

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

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR AGUDA SOBRE A MORFOLOGIA  
E A EXPRESSÃO GÊNICA DOS MÚSCULOS SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR  
DE RATOS**

**LILIANA CAROLINA RAMIREZ RAMIREZ**

**SÃO CARLOS  
2008**

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

**EFEITO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR AGUDA SOBRE A MORFOLOGIA  
E A EXPRESSÃO GÊNICA DOS MÚSCULOS SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR  
DE RATOS**

**Liliana Carolina Ramírez Ramírez**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Fisioterapia da  
Universidade Federal de São Carlos,  
como parte dos requisitos para obtenção  
do Título de Mestre em Fisioterapia.  
Orientadora: Profa. Dra. Tania de  
Fátima Salvini.**

**SÃO CARLOS  
2008**

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

R173ei

Ramirez Ramirez, Liliana Carolina.

Efeito da inflamação articular aguda sobre a morfologia e a expressão gênica dos músculos sóleo e tibial anterior de ratos / Liliana Carolina Ramirez Ramirez. -- São Carlos : UFSCar, 2008.

43 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Inflamação. 2. Expressão gênica. 3. Músculo estriado esquelético. 4. Reabilitação. I. Título.

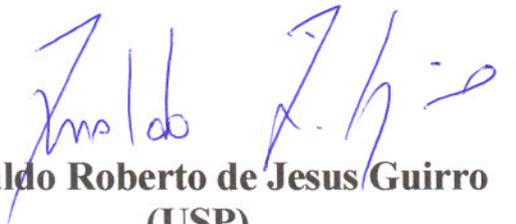
CDD: 615.82 (20ª)

**MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA PARA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado DE Liliana Carolina Ramirez Ramirez, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 15 DE DEZEMBRO DE 2008.**

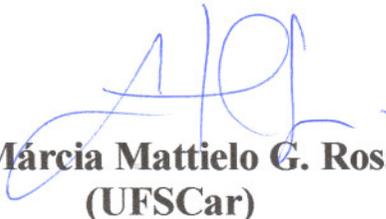
**BANCA EXAMINADORA:**



**Tânia de Fátima Salvini  
(UFSCar)**



**Rinaldo Roberto de Jesus Guirro  
(USP)**



**Stela Márcia Mattiello G. Rosa  
(UFSCar)**

Dedico este trabalho à minha família e a meus amigos,  
especialmente à minha mãe, por sua  
infinita dedicação e seu admirável exemplo  
de coragem e amor incondicional.

“Se eu vivesse de novo, gostaria que a minha vida  
fosse do mesmo jeito que até hoje tem sido.  
Somente abriria mais um pouco os meus olhos.”  
(Jules Renard)

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, eu agradeço a Deus, por sua constante presença na minha vida, por iluminar cada dia da minha existência com Seu infinito amor, por sempre pôr no meu caminho as pessoas certas e as circunstâncias perfeitas para que eu possa fazer realidade meus sonhos, e sobretudo por ter me dado a coragem suficiente para iniciar esta viagem de aprendizado profissional e pessoal no Brasil.

Eternamente grata aos meus Pais por seu amor, por terem me dado o melhor exemplo do mundo para a formação de meu caráter e personalidade.

À minha Mãe, por sua dedicação ao longo de toda minha vida mesmo à distância. Sem a inigualável dedicação da minha mãe, os caminhos percorridos por mim não teriam sido os que consegui andar. Obrigada MAMI!

A meus irmãos (Hermelinda, Güeña, Martín, Diego, Marisol), que desde minha infância deram-me carinho e estímulo que serviram-me depois para caminhar com confiança e atingir minhas metas. Especialmente um muito obrigada ao meu irmão Martín, que sempre tem sonhado os meus sonhos como se fossem os seus próprios e sempre tem torcido por mim.

Só Deus conhece o imenso agradecimento que guardo no meu coração pela Tania, por ter acreditado em mim mesmo sem me conhecer. Um muito obrigada por me oferecer a oportunidade de crescer tanto científica como pessoalmente ao longo destes dois anos. Obrigada pelos momentos de descontração que nos ofereceu no laboratório, por essas entradas rápidas procurando um cafezinho e aproveitando para compartilhar conosco a última notícia política do dia (eu adorava quando essas notícias eram sobre a Colômbia), o último evento cultural da cidade, e muitos outros momentos em que roubou de todos nós inúmeras risadas dentro e fora do laboratório. Obrigada Tania por transcender da simples orientação acadêmica, por dar-me esse exemplo profissional e pessoal, por abrir as portas de sua casa para todos nós, por pensar sempre além do que o nosso olhar pode

enxergar, por estar sempre preocupada pelo futuro de todos nós, e por sempre facilitar e nunca dificultar.

Sou muito grata também a meu tio Hernando, por ter me orientado com esse jeito de professor e pai quando precisei tomar decisões importantes na minha vida.

Agradeço a toda minha família (tios, primos, sobrinhos e a Teresa) por sua amizade e confiança.

Às minhas grandes amigas colombianas Aura e Mônica, Aminta e Ingry, por essas conversas descontraídas em algum café de Bucaramanga durante minhas visitas à Colômbia, que me deram a energia e alegria necessária para continuar com meus propósitos de formação profissional.

Meu muito obrigada a María Cristina, que acreditou em mim desde sempre (mesmo com todo o trabalho que eu dei nas aulas de medicina clínica), obrigada porque para mim está perfeitamente claro que seu apoio foi fundamental para o início de minha vida acadêmica. Obrigada pela companhia, a confiança, a solidariedade, a paciência e a amizade verdadeira.

Aos meus colegas de laboratório (Lúcia, Chris, Sabrina, João, Dório, Jamacy, Gabriel, Marcela, Tereza e Mariana) que me ajudaram sempre e também compartilharam comigo momentos de grande animação, dentro e fora de nosso laboratório.

À Esperanza, por seu apoio desde o começo deste caminho e pelos bons momentos que compartilhamos na Colômbia e no Brasil.

Imensamente grata a Paulinha, que me acolheu com muito carinho e simpatia desde o meu primeiro dia em São Carlos e no laboratório, obrigada pelos banhos de sol na frente do Departamento (rs), por me obrigar a ser simpática (embora não tenha tido um efeito duradouro), muito obrigada por me oferecer uma amizade transparente, cheia de muitas risadas, alegria e cumplicidade.

Ao Thiago, por ter tido a suficiente paciência para me ensinar as complexas técnicas de laboratório e sobretudo, por ter sido um grande amigo que me ensinou entre outras coisas a beleza da generosidade e a importância do trabalho em equipe.

Agradeço também aos meus amigos Catarina e Diogo, que me receberam desde o começo como antigos amigos, por terem compartilhado comigo as delícias da cozinha nordestina e terem feito das nossas aulas um motivo para a integração e a alegria.

Não posso deixar de agradecer aos meus amigos e conterrâneos Jesús e José, por todos os momentos que compartilhamos nossas “colombianadas” e as saudades da nossa terra.

Por fim, agradeço a todas e cada uma das pessoas que em todo este tempo cruzaram por meu caminho e deixaram em mim um aprendizado, a todos eles meu muito obrigada.

## RESUMO

Evidências clínicas indicam que afecções articulares acometem músculos relacionados à articulação tornando-os mais suscetíveis à atrofia e perda de força. Entretanto, as respostas moleculares dos músculos esqueléticos nessas condições não foram ainda estudadas. Objetivo: Avaliar o efeito da inflamação aguda da articulação tíbio-társica sobre a expressão de genes musculares relacionados à atrofia (atrogina-1 e MuRF-1), diferenciação e crescimento (MyoD), e regulação da massa (miostatina) nos músculos Sóleo e Tibial anterior (TA) do rato. Possíveis alterações na área de secção transversa (AST) das fibras musculares foram também identificadas. Métodos: Ratos Wistar foram distribuídos em três grupos (n=5/cada): 1) Controle, 2) Inflamação, 3) Sham. Uma solução de 0,03 ml de carragenina ou salina foi injetada na articulação tíbio-társica direita dos animais nos grupos Inflamação e Sham, respectivamente. Quarenta e oito horas após foram realizadas análises da AST em ambos os músculos sóleo e TA, análise da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real para todos os genes. Resultados: Não houve diferença na AST das fibras musculares entre os diferentes grupos experimentais, tanto para os músculos sóleo como os TA ( $p>0,05$ ). O TA do grupo Inflamação apresentou um aumento na expressão de atrogina-1, MuRF-1 e miostatina com diminuição de MyoD. No sóleo houve aumento na expressão de MuRF-1 e MyoD. O TA do grupo Sham apresentou aumento na expressão de atrogina-1 e miostatina, enquanto que o músculo sóleo apresentou diminuição na expressão de miostatina e aumento de MyoD. Conclusão: Tanto a inflamação como a efusão da articulação tíbio-társica regulam diferentemente a expressão de genes relacionados à atrofia, diferenciação e controle de massa muscular. Essa regulação é diferente entre músculos de contração lenta (sóleo) e rápida (TA).

**Palavras chaves:** Inflamação articular, efusão, expressão gênica, músculo esquelético, reabilitação.

## ABSTRACT

Clinic evidences show that joint injuries affect muscles related to that joint making them more sensitive to atrophy and loss of force. However, muscle molecular responses in those conditions has not been investigated yet. Objective: To evaluate the effects of tibiotarsal acute joint inflammation on the expression of genes related to muscle atrophy (atrogin-1 and MuRF-1), differentiation and growing (MyoD) and mass regulation (myostatin) in soleus and tibialis anterior (TA) rat muscles. Changes in muscular cross-sectional area (CSA) will also be identified. Methods: Fifteen Wistar rats were randomized and divided into three groups: 1) Control, 2) Inflammation, 3) Sham. A 0.03 ml of  $\tau$ -carragenan or saline solution was injected into right tibiotarsal joint, in both Inflammation and Sham groups, respectively. The muscle fiber CSA analysis was performed in soleus and TA muscles. Real time polymerase chain reaction (PCR) was used to investigate gene expression in soleus and TA muscles, after 48 h of inflammation or effusion joint induction. Results: No significant changes were observed either in muscle and animal weights or in muscle fiber CSA among the groups ( $p > 0.05$ ). The Inflammation group enhanced atrogin-1, MuRF-1 and myostatin gene expressions; however, it decreased MyoD expression in TA muscle. On the other hand, the soleus muscle increased MuRF-1 and MyoD expressions. The Sham group presented an increase of atrogin-1 and myostatin in the TA, while soleus muscle decreased myostatin and enhanced MyoD expression. Conclusion: Both the tibiotarsal acute joint inflammation and the effusion regulate the expression of the genes related to atrophy, differentiation and mass control in rat muscles differently. In addition, this regulation between fast (TA) and slow (soleus) twitch muscles is done differently.

**Key words:** Joint inflammation, effusion, gene expression, skeletal muscle, rehabilitation.

## SUMÁRIO

	<i>p</i>
<b>1. APRESENTAÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2. MANUSCRITO</b>	<b>20</b>
<b>ANEXO</b>	

## 1. APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta basicamente por um manuscrito, produto do projeto de mestrado desenvolvido no período compreendido de Março de 2007 à Outubro de 2008. Devido à natureza sucinta do manuscrito final, será apresentada uma breve revisão do tema desenvolvido no trabalho de mestrado, seguido pelo manuscrito na sua versão em português e, por fim, em anexo o artigo em inglês submetido ao periódico *Osteoarthritis and Cartilage*.

O laboratório de Plasticidade Muscular da UFSCar tem desenvolvido há vários anos, trabalhos sobre a adaptação do tecido muscular a diferentes tipos de estímulos, como alongamento e eletroestimulação, contribuindo significativamente com a literatura científica nesta área. Este projeto iniciou uma nova linha de investigação no laboratório, avaliando os efeitos da inflamação articular sobre o músculo esquelético (alterações morfológicas e da expressão gênica) visando fornecer subsídios para a reabilitação dessas condições, já que tradicionalmente, a intervenção fisioterápica em presença de inflamação articular é dirigida principalmente à articulação, enquanto que os músculos que se relacionam a articulação acometida não são usualmente objetos da intervenção.

Para avaliar esses efeitos elaboramos um projeto com o objetivo de avaliar o efeito da inflamação articular nos músculos relacionados à articulação acometida em diferentes períodos (48 horas, 7 dias, 15 dias). Esta dissertação apresenta os resultados do grupo avaliado 48 horas após indução da inflamação.

Com o propósito de contextualizar o leitor ao conteúdo do manuscrito final, a seguir são apresentados os tópicos que fundamentaram o desenvolvimento do projeto.

### **Resposta Muscular frente às modificações articulares**

O músculo esquelético é um dos tecidos mais adaptáveis do corpo humano e pode ser modificado em resposta às mudanças na carga, atividade ou condições patológicas. Por isso períodos prolongados de diminuição da carga, desnervação, imobilização ou microgravidade resultam em significativa atrofia muscular<sup>1-4</sup>.

Os resultados de diversos estudos clínicos permitem associar a presença de alterações da estrutura e fisiologia articular com modificações nas propriedades dos músculos funcionalmente relacionados à articulação. Estas modificações musculares parecem estar relacionadas ao tipo de afecção articular.

Diversos trabalhos mostraram que as 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 causador da perda de força<sup>5,6</sup>. Outras condições articulares, como meniscopatias e procedimentos como a artroscopia de joelho, mostraram diminuição na área de secção transversa (AST) do quadríceps, enquanto as lesões do LCA evidenciaram modificações no padrão de recrutamento do quadríceps em atividades estáticas e dinâmicas<sup>7,8</sup>.

Uma das possíveis explicações para a diminuição de força nessas afecções parece estar relacionada ao mecanismo de Inibição Muscular Artrogênica (IMA)<sup>10</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>10</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 efusão aguda não inflamatória, a excitabilidade dos motoneurônios é facilitada<sup>11,12</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.

Em presença de instabilidade crônica (> 6 meses) do joelho, secundária à ruptura do LCA, tem sido observadas no membro acometido mudanças estruturais e metabólicas no músculo vasto medial do quadríceps como atrofia e diminuição na atividade glicolítica, quando comparado ao membro contra-lateral não acometido<sup>9</sup>.

Considerando todas as informações da literatura científica sobre esse tema, há fortes evidências de que afecções articulares podem gerar alterações na estrutura e função dos músculos associados à articulação acometida.

