

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO

Paula Ramos Viacava

Efeito do Exercício Aeróbico em Modelo Experimental de Artrite

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

COMISSÃO DE GRADUAÇÃO

PAULA RAMOS VIACAVA

Efeito do Exercício Aeróbico em Modelo Experimental de Artrite

Periódico para submissão: Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado como requisito parcial para obtenção
do grau de Bacharel em ciências biológicas

Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier
Orientador

Porto Alegre

2012

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Vitor Viacava e Zoraide Maciel, pelo apoio e oferta da possibilidade de estudos, além de todo afeto que recebi de vocês durante a minha vida, compreensão nos momentos em que estive ausente e os principais responsáveis pela formação do meu caráter.

Aos meus irmãos, Vinicius e Fernando que sempre demonstraram orgulho pelas minhas conquistas, mesmo depois de tantas brincadeiras que acabavam em brigas na infância, tenho certeza em dizer que vocês são os meus melhores amigos.

À minha irmã Keiti, pois sempre foi a melhor irmã mais velha que alguém pode ter, incentivando os meus estudos e provando que a conquista de sonhos são possíveis, além de me proporcionar prazerosos encontros regados com chimarrão onde a conversa sempre acabava na ciência.

À minha família, que esteve na torcida e acreditaram no meu potencial.

Ao Roberto Ferreira, que sempre me trouxe alegria, marcando presença nos momentos importante da minha vida e provando que o carinho que uma pessoa pode sentir pela outra é muito mais forte que a união dos laços de sangue.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração inigualáveis.

Aos meus colegas de laboratório, por criarem a melhor atmosfera de trabalho.

À Lidiane Filippin, Vivian Teixeira e Laura Xavier, pelo apoio na realização desse trabalho.

Ao Dr. Ricardo Xavier, pela orientação durante a minha iniciação científica, sempre com muita paciência, compreensão e palavras de sabedoria.

“Toda a nossa ciência,
Comprada com a realidade, é primitiva e infantil.
No entanto, é a coisa mais preciosa que temos. ”

Albert Einstein

APRESENTAÇÃO

Conforme Decisão 01/2010 da COMGRADBIO (ver em <http://www.ufrgs.br/COMGRADBIO/index.html>) optou-se por apresentar este trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas na forma de artigo a ser submetido a um periódico indexado especializado na área, a revista escolhida foi Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle ISSN: 2190-5991.

Assim, o trabalho intitulado “Efeito do Exercício Aeróbico em Modelo Experimental de Artrite” apresenta-se no formato do periódico, segundo as normas para preparação e encaminhamento de manuscritos exceto pelas figuras, que se encontram no decorrer do texto.

Efeito do Exercício Aeróbico em Modelo Experimental de Artrite

RESUMO

Introdução: A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica autoimune de etiologia desconhecida, acometendo principalmente as articulações, mas também outros tecidos, como o músculo esquelético. A perda de massa muscular determina uma grande repercussão na funcionalidade e qualidade de vida dos pacientes com AR. O exercício físico está associado com a redução da morbidade em diversas doenças e surge como uma alternativa terapêutica para perda muscular nos portadores da AR. Objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do exercício físico sobre a perda muscular de animais com artrite experimental. Métodos: A artrite foi induzida por colágeno do tipo II emulsificado em adjuvante de Freund (CIA) em camundongos DBA1/J por injeção intradérmica na base da cauda (indução no dia zero e reforço no 18º dia). Os animais foram divididos em 2 grupos: CIA (i) animais com artrite sem exercício (sem intervenção) (ii) EXE: animais com artrite e exercício (protocolo: caminhada por 30 min, 3X/semana, durante 30 dias, iniciada na observação do primeiro sinal clínico da doença). O escore clínico de artrite e o edema articular foram avaliados diariamente durante o período experimental. O peso e a locomoção exploratória espontânea foram avaliados semanalmente. Após a morte, a área da miofibrila dos músculos gastrocnêmio, tibial anterior e a histopatologia da articulação tibiotarsal foram avaliadas. Significância estatística foi considerada para valores $p < 0,05$. Resultados: Não foi observada diferença significativa nos parâmetros de atividade da doença (escore clínico, edema), bem como no peso e na locomoção espontânea, na histopatologia da articulação tibiotarsal foi observada redução apesar de não significativa, na erosão cartilaginosa e óssea. Entretanto, houve diferença significativa na área seccional da miofibrila, o grupo intervenção apresentou maior área comparada ao grupo controle ($598\mu\text{m}^2 \pm 58$ e $481\mu\text{m}^2 \pm 63$, respectivamente; $p < 0,05$), representando um aumento médio de 24%. Conclusão: Este é o primeiro estudo de intervenção com exercício em modelo experimental de artrite induzida por colágeno. O exercício aeróbico aplicado a partir dos primeiros sinais clínicos demonstrou benefício sobre a perda muscular no modelo experimental de artrite, reduzindo a atrofia da miofibrila. No entanto, o protocolo testado não parece impactar clinicamente na inflamação articular. Apoio financeiro: CNPq, FAPERGS, FIPE-HCPA.

