immunofluorescence

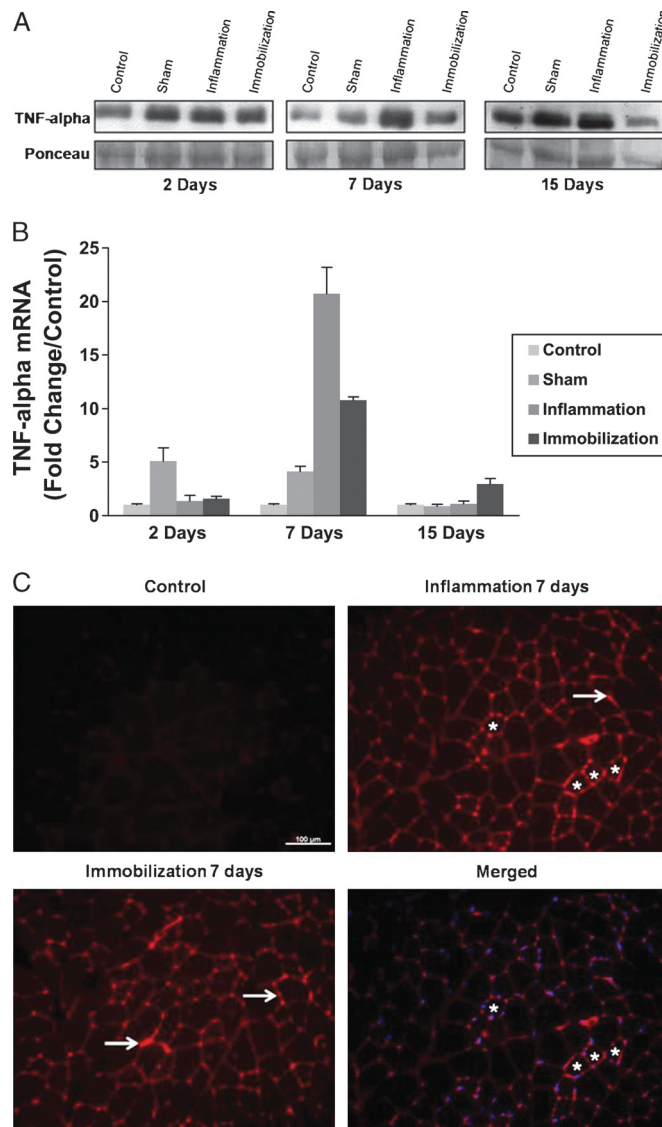
Qualitative analysis of the immunofluorescence staining for TNF- $\alpha$  showed an increased immunoreactivity in all experimental groups; however, TNF- $\alpha$  was barely detected in the control groups (Fig. 3C). Generally, muscle fibers expressing TNF- $\alpha$  were detected in the endomysium area of the TA muscle (represented by arrows). TNF- $\alpha$  was more highly expressed around some muscle fibers (asterisk), whereas in other muscle fibers, TNF- $\alpha$  was not

visible. There was a visible immunoreactivity in the inflammation and immobilization groups at 7 days compared with the control group (Fig. 3C). In some muscle fibers, increased reactivity at 7 days was co-localized with myonuclei (Fig. 3C-merged). The negative control showed no staining.

## DISCUSSION

### Effect of Joint Inflammation on TA Muscle

This study presented new information about how joint inflammation induced by  $\iota$ -carrageenan can regulate muscle fiber CSA, gene expression, and protein content in the rat TA muscle. Early



**FIGURE 3** A, Representative Western blots of TNF- $\alpha$  in control, sham, inflammation, and immobilization groups at 2, 7, and 15 days are shown in the top row, with its respective bands stained with Ponceau S in the lower row. B, Gene expression of TNF- $\alpha$  in control, sham, inflammation, and immobilization groups at 2, 7, and 15 days. Data are presented as mean  $\pm$  SD; \* $P < 0.05$  compared with control. C, Representative immunofluorescence analysis of TNF- $\alpha$  for control, inflammation at 7 days, and immobilization at 7 days is showed. White arrows indicate endomysium immunoreactivity and \* designates the TNF- $\alpha$  expressed mainly around some muscle fibers. TNF indicates Tumor Necrosis Factor.

studies using this inflammatory model showed that, 2 days after intra-articular injection, an acute inflammatory response occurs. This acute response is converted into a macrophage-dominated chronic inflammation by 1 wk and lasts through 8 wks.<sup>8</sup> Therefore, in our study, the molecular response observed in the inflammation group at 2 and 7 days could be considered as a muscle adaptation in response to an acute and chronic joint inflammation, respectively.

Our results showed that, in the inflammation group, expression of atrogin-1 and *MuRF1* genes increased in the first 2 days, but no muscle fiber CSA reduction was observed (Figs. 1; 2A, B). These data suggest that although the molecular mediators of the muscle atrophy pathway were activated, 2 days was not sufficient to detect any reduction in the muscle fiber CSA. Interesting, neither *TNF- $\alpha$*  gene expression nor its protein content was altered by joint inflammation at 2 days.

At 7 days, atrogin-1 expression decreased in the inflammation group compared with the levels observed at 2 days, but it remained elevated when compared with control values. *MuRF1* expression increased at 7 days when compared with 2 days. These changes in atrophy-related gene expression were followed by muscle fiber atrophy (Figs. 1; 2A, B). Chronic joint inflammation and proinflammatory factors found in our study at 7 days (Fig. 2C, D) likely influenced this response.

After 7 days of induced joint inflammation, the levels of atrogin-1, *MuRF1*, and proinflammatory factor-related genes, such as *NF $\kappa$ B* and *p38MAPK*, increased. *TNF- $\alpha$*  protein and mRNA levels were also elevated. These results suggest that chronic joint inflammation stimulates the *TNF- $\alpha$*  pathway, which leads to atrophy<sup>7,8,22</sup> in the TA muscle functionally related to that joint. Therefore, *TNF- $\alpha$*  could upregulate *NF $\kappa$ B* and *p38MAPK* to increase the expression of atrogin-1 and *MuRF1*, respectively. However, other factors such as interferon- $\gamma$ , IL-6, and IL-1 could have participated in the molecular response described. Future studies investigating these molecular mediators and their interactions with the hypertrophy pathway (IGF/IP3/Akt) and Forkhead family of transcription factors are necessary. Recently, López-Mendiá et al.<sup>23</sup> showed that the administration of IGF-1 two times a day improved gastrocnemius muscle weight in an animal model of rheumatoid arthritis. They also observed that IGF-1 attenuated arthritis-induced increase in atrogin-1 and *MuRF1* expressions in this muscle, suggesting the protective effect of IGF-1 on skeletal muscle affected by arthritis. These results confirm the main relation of

IGF-1 pathway and the muscle atrophy mechanisms in inflammatory conditions.

At 15 days of joint inflammation, all genes related to muscle atrophy mediated by the *TNF- $\alpha$*  pathway returned to basal levels, and muscle fiber CSA was also recovered. These results clearly demonstrate that basal levels of *TNF- $\alpha$*  are related to muscle fiber CSA recovery on the 15th day. In addition, these results suggest that joint inflammation induced by  $\iota$ -carrageenan might be lapsing at 15 days. New studies using another carrageenan type such as  $\lambda$ -carrageenan<sup>8,24</sup> would help verify the expression of genes and proteins related to long-term joint inflammation.

On the other hand, MyoD downregulation in the inflammation group at 2 days could be related to elevated atrogin-1 expression. A previous study showed an interaction between atrogin-1 and MyoD<sup>18</sup> and suggested that atrogin-1 causes the ubiquitination of MyoD, which leads to its degradation in the proteasome. Conversely, the atrogin-1/MyoD interaction was not present at 7 days (Fig. 2A–E), when atrogin-1 overexpression was also accompanied by MyoD upregulation. This result could be explained through the muscle atrophy exhibited at 7 days because it has been hypothesized that MyoD would be upregulated during muscle atrophy. Upregulation of MyoD could be an attempt to prevent muscle atrophy, as suggested by MyoD overexpression observed in the denervated muscle.<sup>25</sup> In our study, MyoD expression in the inflammation group returned to basal levels at 15 days, when no muscle fiber atrophy was observed.

Finally, joint inflammation increased myostatin gene expression at 2 days, suggesting a relationship between myostatin and *MyoD* expression. Rat immobilized muscles have increased myostatin expression and, at the same time, decreased *MyoD* expression. Myostatin expression causes an inability of myoblasts to exit from the cellular cycle, affecting myogenic differentiation.<sup>26</sup> Myostatin overexpression in the inflammation group at 7 days also suggests that this gene is related to muscle atrophy. Increased myostatin levels are associated with loss of skeletal muscle mass in conditions as disparate as AIDS wasting syndrome, exposure to microgravity during space flight and hindlimb suspension.<sup>27</sup> Our results suggest that chronic joint inflammation-induced muscle atrophy is also associated with the upregulation of myostatin.

The results of the present study could have implications to clinical practice. Early interventions should be indicated to prevent or detain deleterious modifications on skeletal muscles functionally related



to the affected joint. High-performance athletes could be benefited whether the rehabilitation team objectives, during the joint injury rehabilitation program, also include skeletal muscle activation (e.g., using exercises or electrical stimulation to reduce/control the atrophy pathway).