Apesar dessas evidências, há ainda necessidade de estudos que confirmem essa hipótese. Por exemplo, os possíveis mecanismos moleculares envolvidos nessas alterações ainda não foram investigados.

## **Atrofia muscular por uso diminuído**

A diminuição no uso do membro acometido é clinicamente observada em indivíduos com lesão articular. Esta diminuição do uso da articulação gera inúmeras adaptações musculares que são bem descritas por modelos como imobilização, suspensão, desnervação e micro-gravidade<sup>1</sup>. Em todos os modelos de uso diminuído, a atrofia muscular é uma característica marcante e relevante.

A atrofia é um processo altamente ordenado e regulado, caracterizado de modo geral por diminuição na área de secção transversa 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>1,4,13</sup>. Segundo estudos que utilizaram modelos de suspensão e imobilização em ratos, a atrofia muscular tem sido atribuída à diminuição na síntese e aumento na degradação de mioproteínas<sup>14,15</sup>.

## **Vias de sinalização envolvidas na atrofia muscular**

Bodine et al., (2001) demonstraram que diferentes fatores que levam a degradação de mioproteínas, como a imobilização, suspensão e desnervação, apresentam um programa de proteólise comum chamado via ubiquitina-proteossoma, considerada a via mais importante na quebra de proteínas musculares<sup>16</sup>.

A via ubiquitina-proteossoma 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>17</sup>.

Dois genes são considerados como os principais representantes das E3s: *Muscle Atrophy Fbox* (atrogina-1) e o *Muscle Ring Finger-1* (MuRF-1)<sup>17,18,19</sup>. Diversos trabalhos têm demonstrado que essas duas ligases de ubiquitina aumentam significativamente em presença de atrofia muscular. Os níveis de RNAm para atrogina-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. MuRF-1 é supra-regulado nas primeiras 24 horas após desnervação, sugerindo seu papel no início do processo atrofico<sup>19</sup>.

Estudos recentes do nosso laboratório que avaliaram a expressão gênica de atrogina-1 28 dias após desnervação (Russo et al., 2007) do músculo tibial anterior, e 48 horas após alongamento passivo do músculo sóleo de rato (Peviani et al., 2007), confirmaram a relação entre a atrogina-1 e a atrofia muscular.

Tem sido observado também, que atrogina-1 e MuRF-1 são expressos em presença de doenças sistêmicas relacionadas à caquexia<sup>18</sup>; confirmando a hipótese da existência de um programa comum final para mediar a atrofia, sem importar o origem ou a natureza dela.

### **Factores Regulatórios Miogénicos (MRF's)**

Os MRF's são uma superfamília de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (bHLH) capazes de promover a proliferação e diferenciação do músculo esquelético durante a miogênese, bem como seus processos adaptativos no músculo adulto, sendo a MyoD um dos principais representantes desta família<sup>22</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>23</sup>. Nestes casos a MyoD é uma das molécula responsáveis pela diferenciação miogénica, como por exemplo pela ativação de células satélites. A expressão gênica de MyoD apresenta uma relação direta com a via ubiquitina-proteossoma e também com as citosinas inflamatórias<sup>23</sup>.

### ***Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* (TNF $\alpha$ ) e sua relação com a via ubiquitina-proteossoma e os MRF's**

O TNF $\alpha$  é uma citosina 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>24</sup>. Segundo estudos em humanos e em animais, a concentração elevada de TNF $\alpha$  sanguíneo possui um efeito catabólico<sup>25</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>25,26</sup>. Estudos demonstram que 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 $\alpha$  em músculo de ratos causa degradação de mioproteínas e inibição da diferenciação muscular, indicando um possível papel das citocinas inflamatórias na atrofia muscular.<sup>25</sup> No entanto, não existem evidências

que apontem o papel do TNF $\alpha$  na atrofia muscular por uso diminuído como na suspensão ou na imobilização.

O estímulo pró-inflamatório gerado pelo TNF $\alpha$ , ativaria a via clássica *Nuclear Factor kappa  $\beta$*  (NFk $\beta$ ), e especificamente o p65 (membro da família NFk $\beta$ )<sup>3</sup>. A ativação da via NFk $\beta$  é necessária na perda de proteína muscular associada a caquexia, característico 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>26</sup>.

Foi também observado que o aumento no TNF $\alpha$  eleva a expressão da atrogina-1 em ratos tratados com injeção peritoneal da citocina inflamatória, este aumento foi relacionado à ativação de outra via de sinalização da atrofia muscular, a p38 *Mitogen-activated Protein Kinase*. A elevação do TNF $\alpha$  foi relacionada também com inibição da diferenciação muscular, devido a aumento na proteólise da MyoD pelo proteossoma, o qual foi conseqüente à ativação da via NFk $\beta$ <sup>23</sup>.

### **Miostatina**

A miostatina, previamente conhecida como fator de diferenciação e crescimento 8 (GDF-8), é um membro da superfamília do Fator Transformante do Crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) conhecida como regulador negativo do crescimento do músculo esquelético<sup>27</sup>. Ela inibe a proliferação de mioblastos, sem causar aparente diferenciação e aumento de apoptose. 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 a miostatina inibe a atividade de MyoD, reprimindo a miogênese<sup>28</sup>.

### **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>29</sup>.

Além disso, as carrageninas vem sendo utilizadas como ferramenta experimental validada para a investigação do processo inflamatório agudo e a hiperalgesia em ratos<sup>30</sup>. A inflamação induzida pela carragenina é um processo complexo envolvendo um grande número de mediadores, dentre eles a histamina, a IL-6 e o TNF $\alpha$ <sup>31</sup>.

## **Bibliografia**

1. Lieber R. Skeletal muscle structural, function, & plasticity. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002, 2<sup>nd</sup> edition.
2. Bruton A. Muscle Plasticity: Response to training and detraining. *Physiotherapy*. 2002;88:398-408.
3. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Medical Hypotheses*. 2006;11:1-12.
4. Ferreira R, Nueparth MJ, Magalhaes A, Vitorino R, Amado F. Skeletal muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first week of hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol*. 2006;97:340-6.
5. 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.
6. 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.
7. Akima H, Furukawa T. Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial menisectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2005;13:632-7.
8. Williams G, Barrantes P, Snyder-Mackler L, Buchanan T. Altered quadriceps control in people with anterior cruciate ligament deficiency. *Medicine & Science in sport & Exercise*. 2004;1089-96.
9. Stockmar C, Lill H, Trapp A, Josten C, Punkt K. Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochemica*. 2006;108:335-42.
10. 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.

11. Hopkins J, Palmieri R. Effects of ankle joint effusion on lower leg function. *Clin J Spor Med.* 2004;14:1-7.
12. 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.
13. 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.
14. Siu PM, Pistillo EE, Always SE. Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289:1015-26.
15. 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.
16. 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.
17. Glickman M and Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: Destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002;82:373-423.
18. Sacheck 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.
19. 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.
20. Russo T, Peviani S, Marques C, Gigo-Benato D, Salvini T. Electrical stimulation based on Chronaxie reduces atrogen-1 and MyoD gene expressions in denervated rat muscle. *Muscle Nerve.* 2007;35;87-97.
21. Peviani S, Silveira A, Carreira R, Moriscot A, Salvini T. Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve.* 2007;35:363-70.
22. Saborin LA and Rudnick MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet.* 2000;57:16-25.

23. 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.
24. Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res.* 2001;2:269-72.
25. 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.
26. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2005;37:1974-84.
27. 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.
28. Guttridge DC. Signalling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2004;7:43-450.
29. Ferreira FR. Estudo comparativo de carragenanas comerciais Kappa, Iota e lamda no processo inflamatório em ratos. Natal, 2005. Dissertacao (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
30. Radhakrishnana R, Moorec SA, Slukaa KA. Unilateral carrageenan injection into muscle or joint induces chronic bilateral hyperalgesia in rats. *Pain.* 2003;104:566-577.
31. Nishikori T, Irie K, Suganuma T, Ozaki M, Yoshioka T. Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *European Journal of Pharmacology.* 2002; 451:327-33.

## 2. MANUSCRITO

### EFEITO DA INFLAMAÇÃO ARTICULAR AGUDA SOBRE A MORFOLOGIA E A EXPRESSÃO GÊNICA DOS MÚSCULOS SÓLEO E TIBIAL ANTERIOR DE RATOS

**Autores:**

Carolina Ramírez Ramírez, MS,<sup>1</sup> Thiago Luiz Russo, PhD<sup>1</sup>, María Cristina Sandoval, MS, PhD,<sup>1,2</sup> Adriana Abbade Dentillo,<sup>1</sup> Tania Fátima Salvini, MS, PhD<sup>1</sup>.

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

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

**Correspondência para:** Tania F. Salvini. Departamento de Fisioterapia. Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP: 13565-905, Monjolinho, São Carlos, São Paulo, Brasil. Fone: +55 16 33518345. Fax: +55 16 33612081. e-mail: [taniasalvini@ufscar.br](mailto:taniasalvini@ufscar.br).

**Título Curto:** Inflamação articular e expressão gênica muscular.

## Resumo

Evidências clínicas indicam que afecções articulares acometem músculos relacionados à articulação tornando-os mais suscetíveis à atrofia e perda de força. Entretanto, as respostas moleculares dos músculos esqueléticos nessas condições não foram ainda estudadas.

**Objetivo:** Avaliar o efeito da inflamação aguda da articulação tíbio-társica sobre a expressão de genes musculares relacionados à atrofia (atrogina-1 e MuRF-1), diferenciação e crescimento (MyoD), e regulação da massa (miostatina) nos músculos Sóleo e Tibial anterior (TA) do rato. As alterações na área de secção transversa (AST) das fibras musculares foram também identificadas. **Métodos:** Ratos Wistar foram distribuídos em três grupos (n=5/cada): 1) Controle, 2) Inflamação, 3) Sham. Uma solução de 0,03 ml de  $\tau$ -carragenina ou salina foi injetada na articulação tíbio-társica direita dos animais nos grupos Inflamação e Sham, respectivamente. Quarenta e oito horas após foram realizadas análises da AST em ambos os músculos sóleo e TA, análise da reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real para todos os genes. **Resultados:** Não houve diferença na AST das fibras musculares entre os diferentes grupos experimentais, tanto para os músculos sóleo como os TA ( $p>0,05$ ). O TA do grupo Inflamação apresentou um aumento na expressão de atrogina-1, MuRF-1 e miostatina, com diminuição de MyoD. No sóleo houve aumento na expressão de MuRF-1 e MyoD. O TA do grupo Sham apresentou aumento na expressão de atrogina-1 e miostatina, enquanto que o músculo sóleo apresentou diminuição na expressão de miostatina e aumento de MyoD. **Conclusão:** Tanto a inflamação como a efusão da articulação tíbio-társica regulam diferentemente a expressão de genes relacionados à atrofia, diferenciação e controle de massa muscular. Essa regulação é diferente entre músculos de contração lenta (sóleo) e rápida (TA).

**Palavras chaves:** Inflamação articular, efusão, expressão gênica, músculo esquelético, reabilitação.

## INTRODUÇÃO

Segundo estudos clínicos, há alterações morfológicas e funcionais nos músculos relacionados à articulação acometida<sup>1-8</sup>. Dentre as condições articulares estudadas encontram-se doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide e a osteoartrite<sup>1-5</sup>, lesões ligamentosas e meniscais<sup>6,7</sup>, bem como procedimentos cirúrgicos, como por exemplo, as artroscopias exploratórias<sup>8</sup>.

As adaptações musculares decorrentes destas condições podem envolver alterações no padrão de ativação das unidades motoras, inibição ou facilitação do Reflexo H<sup>9-11</sup>, modificações proprioceptivas, cinestésicas e funcionais<sup>6-9</sup>, bem como a diminuição da força e atrofia muscular<sup>7,8</sup>.

A atrofia é um processo altamente ordenado e regulado, caracterizado por diminuição na área de seção transversa (AST) da fibra muscular e no conteúdo de proteína do músculo, redução na força, aumento da fadiga e da resistência à insulina, além da transformação de fibras Tipo I em II<sup>13-16</sup>. A diminuição na AST tem sido atribuída à diminuição na síntese e aumento na degradação de mioproteínas<sup>17-20</sup>.

Estudos que usaram diferentes modelos de atrofia (imobilização, desnervação, suspensão e restrição alimentar) evidenciaram aumento na expressão de genes considerados essenciais no processo de atrofia muscular, como atrogina-1 ou *Muscle Atrophy Fbox* (MAFbx)<sup>21,22</sup> e o *Muscle Ring Finger-1* ou MuRF-1<sup>22,23</sup>. Estes genes são expressos também em doenças sistêmicas relacionadas à caquexia indicando a existência de um programa comum final de degradação protéica, que regula a atrofia no músculo esquelético, independentemente de sua etiologia<sup>24,25</sup>. Este programa de proteólise no músculo esquelético esta associado à via ubiquitina-proteossoma<sup>16,17</sup>. A ubiquitina é uma proteína presente em todas as células eucariotes e tem um importante papel na marcação de proteínas que serão degradadas. A adição da ubiquitina em um substrato específico de proteína é considerado um processo altamente modulado que precisa a participação de três enzimas (E1, E2, E3), sendo que as E3, cujos representantes são atrogina-1 e MuRF-1, possuem uma característica fundamental que é reconhecer o substrato que será degradado, ligando-o à ubiquitina. Deste modo, as E3 dão especificidade ao processo de reconhecimento da proteína que será degradada pelo proteossoma<sup>16,21,26</sup>.

Já foi bem descrito que os níveis de RNAm tanto de atrogina-1 como MuRF-1 aumentam significativamente em presença de atrofia<sup>21-25</sup>. Os níveis de RNAm para atrogina-1 aumentam rapidamente, antes mesmo que a diminuição no peso muscular seja detectada e mantêm-se elevado quando a proteólise é acelerada, sugerindo assim que este gene seja

importante na iniciação e manutenção da proteólise em diversas doenças<sup>24</sup>. Assim, a expressão de atrogina-1 e MuRF-1 pode ser considerada como marcador precoce do processo atrófico no tecido muscular.