ABSTRACT

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic autoimmune inflammatory disease of unknown etiology, affecting primarily the joints, but also other tissues such as skeletal muscle. The muscle wasting significantly impairs the functionality and quality of life of patients with RA. Physical exercise is associated with reduced morbidity in several diseases and is an alternative therapy for RA related muscle wasting. The aim of this study was to evaluate the effect of exercise on muscle loss of animals with experimental arthritis. Methods: Arthritis was induced by collagen type II emulsified in Freund's adjuvant (CIA) in mice DBA/1J by intradermal injection at the base of the tail (induction on day zero and booster on day 18 booster). The animals were divided into two CIA groups (n=5): (i) animals with exercise (protocol: walking on treadmill for 30 min, three times a week for 4 weeks after the onset of the disease), (ii) animals without exercise (without intervention). Clinical score and paw swelling were assessed daily during the whole experimental period. The weight of the animals and spontaneous exploratory locomotion were evaluated weekly. After death, the ankle histopathological score, myofiber area of the tibialis anterior and gastrocnemius muscles were evaluated. Statistical significance was considered for p

values $p < 0.05$. Results: No significant difference was observed in clinical parameters of disease activity (clinical score, paw swelling and animal weight) and spontaneous locomotion in the walking group compared with the group without exercise, the joint histopathological was no significant, although observed reduction some parameters, especially in bone and cartilage erosion. However, there was significant difference in the myofiber sectional area, with the exercised group showing greater myofiber cross-sectional area compared to the group without exercise ($598 \pm 58 \mu\text{m}^2$ and $481 \pm 63 \mu\text{m}^2$, respectively, $p < 0.05$), representing a mean increase of 24%. Conclusion: This is the first interventional study with walk on treadmill in the experimental model CIA. According to results, aerobic exercise applied from the first clinical signs showed benefit for the muscle wasting in an experimental model of arthritis, observed mainly by the reduction of myofiber atrophy. However, the tested exercise program does not seem to impact clinically in the process of arthritis.

Financial support: CNPq, FAPERGS, FIPE-HCPA.

INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória de etiologia desconhecida, com manifestações autoimunes, caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva preferencialmente de articulações periféricas [1-3], com impacto significativo na morbi-mortalidade dos portadores. A AR tem uma prevalência de 0,46% na população brasileira [4, 5] e 1% na população mundial [6].

A patologia da sinovite reumatoide caracteriza-se fundamentalmente por proliferação da membrana sinovial e erosão subsequente da cartilagem articular e do osso subcondral. Resultando no aumento das células T e B, estimulação da angiogênese na membrana sinovial, acúmulo de células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, proliferação de células sinoviais e desenvolvimento de um *pannus* invasivo de rápido crescimento, que invade a cartilagem, ativando os condrócitos e liberando as enzimas proteolíticas que degradam a cartilagem e o osso, resultando por fim em erosões e destruição articular [7]. Essa inflamação crônica causa a produção de citocinas gerada pela resposta do linfócito T auxiliar 1 (Th1) que produz interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$) estimulando a liberação do fator de necrose tumoral do tipo α ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina-1 beta ($\text{IL-1}\beta$) e metaloproteinases pelos macrófagos e fibroblastos sinoviais [8], junto com a participação de linfócitos T auxiliar 17 (Th17) produtores de IL-17, com papel importante na resposta inflamatória reumatoide, pois induz a produção de IL-6 e IL-23 aumentando a reabsorção óssea e ativação dos osteoclastos diminuindo a formação óssea.[9].

Nos achados clínicos comumente se observa perda muscular no local afetado, ocasionado pela atrofia de fibras musculares [10-12]. Atrofia muscular pode decorrer de diversas condições clínicas, tais como desuso, idade avançada, desnutrição, doenças inflamatórias crônicas, infecciosas e autoimunes. Essas condições clínicas induzem a perda muscular por diferentes vias de sinalização intracelular, tais como proteases lisossomais, proteases ativadas por cálcio e ativação do sistema proteossomo [13], além de ocasionar alterações na capacidade regenerativa do músculo [14]. No músculo estriado esquelético ocorre aumento na produção de radicais livres, que passam a ser um potente estímulo para a produção de citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e IL-6) mediada pelo fator de transcrição nuclear κB ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), o qual inicia uma cascata de eventos que consiste na expressão da enzima óxido nítrico sintetase indutível (iNOS), que ocasiona apoptose e perda muscular.[15] Perda de massa muscular é o principal contribuinte para a perda de força muscular, [16, 17], e essa redução da massa do músculo causa a diminuição da atividade física em pacientes acometidos com AR[18].

Modelos experimentais como a artrite induzida por colágeno (CIA) mimetizam a AR, sendo uma importante ferramenta para o estudo desta doença [19]. Esses modelos são amplamente usados por demonstrar semelhanças clínicas e histopatológicas com a AR, incluindo padrões da sinóvia, erosão da cartilagem articular e osso, bem como a exacerbação da citocinas pró-inflamatórias e características clínicas como dor, edema e perda funcional [20]. Entretanto, ainda é escassa a literatura quanto ao envolvimento muscular nesses modelos, especialmente no que tange o impacto causado pelo exercício na prevenção da perda muscular [21-24].