### **Effect of Immobilization on TA Muscle**

Immobilization increased the expression of both atrogen-1 and *MuRF1*, as expected for a disuse model. Both genes were elevated at all experimental times (2, 7, and 15 days), and this overexpression was associated with muscle atrophy.

This regulation was in accordance with previous studies, which confirmed that the overexpression of both atrogen-1 and *MuRF1* has an essential role in muscle proteolysis.<sup>10,13–15</sup> The elevated oxidative stress caused by immobilization might trigger the molecular responses exhibited in this group and induce NF $\kappa$ B and/or FOXO signaling pathways, leading to an increase in proteolysis through the ubiquitin–proteasome pathway.<sup>28</sup> Corroborating to this hypothesis, TNF- $\alpha$  mRNA levels and protein content were elevated at 7 days but returned to normal values at 15 days.

The expression of *MyoD* in the immobilization group at 7 days was similar to the pattern observed in the inflammation group, and the mechanisms involved could be similar as those previously described.

Our work did not detect an increased expression of myostatin in the atrophied muscle related to immobilization. This result is similar to that of Wojcik et al.,<sup>29</sup> who evaluated the possible role of myostatin in type II fiber atrophy in human muscle. In their study, myostatin mRNA levels did not increase, but myostatin protein was detected through immunocytochemistry and immunoblotting. It is possible that increased myostatin detected only at the protein level was influenced by translational and/or posttranslational modulation.<sup>29</sup>

### **Effect of Intra-Articular Saline Injection on TA Muscle**

Changes in the expression of *MyoD* and myostatin were detected in the sham group. Previous reports showed that saline injection into the tibio-tarsal joint in rats does not cause an inflammatory response.<sup>30</sup> Therefore, in our opinion, the changes detected in the sham group could result from the arthrogenic muscle response caused by joint effusion. Arthrogenic muscle response is triggered by the increase in tension on the joint capsule. Studies in

humans showed that it can alter the excitability of the alpha motoneurons ( $\alpha$ -MN) of muscles functionally related to the joint, without any joint injury.<sup>31</sup> The decreased excitability of the  $\alpha$ -MN related to joint effusion might be related to an increase in activity at slowly adapting Ruffini endings in the joint capsule. Activation of these receptors stimulates Ib inhibitory interneurons, resulting in  $\alpha$ -MN pool inhibition of the agonist muscle.<sup>31</sup>

According to those previous studies, our results could suggest that joint effusion inhibits the  $\alpha$ -MN pool in the TA muscle and regulates the expression of genes associated with muscle mass control and atrophy such as myostatin and atrogen-1 at 2 and 7 days but does not decrease muscle fiber CSA. Other studies are necessary to analyze the neural mechanisms involved in the reduction of  $\alpha$ -MN activity and molecular adaptations in muscles when joint effusion is present. These aspects should be considered by the rehabilitation team because joint distension can interfere on the normal pattern of muscle recruitment, generating an unbalance between agonist and antagonist muscles, thus altering static and dynamic joint stability.

### **Study Limitation and Clinical Implications**

The authors did not discharge that both movement restriction and capsular distension could exert some influence in the results of inflammation group, probably potentiating the effects of inflammation, especially on the first days of inflammation. Future studies should consider a follow-up of animals to access pain and movement restriction during the inflammation process, correlating these finds with muscle adaptation. Furthermore, this manuscript showed the atrophy on the entire muscle, and selective atrophy on different type of muscle fibers could be missed.

Although this study was performed in animals, it has clinical relevance and indicates the importance of therapeutic interventions in the acute phase of joint inflammation with the attempt to reduce the deleterious effects on muscles related to an injured joint.

In conclusion, our study confirmed the initial hypothesis that joint inflammation activates the proteolytic program on muscles functionally related to this joint, inducing genes related to proinflammatory, atrophy, and mass control pathways. In addition, muscle atrophy is only observed after 7 days of joint inflammation, and the recovery of muscle trophism is observed at 15 days, when transcriptional program is normalized.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Teresa F. F. Piassi for her technical support.

## REFERENCES

1. Gür H, Çakin N: Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 2003;84:1534–41
2. Hurley MV: The effects of joint damage on muscle function, proprioception and rehabilitation. *Man Ther* 1997;2:11–7
3. Stockmar C, Lill H, Trapp A, et al: Fiber type related changes in the metabolic profile and fiber diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochem* 2006; 108:3335–42
4. Akima H, Furukawa T: Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial meniscectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005;13:632–7
5. Serhan C, Ward P, Gilroy D: *Fundamentals of Inflammation*. 1st ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2010:1–13
6. Lieber R: *Skeletal Muscle Structural, Function & Plasticity*. 2nd ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2002:225–55
7. Glass DJ: Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:1974–84
8. Radhakrishnana R, Moorec SA, Slukaa KA: Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 2003; 104:566–77
9. Nishikori T, Irie K, Suganuma T, et al: Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 2002;451:327–33
10. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, et al: Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:14440–5
11. Russo TL, Peviani SM, Duringan JL, et al: TNF-alpha acts via p38MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 2005;19:362–70
12. Cai D, Frantz JD, Tawa NE, et al: IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 2004;119:285–98
13. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, et al: Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294:1704–7
14. Satchek JM, Hyatt JP, Raffaello A, et al: Rapid desuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J* 2007;21:140–55
15. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, et al: Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. *J Nutr* 1999;129:227S–37S
16. Russo TL, Peviani SM, Duringan JL, et al: Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 2010;31:45–57
17. Saborin LA, Rudnick MA: The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 2000;57:16–25
18. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, et al: Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2005;280:2847–56
19. Peviani S, Silveira A, Carreira R, et al: Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve* 2007;35:363–70
20. Wang Y, Huang C, Cao Y, et al: Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. *Life Sci* 2000;67:261–7
21. Coutinho AL, Gomes A, Franca CN et al: A new model for the immobilization of rat hind limb. *Braz J Biol Res* 2004;37:1473–80
22. Langen RM, Van der Velden JL, Schols A, et al: Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenic differentiation through MyoD protein destabilization. *FASEB J* 2004;18:227–37
23. López-Menduiña M, Martín AI, Castellero E, et al: Systemic IGF-1 administration attenuates the inhibitory effect of chronic arthritis on gastrocnemius mass and decreases atrogin-1 and IGFBP-3. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2010;299:R541–51.
24. Loram LC, Fuller A, Fick LG, et al: Cytokines profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *J Pain* 2007;8:127–36
25. Ishido M, Kami K, Masuhara M: In vivo expression patterns of MyoD, p21 and Rb proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:484–93
26. Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, et al: The Myostatin gene is downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Mol Cell Biol* 2002;22:7066–82
27. Ma K, Mallidis C, Bhasin S, et al: Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Meta* 2003;285:363–71
28. Kondo H, Miura M, Itokawa Y. Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand* 1991;142:527–32
29. Wojcik S, Nogalska A, Engel WK, et al: Myostatin and its precursor protein are increased in the skeletal muscle of patients with Type-II muscle fibre atrophy. *Folia Morphol* 2008;67:1–7
30. Saricaoglu F, Dal D, Atilla P, et al: Effect of intraarticular injection of lornoxicam on the articular cartilage & synovium in rat. *Indian J Med Res* 2008;127:362–5
31. Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA, et al: Arthrogenic muscle response to a simulated ankle joint effusion. *Br J Sports Med* 2004;38:26–30

# Journal of Muscle Research and Cell Motility

## Chronic joint inflammation leads to muscle atrophy without up-regulation of atrogenes in rat soleus muscle

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	JURE385
<b>Full Title:</b>	Chronic joint inflammation leads to muscle atrophy without up-regulation of atrogenes in rat soleus muscle
<b>Article Type:</b>	Original Research Paper
<b>Keywords:</b>	skeletal muscle, joint disease, gene expression, muscle plasticity.
<b>Corresponding Author:</b>	Tania Fátima Salvini, PhD Federal University of Sao Carlos Sao Carlos, BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Federal University of Sao Carlos
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	carolina ramirez, Dr.
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>All Authors:</b>	carolina ramirez, Dr. Thiago Luiz Russo, Dr. Gabriel Borges Delfino, Dr. Sabrina Messa Peviani, Dr. Carolina Carmona Alcântara Tania Fátima Salvini, PhD
<b>All Authors Secondary Information:</b>	
<b>Abstract:</b>	<p>The muscle fibre cross-sectional area (CSA), gene expression levels (atrogin-1, MuRF1, MyoD, myostatin, p38MAPK, NFκB, TNF-alpha), and TNF-alpha protein in the soleus muscle after tibiotarsal joint inflammation induced by carrageenan were described. Wistar rats were randomly divided into 3 periods (2 days, 7 days and 15 days) and assigned into 4 groups within each experimental period; the groups were control, sham, inflammation and immobilization. Real-time polymerase chain reaction, western blot, immunofluorescence and muscle fibre CSA analyses were performed. In the inflammation group at 2 days, the MuRF1 and p38MAPK gene expression levels were increased, and the NFκB mRNA levels were reduced. At 7 days, only the expression of the myostatin gene was reduced. At 7 and 15 days, the inflammation group displayed a reduction of the muscle fibre CSA. At 2 days, the immobilization group showed increased atrogenes, MuRF1, NFκB, MyoD and p38MAPK gene expressions, and a reduced muscle fibre CSA. At 7 and 15 days, increased mRNA expression levels of myostatin and was reduced the CSA. The sham group showed increased p38MAPK gene expression at 2 days, and no changes in the muscle fibre CSA were detected; and at 7 days, the myostatin gene expression was increased. No changes occurred in TNF-alpha gene or protein expression in any group at any time point. Acute joint inflammation induces the expression of genes related to the proteolytic pathway without muscle fibre CSA reduction. Chronic joint inflammation induced muscle atrophy without the up-regulation of genes involved in the proteolytic pathway.</p>
<b>Suggested Reviewers:</b>	Stanley Salmons University of Liverpool s.salmons@liverpool.ac.uk

	The professor has experience related to the plasticity of the skeletal muscle
	<p>Carol Gregorio  gregorio@u.arizona.edu  The professor has experience related to the article submitted</p>
	<p>Heloisa Araujo  Federal University of Sao Carlos  hsaraujo@ufscar.br  The professor has an excellent experience related to our study</p>
	<p>Anselmo Moriscot  University of Sao Paulo  moriscot@usp.br  The professor has experience related to the skeletal muscle plasticity</p>
	<p>joao durigan  Federal University of Sao Carlos  joaodurigan@gmail.com  The professor has experience with the methods used in our work and the skeletal muscle plasticity</p>

August 26<sup>th</sup> 2011.