A indução de inflamação articular pela  $\iota$ -carragenina eleva os níveis sanguíneos de citocinas inflamatórias como, por exemplo, o TNF $\alpha$ <sup>27</sup>. Esta citocina, produzida por monócitos, macrófagos e outros tipos de células incluindo linfócitos B, T e células musculares, tem sido apontada como um fator chave na ativação de vias de atrofia, como a ubiquitina-proteossoma, no tecido muscular<sup>15,16,28</sup>. Níveis elevados de TNF $\alpha$  são acompanhados de um aumento na expressão de atrogina-1 e MuRF-1, através das vias *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK) e *Nuclear Factor kappa  $\beta$*  (NFk $\beta$ ), respectivamente<sup>15,16,28</sup>.

Além disso, outros fatores também estão envolvidos nos processos de regulação muscular. MyoD é um dos principais representantes dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs), uma superfamília de fatores de transcrição hélice-alça-hélice – bHLH, guarda uma relação direta com a via ubiquitina-proteossoma e com as citosinas inflamatórias. MyoD promove a proliferação e diferenciação do músculo esquelético durante a miogênese e participa também nos processos adaptativos no músculo adulto<sup>29,30,31</sup>. Tintignac et al., (2005), observaram que o aumento da expressão gênica de atrogina-1 promove a degradação de MyoD, regulando assim o curso da diferenciação muscular ao determinar a quantidade de MyoD<sup>31</sup>.

A miostatina também é um regulador negativo da hipertrofia e inibe a proliferação de mioblastos, sem causar aparente aumento de apoptose<sup>32</sup>. A miostatina continua a ser expressa no músculo adulto em resposta a diferentes estímulos, sendo que em presença de estímulos atróficos, como a imobilização, tem sido observado aumento na expressão deste gene<sup>33</sup>. Estudos recentes mostraram que o aumento na expressão de miostatina é acompanhado pela diminuição da expressão de MyoD<sup>34</sup>.

Evidências clínicas indicam que afecções articulares tornam os músculos relacionados à articulação acometida mais suscetíveis à atrofia e perda de força<sup>1-8</sup>. Entretanto, as respostas moleculares e as adaptações morfológicas desses músculos não foram ainda estudadas. O estudo deste tema tem relevância clínica e poderá fornecer subsídios para a intervenção terapêutica nos músculos esqueléticos associados à articulação acometida. Entender os mecanismos de adaptação molecular desses músculos pode contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento que possam contemplar também os músculos esqueléticos.

A hipótese deste estudo foi que a inflamação articular acarreta em atrofia e alterações moleculares nos músculos de contração lenta e rápida relacionados a essa articulação

acometida. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da inflamação aguda da articulação tíbio-társica do rato sobre a expressão de genes relacionados à atrofia (atrofina-1 e MuRF-1), diferenciação e crescimento (MyoD), e regulação massa (miostatina) nos músculos Sóleo (contração lenta) e Tibial anterior (TA) (contração rápida), bem como avaliar as possíveis alterações na AST das fibras musculares.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Quinze ratos Wistar ( $310 \pm 12$  g), 3 meses de idade, foram mantidos em condições ambientais controladas em de biotério próprio, recebendo água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e o estudo foi desenvolvido segundo recomendações do *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (National Research Council, 1996). Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=5): grupo Controle, grupo Sham e grupo 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 ao 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>35</sup> e Omote *et al*<sup>36</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.

Após 48 horas, foram retirados ambos os músculos Sóleo e TA direitos e esquerdos com os animais vivos e anestesiados. Depois da retirada, cada músculo foi pesado e dividido ao meio com um corte transversal no seu ventre, sendo a porção distal para a análise morfológica e a porção proximal usada para a expressão gênica.

Posteriormente, as porções distais de cada músculo foram pré-congeladas em isopentano em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer à  $-86^{\circ}\text{C}$ . As porções proximais foram congeladas em nitrogênio líquido e também armazenadas até o seu processamento. Os músculos da pata esquerda foram usados para a análise comparativa tanto da AST quanto do peso. Após a retirada dos músculos, os animais foram eutanasiados com overdose de anestesia.

## **Análise Morfológica**

De todos os músculos foram obtidos cortes histológicos transversais e seriados (10  $\mu\text{m}$ ), em micrótomo criostato (Microm 505 HE), mantido à temperatura de  $-25^{\circ}\text{C}$ . Os cortes histológicos foram corados com azul de toluidina 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. OS músculos da pata esquerda foram usados para a análise comparativa tanto da AST quanto do peso muscular.

## **Isolamento do RNA total**

Todos os músculos foram macerados em cadinho usando nitrogênio líquido. 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 7,8. A densidade óptica das amostras foi determinada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Para avaliar a qualidade do RNA isolado foi determinada a razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (razão  $\geq 1.8$ ). Para verificar a integridade do RNA ribossômico 18 e 28S as amostras foram avaliadas por eletroforese (2 $\mu\text{g}$  de RNA total) em gel denaturante de agarose-formamida (1%), em tampão MOPS (40mM de ácido morfolinopropanosulfônico).

## **RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*)**

Após o isolamento do RNA, realizou-se as transcrições reversas (RT) para converter 1 $\mu\text{g}$  RNA em cDNA. A reação de RT foi realizada em um termociclador da seguinte forma: 1 $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{l}$  de primer oligo (dT) (Invitrogen, Carlsbad, CA) e 200U 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.

## **Real Time-PCR**

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>37,38</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.

### **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*). O primer para o MuRF-1 foi descrito por Granado *et al.*<sup>39</sup> e MyoD foi descrita por Hill & Goldspink<sup>40</sup>. Os pares de primers usados para a amplificação dos produtos dos genes foram: GAPDH senso: GATGCTGGTGCTGAGTATGTCG, antisenso: GTGGTG-CAGGATGCATTGCTGA; atrogina-1 senso: TACTAAGGAGCGCCATGGATACT, antisenso GTTGAATCTTCTGGATCCAGGAT; MuRF1 senso: TGTCTGGAGGTC-GTTTCCG, antisenso: ATGCCGGTCCATGATCACTT; miostatina senso CTACCA-CGGAAACAATCATTACCA, antisenso AGCAACATTTGGGCTTTCCAT; MyoD senso: GGAGACATCCTCAAGCGATGC, antisenso AGCACCTGGTAAATCGGATTG.

### **Análise Estatística**

Inicialmente foram aplicados os testes Shapiro Wilk's e Levene para avaliar a normalidade e homogeneidade dos dados, respectivamente. Os dados paramétricos, foram submetidos à análise de variância ANOVA *one-way*, para determinar a diferença entre os grupos; quando detectada alguma diferença, foi realizado o Teste de *Tukey* para identificar a fonte das diferenças. Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste *Kruskal-Wallis*, seguido pelo teste de *Newman Keulls*. O teste *t-Student* pareado foi usado para avaliar a AST dos músculos das patas esquerdas e direitas. O nível de significância mínima estabelecida foi

de 5%. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico STATISTICS 5.5.

## RESULTADOS

### Peso dos músculos e AST das fibras

Não houve diferenças no peso e na AST das fibras musculares nos músculos sóleo e TA entre as patas acometidas e não acometida, nem entre os diferentes grupos experimentais ( $p > 0,05$ ). (Tabelas 1 e 2).

**TABELA 1.** Peso dos músculos TA e sóleo dos diferentes grupos experimentais.

Peso (mg)	Grupo Controle N = 5	Grupo Sham N = 5	Grupo Inflamação N = 5
<i>Tibial Anterior</i>			
<i>Direito</i>	0,49 ± 0,09	0,61 ± 0,06	0,54 ± 0,05
<i>Esquerdo</i>	0,49 ± 0,12	0,61 ± 0,09	0,53 ± 0,05
<i>Sóleo</i>			
<i>Direito</i>	0,15 ± 0,023	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,013
<i>Esquerdo</i>	0,16 ± 0,027	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,014

Resultados são média ± desvio padrão.

**TABELA 2.** Análise da área de seção transversa (AST) das fibras musculares do TA e sóleo.

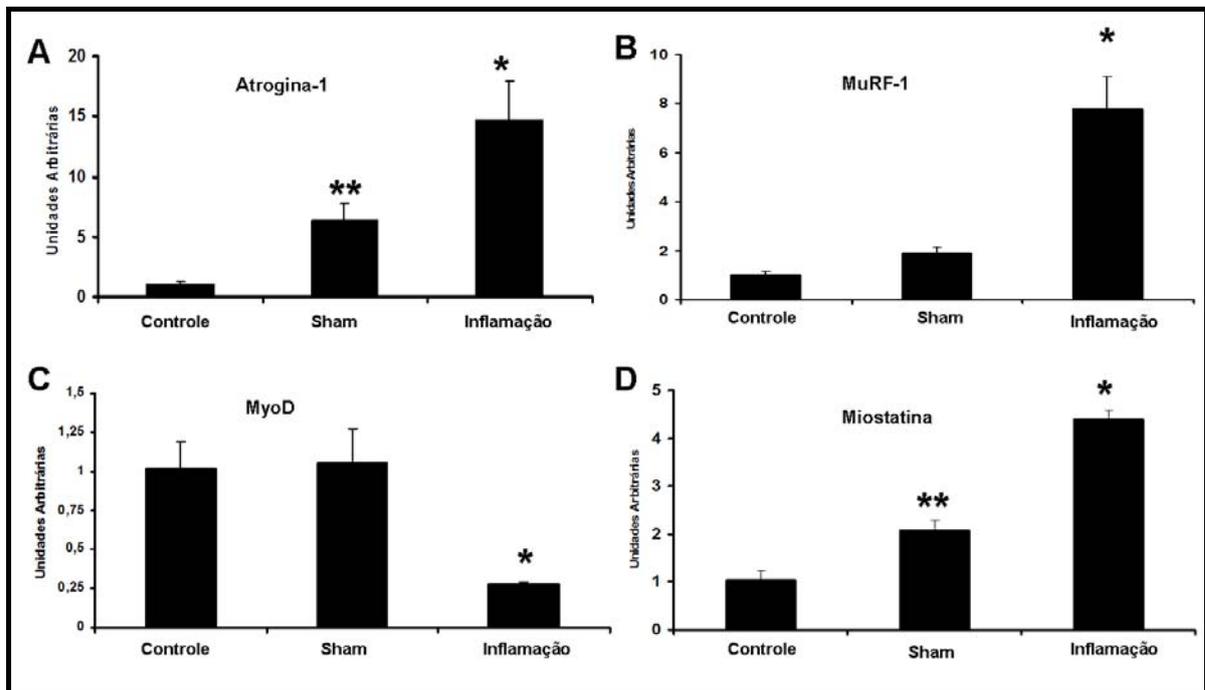
AST ( $\mu\text{m}^2$ )	Grupo Controle N = 5	Grupo Sham N = 5	Grupo Inflamação N = 5
<i>Tibial Anterior</i>			
<i>Direito</i>	733,56 ± 137,38	676,32 ± 143,69	768,51 ± 238,48
<i>Esquerdo</i>	749,18 ± 128,37	625,02 ± 162,93	815,03 ± 114,37
<i>Sóleo</i>			
<i>Direito</i>	830,32 ± 43,69	804,34 ± 187,69	754,29 ± 161,19
<i>Esquerdo</i>	899,32 ± 142,62	792,53 ± 40,53	862,94 ± 73,99

Resultados são média ± desvio padrão.

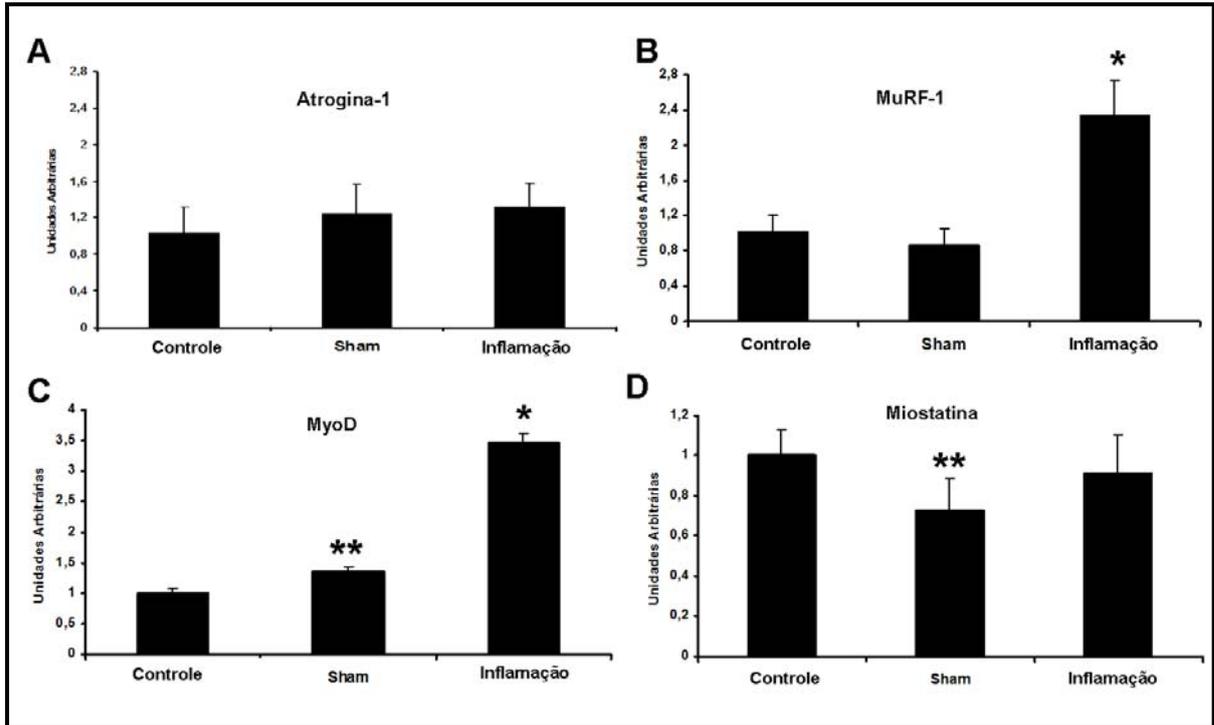
## Expressão gênica

No grupo Inflamação o TA, teve um aumento da expressão de atrogina-1, MuRF-1 e miostatina ( $p < 0,05$ ) e uma redução na expressão de MyoD ( $p < 0,05$ ) (Fig 1). O músculo sóleo apresentou aumento na expressão de MuRF-1 e MyoD comparado aos Controle e Sham ( $p < 0,05$ ; Fig 2).