Estudos demonstram que o exercício físico está associado com a redução da morbidade e mortalidade cardiovascular [25], apresenta efeito neuroprotetor em modelo experimental de Parkinson [26] e redução na obesidade de modelo experimental de diabetes do tipo 2 [27]. Nas doenças autoimunes, os estudos relacionados à atividade física ainda apresentam resultados controversos [28]. Mesmo assim, exercícios físicos são recomendados para pacientes com AR devido aos benefícios, como aumento da mobilidade articular, força muscular e da capacidade aeróbica [29], preservando mobilidade sem causar danos na articulação de pacientes fisicamente ativos [30, 31]. Contudo, ainda não está totalmente esclarecida qual a frequência, a duração e a intensidade que o exercício deve ser realizado [32]. o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de um protocolo de exercício físico aeróbico moderado sobre a perda muscular de animais com artrite experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais:

Foram utilizados camundongos DBA1/J machos de 8 a 12 semanas de vida, mantidos na Unidade de Experimentação Animal (CP-HCPA) durante todo o período experimental, em caixas plásticas de 30cmx20cmx12cm forradas com maravalha, em ciclo de 12 horas claro/escuro e temperatura entre 18° e 22°C. A água e a ração eram administradas *ad libitum*. Este estudo obedeceu à Legislação Brasileira e do Código Estadual de Proteção aos Animais, (lei 11794/ 2008), com políticas locais no cuidado e uso de animais de acordo com os códigos relacionados à prática. [33]

Grupos e delineamento experimental:

Os animais foram divididos em 2 grupos: (i) grupo CIA – artrite sem exercício (n=4); (ii) grupo EX - animais com artrite submetidos ao protocolo de exercício aeróbico moderado (n=5). A artrite foi induzida por colágeno bovino tipo II (CIA) segundo Brand et al.[34]. Os animais foram anestesiados com inalação de isoflurano (1 ml/ml, Abbott) e imunizados através de uma emulsão de 50µL contendo volumes iguais de colágeno bovino tipo II (2mg/ml) e adjuvante completo de Freund (CFA, Sigma, St Louis, MO, USA) misturado com *Mycobacterium tuberculosis* (bactéria inativada) (strain H37RA, Difco, Detroit, MI, USA) por injeção intradérmica a uma distância de 1,5 cm da base da cauda no dia zero. O reforço da imunização (*booster*) foi realizado no 18° dia, para garantir a indução com uma alta incidência da doença. No *booster* foi utilizada a mesma concentração de colágeno bovino do tipo II, no entanto, foi emulsificado com adjuvante incompleto de Freund (IFA) para imunização. Os animais foram anestesiados como na primeira imunização e a injeção é

novamente intradérmica na base cauda, porém numa parte mais distal ao primeiro local da injeção. Os animais foram acompanhados diariamente após o *booster* e no 28º dia sacrificados por deslocamento cervical.

Escore clínico da artrite:

Os animais foram monitorados diariamente durante todo período experimental por examinadores cegados, para análise dos sinais clínicos da artrite através do escore de severidade, como segue: 0 – sem sinais de eritema ou edema; 1 – eritema e edema leve (tarsos ou metatarsos); 2 – eritema e edema moderado (tarsos e metatarsos ou tarsos e tornozelo); 3 – eritema e edema severo (metatarsos a tornozelo) e 4 – todas as articulações afetadas com perda da função (anquilose). E, ao final do experimento, o máximo de escore do animal será 16 (escore 4 em cada pata) [34].

Quantificação do edema de pata:

No modelo em estudo, a medida bilátero-lateral da pata do camundongo indica o seu grau de inchaço. Essa medida do edema das patas posteriores foi realizada diariamente após o primeiro sinal clínico, durante todo o experimento, por paquímetro digital Mitutoyo (Sul Americana Ltda, Suzano – São Paulo).

Avaliação da locomoção espontânea

No dia do *booster* e ao final de cada semana, camundongos foram colocados individualmente em uma caixa acrílica (Monitor de Atividade IR) de 60 cm x 40 cm. A locomoção espontânea exploratória dos animais é detectada por barras de sensores localizadas nas laterais e acima das caixas de movimento. Registrando 5 minutos de movimentos, inicia-se após os animais permanecerem na caixa por 20 segundos (adaptado de [18]). A detecção dos movimentos foi enviada a um computador, e avaliada pelo software da Insight Equipamentos Ltda® onde determinou os seguintes parâmetros: desenho do trajeto percorrido, distância percorrida, velocidade média percorrida, tempo de repouso, quantidade de vezes que o animal ficou em pé ou pulou.