To  
Mathias Gautel  
Editor-in-Chief  
Journal of Muscle Research and Cell Motility

We are enclosing a paper entitled “**Chronic joint inflammation leads to muscle atrophy without up-regulation of atrogenes in rat soleus muscle**, to be submitted to Journal of Muscle Research and Cell Motility. This work is an experimental study and we investigated the molecular mechanisms related to muscle adaptation in the presence of joint inflammation and the possible changes in the CSA of muscle related to the injured joint. Investigation of this problem is clinically relevant and could provide new information about the effect of the joint inflammation on muscles functionally related to the inflamed joint. All authors think that this issue is adequate for this Journal.

The results showed that the joint inflammation is able to regulate the expression of genes related to atrophy (atrogin-1 and MuRF-1), differentiation and growth (MyoD) and mass regulation (myostatin) in the soleus muscle in rats. Furthermore, joint effusion per se was also able to alter the gene expression. Thus, our results provide relevant information about the impact of the joint inflammation or effusion on the adaptation of skeletal muscle.

The authors are: Carolina Ramírez, Thiago Luiz Russo, Gabriel Delfino, Sabrina Peviani, Carolina Alcântara, Tania Fátima Salvini. This paper is unpublished and all authors guarantee that the manuscript will not be published elsewhere in any language without the consent of the copyright holders and that the rights of third parties will not be violated.

I should be grateful for acknowledgement of this letter as soon as possible.

Thank you very much for your kindness.

Sincerely,

**Tania de Fátima Salvini**  
Federal University of São Carlos.  
Department of Physical Therapy  
Rodovia Washington Luiz Km  
235,C.P.676-CEP. 13.565-905 São  
Carlos-SP- Brazil  
Fax: 00551633612081  
Lab: 00551633518345  
E-mail: [tania@ufscar.br](mailto:tania@ufscar.br)

Carolina Ramírez, MS,<sup>1,2</sup> Thiago Luiz Russo, PhD,<sup>1</sup> Gabriel Borges Delfino, MS,<sup>1</sup> Sabrina Messa Peviani PhD<sup>1</sup>, Carolina Carmona Alcântara,<sup>1</sup> Tania Fátima Salvini, MS, PhD<sup>1</sup>

Chronic joint inflammation leads to muscle atrophy without up-regulation of atrogenes in rat soleus muscle

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

<sup>2</sup>School of Physical Therapy, Industrial University of Santander, Bucaramanga, Santander, Colombia.

Corresponding author: Tania F. Salvini. E-mail: [tania@ufscar.br](mailto:tania@ufscar.br) Telephone: (0055-16) 33518345 / FAX: (0055-16) 33512081.

## **Abstract**

The muscle fibre cross-sectional area (CSA), gene expression levels (atrogin-1, MuRF1, MyoD, myostatin, p38MAPK, NFκB, TNF-alpha), and TNF-alpha protein in the soleus muscle after tibiotarsal joint inflammation induced by carrageenan were described. Wistar rats were randomly divided into 3 periods (2 days, 7 days and 15 days) and assigned into 4 groups within each experimental period; the groups were control, sham, inflammation and immobilization. Real-time polymerase chain reaction, western blot, immunofluorescence and muscle fibre CSA analyses were performed. In the inflammation group at 2 days, the MuRF1 and p38MAPK gene expression levels were increased, and the NFκB mRNA levels were reduced. At 7 days, only the expression of the myostatin gene was reduced. At 7 and 15 days, the inflammation group displayed a reduction of the muscle fibre CSA. At 2 days, the immobilization group showed increased atrogen-1, MuRF1, NFκB, MyoD and p38MAPK gene expressions, and a reduced muscle fibre CSA. At 7 and 15 days, increased mRNA expression levels of myostatin and was reduced the CSA. The sham group showed increased p38MAPK gene expression at 2 days, and no changes in the muscle fibre CSA were detected; and at 7 days, the myostatin gene expression was increased. No changes occurred in TNF-alpha gene or protein expression in any group at any time point. Acute joint inflammation induces the expression of

genes related to the proteolytic pathway without muscle fibre CSA reduction. Chronic joint inflammation induced muscle atrophy without the up-regulation of genes involved in the proteolytic pathway.

**Key words:** skeletal muscle, joint disease, gene expression, muscle plasticity.

## INTRODUCTION

Inflammation is an innate system of cellular and humoral responses following injuries, in which the body attempts to restore the tissue to its pre-injury state. It is a protective attempt by the organism to remove the injurious stimuli and to initiate the healing process (Serhan et al. 2010; Cotran et al. 1998). In the musculoskeletal system, inflammation plays an active role in the pathophysiology of disparate joint conditions and chronic diseases, including rheumatoid arthritis and osteoarthritis (Serhan et al. 2010; Brown et al. 2008), infectious arthritis (Dubost et al. 2006), and traumatic joint injuries, such as sprains, fractures, ligament injuries, and contusions (Sandoval et al. 2010; Bastian et al. 2011; Sharma and Mafulli 2005).

Carrageenan is frequently used to study the inflammatory process in animals. Carrageenan is an agent derived from red seaweed that causes inflammation and hyperalgesia when injected into tissues but not when ingested or applied topically (Radhakrishnana et al. 2003; Bhattacharyya et al. 2008; Loram et al. 2007). Previous studies have shown that an intra-articular injection of carrageenan triggers an acute inflammatory response within the first few days; this response is converted to macrophage-dominated chronic inflammation by the first week, and it lasts through the 8<sup>th</sup> week (Radhakrishnana et al. 2003). Therefore, carrageenan is a useful experimental tool for the analysis of acute and chronic joint inflammation in rats (Radhakrishnana et al. 2003; Loram et al. 2007).

Studies using carrageenan have mainly focused on the characterisation of the inflammatory response, the description of nociception, and the analysis of cytokine profiles after its injection (Radhakrishnana et al. 2003; Bhattacharyya et al. 2008; Loram et al. 2007; Wang et al. 2000; Omote et al. 2002). To date, there are no studies that have analysed the effects that an intra-articular injection of carrageenan could exert on the muscles related to the inflamed joint. To study this issue, it is relevant to understand the skeletal muscle adaptation to joint inflammation.

Skeletal muscle is a highly plastic tissue and is sensitive to conditions of disuse, such as immobilization, hindlimb unloading and denervation in rats (Lieber R 2002; Guillot et al. 2006). In humans, clinical studies have described joint diseases that are accompanied by inflammation, including rheumatoid arthritis, osteoarthritis, ligament and meniscus injuries and exploratory joint procedures such as arthroscopy (Stockmar



et al. 2006; Gür and Çakin 2003; Hurley MV 1997), and that have been related to an important muscle change, such as muscle atrophy. Muscle atrophy is a highly regulated and ordered process resulting in a reduced muscle fibre cross-sectional area (CSA), protein content and force; (Lieber R 2002; Stockmar et al. 2006); increased fatigue and insulin resistance (Lieber R 2002); and the transformation of type I fibres into type II fibres (Lieber R 2002; Guillot et al. 2006).

Molecular changes have been detected in rats and humans during muscle atrophy; these changes include the up-regulation of two E3 ligases of the ubiquitin-proteasome pathway, such as MAFbx, also known as atrogen-1, and, Muscle Ring Finger-1 (MuRF1) (Gomes et al. 2001; Bodine et al. 2001; Sackeck et al. 2007; Lecker et al. 1999; Zhang et al. 2006). Muscle fibre CSA reduction is also followed by changes in the regulation of genes that are related to muscle differentiation and growth, such as MyoD (Ishido et al. 2004; Mozdiak et al. 1999; Walters et al. 2000); mass regulation like myostatin (Wojcik et al. 2008); and pro-inflammatory factors, such as p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (p38MAPK), Nuclear Factor kappa B-dependent (NFκB), and Tumour Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) (Zhang et al. 2006; McKineell and Rudnicki 2004; Li et al. 2005; Cai et al. 2004).