No grupo Sham, o TA apresentou aumento na expressão de atrogina-1 e miostatina, quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ; Fig 1). No sóleo houve aumento na expressão de MyoD ( $p = 0,01$ ) e diminuição na expressão de miostatina ( $p = 0,0008$ ), comparados ao Controle (Fig 2).



**FIGURA 1.** Expressão gênica de Atrogina-1 (A), MuRF1 (B), MyoD (C) e (D) Miostatina no TA. Valores apresentados em médias  $\pm$  DP. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo Sham e Controle, \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo Controle.



**FIGURA 2.** Expressão gênica de Atrogina-1 (A), MuRF-1 (B), MyoD (C) e Miostatina (D) no músculo Sóleo. Valores apresentados em médias  $\pm$  DP. \*  $p < 0,05$  comparada aos grupos Controle e Sham, \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo Controle.

A seguir a Tabela 3 resume os resultados da expressão gênica de ambos os músculos nos diferentes grupos experimentais.

**TABELA 3.** Mudanças percentuais significativas na expressão gênica nos grupos Inflamação e Sham, comparados ao Controle.

Músculo	Grupo Sham	Grupo Inflamação
<b>Tibial Anterior</b>	Atrogina-1 (+519%)	Atrogina-1 (+1334%)
	Miostatina (+103%)	MuRF-1 (+672%)
		Miostatina (+330%) MyoD (-73%)
<b>Sóleo</b>	MyoD (+34,5%)	MuRF-1 (+128,5%)
	Miostatina (-38%)	MyoD (+245,6%)

## DISCUSSÃO

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a reportar aumento da expressão de genes relacionados à atrofia muscular após indução de inflamação aguda e efusão articular em ratos. Um aspecto muito interessante do estudo, foi a diferente regulação gênica em músculos de contração lenta e rápida, relacionados à articulação acometida. Os resultados do presente estudo mostraram que a inflamação da articulação tíbio-társica aumenta a expressão gênica de atrogina-1 no músculo TA, mas não no músculo sóleo, embora ambos estejam funcionalmente associados a essa articulação.

A expressão de diversos genes no tecido muscular parece estar relacionado ao tipo de fibras que os constituem<sup>41-44</sup>. Deste modo, o presente trabalho optou por avaliar dois músculos com diferentes constituições. O músculo TA de rato é formado majoritariamente por fibras glicolíticas de contração rápida, com miosina de cadeia pesada (MHC) do tipo II<sup>13,44</sup>. Já o músculo sóleo é constituído prioritariamente por fibras oxidativas de contração lenta com MHC do tipo I<sup>13</sup>.

O aumento na expressão de atrogina-1 está bem descrito em modelos de desuso, como a desnervação e a suspensão onde observa-se atrofia muscular principalmente em fibras oxidativas de contração lenta<sup>13,16,24,41,42</sup>. Os resultados obtidos em nosso trabalho indicam que em presença de inflamação articular aguda, a atrofia muscular segue um padrão parecido com aquele que ocorre em doenças sistêmicas, na qual há o maior acometimento das fibras glicolíticas de contração rápida, diferente do padrão observado em modelos de desuso, onde as fibras oxidativas são mais acometidas. Segundo estudo prévio<sup>24</sup>, a atrofia preferencial das fibras de contração rápida ocorre, devido ao maior tamanho dessas fibras, que as estariam mais susceptíveis aos efeitos catabólicos dos hormônios adrenais circulantes presentes na atrofia muscular devida a afecções sistêmicas.

A expressão elevada de MuRF-1 nos músculos TA e sóleo do grupo Inflamação, sugere que a expressão deste gene nessa condição é independente do tipo de fibra, embora a porcentagem de aumento tenha sido bem maior no TA (672%) comparada ao sóleo (125%).

Modelos de desnervação e imobilização têm mostrado que os níveis de RNAm de MuRF-1 são elevados nas primeiras 24 horas, sugerindo sua importância no início do processo atrofico, independente do modelo de atrofia utilizado<sup>15,16</sup>. Esta E3 marca proteínas musculares para serem degradadas pelo proteossoma, incluindo a troponina I, a conectina/titina e a myotilina<sup>45,46</sup>.

O aumento na expressão da atrogina-1 e MuRF-1 no grupo inflamação pode ser também explicado através da via do TNF $\alpha$ . A injeção de  $\tau$ -carragenina causa um processo inflamatório complexo, que envolve um grande número de mediadores, dentre eles o TNF $\alpha$ , uma citocina inflamatória que promove a quebra de proteína muscular<sup>47,48,49</sup>. Os níveis séricos de TNF $\alpha$  encontra-se bastante aumentados após injeção de  $\tau$ -carragenina na pata de ratos<sup>27</sup>. A ação catabólica do TNF $\alpha$  explica-se em parte, pela ativação da família de fatores de transcrição NFk $\beta$ , sendo que o principal mediador da atrofia muscular desta via é o p65. O p65 encontra-se inativo no citoplasma da célula e quando ativado é translocado até o núcleo, ligando-se em sítios específicos do DNA e regulando a expressão de MuRF-1<sup>16</sup>. Estudos recentes indicam que aumentos na expressão de NFk $\beta$  são acompanhados pela regulação positiva da expressão do MuRF-1, induzindo a degradação de mioproteínas<sup>43</sup>.

Uma outra via que também pode ser regulada pelo TNF $\alpha$  é a da família de MAPK, em que o p38 destaca-se como o potencial regulador do metabolismo muscular. Células musculares diferenciadas estimuladas por TNF $\alpha$  apresentaram aumento na expressão de p38 que é acompanhado pelo aumento da expressão de atrogina-1. Foi observado também que inibidores farmacológicos de p38 são capazes de bloquear essa expressão de atrogina-1<sup>28</sup>.

Em nosso estudo, o aumento na expressão da atrogina-1 (17 vezes) e o MuRF-1 (14 vezes) no TA do grupo Inflamação, não foi suficiente para produzir perda de peso nem diminuição na AST das fibras musculares. Sacheck et al., (2007), estudaram dois modelos de desuso e registraram o pico de expressão de atrogina-1 e MuRF-1 no 3º dia. Eles observaram correlação desse pico de expressão gênica de atrogina-1 e MuRF-1 em 50 e 20 vezes respectivamente, com a perda acentuada de peso no músculo gastrocnêmio<sup>24</sup>. A comparação desse estudo com o nosso, sugere que a magnitude do aumento na expressão possa ser um fator chave na redução do peso muscular e na AST das fibras musculares.

Tintignac et al., (2005) identificaram a existência de uma interação *in vivo* entre MyoD e atrogina-1. Nesta interação a atrogina-1 funciona como ubiquinizadora de MyoD, levando a sua degradação pelo proteossoma. Os resultados desse estudo mostraram que o aumento na expressão de atrogina-1 resultou em degradação elevada de MyoD, diminuindo sua vida média em aproximadamente 30 min. Assim, os autores sugeriram que níveis elevados de atrogina-1 são incompatíveis com a expressão de MyoD, inibindo a formação de novas miofibrilas<sup>31</sup>. Os resultados de nosso estudo são similares aos de Tintignac et al., (2005), uma vez que no TA do grupo inflamação houve aumento de atrogina-1 e diminuição de MyoD. Por outro lado, no músculo sóleo houve aumento de MyoD, sem alteração na expressão de atrogina-1.

Outro possível mecanismo responsável pela diminuição na expressão de MyoD no TA do grupo inflamação observada em nosso estudo, pode estar também relacionada com o TNF $\alpha$ . Langen et al., (2004) demonstraram que o TNF $\alpha$  inibe a diferenciação miogênica, diminui a vida média de MyoD e aumenta a sua degradação pela via ubiquitina-proteossoma. Estes autores observaram em miócitos diferenciados, uma notável redução de MyoD em presença de TNF $\alpha$ <sup>30</sup>. A diferença na expressão de MyoD no músculo sóleo e TA do grupo inflamação observada em nosso trabalho, permite sugerir que o efeito catabólico do TNF $\alpha$  é mais intenso nos músculos de contração rápida, e que desta forma a inflamação articular produziria um padrão de expressão de genes relacionados à atrofia, similar com aquele observado em doenças sistêmicas<sup>24</sup>.

Por outro lado, a expressão elevada de MyoD no sóleo do grupo inflamação poderia estar relacionada com uma possível mudança de fibras tipo I em tipo II, conforme tem sido relatado durante o processo de atrofia de músculos lentos<sup>13,44</sup>.

Uma proteína chave nessa mudança de fenótipo da fibra muscular é a MHC do tipo IIB, a qual é expressa em fibras de contração rápidas. A MCH IIB possui duas regiões E-box que funcionam como motivos de união para alguns membros da família dos MRFs, dentre eles MyoD<sup>44</sup>. Wheeler et al., (1999), utilizando um modelo de suspensão da pata traseira identificaram aumento na expressão de MyoD e da MHC IIB no 1º e 4º dia, respectivamente, no músculo sóleo de rato. Esta relação temporal entre MyoD e MCH IIB, sugere que MyoD é requerido para a expressão de MCH IIB no sóleo, o qual seria necessário para a mudança da fibra muscular de lenta em rápida<sup>44</sup>. Desta forma o aumento na expressão de MyoD no músculo sóleo do grupo inflamação, identificada no presente estudo, sugere que na ausência de atrogina-1, MyoD pode ser expresso no sóleo. Além disso, nas primeiras 48 horas pode ter iniciado a ativação de sinalização relacionadas às mudanças das fibras do tipo I para II, indicando o início do processo de atrofia.

Os níveis elevados de RNAm de miostatina registrados no TA do grupo inflamação mas não no sóleo do presente estudo coincidem com resultados prévios que reportaram uma correlação positiva entre a porcentagem de MHC IIB e a expressão de miostatina<sup>41</sup>. Há relatos que miostatina é expresso preferencialmente em fibras rápidas, pois quantidades elevadas de MHC IIB e de miostatina foram encontradas nos músculos gastrocnêmio e plantar do rato, mas não no músculo sóleo<sup>41</sup>.

Além disso, os nossos resultados sugerem a relação entre a expressão de miostatina e MyoD. Tem sido observado que em presença de estímulos atrofícos, como a imobilização em ratos, o aumento na expressão de Miostatina acompanha uma diminuição na expressão de

MyoD, gerando incapacidade dos mioblastos para sair do ciclo celular afetando a diferenciação miogênica<sup>50,51,52</sup>. Desta forma, a marcada diminuição na expressão de MyoD no TA do grupo inflamação em nosso estudo, deve estar também relacionada ao aumento (~330%) na expressão de miostatina.

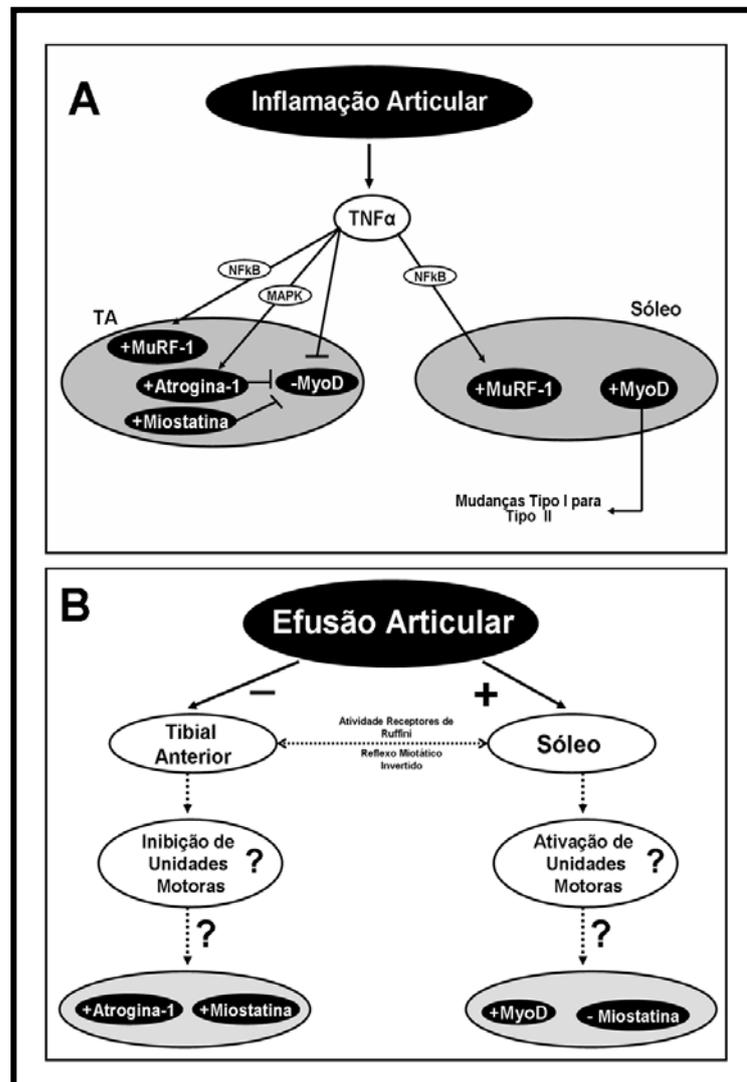
Uma possível diminuição na atividade contrátil, produto de uma diminuição do uso da pata inflamada por dor, pode também ter contribuído para a alteração na expressão gênica observada no presente estudo, pois o uso diminuído também estimula a expressão de genes relacionados à atrofia. No entanto, o fato de ter sido o músculo TA quem mostrou maior expressão de genes relacionados à atrofia, sugere o fator determinante dessa expressão não foi o uso diminuído, já que nesse caso o sóleo seria o principal músculo acometido. Porém, estudos futuros que investiguem o efeito do desuso (imobilização) associados à inflamação articular, são necessários para esclarecer os mecanismos regulatórios envolvidos.