Exercício aeróbico

Após o desenvolvimento da doença (considerada escore clínico igual a um), os animais foram submetidos ao protocolo de exercício aeróbico moderado em esteira motorizada de roedores (desenvolvida pela engenharia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre). O protocolo de treinamento ocorreu da seguinte forma: os animais foram ambientados em uma velocidade 8 m/min um dia após o *booster*. Depois que desenvolveram a doença treinaram com uma velocidade de 9 m/min por 5 minutos, após a velocidade passou para 12 m/min por 5 minutos, 15 m/min por 10 minutos, 12 m/min por 5 minutos e os animais terminaram o treinamento em uma velocidade de 9 m/min por 5 minutos. O treinamento total foi de 30 minutos por dia, 3 dias por semana durante período de quatro semanas [25].

Histopatologia da articulação

Após a dissecação anatômica das articulações, as mesmas foram colocadas separadamente em recipientes com formol 10% tamponado de 5 a 7 dias. Após esse período, o formol foi retirado e as articulações colocadas em ácido nítrico 10% por 24 horas para descalcificação, e depois encaminhadas à patologia. Essas seções das articulações coradas com hematoxilina eosina (HE) foram analisadas por um patologista cegado.

Para inflamação sinovial usamos o sistema de contagem usado por Oliveira [35], no qual 5 campos de ampliação de alto-poder (HPFs) foram analisados, sendo a média da contagem usada para análises.

1) Infiltrado mononuclear inflamatório, classificado como 0 - ausente, 1 - leve (1-10%), 2 - moderado (11-50%), e 3 - severo (51-100%);

2) Hiperplasia sinovial através de sistema de contagem descrito por Douni *et. al.* [36], como segue: 0 - ausente, 1 - leve (5-10 camadas), 2 - moderado (11-20 camadas), e 3 - severo (20 camadas);

3) Extensão da formação de pannus, baseado na impressão do leitor, classificado como 0 - ausente, 1 - leve, 2 - moderado, e 3 - severo;

4) Fibrose sinovial classificado como 0 - ausente, 1 - leve (1-10%), 2 - moderado (11-50%), e 3 - severo (51-100%);

5) Erosão da cartilagem, avaliada conforme sistema de contagem descrito por Douni *et. al.* [36] que avalia a porcentagem da superfície de cartilagem que é afetada: 0 - nenhum, 1 - leve (1-10%), 2 - moderado (11-50%), e 3 - severo (51-100%);

6) Erosão Óssea marcada como 0 - ausente, 1 - leve (erosão 5HPF), 2 - moderado (erosão aumento), 3 - severo (erosão transcortical que invade medula óssea, neoformação óssea cortical).

Histopatologia do Músculo

Após a dissecação anatômica dos músculos tibial anterior e gastrocnêmio, esses foram colocados separadamente em frascos com formol tamponado a 10% de 1 a 3 dias e encaminhamos à patologia, onde foram coradas em HE. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico.

Área da miofibra

Nas seções transversais do músculo tibial anterior e gastrocnêmio corado em HE foi traçado duas linhas retas perpendiculares, no sentido do maior e do menor comprimento da fibra para a medida do diâmetro [37]. Desta maneira é possível determinar a estimativa da área da seção transversa de uma fibra, que é obtida considerando-se a fibra um círculo cujo diâmetro é a média geométrica entre o menor e o maior diâmetro medido.

Para essas medidas são capturadas 10 imagens de cada lâmina histológica com *QImaging Digital Câmera (Media Cybernetics)* e de cada campo são mensurados os diâmetros de 20 miofibras com auxílio do

software *Image-Pro Express* (versão 5.1.0.12, Media Cybernetics). Por fim, a média geométrica dos diâmetros foi gerada e calculada a área transeccional da miofibrila [38].

Tamanho amostral e análises estatísticas:

O tamanho amostral foi definido de acordo com modelos adaptados de osteoartrite encontrados na literatura [39-41], visto que na ausência de estudos que avaliam a perda muscular associados com o exercício físico em modelo animal de artrite, realizamos um estudo piloto. Os dados quantitativos gerados foram descritos por média e erro padrão. A comparação dos grupos foi realizada por teste T de Student. Os dados analisados com o programa Graphpad prism v5.

RESULTADOS

Parâmetros Clínicos

Nossos resultados demonstram que os parâmetros clínicos da doença, escore clínico e edema, acompanhados diariamente, foram similares em ambos os grupos estudados, sugerindo que este protocolo de exercício físico aeróbico moderado não foi capaz de afetar o desenvolvimento clínico da doença (Fig. 1).

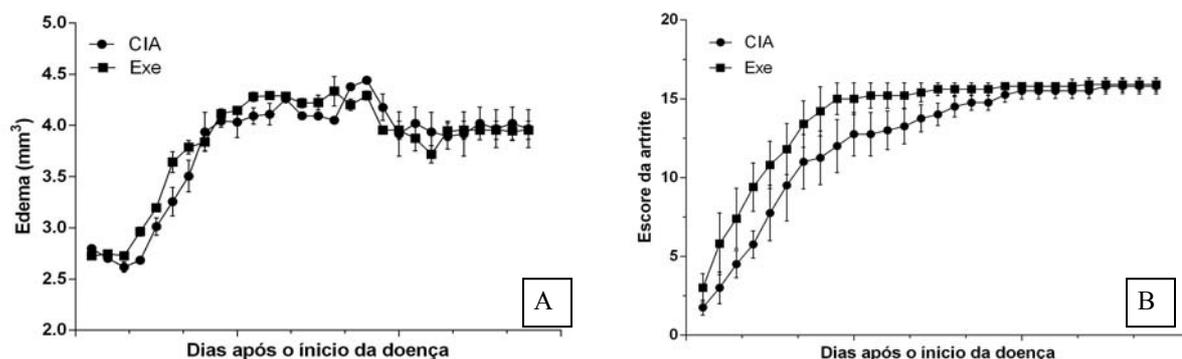


Figura 1: Efeito do exercício aeróbico sobre o desenvolvimento da artrite experimental.