According to a previous study, the injection of carrageenan increases TNF-alpha (Nikishori et al. 2002), a circulating inflammatory cytokine, and its elevation is able to increase MuRF1 and atrogen-1 expression levels in rat skeletal muscle (Cai et al. 2004; Zhang et al. 2006; Li et al. 2005; Glass DJ 2005). MuRF1 and atrogen-1 up-regulation can occur via the NFκB (Cai et al. 2004) and MAPK (Li et al. 2005) pathways, respectively. Thus, after an intra-articular carrageenan injection, the described gene interactions could be activated in the muscles related to the injured joint and participate in muscle adaptation due to joint inflammation.

Although inflammatory joint conditions are common in the general population and clinical studies have shown morphological and functional alterations in the muscles related to injured joints (Lindehammar and Londvall 2004; Pap et al. 2004; Suetta et al. 2007; Williams et al. 2004), neither the molecular mechanism related to the muscle adaptation to joint inflammation nor its possible morphologic alterations have not been studied yet. We hypothesise that joint inflammation induces molecular and structural changes in the soleus muscle related to the inflamed joint. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of tibiotarsal

joint inflammation induced by carrageenan on the genes related to atrophy (atrogin-1 and MuRF1), differentiation and growth (MyoD), mass regulation (myostatin), and pro-inflammatory factors (p38MAPK, NFκB and TNF-alpha) and on the expression of the TNF-alpha protein in the soleus rat muscle. The possible changes in the muscle fibre CSA were also assessed.

## **METHODS**

### **Animal care and experimental groups**

This study was conducted in accordance with the National Guide for Care and use of Laboratory Animals and with the approval of the University Ethics Committee (protocol number 049/2007). Sixty Wistar rats ( $310 \pm 12$  g body weight; 3 months old) were used. The animals were housed in plastic cages in a room with controlled environmental conditions and had free access to water and standard food. The animals were randomly divided into three experimental groups (2, 7 and 15 days) and they were further assigned randomly into four groups (Control, Sham, Inflammation and Immobilization) within each experimental period (Fig. 1). The Immobilization group was used to evaluate the effect of the immobilization in the skeletal muscle and to compare the possible effects of hindlimb movement restriction due to inflammation.

### **Fig. 1** Distribution of experimental groups used in the study

The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (12 mg/kg) and ketamine (95 mg/kg) for all experimental procedures. After they were weighed and anesthetized, the animals from the Inflammation and Sham groups were injected with  $\iota$ -carrageenan or saline solution, respectively, into the right tibiotarsal joint. Joint inflammation was induced with 0.03 ml of 3%  $\iota$ -carrageenan (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) dissolved in saline solution (0.9% NaCl), as described by Wang et al (2000) and Omote et al (2002). The Sham group was submitted to the same procedure for injection of 0.03 ml of saline solution. The immobilization group was immobilized according to Coutinho et al. (2002), and the right tibiotarsal joint was immobilized in a neutral position to induce disuse and to avoid possible stretching or shortening effects on the soleus muscle. Neutral position was defined by the resting arrangement of the

hindlimb with the animal anesthetized. After the experimental procedures, all of the animals remained free in their cages for 2, 7 or 15 days without restriction of their movement, except for the Immobilization group.

After the experimental time course (2, 7 and 15 days), the right soleus muscle was carefully dissected and removed. The muscle was weighed and then divided in half at the middle belly. The proximal fragment was divided in half again, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  (Forma Scientific, Marietta, OH); the fragments were used for the mRNA and protein expression analyses. Distal fragments of the muscle were frozen in isopentane in liquid nitrogen, stored at  $-86^{\circ}\text{C}$  and used for histological, immunofluorescence and muscle fiber CSA measurements. After muscle removal, animals were euthanized with an overdose of anesthesia.

#### **Muscle fiber CSA analysis**

Histological cross-sections (10  $\mu\text{m}$ ) from the middle belly of each right soleus muscle were obtained using a cryostat (Micron HE 505, Jena, Germany), stained with Toluidine Blue/1% Borax (TB) and analyzed by light microscopy (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) to evaluate the muscle fiber CSA. Images were obtained with a light microscope equipped with a digital camera (Sony DSCs75, Tokyo, Japan). The CSAs of 100 randomly chosen fibers were measured using Axiovision 3.0.6 SP4 software (Carl Zeiss, Jena, Germany). All of the measurements were made by a blinded evaluator.

#### **RNA isolation and analysis**

One frozen fragment from each right soleus muscle was homogenized, and total RNA was isolated using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's recommendations. Extracted RNA was dissolved in Tris-HCl and ethylene-diaminetetracetic acid (TE) pH 7.6, and its concentration was quantified spectrophotometrically. RNA purity was assessed by determining the ratio of the absorbance at 260 nm to 280 nm (ratios were between 1.8 and 2.0). The integrity of RNA was confirmed by electrophoretic analysis of the 18S and 28S ribosomal RNAs, which were stained with ethidium bromide (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### Reverse transcription

One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA. The reverse transcription reaction (RT) mixture contained 5x first-strand buffer, a dNTP (Promega, Madison, WI) mixture with 0.2 mmol·L<sup>-1</sup> each of dATP, dCTP, dGTP and 0.1 mol·L<sup>-1</sup> of dTTP, 1 µl of oligo (dT) primer (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 200 U of M-MLV RT enzyme (Promega, Madison, WI). The reverse transcription reaction was incubated at 70°C for 10 min, 42°C for 60 min and 95°C for 10 min before quick chilling on ice.

### Analyses by real-time polymerase chain reactions

RNA transcript levels for the different experimental and control muscles were analyzed simultaneously, and the reactions were performed in duplicate in a Lightcycler (Rotor Gene 3000, Cobertt Research, San Francisco, USA) using SYBR green fluorescent dye detection (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 180 nM of each primer in a final volume of 50 µl. The cycling conditions for the target genes were previously described (Russo et al. 2010; Peviani et al. 2007; Russo et al. 2007). Data were analyzed using the comparative cycle threshold (Ct) method described by the manufacturer; GAPDH was the control gene. In Figure 2 the control levels are arbitrarily set to 1. Negative controls contained RNA but no M-MLV RT, ensuring that the PCR product was not a result of amplified genomic DNA. A blank control that only contained water, primers and SYBR green was also performed.

### Oligonucleotide primers

Oligonucleotide primers were designed for GAPDH (GenBank, AF106860), atrogen-1 (Gen-Bank AF441120) and myostatin (GenBank AF019624) using the Primer Express Software 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, California). Primers have been previously described for MuRF1 (Granado et al. 2005), MyoD (Hill and Goldspink, 2003), p38MAPK (Jones et al. 2004) and NFκB (Jokelainen et al. 1998). Primers used for the amplification of products were as follows: GAPDH Fw-GATGCTGGTGCTGAGTATGTCCG, Rv-GTGGTGCAGGATGCATTGCTGA; atrogen-1 Fw-TACTAAGGAGCGCCATGGATACT, Rv-GTTGAATCTTCTGGATCCAGGAT; MuRF1 Fw-TGTCTGGAGGTCGTTTCCG, Rv-ATGCCGGTCCATGATCACTT; myostatin Fw-CTACCACGGAAACAATCATTACCA, Rv-AGCAACATTTGGGCTTTCCAT; MyoD Fw-GGAGACATCCTCAAGCGATGC, Rv-AGCACCTGGTAAATCGGATTG; p38MAPK Fw-AGCTGAACAAGACAATCTGGGA, Rv-

CATAGGCGCCA-GAGCCC; NFκB Fw-CATTGAGGTGTATTTACGG, Rv-  
GGCAAGTGGCCATTGTGTTC.

### **Western blot analysis**

Protein was extracted from muscles in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% w/v Triton X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 150 mM sodium chloride, 1 mM phenyl methylsulfonyl fluoride, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM sodium fluoride). Equal amounts of protein (80 µg) from each muscle lysate were separated by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were stained with Ponceau S to confirm protein transfer and then rinsed with TBST. Membranes were blotted with antibodies against TNF-alpha (1:300, Santa Cruz Biotechnology, sc-80383). After incubation, membranes were rinsed in TBST and incubated with a secondary antibody against goat immunoglobulin G (KPL, 14-13-06; 1:2000, 0.1% nonfat dried milk in TBST). Detection of the labeled protein was done using the enhanced chemiluminescence system (ECL, Amersham, UK).

### **Statistical Analysis**

Shapiro-Wilk's and Levene's tests were applied to evaluate the normality and homogeneity, respectively, of the results. One-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test, was performed to compare the groups. Non-parametric data were analyzed using a Kruskal-Wallis test followed by a Newman-Keuls test. For all tests,  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **Muscle fibre CSA**

The muscle fibre CSA at 2 days decreased only in the immobilization group compared with the control ( $p < 0.05$ ; Table 1), and this reduction continued at 7 and 15 days. The inflammation group displayed muscle fibre CSA reduction at 7 and 15 days when compared with the control ( $p < 0.01$ ). No changes were detected in the sham group compared with the control (Table 1).

Group	2 days	7 days	15 days
	(n=20)	(n=20)	(n=20)
<i>Control</i>			
(n=5)	1925 ± 94.5	2063 ± 140.3	1990 ± 350.2
<i>Sham</i>			
(n=5)	1878 ± 270.8	1863 ± 373.3	1652 ± 130.7
<i>Inflammation</i>			
(n=5)	1974 ± 320.3	904 ± 162.6*	1362 ± 250.5*
<i>Immobilization</i>			
(n=5)	1358 ± 110.1*	1087 ± 150.6*	1323 ± 280.1*

**Table 1.** Muscle fibre cross-sectional area ( $\mu\text{m}^2$ ) in the soleus muscle at 2, 7 and 15 days. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs. control.