Estudos prévios relatam que a injeção de solução salina não gera resposta inflamatória em ratos<sup>53</sup>. Assim, as mudanças na expressão gênica observadas em ambos os músculos sóleo e TA do grupo Sham, podem ser conseqüentes de uma Resposta Muscular Atrogênica (RMA) devida à efusão articular. A RMA é gerada por aumento da tensão na cápsula articular que pode aumentar ou diminuir a excitabilidade dos motoneurônios alfa (MN $\alpha$ ) nos músculos funcionalmente relacionados à articulação acometida, embora sem lesão articular relacionada<sup>9-11</sup>. A inibição da excitabilidade das MN $\alpha$  em presença de efusão articular, pode ser devida ao aumento na atividade das de Ruffini de adaptação lenta localizados na cápsula articular. Esta atividade aumentada estimula interneurônios inibitórios Ib, os quais inibem os motoneurônios alfa do músculo<sup>9,10,54</sup>. O aumento na excitabilidade das MN $\alpha$  pode ser observada no grupo muscular antagonista.<sup>54,55</sup> Esse aumento/diminuição da excitabilidade das MN pode ser avaliado através do Reflexo H<sup>55</sup>.

A RMA tem sido também associada a mudanças eletromiográficas (EMG). Em presença de efusão articular no joelho em humanos, o músculo quadríceps registrou diminuição no Reflexo H e na atividade EMG, enquanto que os isquiotibiais tiveram aumento destas duas variáveis<sup>56</sup>. O aumento e diminuição na atividade EMG reflete por sua vez, um maior número de unidades motoras ativadas.<sup>57,58,59</sup> Diante disso, a análise dos resultados do presente estudo indicam que a efusão articular da articulação tíbio-társica causou inibição das unidades motoras do TA e aumento no músculo sóleo. Essa hipótese justificaria o aumento na expressão de MyoD com diminuição de miostatina observada no sóleo, bem como a maior expressão de genes relacionados à atrofia (atrogina-1 e miostatina) no TA.

Os nossos resultados indicam que a efusão articular regula a expressão de genes relacionados à atrofia e diferenciação e proliferação muscular. No entanto, estudos futuros devem investigar esta hipótese. Além disso, pode ser considerado que os resultados encontrados no grupo Sham são principalmente relacionados à distensão capsular, pois o modelo de efusão articular permite a estimulação mecânica da articulação com ausência de dor<sup>60</sup>.

Em resumo, o possível mecanismo regulatório envolvido na adaptação do músculo em presença de inflamação ou efusão articular é apresentada na Figura 3.



**FIGURA 3.** Possíveis modelos da expressão gênica nos músculo TA e sóleo na inflamação (A) e na efusão (B) da articulação tibio-társica.

Basicamente, está bem descrito que a inflamação articular gerada pela injeção de  $\tau$ -carragenina eleva os níveis plasmáticos de TNF $\alpha$ <sup>27</sup>. Considerado os resultados do presente estudo, é possível que no grupo Inflamação o TNF $\alpha$  através das vias NFKB e MAPK possa

estar associado com o aumento na expressão de MuRF-1 e Atrogina-1, respectivamente, bem como com a diminuição na expressão de MyoD (Fig. 3A). A elevada expressão de miostatina somada à supra-regulação de atrogina-1, pode ter contribuído também com a redução de MyoD. De outro lado, os resultados observados no músculo sóleo sugerem que o TNF $\alpha$  agiria “preferencialmente” sobre a expressão do MuRF-1. A expressão elevada de MyoD no músculo sóleo poderia estar relacionada com mudanças no fenótipo muscular (de tipo I para tipo II), como reportado em modelos de atrofia de fibras de contração lenta (Fig. 3A). Adicionalmente, no grupo Sham (Fig. 3B), a efusão articular induzida pela injeção de solução salina pode ter inibido as unidades motoras do TA através da ativação das terminações de adaptação lenta de Ruffini, localizadas na cápsula articular<sup>54,55</sup>. Esta inibição aumentaria a expressão de atrogina-1 e miostatina no TA (Fig. 3B). Além disso, através do reflexo miotático invertido, o músculo sóleo (antagonista do TA) poderia ter facilitadas as unidades motoras, reduzindo desta forma a expressão de miostatina e elevando a expressão de MyoD (Fig. 3B).

Em conclusão, a inflamação aguda da articulação túbio-tarsica regula diferentemente a expressão de genes relacionados à atrofia (atrogina-1 e MuRF-1), diferenciação e crescimento (MyoD), e controle de massa (miostatina) em músculos de contração lenta (sóleo) e rápida (TA) relacionados funcionalmente a essa articulação. A efusão articular por si só também modificou a expressão desses genes de modo diferenciado nos dois músculos examinados.

Os resultados deste estudo têm relevância clínica e indicam que seria importante intervir para amenizar os efeitos deletérios que a inflamação e a efusão articular causam nos músculos funcionalmente relacionados à articulação acometida.

### **Agradecimentos:**

Este projeto foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, proc. 2007/07475-3). C Ramirez foi bolsista de mestrado pelo CNPq (PEC-PG) TL Russo foi bolsista de doutorado pela FAPESP. Os autores são gratos a Teresa F. F. Piassi pela assessoria técnica prestada.

## BIBLIOGRAFIA

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. *Manual Therapy.* 1997;2:11-7.
3. Lindehammar H, Londvall B. Muscle involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology.* 2004;43:1546-54.
4. Pap G, Machner A, Awiszus F. Strength and voluntary activation of the quadriceps femoris muscle at different severities of osteoarthritic knee joint damage. *Journal of Orthopaedic Research.* 2004;22:96-103.
5. 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;102:942-8.
6. 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;36:1089-96.
7. Stockmar C, Lill H, Trapp A, Josten C, Punkt K. Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochemica.* 2006;108:335-42.
8. Akima H, Furukawa T. Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial menisectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2005;13:632-7.
9. 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.
10. 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.
11. Hopkins J, Palmieri R. Effects of ankle joint effusion on lower leg function. *Clin J Spor Med.* 2004;14:1-7.

12. 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.
13. Lieber R. Skeletal muscle structural, function, & plasticity. Second edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
14. Stevenson EJ, Giresi PG, Koncarevic A, Kandarian SC. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat muscle skeletal. *J. Physiol*. 2003;551:33-48.
15. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005;37:1974-84.
16. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Medical Hypotheses*. 2006;69:310-21.
17. McKineell IW e Rudnicki MA. Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell*. 2004;119:907-10.
18. Ferreira R, Nueparth MJ, Magalhaes A, Vitorino R, Amado F. Skeletal muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first week of hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol*. 2006;97:340-6.
19. 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;2:276–83.
20. Eley HL, Tisdale MJ. Skeletal atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282:7087-97.
21. Jones SW, Hill R, Krasney P, O'Conner B, Greenhaft PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J*. 2004;18:1025-7.
22. 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; 98:14440-5.
23. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001;294:1704-07.
24. 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 J*. 2007;21:140-55.

25. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg 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.
26. Glickman MH e Ciechanover A. The ubiquitin-preteasome proteolytic pathway: destruction for sake of construction. *Physiological Reviews.* 2002;82:373-428.
27. Nishikori T, Irie K, Suganuma T, Ozaki M, Yoshioka T. Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *European Journal of Pharmacology.* 2002; 451:327-33.
28. 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;19:362-70.
29. Saborin LA and Rudnick MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet.* 2000;57:16-25.
30. 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;18:27-237.
31. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *The Journal of the Biological Chemistry.* 2005;280:2847-56.
32. Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J and Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem.* 2000;275:40235-43.
33. Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV et al. Myostatin, a transforming growth factor- $\beta$  superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol.* 1999;180:1-9.
34. Guttridge DC. Signalling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2004;7:443-50.
35. Wang Y, Huang C, Cao Y, Han Y. Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. *Life Sciences.* 2000;67:261-67.
36. Omote K, Kawamata T, Nakayama Y, Yamamoto H, Kawamata M, Namiki A. Effects of a Novel Selective Agonist for Prostaglandin Receptor Subtype EP4 on Hyperalgesia and Inflammation in Monoarthritic Model. *Anesthesiology.* 2002;97:170-76.

37. Peviani S, Silveira A, Carreira R, Moriscot A, Salvini T. Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogin-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve*. 2007;35:363-70.
38. Russo T, Peviani S, Marques C, Gigo-Benato D, Salvini T. Electrical stimulation based on Chronaxie reduces atrogin-1 and Myod gene expressions in Denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2007;35:87-97.
39. Granado M, Priego T, Martín A, Villanúa MA, López-Calderon A. 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*. 2005;289:1007–14
40. Hill M, Goldspink G. 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*. 2003;549:409-18.
41. Carlson CJ, Booth FW and Gordon SE. Skeletal muscle myostatin RNAm expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 1999;277:601-6.
42. Huey KA, Roy R, Baldwin KM and Edgerton RV. Temporal effects of inactivity on myosin heavy chain gene expression in rat slow muscle. *Muscle Nerve*. 2001;24:517-26.
43. 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;119:285-98.
44. Wheeler MT, Snyder EC, Patterson MN and Swoap SJ. 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*. 1999;276:1069-78.
45. Koyama S, Hata S, Witt C, Ono Y, Lerche S, Doi N et al. Muscle RING-Finger protein-1 as a conector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *J. Mol. Biol*. 2008;376:1224-36.
46. Witt S, Granzier H, Witt C e Labeit S. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: Towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J. Mol. Biol*. 2005;350:713-22.
47. Reid MB, Li Y-P. Cytokines and oxidative signaling in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2001;171:225-32.

48. Rall LC and Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanism and interventions. *Rheumatology*. 2004;43:1219-23.
49. 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.
50. Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2004;20:61-86.
51. Dominique JE and Gérard C. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental Cell Research*. 2006;321:2401-14.
52. 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.
53. Saricaoglu F, Dal D, Atilla P, İskit AB, Tarhan O, Asan E et al. Effect of intraarticular injection of lornoxicam on the articular cartilage & synovium in rat. *Indian J Med Res*. 2008;127:362-5.
54. Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA. The Hoffmann Reflex: Methodologic considerations and applications for use in sports medicine and athletic training research. *Journal of Athletic Training*. 2004;39:268-77.
55. Takada Y, Miyahara T, Tanaka T, Ohyama T, and Nakamura Y. Modulation of H Reflex of Pretibial Muscles and Reciprocal Ia Inhibition of Soleus Muscle During Voluntary Teeth Clenching in Humans. *J Neurophysiol*, 2000;83:63-2070.
56. Torry MR, Decker MJ, Viola RW, O'Connor DD and Steadman JR. Intra-articular knee joint effusion induces quadriceps avoidance gait patterns. *Clin Biomech*. 2000;15:147-59.
57. Suetta C, Aagaard P, Magnusson SP, Andersen LL, Sipilä S, Rosted A, Jakobsen AK, Duus B, and Kjaer M. 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;102:942-8.
58. Häkkinen K, Kallinen M, Izquierdo M, Jokelainen K, Lassila H, Mälkiä E, Kraemer WJ, Newton RU and Alen M. Changes in agonist-antagonist EMG, muscle CSA, and force during strength training in middle-aged and older people. *J Appl Physiol*. 1998;84:1341-9.
59. Häkkinen K, Pakarinen A, Kraemer J, Häkkinen A, Valkeinen H and Alen M. *J Appl Physiol*. 2001;91;569-80

60. Hopkins JT, Ingersoll CD, Edwards J and Klootwyk TE. Cryotherapy and transcutaneous electric neuromuscular stimulation decrease arthrogenic muscle inhibition of the vastus medialis after knee joint effusion. *Journal of Athletic Training*. 2001;37;25-31.

**ANEXO**

Editorial Manager(tm) for Osteoarthritis and Cartilage  
Manuscript Draft

Manuscript Number: OAC4862

Title: EFFECTS OF ACUTE JOINT INFLAMMATION ON MORPHOLOGY AND GENE  
EXPRESSION OF RAT SKELETAL MUSCLE

Article Type: Manuscript

Keywords: Joint inflammation; effusion; gene expression; skeletal muscle; rehabilitation.

Corresponding Author: PhD Tania Salvini, PhD.

Corresponding Author's Institution: Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil.

First Author: Carolina Ramirez

Order of Authors: Carolina Ramirez; Thiago Russo, PhD.; Maria Cristina Sandoval , PhD.; Adriana Abbade; Tania Salvini, PhD.

Abstract: Joint injuries affect muscles functionally related to the joint making them more sensitive to atrophy. Muscle molecular responses in these conditions have not been investigated yet. Objective: To evaluate the effects of tibiotarsal acute inflammation on the muscle fiber cross-sectional area (CSA) as well as on the atrogen-1, MuRF-1, MyoD and, myostatin gene expressions in the soleus and the tibialis anterior (TA) muscles of rat. Methods: Fifteen Wistar rats were divided into three groups: 1) Control, 2) Inflammation and, 3) Sham. A 0.03 ml of  $\tau$ -carragenan or saline solution was injected into right tibiotarsal joint in Inflammation and Sham groups, respectively. The muscle fiber CSA analysis and the real time polymerase chain reaction (PCR) were performed in the soleus and the TA muscles after 48 h of joint inflammation or effusion induction. Results: There were no differences in weight and in muscle fiber CSA of both right/left muscles nor within any groups ( $p > 0.05$ ). The Inflammation group enhanced atrogen-1, MuRF-1 and myostatin gene expressions and decreased MyoD expression in the TA muscle. Inflammation increased MuRF-1 and MyoD expressions in the soleus muscle. The Sham group presented an increase of atrogen-1 and

myostatin in the TA, while soleus muscle decreased myostatin and enhanced MyoD expressions. Conclusion: Gene expression in both tibiotarsal acute joint inflammation or effusion had different regulation of atrogen-1, MuRF-1, MyoD and, myostatin in rat muscles. Gene expression was also different in fast-twitch (TA) from slow-twitch (soleus) muscles.

## EFFECTS OF ACUTE JOINT INFLAMMATION ON MORPHOLOGY AND GENE EXPRESSION OF RAT SKELETAL MUSCLE.

### Authors:

Carolina Ramírez, MS,<sup>1</sup> Thiago Luiz Russo, PhD<sup>1</sup>, María Cristina Sandoval, MS, PhD,<sup>1,2</sup> Adriana Abbade,<sup>1</sup> Tania Fátima Salvini, MS, PhD<sup>1</sup>.