(A) Edema; (B) Escore clínico

Valores expressos em médias \pm erro padrão (EP).

O peso dos animais foi monitorado semanalmente. Esta variável também não demonstrou diferença significativa. Quando analisado o peso muscular e a relação sarcossomática (relação entre o peso muscular e o peso total do animal) nos animais igualmente não se encontra diferença significativa entre os grupos. Contudo, na última semana de experimento foi observado que o grupo EXE ganhou, em média, 0,89g de peso, enquanto o grupo CIA perdeu, em média, de 0,47g. No entanto, essa diferença não foi significativa. ($p=0.093$) (Figura 2a).

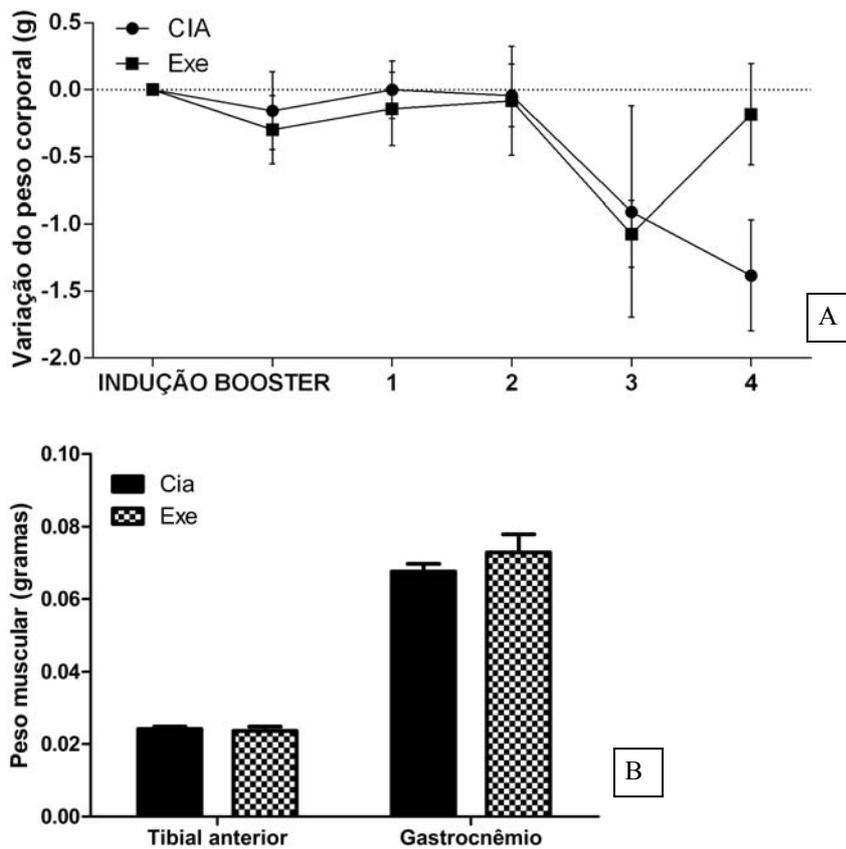


Figura 2: Efeito do exercício aeróbico sobre o peso dos animais e peso muscular. (A) Variação do peso durante as semanas de experimento; (B) Peso dos músculos tibial anterior e gastrocnêmio no 28º de doença. Valores expressos em média \pm EP.

Também foi avaliada a locomoção espontânea dos animais. Não foi demonstrada alteração na distância percorrida nos animais do grupo CIA (385,9cm) quando comparados com o grupo EXE (363,8cm) (Figura 3).

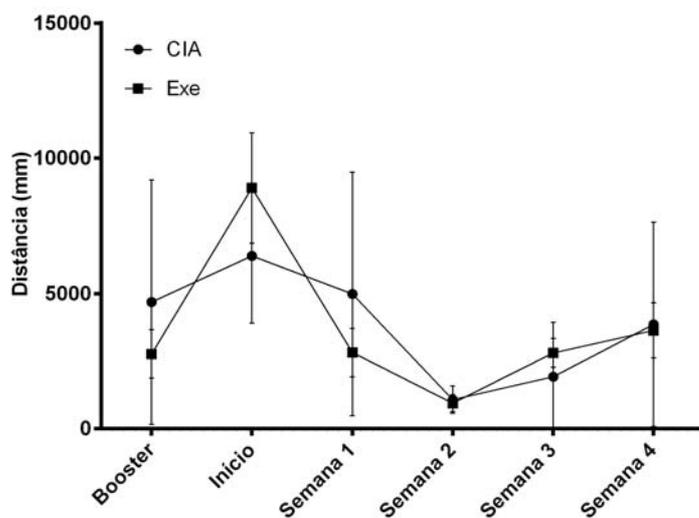


Figura 3: Efeito do exercício aeróbico na locomoção espontânea. Valores expressos em médias \pm EP.