### Gene expression

**Atrogin-1.** At 2 days, atrogin-1 increased (3.6-fold) only in the immobilization group compared with the control ( $p < 0.05$ ). At 7 and 15 days, this gene was expressed at basal levels in all groups (Fig. 2A).

**MuRF1.** MuRF1 mRNA levels increased in the inflammation (2.3-fold) and immobilization groups (7.6-fold) at 2 days compared with the control ( $p < 0.001$ ). At 7 and 15 days, this overexpression returned to basal levels in both groups (Fig. 2B).

**Fig. 2** Gene expression of atrogin-1 (A), MuRF1 (B), p38MAPK (C), NF $\kappa$ B (D), MyoD (E) and myostatin (F) in the soleus muscle of the sham, inflammation and immobilization groups at 2, 7 and 15 days. \* $p < 0.05$  vs. control. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD

**p38MAPK.** p38MAPK was overexpressed at 2 days in the sham (2.7-fold), inflammation (6.2-fold) and immobilization (11.3-fold) groups compared with the control ( $p<0.05$ ) (Fig. 2C). After 7 and 15 days, the gene expression returned to basal levels in all groups (Fig. 2C).

**NF $\kappa$ B.** At 2 days, this gene showed decreased expression in the inflammation group (0.08-fold) and increased expression in the immobilization group (1.5-fold) compared with the control ( $p<0.05$ ). At 7 and 15 days, expression was at basal levels in all groups (Fig. 2D).

**MyoD.** MyoD was strongly upregulated only in the immobilization group (15-fold) at 2 days; the expression returned to basal levels at 7 and 15 days (Fig. 2E).

**Myostatin.** There was no change in myostatin expression levels in any group at 2 days. At 7 days, there was decreased myostatin expression in the inflammation (0.4-fold) and sham (0.2-fold) groups, and at 15 days, the expression returned to basal levels in both groups (Fig. 2F). In the immobilization group, myostatin expression increased (1.9-fold) compared with the control ( $p<0.05$ ; Fig. 2F) at 7 days and remained elevated (1.9-fold) until 15 days (Fig. 2F).

### **TNF-alpha**

Protein and gene expression of TNF-alpha was not altered in any group at any time point (Fig. 3A and 3B), which was confirmed by the qualitative analyses of immunofluorescence staining (Fig. 3C).

**Fig. 3** (A) The top row shows the representative blots of TNF-alpha in the control, sham, inflammation and immobilization groups at 2, 7 and 15 days. The lower row shows the respective bands stained with Ponceau S. (B) Gene expression of TNF-alpha in the control, sham, inflammation and immobilization groups at 2, 7 and 15 days. The data are presented as the mean  $\pm$  SD. (C) A representative immunofluorescence image of TNF-alpha for the control, sham, inflammation and immobilization groups at 2, 7 and 15 days. The white arrows indicate endomysium immunoreactivity to TNF-alpha that was observed in all experimental groups

## **DISCUSSION**

### **Muscle response to acute and chronic joint inflammation**

Our study provides new information regarding the adaptation of skeletal muscle in response to the joint inflammation induced by  $\iota$ -carrageenan. We observed that joint inflammation altered the expression of some genes involved in the protein degradation pathway, but this change was not enough to induce muscle atrophy at 2 days.

The up-regulation of MuRF1 was only observed prior to muscle atrophy in the inflammation group at 2 days and suggests that under the analysed experimental conditions, this gene could be related to the onset of muscle adaptation to joint inflammation. MuRF1 gene expression is located downstream of NF $\kappa$ B (Adams et al. 2008); therefore, the up-regulation of MuRF1 should be favoured by the NF $\kappa$ B overexpression detected in our study. However, this up-regulation was not enough to reduce the muscle fibre CSA in the inflammation group at 2 days.

Atrophy is a complex muscle modification that occurs as a result of a variety of mechanisms. Atrophy activates different molecular triggers and signalling pathways and results in accelerated protein degradation, which may occur through the activation of the ubiquitin proteasome pathway (MacKineell and Rudnicki 2004; Adams et al. 2008; Glickman and Ciechanover 2002). However, in our study, during chronic joint inflammation (at 7 and 15 days), the expression of two genes that are involved in muscle-specific ubiquitination, atrogin-1 and MuRF1, was not increased. The same pattern was observed for the expression of NF $\kappa$ B, p38MAPK and TNF-alpha, which are other important mediators of muscle protein degradation (Zhang et al. 2006; Li et al. 2005; Cai et al. 2004; Dogra et al. 2007).

Therefore, in our study, the muscle atrophy that was detected in the soleus after 7 and 15 days of inflammation suggests that this response was likely regulated through pathways other than those of the ubiquitin proteasome, such as pathways involved in translational regulation and apoptotic processes. According to Oishi et al. (2008), there is a dramatic increase in the number of apoptotic nuclei in the atrophic soleus muscle that was subjected to hindlimb suspension, which suggests that in this muscle, the apoptotic response is a key factor that induces muscle atrophy. Additional studies to investigate the apoptotic response in the skeletal muscles related to joint inflammation are necessary.



In our study, myostatin expression and the muscle fibre CSA at 7 days were reduced in the inflammation group. In humans, a reduction in myostatin expression associated with muscle hypertrophy has been observed, which suggests an important role for myostatin in the regulation of muscle mass (Ryan et al. 2010). However, Ma et al. (2003) identified that skeletal muscle atrophy could be associated with the upregulation of myostatin. Therefore, the role of the change in gene expression that was detected in our study is not clear.

Neither TNF-alpha mRNA nor its protein content was altered in the inflammation group. TNF-alpha is a cytokine associated with muscle atrophy; it increases muscle proteolysis and inhibits skeletal muscle protein synthesis by altering the initiation of translation (Adams et al. 2008; Dogra et al. 2007; Lang and Frost 2007; Lang et al. 2002). Our results indicate that genes related to muscle proteolysis were not involved on the soleus muscle atrophy due to joint inflammation, and suggest that the muscle fibre CSA reduction could result from a decrease in protein synthesis or be mediated by another pro-inflammatory factor, such as IL-6, which is also elevated in carrageenan-induced inflammation (Loram et al. 2007) and appears to be preferentially expressed in slow twitch muscle (Plomgaard et al. 2005). According to Phillips and Leeuwenburgh (2005), TNF-alpha expression is fibre type-specific. The authors identified no detectable differences in the TNF-alpha gene and protein expression levels in the soleus muscle from rats that were subjected to caloric restriction; however, elevated TNF-alpha expression levels were detected in the TA muscle.

In our study, the gene expression of NFκB at 2 days in the inflammation group was unexpectedly reduced. A previous study reported a reduction of this pro-inflammatory factor in muscle disuse due to immobilization (Li et al. 2008), but the significance of this reduction has not yet been clarified in the literature.

### **Muscle response to immobilization**

In the immobilization group at 2 days, the muscle fibre CSA reduction was detected in combination with the elevated gene expression levels of atrogin-1, MuRF1, p38MAPK and NFκB. This response confirms the pivotal role of the ubiquitin proteasome pathway and of protein degradation in the early stage of atrophy in muscles that have been subjected to disuse (Bodine et al. 2001; Satchek et al. 2007; Gomes et al. 2001). According to previous studies, the up-regulation of those genes could be influenced by the elevated oxidative stress following immobilization (Caron et al. 2009; Kondo et al. 1991).

The up-regulation of MyoD at 2 days in the immobilization group could be related to a possible change from type I to type II fibres, as reported during the atrophic process in slow-twitch muscles (Lieber 2002; Wheeler et al. 1999). Using a hindlimb suspension model, Wheeler et al. (1999) identified an increase in the expression levels of MyoD and MHC IIB (a key protein related to muscle fibre phenotypic changes) in the soleus muscle of rats on the 1st and 4th days, respectively. The temporal relationship between MyoD and MCH IIB suggests that MyoD is required for the expression of MCH IIB in the soleus muscle to convert the fibre from a slow to a fast phenotype, thereby activating the myogenic program in the early state of disuse (Wheeler et al. 1999).

At 7 and 15 days after immobilization, there was no increased expression of genes related to the proteolytic pathway, but the muscle fibre CSA remained reduced (Table 1) and was similar to that observed in the inflammation group. According to Calura et al. (2008), protein degradation is an early response to the stimulus that induces atrophy. This response is subsequently masked and likely occurs through the biological process of muscle adaptation to atrophy. In our study, the classical pathway related to protein degradation was activated prior to 7 days; therefore, after 7 and 15 days of immobilization, other pathways could be responsible for the muscle atrophy that was detected.

A potential mechanism involved in the response described in the immobilization group at 7 and 15 days, could be a decrease in protein synthesis. Previous studies have shown that the rates of protein synthesis in the soleus muscle decreased after unloading and denervation (Thomason et al. 1989). These results differ from those observed in the fast-twitch muscle, in which denervation-induced atrophy is characterised by an increase in protein synthesis; this implies an even greater contribution of protein degradation to type II muscle fibre atrophy (Goldspink 1976; Hornberger et al. 2001). Molecular mediators involved in protein synthesis regulation this implies an even greater contribution of protein degradation, such as p70s6k, eIF-2 $\alpha$  and eEF-2, may be involved in the reduced total protein content of the soleus muscle; however, our data did not support this hypothesis. Future studies to analyse the regulation of protein synthesis during immobilization are necessary.