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

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

**Corresponding authors:** Tania de Fatima Salvini. Federal University of São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235, CEP: 13565-905, São Carlos, São Paulo, Brazil  
Phone: (0055-16) 33518345 / FAX: (0055-16) 33512081. E-mail: [tania@ufscar.br](mailto:tania@ufscar.br)

### ABSTRACT

Joint injuries affect muscles functionally related to the joint making them more sensitive to atrophy. Muscle molecular responses in these conditions have not been investigated yet. Objective: To evaluate the effects of tibiotarsal acute inflammation on the muscle fiber cross-sectional area (CSA) as well as on the atrogen-1, MuRF-1, MyoD and, myostatin gene expressions in the soleus and the tibialis anterior (TA) muscles of rat. Methods: Fifteen Wistar rats were divided into three groups: 1) Control, 2) Inflammation and, 3) Sham. A 0.03 ml of  $\tau$ -carragenan or saline solution was injected into right tibiotarsal joint in Inflammation and Sham groups, respectively. The muscle

fiber CSA analysis and the real time polymerase chain reaction (PCR) were performed in the soleus and the TA muscles after 48 h of joint inflammation or effusion induction. Results: There were no differences in weight and in muscle fiber CSA of both right/left muscles nor within any groups ( $p>0.05$ ). The Inflammation group enhanced atrogen-1, MuRF-1 and myostatin gene expressions and decreased MyoD expression in the TA muscle. Inflammation increased MuRF-1 and MyoD expressions in the soleus muscle. The Sham group presented an increase of atrogen-1 and myostatin in the TA, while soleus muscle decreased myostatin and enhanced MyoD expressions. Conclusion: Gene expression in both tibiotarsal acute joint inflammation or effusion had different regulation of atrogen-1, MuRF-1, MyoD and, myostatin in rat muscles. Gene expression was also different in fast-twitch (TA) from slow-twitch (soleus) muscles.

**Key words:** Joint inflammation, effusion, gene expression, skeletal muscle, rehabilitation.

**Running title:** Joint inflammation and gene expression.

## INTRODUCTION

According to clinical studies, there are morphological and functional alterations in muscles related to injured joint<sup>1-8</sup>. Many joint diseases are studied, such as arthritis rheumatoid, osteoarthritis,<sup>1-5</sup> ligament and meniscal injuries<sup>6,7</sup>, as well as exploratory arthroscopy<sup>8</sup>.

The muscular adaptations due those conditions can involve modifications in the motor units activation pattern, H-reflex inhibition or facilitation<sup>9-11</sup>, proprioceptives and functional disturbances<sup>6-9</sup>, force reduction and, muscle atrophy<sup>7,8</sup>.

Atrophy is a highly ordered and regulated process resulting in muscle fiber cross-sectional area (CSA) decrease and reduction of muscle protein content. Other characteristics are decrease of muscle force-generation, increase of both fatigue and insulin resistance and, transformation of fibers Type I into Type II<sup>13-16</sup>. Atrophy has also been associated with reduction in protein synthesis and increase in muscle protein degradation<sup>17-20</sup>.

Early studies using atrophy models (i.e., immobilization, denervation, hindlimb suspension and fasted) established an increase in mRNA expression for genes related to muscle atrophy, like atrogen-1 also called Muscle Atrophy Fbox (MAFbx)<sup>21,22</sup> and Muscle Ring Finger-1 (MuRF-1)<sup>22,23</sup>. These genes are also induced in muscle during systemic diseases associated with cachexia<sup>24</sup>. Thus, a common program of protein degradation and musculoskeletal atrophy has been reported, and it is independent of the atrophy etiology<sup>24,25</sup>.

This common program is related to the ubiquitin-proteasome proteolysis pathway<sup>16,17</sup>. Ubiquitin is an abundant protein present in all eukaryotic cells that work tagging the substrate (protein) which will be degraded by the proteasome. Conjugation of ubiquitin to the substrate is highly selective and it requires three enzymes that participate on a cascade of ubiquitin activation, transference and ligation (E1, E2 and E3). Atrogin-1 and MuRF-1 are the most important members of E3s that act on the last step of the cascade in the muscle atrophy. Atrogin-1 and MuRF-1 recognize the substrate and attach it to the ubiquitin. Therefore, E3s provide high specificity and selectivity into the muscle protein recognition as well as its degradation by the proteasome<sup>16,21,26</sup>.

Atrogin-1 and MuRF-1 mRNAs increase significantly in multiple models of skeletal muscle atrophy<sup>21-25</sup>. Atrogin-1 is up-regulated before the weight decrease can be detected and it remains elevated during accelerated muscle protein loss, suggesting that atrogin-1 may be important in the onset and maintenance of proteolysis in a variety of diseases<sup>24</sup>. Thus, atrogin-1 and MuRF-1 expressions can be considered early markers for atrophy in the muscle tissue.

Joint inflammation induced by  $\iota$ -carrageenan elevates circulating inflammatory cytokines, such as Tumoral Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )<sup>27</sup>. This cytokine is released by macrophages, monocytes, and other cell types, including linfocites B, T and skeletal muscle. TNF $\alpha$  has been reported to stimulate muscle atrophy pathways, as the ubiquitin-proteasome<sup>15,16,28</sup>. Rise in circulating TNF $\alpha$ -levels leads to an increased expression of atrogin-1 and MuRF-1 via Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and via Nuclear Factor kappa  $\beta$ -dependent (NFk $\beta$ ) pathways, respectively<sup>15,16,28</sup>.

Moreover, other factors also participate in the muscle skeletal regulation process. MyoD is the main member of the myogenic regulatory factor (MRFs), a group of basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors. MyoD has a direct relationship with the ubiquitin-proteasome pathway and with cytokines. MyoD has a regulatory role in muscle proliferation as well as myogenic differentiation. It also participates in the adaptative process of adult skeletal muscle<sup>29,30,31</sup>. Elevated levels of atrogin-1 promote MyoD degradation; therefore, atrogin-1 regulates muscle differentiation by controlling MyoD degradation<sup>31</sup>.

Other important gene involved in the mass control of the skeletal muscle is myostatin. Myostatin has been shown to be a strong negative regulator of muscle growth, inhibiting myoblasts proliferation without increase in the apoptosis<sup>32</sup>. This, gene is expressed not only in the developing skeletal muscle but also in adult muscle in response to different stimuli. Its expression is up-regulated during muscle atrophy models<sup>33</sup>. Furthermore, it has been demonstrated recently that up-regulation of myostatin leads to a decrease on MyoD expression<sup>34</sup>. Thus, myostatin is a good target gene to understand the muscle adaptation in atrophy models.

It is well known that joint damage results in atrophy and in reduced muscle strength in humans. Nevertheless, molecular mechanisms involved on the adaptation of these muscles have not been studied yet. Investigating this problem is clinically relevant, and it is important to design effective strategies to restore muscles functionally related to the injured joint.

The hypothesis of this study was that the joint inflammation leads to atrophy and molecular disturbances in both slow and fast twitch muscles which are related to the damaged joint. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of tibiotarsal joint inflammation on the regulation of important genes related to atrophy (atrogin-1 and MuRF-1), differentiation and growing (MyoD), and mass regulation (myostatin) in the soleus and in the tibialis anterior (TA) rat muscles, as well as to investigate possible changes in the muscle fiber CSA.

## **METHODS**

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

Fifteen 3-month-old male Wistar rats ( $310 \pm 12$  g) 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. All experimental procedures and the study were conducted in accordance with the National Guide for Care and use of Laboratory Animal and with the approval of The University Ethics Committee. The animals were randomly divided into three groups: (1) Control ( $n = 5$ ), Inflammation ( $n = 5$ ) and, Sham ( $n = 5$ ).

The animals were anaesthetized with an intraperitoneal injection of xylazine (12 mg/kg) and ketamine (95 mg/kg) for all experimental procedures. After weighted and anaesthetized, the animals from the Inflammation and Sham groups were submitted to an injection of  $\iota$ -carragenan or saline solution into the right tibiotarsal joint, respectively. A volume of 0,03 ml of  $\iota$ -carragenan 3% (Sigma Chemical Company - St. Louis, USA) dissolved in saline solution (NaCl 0,9%) was used to induce the joint inflammation, as described by Wang et al<sup>35</sup> and Omote et al<sup>36</sup>. The Sham group were submitted to the same procedure for injecting 0.03 ml of saline solution. After injection, the animals were remained free in cages for 48 h without any restriction on their motility.

After 48 h the right and the left TA and soleus muscles were carefully dissected and removed. The muscles were weighted and then divided into two similar fragments at the middle of the belly. Muscle pieces were quickly frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  (Forma

Scientific, Marietta, OH). Distal fragments from left and right muscles were used to histological and morphometrical measurements, whereas only the proximal portion from the right TA and soleus muscles was used to gene expression analysis. The left TA and soleus muscles were considered as internal control.

### **Morphometric analysis**

Histological cross-sections (10  $\mu\text{m}$ ) from the middle belly of each muscle were obtained in cryostat (Micron HE 505, Jena, Germany), stained with Touluidine Blue/1% Borax (TB) and accessed by light microscopy (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Germany) to evaluate general muscle morphology and the muscle fibers CSA. The CSA were obtained from 100 randomly chosen fibers and measured using the Axiovision 3.0.6 SP4 software (Carl Zeiss, Jena, Germany).

### **RNA Isolation and Analysis**

One frozen fragment from each right TA and soleus muscles was powdered under a mortar and pestle cooled in liquid nitrogen and homogenized for total RNA isolation using the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's recommendations. The extracted RNA was dissolved in tris-HCl and ethylenediaminetetraacetic acid (TE) pH 7.6. The extracted RNA purity was determined spectrophotometrically at 260 and 280 nm (ratios were between 1.8 and 2.0) and by ethidium bromide staining (Invitrogen, Carlsbad, CA).

## **Reverse Transcription**

One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA. The reaction containing also 5x first- strand buffer, a dNTP (Promega, Madison, WI) mixture containing 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 200U of M-MLV RT enzyme (Promega, Madison, WI). Reverse transcription was performed at 70°C for 10 min, followed by incubation at 42°C for 60 min and at 95°C for 10 min.

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

The RNA transcript levels for the different experimental and control muscles were analysed simultaneously and the reactions was performed in duplicate in the Lightcycler (Rotor Gene 3000, Cobertt Research, San Francisco, USA) using fluorescent dye SYBR green detection (Applied Biosystems, Foster City, CA) and 180 nM of each primer in a final volume of 50 µl. The cycling conditions to target genes were previously described<sup>37,38</sup>. Data were analysed using the comparative cycle threshold (Ct) method and described by the manufacturer. GAPDH was considered as control gene. In addition, negative controls contained RNA, but no M-MLV RT, ensuring that PCR product was not a result from amplified genomic DNA. A blank with no template sample but just 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). Primer sequences for MuRF-1 were previously described by Granado et al<sup>39</sup> and MyoD by Hill and Goldspink<sup>40</sup>. All primers were synthesized by Imprint (Campinas, São Paulo, Brazil).

### **Statistics**

Shapiro-Wilk's and Levene's tests were applied to evaluate the data normality and homogeneity, respectively. One-way ANOVA was used to identify differences amongst groups. When differences were observed, the Tukey test was performed. Kruskal Wallis followed by Newman-Keulls were used to evaluate non parametric data. For all tests, the significance level was set at 5%.

## **RESULTS**

### **Muscle weight and muscle fiber CSA**

There was no difference in weight and in muscle fiber CSA of both right/left muscles, nor within any of the experimental groups ( $p>0.05$ ; Table 1 and 2).

### **Gene expression**

Atrogin-1, MuRF-1 and, myostatin expressions were significantly elevated whereas MyoD was reduced in the TA muscle of the Inflammation group compared to the Control and Sham groups ( $p<0.05$ ; Fig. 1). The expression of MuRF-1 and MyoD was up-regulated in soleus muscle compared to the Control and Sham groups ( $p<0.05$ ; Fig. 2).

The TA muscle of the Sham group presented an increase of atrogina-1 and of myostatin expressions, compared to the Control group ( $p<0.05$ ; Fig. 1). On the other hand, the soleus muscle presented a reduction of MyoD expression ( $p=0.0008$ ) and an increase of myostatin ( $p=0.01$ ) compared to the Control (Fig. 2).

Table 3 summarizes the changes in gene expression, which are presented as the percentage of the Control group values.

## DISCUSSION

As we know, this is the first study to report an increase on expression of genes related to muscle atrophy after induction of joint inflammation and effusion in rats. A very interesting aspect of the present study was the gene regulation differences in slow and fast twitch muscles related to the affected joint. Our results showed that the inflammation of the tibiotarsal joint increases the expression of atrogin-1 in the TA, but not in the soleus muscle. This data is interesting because both muscles are functionally linked to the ankle joint.

The expression of many genes in skeletal muscle seems to be related to the muscle fiber type composition<sup>41-44</sup>. Thus, this study evaluated two muscles having different compositions. The TA muscle of rats is mainly formed by fast-twitch glycolytic fibers having myosin heavy chain (MHC) type II<sup>13,44</sup>, while the soleus is a slow-twitch oxidative muscle having MHC-type I<sup>13</sup>.

The increase in the expression of atrogin-1 is well described in models of disuse, such as denervation and suspension where the muscle atrophy occurs mainly in slow-twitch oxidative fibers<sup>13,16,24,41,42</sup>. The results of our work indicate that in the presence of joint inflammation, the gene expression followed a similar pattern of systemic diseases, involving mainly the fast-twitch glycolytic fibers, differently from the pattern observed in models of disuse, where the oxidative fibers are the most affected. According to a previous study<sup>24</sup>, the preferred atrophy of fast-twitch fibers occurs due to a larger size of these fibers, which are more sensitive to catabolic effects of the adrenal hormones required for most of the muscle atrophy systemic types.

The high expression of MuRF-1 in the TA and soleus muscles of the Inflammation group, suggests that the expression of this gene is independent of the fiber type, although the increase was much higher in the TA (almost 6-fold) than in the soleus muscle.

Models of denervation and immobilization have shown that levels of mRNA of MuRF-1 are higher in the first 24 hours, suggesting the important role of MURF-1 at the onset of the atrophic process, regardless the atrophy model used<sup>15,16</sup>. This E3 targets the muscle protein which will be degraded by the proteasome, including troponin I, conectin/titin and myotilin<sup>45,46</sup>.