Estudo histopatológico

Mesmo não demonstrando diferença significativa nos parâmetros clínicos avaliados, quando estudada a histopatologia da articulação tibiotarsal foi observada redução apesar de não significativa, em alguns parâmetros, principalmente na erosão cartilaginosa e óssea (Figura 4).

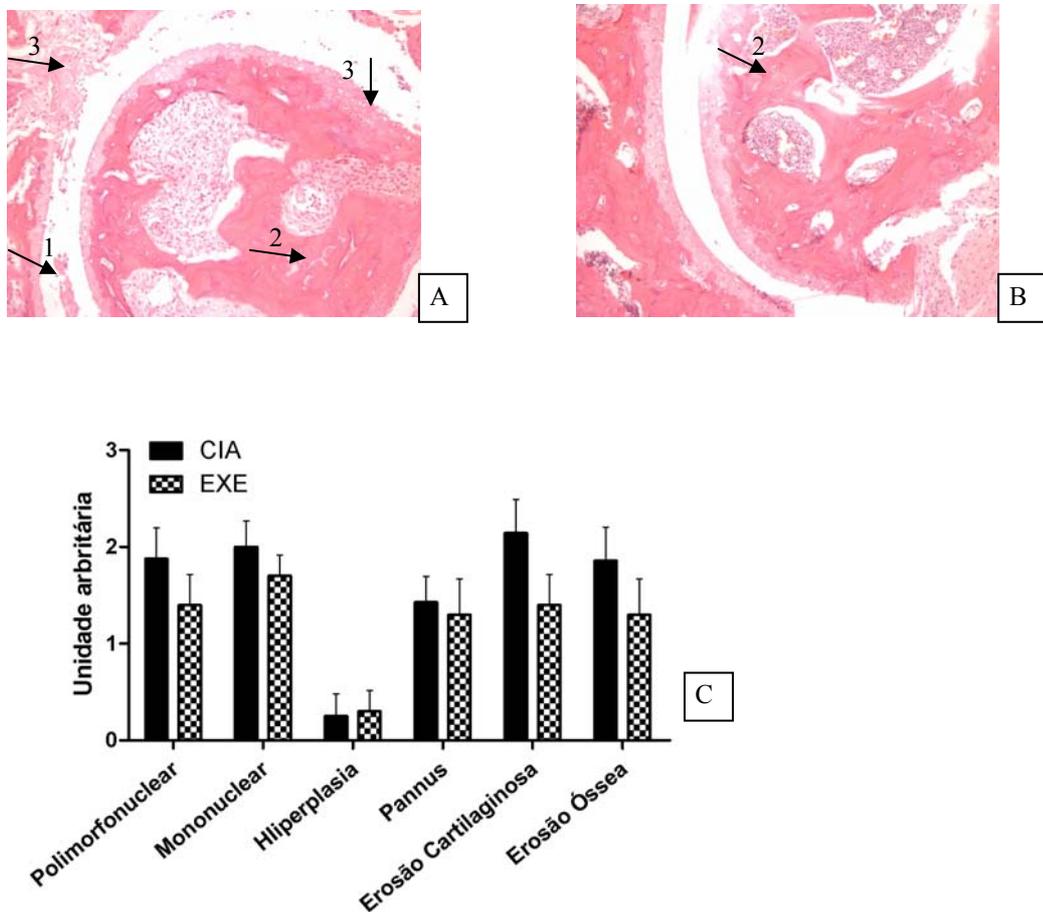


Figura 4: Impacto do exercício físico sobre parâmetros histopatológicos da articulação Tibiotarsal. (A) CIA; (B) EXE; (C) Gráfico com escore dos parâmetros da histopatológica articular. 1-Formação do Pannus invasivo, 2-Erosão óssea, 3-Erosão Cartilaginosa. Aumento de 200x. Valores expressos em médias \pm EP.

Após avaliar os parâmetros clínicos e a histopatologia da articulação tibiotarsal que confirmou a presença da doença, a área da miofibrila (gastrocnêmio e tibial anterior) foi mensurada. Observamos a diminuição da perda muscular do grupo EXE, tanto no músculo gastrocnêmio quanto do tibial anterior, apresentando uma área de $598\mu\text{m}^2 \pm 58$ e $607\mu\text{m}^2 \pm 40$ no grupo EXE enquanto no grupo CIA apresenta área de $481\mu\text{m}^2 \pm 63$ e $503\mu\text{m}^2 \pm 32$, respectivamente. Esse resultado representa um aumento médio de 24% da área muscular quando comparamos o grupo EXE em relação ao CIA ($p < 0,05$) (Figura 5).