In our study, myostatin expression was up-regulated at 7 and 15 days in the immobilization group. It has been observed that in the presence of an atrophic stimulus such as immobilization, an increase in myostatin

expression is accompanied by a decrease in MyoD expression (Spiller et al. 2002). Our results suggest that the increased myostatin expression could induce muscle atrophy and elicit the down-regulation of muscle-specific genes, such as MyoD.

### **Muscle response to joint effusion**

In the sham group, the changes detected in gene expression indicate that joint effusion is able to generate molecular alterations in the muscle that are functionally related to the injured joint, although the significance of these changes is not clear. A mechanism by which this muscle response could be mediated is the arthrogenic muscle response (AMR). The AMR is generated by the elevated tension inside the joint capsule, which increases or decreases the extent of the H-reflex in muscles that are functionally related to the affected joint; this process can occur even without an associated joint injury (Palmieri et al. 2004). The H-reflex inhibition in joint effusion could result in the inhibition of the alpha motoneurons pool in the agonist muscle, and alpha motoneurons facilitation was observed in the antagonist muscle group (Palmieri et al. 2004; Takada et al. 2000). Thus, in our study, the tibiotarsal joint effusion could cause activation in the soleus motor units and, in this manner, stimulate the detected gene expression. However, future studies should investigate this hypothesis using EMG and H-reflex measurements.

In conclusion, our study showed that acute joint inflammation was able to induce the expression of some genes related to the proteolytic pathway without reducing the muscle fibre CSA. Conversely, chronic joint inflammation generated muscle atrophy without up-regulating the genes involved in the proteolytic pathway, such as atrogin-1, MuRF1, NF $\kappa$ B, p38MAPK and TNF- $\alpha$ . This pattern was similar to that observed after 7 and 15 days of immobilization. This result suggests that in the soleus muscle, muscle atrophy due to joint inflammation and immobilization after 7 days could be mediated by pathways other than the ubiquitin proteasome and suggests the importance of protein synthesis control in the reduced protein content in the soleus muscle. Despite this study was executed in rats, it has clinical relevance and indicates the importance of controlling the acute joint inflammatory response through therapeutic interventions, to prevent the noxious effects caused by chronic joint inflammation on the muscle that is functionally related to the inflamed joint.

**Acknowledgments**

This project was supported by the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP, process 07/5474-3). C Ramirez, TL Russo and G Delfino were fellows from FAPESP (process 08/10663-9, 08/05237-0 and 08/03499-8, respectively), and S Messa Peviani was a fellow from *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Programa Nacional de Pós-Doutorado* (CAPES/PNPD, process 23038.039396/2008-19). The authors are also grateful to Teresa F. F. Piassi for her technical support.

## References

- Adams V, Manger N, Gasch A, Krohne C, Gielen S, Hirner S et al (2008) Induction of MuRF1 is essential for TNF- $\alpha$  induced loss of muscle function in mice. *J Mol Biol* 384:48-59
- Akima H, Furukawa T (2005) Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial meniscectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 13:632-637
- Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L (2011) Systemic inflammation and fracture healing. *J Leukoc Biol* 2: 34-40
- Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobacman JK (2008) Carrageenan-induced NF $\kappa$ B activation depends on distinct pathways mediated by reactive oxygen species and Hsp27. *Bioch et Biophysica Acta* 1780:973-982
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA et al (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294:1704-1707
- Brown KK, Heitmeyer SA, Hookfin EB, HSieh L, Buchalova M, Taiwo YO, et al (2008) p38 MAPK kinase inhibitors as potential therapeutics for the treatment of joint degeneration and pain associated with Osteoarthritis. *Journal of Inflammation* 5:22-27
- Cai D, Frantz JD, Tawa NE, Melendez PA, Lidov H, Hasselgren GW, et al (2004) IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B activation causes severe muscle wasting in mice. *Cell* 119:285-298
- Calura E, Cagnin S, Raffaello A, LAveder P, Lanfranchi G and Romualdi C (2008) Meta-analysis of expression signatures of muscle atrophy: gene interaction networks in early and late stages. *BMC Genomics* 9:630-650
- Caron AZ, Drouin G, Desrosiers J, Trens F, Grenier G (2009) A novel hindlimb immobilization procedure for studying skeletal muscle atrophy and recovery in mouse. *J Appl Physiol* 106:2049-59
- Cotran RS, Kumar V, Collins T (2005) Robbins: Pathologic Basis of Disease. W.B Saunders, Philadelphia
- Coutinho AL, Gomes A, Franca CN and Salvini TF (2004) A new model for the immobilization of rat hind limb. *Braz J Biol Res* 37:1473-1480
- Dogra C, Changotra H, Wedhas N, Qin Xuezhong, Wededal JE, Kumar A (2007) TNF-related weak inducer of apoptosis is a potent skeletal muscle-wasting cytokine. *FASEB J* 21:1857-1869

- Dubost JJ, Soubrier M, Sauvezie B (2000) Pyogenic arthritis in adults. *Joint Bone Spine* 67:11-21
- Glass DJ (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol* 37:1974-1984
- Glickman MH e Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for sake of construction. *Physiol Rev* 82:373-428
- Goldspink DF (1976) The effect of denervation on protein turnover of rat skeletal muscle. *Biochem J* 71-80
- Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL (2001) Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14440-14445
- Granado M, Priego T, Martín A, Villanúa MA, López-Calderon A (2005) Ghrelin receptor agonist GHRP-2 prevents arthritis-induced increase in E3 ubiquitin-ligating enzymes MuRF1 and MAFbx gene expression in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:1007–1014
- Guillot C, Steinberg JG, Delliaux S, Kipson N, Jammes Y, Badier M (2006) Physiological, histological and biochemical properties of rat skeletal muscles in response to hindlimb suspension. *J Electromyogr Kines* 2:276–283
- Gür H and Çakin N (2003) Muscle mass, isokinetic torque, and functional capacity in women with osteoarthritis of the knee. *Arch Phys Med Rehabil* 84:1534-1541
- Hill M, Goldspink G (2003) Expression and splicing of the insulin-like growth factor gene in rodent muscle is associated with muscle satellite (stem) cell activation following local tissue damage. *J Physiol* 549:409-418
- Hornberger TA, Hunter BR, Kandarian SC and Esser Karyn (2001) Regulation of translation factors during hindlimb unloading and Denervation of skeletal muscle in rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:179-187
- Hurley MV (1997) The effects of joint damage on muscle function, proprioception and rehabilitation. *Manual Therapy* 2:11-17
- Ishido M, Kami K, Masuhara M (2004) In vivo expression patterns of MyoD, p21 and RB proteins in myonuclei and satellite cells of denervated rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287:484-493

- Jokelainen K, Thomas P, Lindros K and Nanji A (1998) Acetaldehyde inhibits NF-kappaB activation through IkappaBalpha preservation in rat Kupffer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 30;253:834-836
- Jones SW, Hill R, Krasney P, O'Conner B, Greenhaft PL (2004) Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 18:1025-1027
- Kondo H, Miura M and Itokawa Y (1991) Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Acta Physiol Scand* 142:527-528
- Land CH, Frost RA, Nairn AC, McLean DA, Vary TC (2002) TNF- $\alpha$  impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:336-347
- Lang CH, Frost RA (2007) Sepsis-induced suppression of skeletal muscle translation initiation mediated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Metabolism Clinical and Experimental* 56:49-57
- Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg AL (1999) Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease state. *J Nutr* 129:227S-237S
- Li H, Malhotra S and Kumar A (2008) Nuclear factor-kappa B signaling in skeletal muscle atrophy. *J Mol Med* 86:113-1126
- Li YP, Chen Y, John J, Moylan J, Jin B, Reid M (2005) TNF-alpha acts via p38MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J* 19:362-370
- Lieber R (2002) Skeletal muscle adaptation to decreased use. In: *Skeletal muscle structural, function & plasticity*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Lindehammar H, Londvall B (2004) Muscle involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology* 43:1546-1554
- Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S and Mitchell D (2007) Cytokines profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *The Journal of Pain* 8;127-136
- Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N (2003) Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Meta* 285:363-371
- McKineell IW and Rudnicki MA (2004) Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell* 119:907-910

Mozdiak PE, Greaser ML, Schultz E (1999) Myogenin, MyoD and myosin heavy chain isoform following hindlimb suspension. *Avia Space Environ Med* 70:511-516

Nishikori T, Irie K, Suganuma T, Ozaki M, Yoshioka T (2002) Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 451:327-233

Oishi Y, Ogata T, Yamamoto K, Terada M, Ohira T, Ohira Y, et al (2008) Cellular adaptations in soleus muscle during recovery after hindlimb unloading. *Acta Physiol* 192:381–395

Omote K, Kawamata T, Nakayama Y, Yamamoto H, Kawamata M, Namiki A (2002) Effects of a Novel Selective Agonist for Prostaglandin Receptor Subtype EP4 on Hyperalgesia and Inflammation in Monoarthritic Model. *Anesthesiology* 97:170–176

Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA, Cordova ML, Porter DA, Edwards JE et al (2004) Arthrogenic muscle response to a simulated ankle joint effusion. *Br J Sports Med* 38:26-30

Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA (2004) The Hoffmann Reflex: Methodologic considerations and applications for use in sports medicine and athletic training research. *Journal of Athletic Training* 39:268-77

Pap G, Machner A, Awiszus F (2004) Strength and voluntary activation of the quadriceps femoris muscle at different severities of osteoarthritic knee joint damage. *J Orthop Res* 22:96-103

Peviani S, Silveira A, Carreira R, Moriscot A, Salvini T (2007) Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve* 35:363-370

Phillips T, Leeuwenburgh C (2005) Muscle fiber specific apoptosis and TNF-alpha signaling in sarcopenia are attenuated by life-long caloric restriction. *FASEB J* 19:668-70

Plomgaard P, Penkowa M, Pedersen BK (2005) Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles. *Exerc Immunol Rev* 11:53-63

Radhakrishnana R, Moorec SA, Slukaa KA (2003) Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain* 104:566-577

Russo T, Peviani S, Marques C, Gigo-Benato D, Salvini T (2007) Electrical stimulation based on Chronaxie reduces atrogin-1 and Myod gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve* 35:87-



- Russo TL, Peviani SM, Durling JL, Gigo-Benato, Delfino GB, Salvini TF (2010) Stretching and electrical stimulation reduce the accumulation of MyoD, myostatin and atrogin-1 in denervated rat skeletal muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 31:45-57
- Ryan AS, Ivey FM, Prior S, Li G, Hafer-Macko C (2011) Skeletal muscle hypertrophy and muscle myostatin reduction after resistive Training in Stroke Survivors. *Stroke* 42:416-420
- Sacheck JM, Hyatt JP, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton RV et al (2007) Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J* 21:140-155
- Sandoval MC, Ramírez C, Camargo DM, Salvini TF (2010) Effect of high-voltage pulsed current plus conventional treatment on acute ankle sprain. *Brazilian Journal of Physical Therapy* 14:193-200
- Serhan C, Ward P and Gilroy D (2010) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, Cambridge
- Sharma P, Maffulli N (2005) *Tendon Injury and Tendinopathy: Healing and Repair*. *J. Bone Joint Surg Am* 87:187-202
- Spiller MP; Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martin JK, Bass JJ, Sharma M (2002) The Myostatin gene is downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Molecular and Cellular Biology* 22:7066-82
- Stockmar C, Lill H, Trapp A, Josten C, Punkt K (2006) Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochem* 108:335-3342
- Suetta C, Aagaard P, Magnusson S, Andersen L, Sipilä S, Rosted A et al (2007) Muscle size, neuromuscular activation, and rapid force characteristics in elderly men and women: effects of unilateral long-term disuse due to hip-osteoarthritis. *J Appl Physiol* 102:942-948
- Takada Y, Miyahara T, Tanaka T, Ohyama T, and Nakamura Y (2000) Modulation of H Reflex of Pretibial Muscles and Reciprocal Ia Inhibition of Soleus Muscle During Voluntary Teeth Clenching in Humans. *J Neurophysiol* 83:63-2070
- Thomason DB, Biggs RB and Booth FW (1989) Protein metabolism and beta – myosin heavy mRNA in unweight soleus muscle. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 257:300-305

- Walters EH, Stickland NC, Loughna PT (2000) The expression of the myogenic regulatory factors in denervated and normal muscles of different phenotypes. *J Muscle Res Cell Motil* 21: 647-653
- Wang Y, Huang C, Cao Y, Han Y (2000) Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. *Life Sciences* 67;261-267
- Wheeler MT, Snyder EC, Patterson MN and Swoap SJ (1999) An E-box within the MHC IIB gene is bound by MyoD and is regulated for gene expression in fast muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 276:1069-1078
- Williams G, Barrance P, Snyder-Mackler L, Buchanan T (2004) Altered quadriceps control in people with anterior cruciate ligament deficiency. *Med Sci Sport Exerc* 36:1089-1096
- Wojcik S, Nogalska A, Engel WK, Askanas V (2008) Myostatin and its precursor protein are increased in the skeletal muscle of patients with Type-II muscle fibre atrophy. *Folia Morphol* 67;1-7
- Zhang P, Chen X, Fan M (2006) Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses* 69:310-321

**Figure**

[Click here to download high resolution image](#)

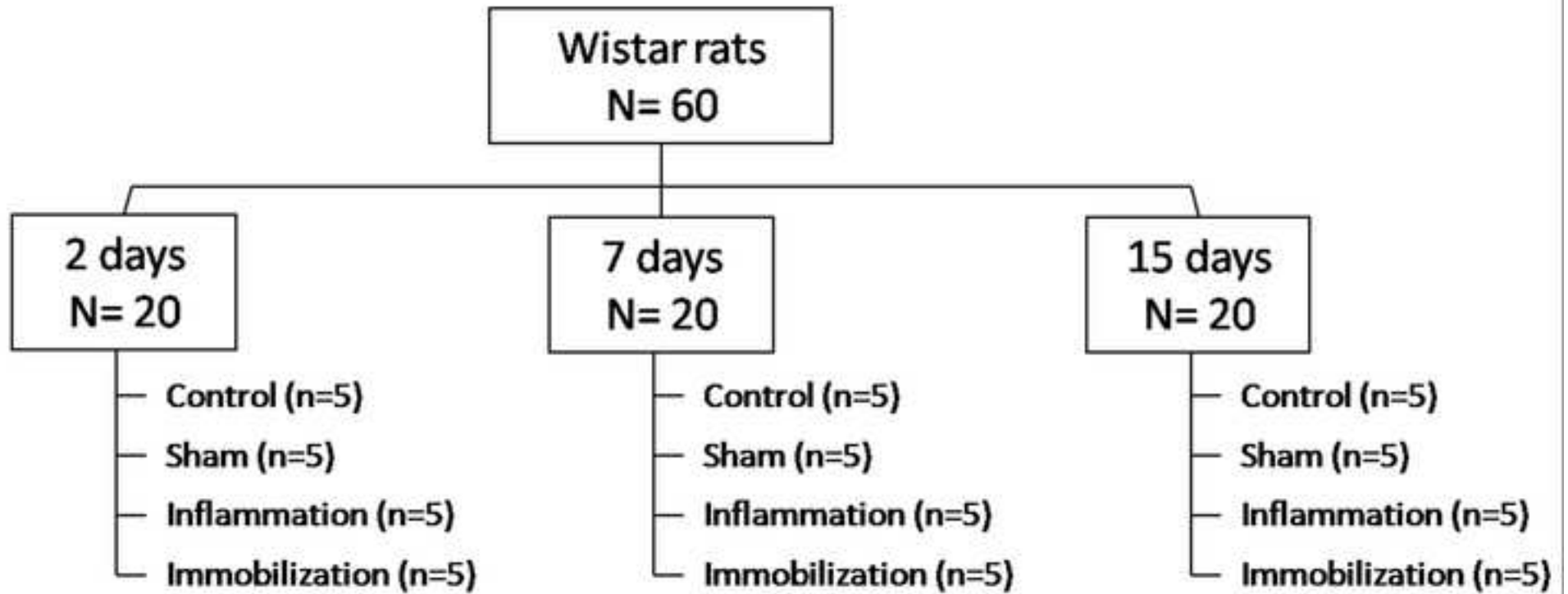
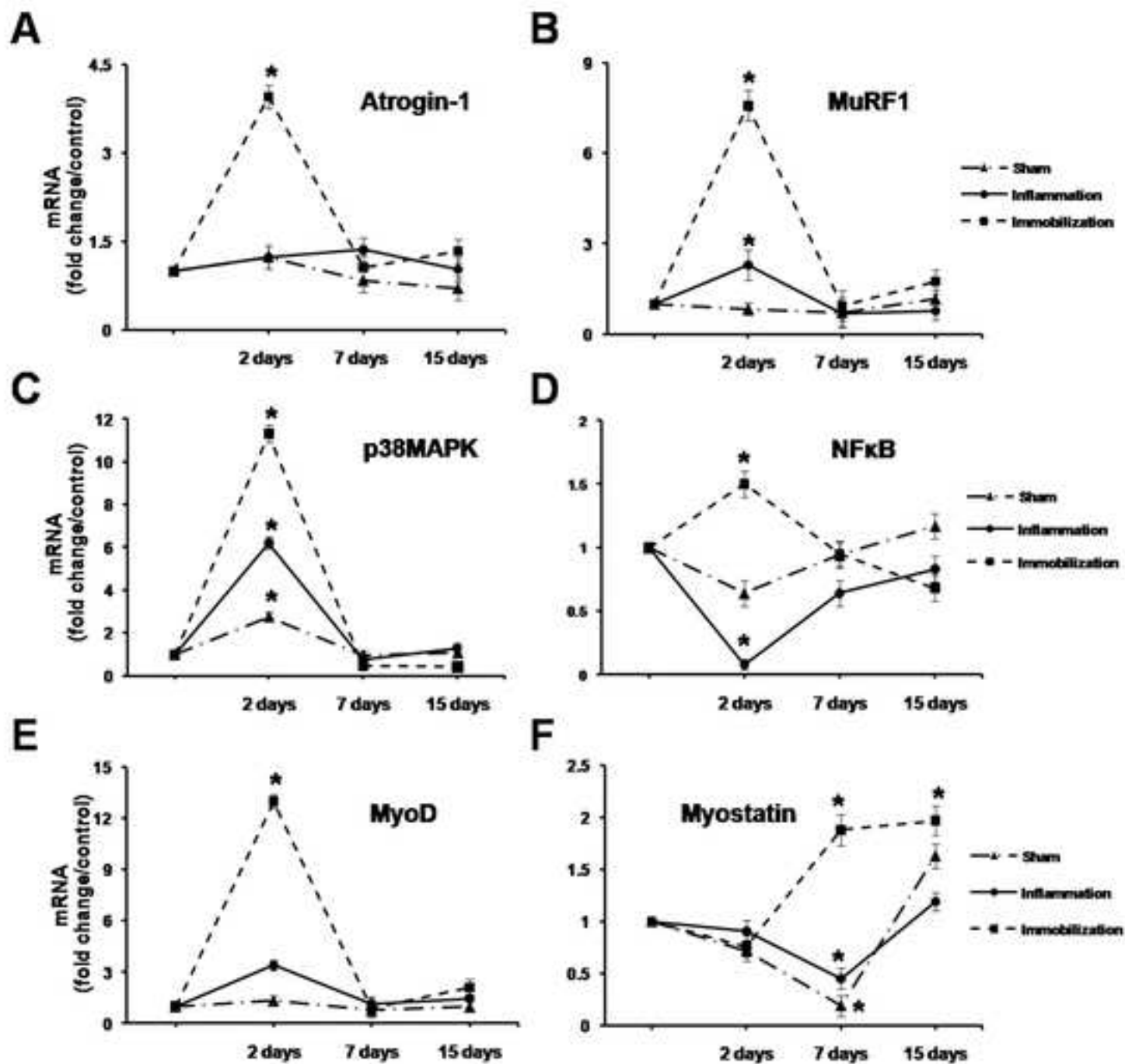