The increase of atrogina-1 and MuRF-1 in the Inflammation group could also be explained by TNF $\alpha$  pathway. The injection of  $\tau$ -carrageenan causes a complex inflammatory process, involving a large number of mediators, among them the TNF $\alpha$ , an inflammatory cytokine that promotes the breakdown of muscular protein<sup>47-49</sup>. Seric levels of TNF $\alpha$  are also increased after injection of  $\tau$ -carrageenan in rats hindlimb<sup>27</sup>. The catabolic action of TNF $\alpha$  can be explained in part by activating of the NFk $\beta$ -family transcription factors, being the p65 the main mediator of muscle atrophy of this pathway. The p65 is inactive in the cytoplasm of the cell and when activated it is translocated to the nucleus, binding to specific DNA sites and regulating the expression of MuRF-1<sup>16</sup>. Recent studies indicate that an increase in the expression of NFk $\beta$  are accompanied by a positive regulation in the MuRF-1 expression, leading to degradation of muscle proteins<sup>43</sup>.

Another pathway that can also be regulated by  $\text{TNF}\alpha$  is the MAPK pathway, in which the p38 stands out as the most important member. The expression of p38 is accompanied by an increased expression of atrogin-1, because it was noticed that pharmacological p38 inhibitors are capable of blocking the atrogin-1 expression<sup>28</sup>.

In our study, the increase in the atrogin-1 (14 times) and MuRF-1 (17 times) expressions in the TA of the Inflammation group, was not sufficient to produce weight loss or to decrease the CSA of muscle fibers. Sacheck et al. (2007) found that atrogin-1 and MuRF-1 mRNAs reached the peak in 3 days of disuse. Maximal gene expression of these critical E3s (50 and 20 times respectively) coincided with the greatest loss of muscle weight<sup>24</sup>. The comparison of that study with our results suggests that the magnitude of the increase in these genes can be a key factor for reducing the muscle weight and the muscle fiber CSA.

Tintignac et al. (2005) identified an interaction in vivo between MyoD and atrogin-1. In this interaction atrogin-1 ubiquitina MyoD, leading its to degradation by proteasome. The increase in the atrogin-1 expression resulted in high degradation of MyoD, reducing their average life in approximately 30 minutes. The authors suggested that high levels of atrogin-1 are incompatible with the MyoD expression, inhibiting the formation of new myofibers<sup>31</sup>. Our results are similar to those of Tintignac et al. (2005), since the TA of the Inflammation group presented an increase of atrogin-1 and a decrease of MyoD expression. Moreover, there was an increase in the MyoD soleus muscle, without any change in the atrogin-1 expression.

Another possible mechanism responsible for the decrease in the MyoD expression in the TA of the Inflammation group could also be related to TNF $\alpha$ . Langen et al. (2004) found that TNF $\alpha$  inhibits the myogenic differentiation, reduces the average life of MyoD and increases its degradation through ubiquitin-proteasome pathway. These authors observed in differentiated myocytes a remarkable reduction of MyoD in the presence of TNF $\alpha$ <sup>30</sup>. In the present study, the MyoD expression in the soleus and TA muscles of the Inflammation group suggests that the catabolic effect of TNF $\alpha$  is more intense in fast-twitch fibers; therefore, the joint inflammation produced a gene expression pattern similar to that one observed in systemic diseases<sup>24</sup>.

On the other hand, the up-regulation of MyoD in soleus of the Inflammation group could be related to a possible change from type I to type II fibers, as reported during the atrophic process in slow muscles<sup>13,44</sup>. A key protein related to muscle fibers phenotype changes is the type IIB MHC, which is expressed in fast-twitch muscle fibers<sup>44</sup>.

The MCH IIB has two E-box regions that act as union for motifs of some MRFs family members, as MyoD<sup>44</sup>. Wheeler et al. (1999), using a hindlimb suspension model, identified an increase in the expression of MyoD and MHC IIB on the 1st and 4th days in the soleus muscle of rats, respectively. The temporal relationship between MyoD and MCH IIB suggests that MyoD is required for the expression of MCH IIB in soleus, being necessary to change the fiber from a slow to a fast phenotype<sup>44</sup>. Thus, the increase of MyoD expression in the soleus muscle of the Inflammation group, identified in this study, suggests that in the absence of atrogen-1, MyoD can also be expressed in slow-twitch muscles. Furthermore, in the first 48 hours the increment of MyoD expression

could be related to the changes in the soleus muscle composition (from type I to II) and consequently the starting of the atrophy.

In this study, high levels of myostatin mRNA were observed in the TA muscles of the Inflammation group but not in the soleus, which coincides with previous results that revealed a positive correlation between the MHC IIB percentage and myostatin expression<sup>41</sup>. Reports showed that myostatin is expressed preferentially in fast-twitch muscle fibers because large amounts of MHC IIB and myostatin were found in the gastrocnemius and plantar muscles in mice, but not in the soleus<sup>41</sup>.

Moreover, our results confirm the relationship between the myostatin and MyoD expression. It has been observed that in the presence of an atrophic stimuli, as immobilization in rats, the increase in the Myostatin expression accompanies a decrease in the MyoD expression, generating inability of myoblasts to exit of the cell cycle and affecting the myogenic differentiation<sup>50,51,52</sup>. This way, the marked decrease in the MyoD expression in the TA of the Inflammation group in our study could also be related to the increase in myostatin expression (~ 330%).

A possible decrease on contractile activity, caused by the restriction in the use of the painful inflamed joint, could also contribute to the atrophic gene expression changes observed in this study. Thereby, the disuse also stimulates the expression of genes related to atrophy. However, the fact that the TA muscle showed the highest expression of both atrogen-1 and MuRF-1 suggests that the disuse was not the determinant factor to influence the gene expression, since in this case the soleus muscle should be the most

affected. Future studies to investigate the effect of disuse (immobilization) associated to joint inflammation are needed to clarify these possible regulatory mechanisms.

A previous study reported that the injection of saline solution does not generate inflammatory response in rats<sup>53</sup>. Thus, changes in gene expression observed in both TA and soleus muscles of the Sham group could be resulting from arthrogenic muscle response (AMR). The AMR, due to joint effusion, is generated by elevate tension inside the joint capsule increasing or decreasing the extent of the H-reflex in muscles functionally related to the affected joint, even without any associated joint injury<sup>9-11</sup>.

H-reflex inhibition in joint effusion could probably be related to increment of the activity of slowly adaptation Ruffini endings in the joint capsule. Activity of these receptors stimulates Ib inhibitory interneurons, resulting in inhibition of alpha motoneurons pool in the agonist muscle<sup>9,10,54</sup>. H-reflex facilitation could be observed in the antagonist muscle group<sup>55</sup>.

The AMR has been also associated with electromyographic (EMG) changes. Joint effusion in the knee joint in humans showed decrease in both the H-reflex and EMG activity in the quadriceps muscle, while the hamstrings had increased this two measurements<sup>56</sup>. The increase and decrease in EMG activity has been associated with hypertrophy and atrophy, respectively<sup>57,58,59</sup>.

The results of this study suggest that the tibiotarsal joint effusion causes activation in soleus motor units and inhibition in TA ones. This hypothesis could justify the increase of MyoD expression and the decrease of myostatin found in the soleus, as well as the

high expression of genes related to muscle atrophy (atrogin-1 and myostatin) in the TA muscle.

Our results indicate that joint effusion regulates the expression of genes related to atrophy, differentiation and muscle proliferation. However, future studies should investigate this hypothesis using EMG and H-Reflex measurements. Moreover, it could be considered that the results observed in Sham group are mainly related to the capsular distension, because the joint effusion model allows to stimulate mechanically the joint without pain<sup>60</sup>.

Summarily, the possible regulatory mechanism related to the muscle adaptation due to joint inflammation and effusion, is represented on the Fig. 3. Basically, it is known that the joint inflammation caused by  $\tau$ -carrageenan injection increases serum levels of  $\text{TNF}\alpha$ <sup>27</sup>. Considering the results of the present study it is possible that in the Inflammation group, the  $\text{TNF}\alpha$  through NF $\kappa$ B and MAPK pathways could be associated to increases of MuRF-1 and atrogin-1 expressions, respectively, as well as, to decreases of MyoD in the TA (Fig. 3A). The elevated expression in myostatin added to the up-regulation of atrogin-1, could also contribute to MyoD reduction in the TA muscle. The results found in the soleus muscle suggest that  $\text{TNF}\alpha$  acts “preferentially” on MuRF-1 expression. The up-regulation of MyoD observed in soleus muscle could be related to possible changes in the muscle type phenotype (from type I to type II), as reported in slow-twitch muscle atrophy models (Fig. 3A). Furthermore, in the Sham group (Fig. 3B), the joint effusion induced by injection of saline solution could inhibit the motor units of the TA muscle through the activation of the slow adaptation Ruffini endings localized in the joint capsule<sup>54,55</sup>. This inhibition increases the expression of atrogin-1

and myostatin in TA muscle. (Fig. 3B). Furthermore, by the reciprocal innervation mechanism, could be facilitated the soleus (antagonist of TA) muscle motor units activity, reducing the myostatin and increasing the MyoD expressions (Fig. 3B).

In conclusion, the acute inflammation of the tibiotarsal joint regulates differently the expression of genes related to muscle atrophy (atrogin-1 and MuRF-1), growth and differentiation (MyoD), and control of mass (myostatin) in slow (soleus) and fast twitch (TA) muscles functionally related to that joint. Furthermore, joint effusion by itself can also regulates gene expression differently in these two muscles examined.

The results of this study have clinical relevance and highlight about the importance of rehabilitation programs to minimize negative effects that inflammation or joint effusion cause in muscles functionally related to the affected joint.

### **Acknowledgments**

This project was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process 05/5474-3, and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). C Ramirez was MS fellow from CNPq (PEC-PG); T L Russo was PhD fellow from FAPESP. We also would like to thank Teresa F. F. Piassi for your technical support.

## REFERENCES

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. *Manual Therapy.* 1997;2:11-7.
3. Lindehammar H, Londvall B. Muscle involvement in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology.* 2004;43:1546-54.
4. Pap G, Machner A, Awiszus F. Strength and voluntary activation of the quadriceps femoris muscle at different severities of osteoarthritic knee joint damage. *Journal of Orthopaedic Research.* 2004;22:96-103.
5. 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;102:942-8.
6. 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;36:1089-96.
7. Stockmar C, Lill H, Trapp A, Josten C, Punkt K. Fibre type related changes in the metabolic profile and fibre diameter of human vastus medialis muscle after anterior cruciate ligament rupture. *Acta Histochemica.* 2006;108:335-42.
8. Akima H, Furukawa T. Atrophy of thigh muscles after meniscal lesions and arthroscopic partial menisectomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2005;13:632-7.

9. 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 Rehal.* 2003;64:1076-9.
10. 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.
11. Hopkins J, Palmieri R. Effects of ankle joint effusion on lower leg function. *Clin J Spor Med.* 2004;14:1-7.
12. 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.
13. Lieber R. Skeletal muscle structural, function, & plasticity. Second edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
14. Stevenson EJ, Giresi PG, Koncarevic A, Kandarian SC. Global analysis of gene expression patterns during disuse atrophy in rat muscle skeletal. *J. Physiol.* 2003;551:33-48.
15. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2005;37:1974-84.
16. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Medical Hypotheses.* 2006;69:310-21.
17. McKineell IW e Rudnicki MA. Molecular mechanisms of muscle atrophy. *Cell.* 2004;119:907-10.

18. Ferreira R, Nueparth MJ, Magalhaes A, Vitorino R, Amado F. Skeletal muscle atrophy increases cell proliferation in mice gastrocnemius during the first week of hindlimb suspension. *Eur J Appl Physiol.* 2006;97:340-6.
19. 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;2:276–83.
20. Eley HL, Tisdale MJ. Skeletal atrophy, a link between depression of protein synthesis and increase in degradation. *Journal of Biological Chemistry.* 2007;282:7087-97.
21. Jones SW, Hill R, Krasney P, O'Conner B, Greenhaft PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J.* 2004;18:1025-7.
22. 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; 98:14440-5.
23. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001;294:1704-07.
24. 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 J.* 2007;21:140-55.
25. Lecker SH, Solomon V, Mitch WE, Goldberg 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.

26. Glickman MH e Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for sake of construction. *Physiological Reviews*. 2002;82:373-428.
27. Nishikori T, Irie K, Suganuma T, Ozaki M, Yoshioka T. Anti-inflammatory potency of FR167653, a p38 mitogen-activated kinase inhibitor, in mouse models of acute inflammation. *European Journal of Pharmacology*. 2002; 451:327-33.
28. 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;19:362-70.
29. Saborin LA and Rudnick MA. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet*. 2000;57:16-25.
30. 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;18:27-237.
31. Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *The Journal of the Biological Chemistry*. 2005;280:2847-56.
32. Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J and Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem*. 2000;275:40235-43.
33. Sharma M, Kambadur R, Matthews KG, Somers WG, Devlin GP, Conaglen JV et al. Myostatin, a transforming growth factor- $\beta$  superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. *J Cell Physiol*. 1999;180:1-9.

34. Guttridge DC. Signalling pathways weigh in on decisions to make or break skeletal muscle. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 2004;7:443-50.
35. Wang Y, Huang C, Cao Y, Han Y. Repeated administration of low dose ketamine for the treatment of monoarthritic pain in the rat. *Life Sciences*. 2000;67:261-67.
36. Omote K, Kawamata T, Nakayama Y, Yamamoto H, Kawamata M, Namiki A. Effects of a Novel Selective Agonist for Prostaglandin Receptor Subtype EP4 on Hyperalgesia and Inflammation in Monoarthritic Model. *Anesthesiology*. 2002;97:170–76.
37. Peviani S, Silveira A, Carreira R, Moriscot A, Salvini T. Short bouts of stretching increase myo-d, myostatin and atrogen-1 in rat soleus muscle. *Muscle Nerve*. 2007;35:363-70.
38. Russo T, Peviani S, Marques C, Gigo-Benato D, Salvini T. Electrical stimulation based on Chronaxie reduces atrogen-1 and Myod gene expressions in Denervated rat muscle. *Muscle Nerve*. 2007;35:87-97.
39. Granado M, Priego T, Martín A, Villanúa MA, López-Calderon A. 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*. 2005;289:1007–14
40. Hill M, Goldspink G. 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*. 2003;549:409-18.