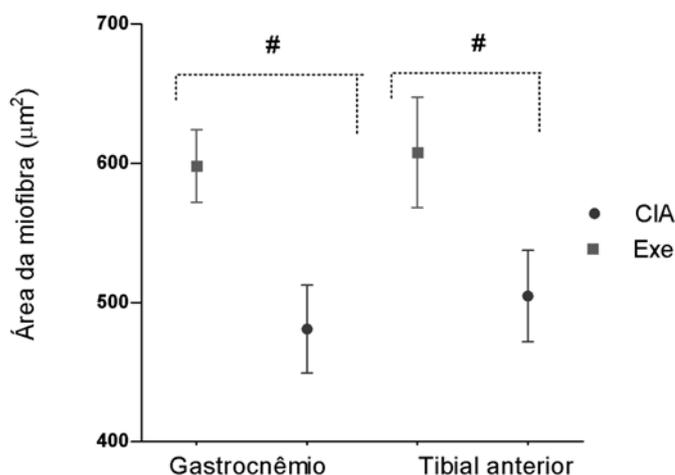


Figura 5: Efeito do exercício aeróbico sobre a área da miofibrila. Os valores são expressos em médias \pm EP. # $p < 0,05$

DISCUSSÃO

Estudos de modelos animais, em que a indução e a evolução da doença são sincronizadas e mais previsíveis, têm grande importância para determinar a contribuição dos tipos celulares específicos e moléculas efetoras durante a indução e o desenvolvimento da artrite [42]. A CIA compartilha várias características com AR, como o colágeno tipo II, a principal proteína da cartilagem e um dos potenciais autoantígenos da AR, nesse modelo o CII leva a artrite experimental autoimune, com inflamação da sinóvia articular, destruição do tecido cartilaginoso e ósseo, semelhante ao acometimento articular humano, mesmo apresentando ausência do fator reumatoide [43].

Nosso estudo não observou diferença dos parâmetros clínicos, como peso, edema e escore da doença. Porém, a ausência de significância na variável do peso pode ser explicado pelo período de treinamento (4 semanas), ou seja, se o protocolo de exercício fosse continuado talvez o peso dos animais fosse estatisticamente diferente, pois na última semana de treinamento os animais demonstraram ganho de peso (Figura 2a). Em estudo similar de Navarro et al [29], que utilizaram ratas Wistar com CIA, também não observaram diferença nesses parâmetros clínicos entre os animais artríticos quando comparados com os animais exercitados com natação. Segundo os autores a natação, embora não tenha impactado diretamente sobre os parâmetros clínicos, foi capaz de aumentar a capacidade aeróbia e a força muscular, além de reduzir em 10% a inflamação articular. Neste modelo o exercício conseguiu diminuir a migração de linfócitos e macrófagos para a articulação no modelo de CIA. Benefícios também têm sido demonstrados em estudos clínicos. Neuberger et al [44] avaliou 220 pacientes submetidos a caminhadas moderadas de uma hora com frequência cardíaca máxima de 60%, exercitando 3 vezes por semana durante um período de 12 semanas, e demonstraram redução da dor, fadiga e depressão. Van den Berg *et. al* observou uma pequena redução na atividade da doença de pacientes que realizaram caminhadas diárias por um ano, porém essa redução não foi estatisticamente significativa [45].

Hartog *et. al* [18], em modelo de CIA avaliou a locomoção espontânea e demonstrou forte correlação entre a diminuição da locomoção com o aumento do escore da artrite. Esses autores concluem que a detecção quantitativa da locomoção corresponde a alterações clínicas, indicando a gravidade da doença. Em recente trabalho do nosso grupo (dados não publicados) foi demonstrado que animais CIA reduzem 90% da distância

percorrida quando comparados com animais saudáveis e essa redução estava associada com a perda muscular e peso corporal. Nesse estudo, a perda muscular, avaliada através de seções transversais do músculo gastrocnêmio, demonstrou redução de 34%. Okiura *et. al* [46] em estudo semelhante observou um redução de 15% na área da miofibrila de animais com CIA. A redução da área da miofibrila pode estar associada à atividade inflamatória da doença, desequilíbrio entre a síntese e degradação proteica, alterações metabólicas e ingestão alimentar reduzida [47].

Nossos achados mostram redução na perda da massa muscular avaliado pela área da miofibrila, onde animais com artrite experimental, quando submetidos ao exercício aeróbico apresentam área da miofibrila 24% maior que animais com CIA (Figura 5). Cabe salientar que camundongos DBA1/J saudáveis apresentam cerca de 700 μm^2 na área da miofibrila, ou seja, animais em fase avançada de doença (escore clínico grau 4) quando submetidos a exercício aeróbico moderado demonstram decréscimo de somente 10% na área muscular em relação à animais saudáveis. A fibra muscular esquelética é formada durante a miogênese e utiliza as células satélites (CS) para os seu reparo [48]. Essas células são percussores miogênicos que em adultos estão quiescentes e diferenciam-se frente a uma resposta de estresse como trauma, estímulo de crescimento ou exercício físico [49]. Portanto, essas células podem estar sendo estimuladas para entrar no ciclo celular e diferenciar-se em novas miofibrilas, reduzindo assim a perda muscular relacionado à doença articular inflamatória crônica. No entanto, essa relação não é clara na literatura. Treinamento de resistência de alta intensidade progressiva produz um aumento na massa magra e redução de massa gorda [50, 51], o que corrobora com os nossos achados acerca da área da miofibrila (figura 5) e aumento do peso (figura 3a).