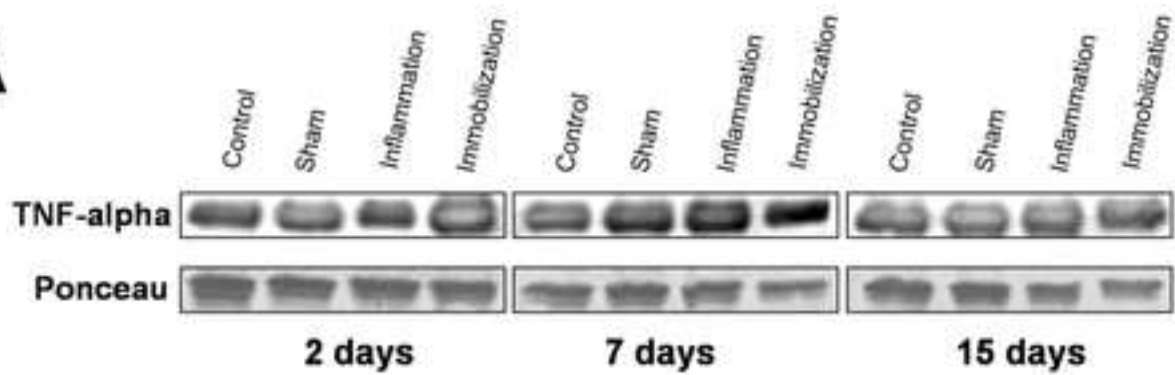
Figure  
[Click here to download high resolution image](#)



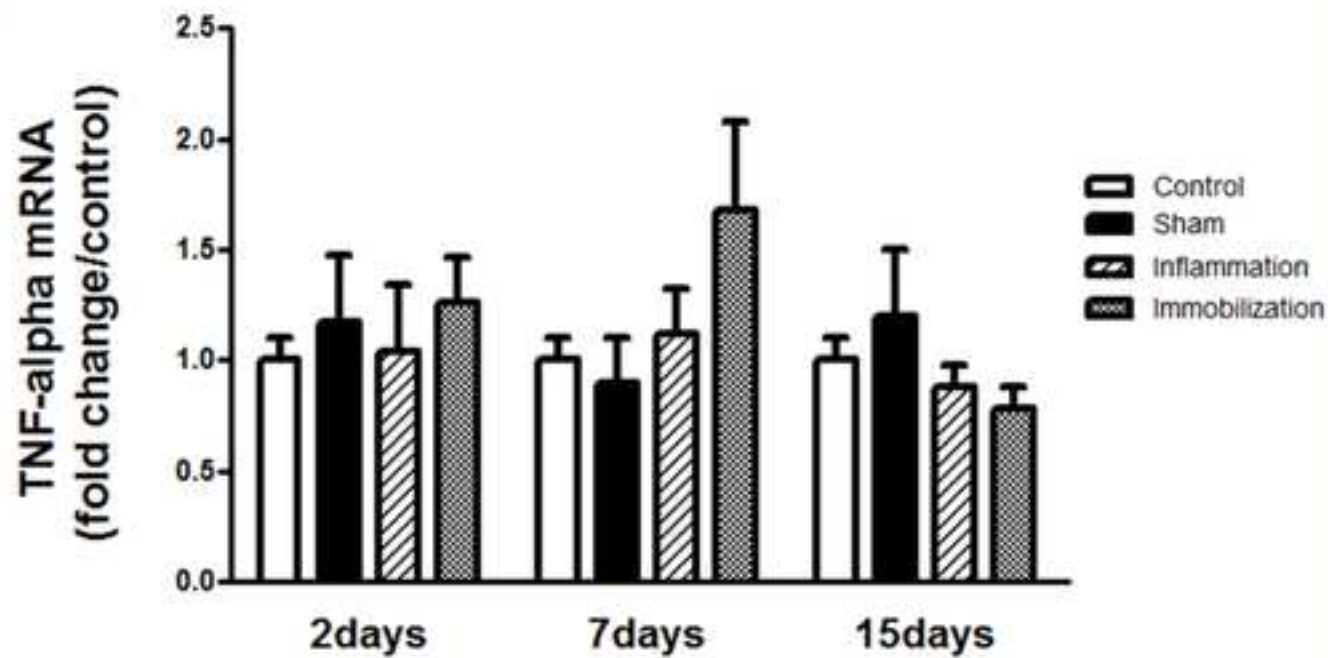
Figure

[Click here to download high resolution image](#)

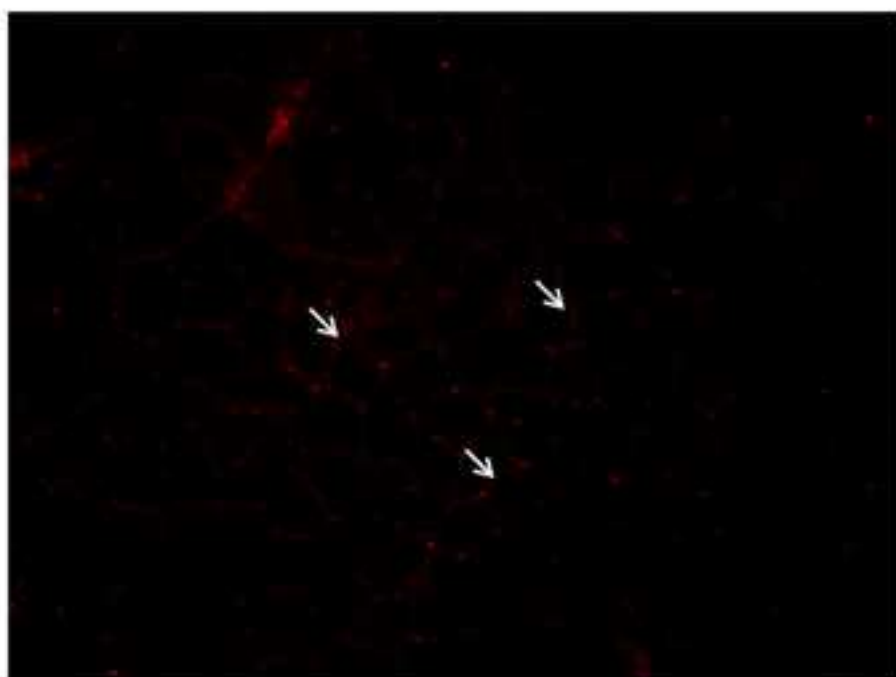
**A**



**B**



**C**



**Table**[Click here to download table: Table 1.doc](#)

<b>Group</b>	<b>2 days</b>	<b>7 days</b>	<b>15 days</b>
	<b>(n=20)</b>	<b>(n=20)</b>	<b>(n=20)</b>
<hr/>			
<i>Control</i>			
(n=5)	<b>1925 ± 94.5</b>	<b>2063 ± 140.3</b>	<b>1990 ± 350.2</b>
<i>Sham</i>			
(n=5)	<b>1878 ± 270.8</b>	<b>1863 ± 373.3</b>	<b>1652 ± 130.7</b>
<i>Inflammation</i>			
(n=5)	<b>1974 ± 320.3</b>	<b>904 ± 162.6*</b>	<b>1362 ± 250.5*</b>
<i>Immobilization</i>			
(n=5)	<b>1358 ± 110.1*</b>	<b>1087 ± 150.6*</b>	<b>1323 ± 280.1*</b>

**Table 1.** Muscle fibre cross-sectional area ( $\mu\text{m}^2$ ) in the soleus muscle at 2, 7 and 15 days. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  vs. control.