41. Carlson CJ, Booth FW and Gordon SE. Skeletal muscle myostatin RNA expression is fiber-type specific and increases during hindlimb unloading. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 1999;277:601-6.
42. Huey KA, Roy R, Baldwin KM and Edgerton RV. Temporal effects of inactivity on myosin heavy chain gene expression in rat slow muscle. *Muscle Nerve*. 2001;24:517-26.
43. 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;119:285-98.
44. Wheeler MT, Snyder EC, Patterson MN and Swoap SJ. 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*. 1999;276:1069-78.
45. Koyama S, Hata S, Witt C, Ono Y, Lerche S, Doi N et al. Muscle RING-Finger protein-1 as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis. *J. Mol. Biol*. 2008;376:1224-36.
46. Witt S, Granzier H, Witt C e Labeit S. MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: Towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination. *J. Mol. Biol*. 2005;350:713-22.
47. Reid MB, Li Y-P. Cytokines and oxidative signaling in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 2001;171:225-32.
48. Rall LC and Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanism and interventions. *Rheumatology*. 2004;43:1219-23.
49. 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.

50. Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004;20:61-86.
51. Dominique JE and Gérard C. Myostatin regulation of muscle development: molecular basis, natural mutations, physiopathological aspects. *Experimental Cell Research.* 2006;321:2401-14.
52. 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.
53. Saricaoglu F, Dal D, Atilla P, İskit AB, Tarhan O, Asan E et al. Effect of intraarticular injection of lornoxicam on the articular cartilage & synovium in rat. *Indian J Med Res.* 2008;127:362-5.
54. Palmieri RM, Ingersoll CD, Hoffman MA. The Hoffmann Reflex: Methodologic considerations and applications for use in sports medicine and athletic training research. *Journal of Athletic Training.* 2004;39:268-77.
55. Takada Y, Miyahara T, Tanaka T, Ohyama T, and Nakamura Y. Modulation of H Reflex of Pretibial Muscles and Reciprocal Ia Inhibition of Soleus Muscle During Voluntary Teeth Clenching in Humans. *J Neurophysiol.* 2000;83:63-2070.
56. Torry MR, Decker MJ, Viola RW, O'Connor DD and Steadman JR. Intra-articular knee joint effusion induces quadriceps avoidance gait patterns. *Clin Biomech.* 2000;15:147-59.
57. Suetta C, Aagaard P, Magnusson SP, Andersen LL, Sipilä S, Rosted A, Jakobsen AK, Duus B, and Kjaer M. 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;102:942-8.

58. Häkkinen K, Kallinen M, Izquierdo M, Jokelainen K, Lassila H, Mälkiä E, Kraemer WJ, Newton RU and Alen M. Changes in agonist-antagonist EMG, muscle CSA, and force during strength training in middle-aged and older people. *J Appl Physiol*.1998;84;1341-9.
59. Häkkinen K, Pakarinen A, Kraemer J, Häkkinen A, Valkeinen H and Alen M. *J Appl Physiol*. 2001;91;569-80
60. Hopkins JT, Ingersoll CD, Edwards J and Klootwyk TE. Cryotherapy and transcutaneous electric neuromuscular stimulation decrease arthrogenic muscle inhibition of the vastus medialis after knee joint effusion. *Journal of Athletic Training*. 2001;37;25-31.

Figure 1. Gene expression of Atrogin-1 (A), MuRF-1 (B), MyoD (C) e Myostatin (D) in the TA muscle. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$  compared to Sham and Control, \*\*  $p < 0.05$  compared to Control group.

Figure 2. Gene expression of Atrogin-1 (A), MuRF-1 (B), MyoD (C) and Myostatin (D) in soleus muscle. Values are presented as mean  $\pm$  SD. \*  $p < 0.05$  compared to Control and Sham groups. \*\*  $p < 0,05$  compared to Control group.

Figure 3. Possible model of gene expression in TA and soleus muscles in joint inflammation (A) and joint effusion (B).

Fig. 1.

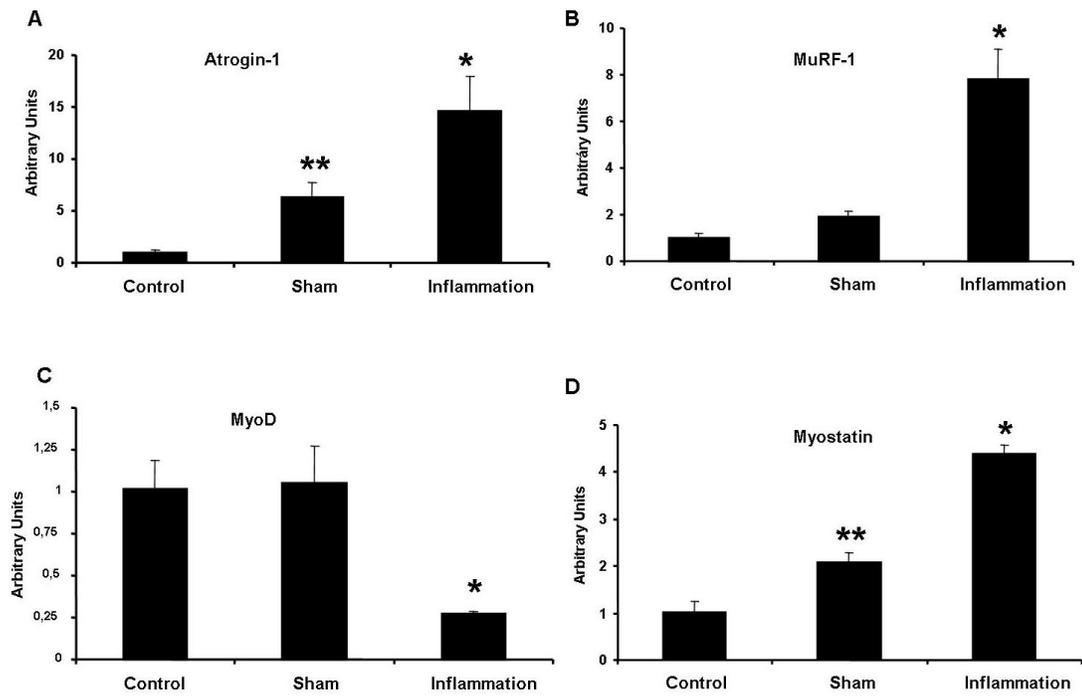


Fig. 2.

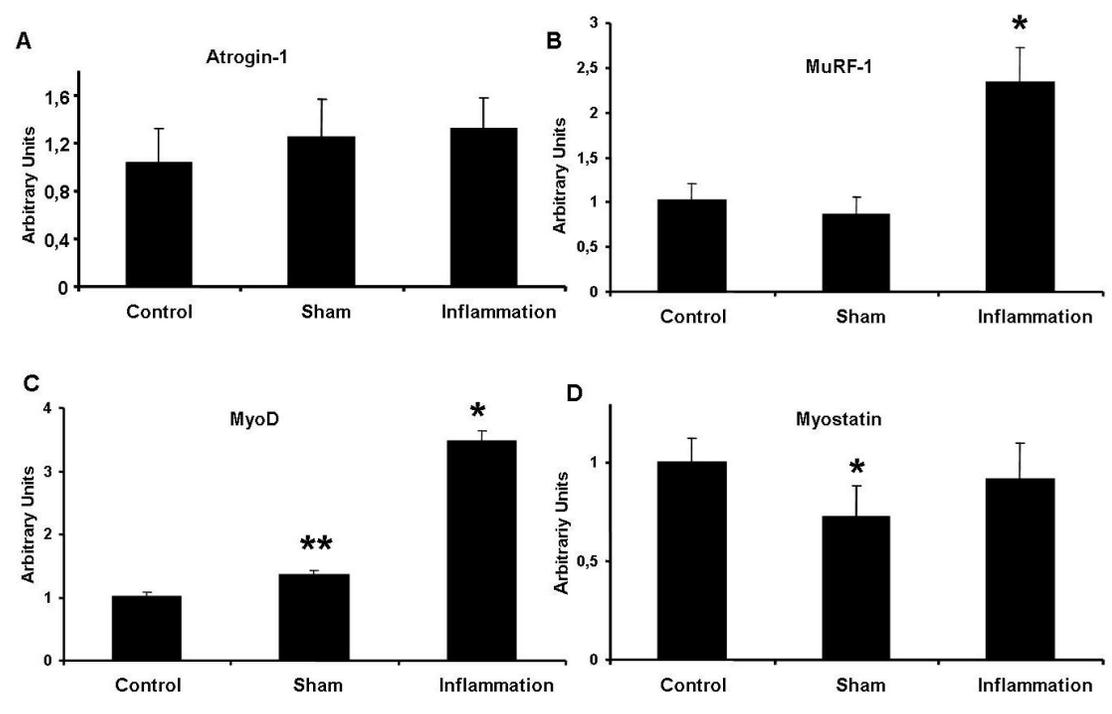


Fig. 3

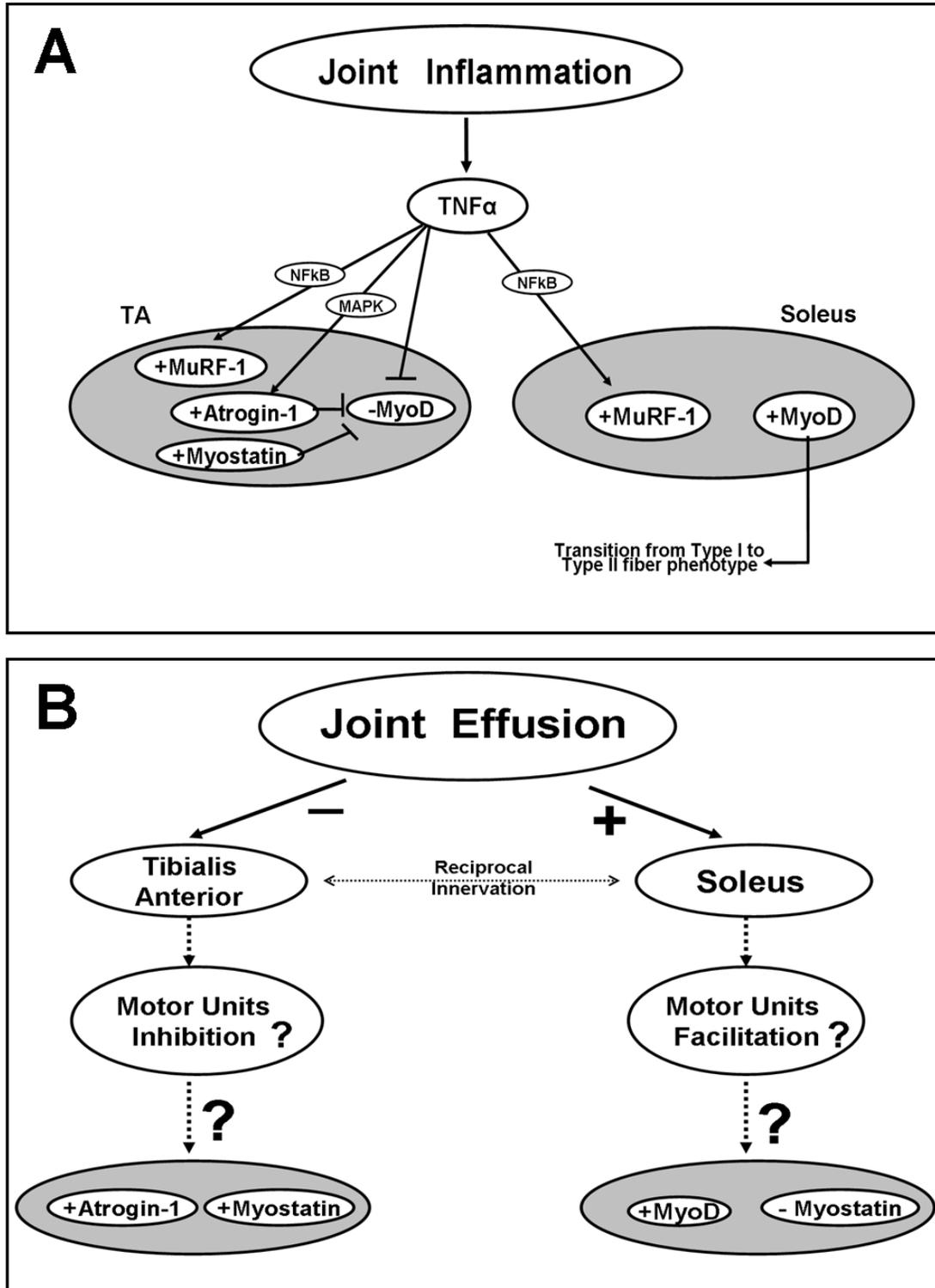


Table 1. Muscular weight of experimental groups.

Weight (mg)	Control N = 5	Sham N = 5	Inflammation N = 5
<i>Tibialis Anterior</i>			
Right	0.49 ± 0.09	0.61 ± 0.06	0.54 ± 0.05
Left	0.49 ± 0.12	0.61 ± 0.09	0.53 ± 0.05
<i>Soleus</i>			
Right	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.01
Left	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.01

Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).

Table 2. Muscle fiber cross-sectional area (CSA) of Soleus and TA muscles.

CSA ( $\mu\text{m}^2$ )	Control N = 5	Sham N = 5	Inflammation N = 5
<i>Tibialis Anterior</i>			
Right	733.56 $\pm$ 137.38	676.32 $\pm$ 143.69	768.51 $\pm$ 238.48
Left	749.18 $\pm$ 128.37	625.02 $\pm$ 162.93	815.03 $\pm$ 114.37
<i>Soleus</i>			
Right	830.32 $\pm$ 43.69	804.34 $\pm$ 187.69	754.29 $\pm$ 161.19
Left	899.32 $\pm$ 142.62	792.53 $\pm$ 40.53	862.94 $\pm$ 73.99

Data are expressed as mean  $\pm$  SD.

Table 3. Changes in gene expression in Inflammation and Sham groups.

<b>Muscle</b>	<b>Sham Group</b>	<b>Inflammation Group</b>
<i>Tibialis Anterior</i>	Atrogin-1 (+519%) Myostatin (+103%)	Atrogin-1 (+1334%) MuRF-1 (+672%) Myostatin (+330%) MyoD (-73%)
<i>Soleus</i>	MyoD (+34,5%) Myostatin (-38%)	MuRF-1 (+128,5%) Miostatina(+245,6%)

Values are expressed as percentage of increase (+) or decrease (-) in gene expression, compared with Control group.