Na literatura já é descrito que o exercício físico exerce ação antiinflamatória e a principal citocina envolvida nessa modulação é a IL-6 [52, 53]. Esse efeito antiinflamatório é caracterizado pelo aumento plasmático de IL-10 e de receptores solúveis de TNF I e II, induzidos pela IL-6 [53]. Além disso, a prática de exercício, que restaura a massa muscular, tem mostrado melhora substancial na função física, com redução da incapacidade em pacientes com AR [50, 54, 55]. Estudo de Lynberg *et al.* [56] mostrou que o exercício físico de fortalecimento muscular não agrava a inflamação articular (sinovite, edema e dor articular), pois pacientes com doença ativa moderada apresentaram redução da atividade da doença nas articulações após o exercício [57]. Acredita-se que no processo inflamatório da artrite ocorre a proliferação da membrana sinovial e ação de citocinas como IL-1 e TNF- α , quebrando as camadas superficiais da cartilagem articular, causando edema e inflamação [58]. Algumas evidências sugerem que os ciclos intermitentes de aumento da pressão intra-articular durante o exercício aumenta o fluxo de sangue sinovial, o que sugere um efeito benéfico do exercício na inflamação causada pela artrite [30]. Esse poderia ser um mecanismo relacionado com a pequena melhora observada na articulação tibiotarsal, onde mostra uma diminuição no infiltrado inflamatório e redução da erosão do tecido ósseo e cartilaginoso (figura 4). Galois *et. al* em modelo de osteoartrose com animais submetidos a exercício aeróbico em esteira, demonstrou redução na erosão do tecido ósseo a partir da segunda semana de exercício [59].

Assim, o incentivo para o exercício torna-se parte habitual em cuidados de reumatologia em paciente, especialmente aqueles com doença mais branda, pois ameniza principalmente a perda muscular acometida pela artrite, também diminuindo os efeitos da AR nas células do sistema imune e aumentando a força muscular e a capacidade aeróbica. Como foi demonstrado nos nossos achados com a redução da atrofia muscular, bem como uma melhora mesmo que não significativa da articulação tibiotarsal e o aumento de peso na última semana de exercício, mostrando que o exercício aeróbico é capaz de promover uma melhora na qualidade de vida dos

pacientes com artrite reumatoide, pois torna-se uma alternativa na prevenção da perda muscular ocasionada PR essa doença.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao laboratório de Patologia Experimental, pelo apoio nas análises histológicas, a Unidade de Experimentação Animal pelos cuidados com os camundongos. Ao CNPq, FAPERGS e FIPE-HCPA, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kinne RW, Brauer R, Stuhlmuller B, Palombo-Kinne E, Burmester GR. Macrophages in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2(3):189-202.
2. Altindag O, Karakoc M, Kocyigit A, Celik H, Soran N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2007; 40(3-4):167-71.
3. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2010; 376(9746):1094-108.
4. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, Ferraz MB. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the copcord approach. *J Rheumatol* 2004; 31(3):594-7.
5. Mota LM. Consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia 2011 para diagnóstico e avaliação inicial da artrite reumatoide. In: Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, *et al.* eds, Vol. 51. Brasil, 2011:199-219.
6. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet* 2001; 358(9285):903-11.
7. Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CCJ, Plum F. *Medicina Interna Básica*. Livro 1998:568-70.
8. Klimiuk PA, Yang HY, Goronzy JJ, Weyand CM. Production of cytokines and metalloproteinases in rheumatoid synovitis is T cell dependent. *Clinical Immunology* 1999; 90(1).
9. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Immunology* 2007; 7(6).
10. Magyar E, Talerma A, Mohacsy J, Wouters HW, de Bruijn WC. Muscle changes in rheumatoid arthritis. A review of the literature with a study of 100 cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1977; 373(3):267-78.
11. Khurana R, Berney SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 2005; 12(3):153-65.
12. Miro O, Pedrol E, Casademont J, Garcia-Carrasco M, Sanmarti R, Cebrian M, Grau JM. Muscle involvement in rheumatoid arthritis: clinicopathological study of 21 symptomatic cases. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 25(6):421-8.
13. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287(4):C834-43.
14. Teixeira VdON, Filippin LI, Xavier RM. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. *Revista Brasileira de Reumatologia* 2012; 52:252-529.
15. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology* 2008; 23(3).
16. Degens H, Erskine RM, Morse CI. Disproportionate changes in skeletal muscle strength and size with resistance training and ageing. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 2009; 9(3).
17. Reeves ND, Narici MV, Maganaris CN. Myotendinous plasticity to ageing and resistance exercise in humans. *Experimental Physiology* 2006; 91(3).
18. Hartog A, Hulsman J, Garssen J. Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 2009; 10:59.

19. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, *et al.* Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2011; 70(8):1357-62.
20. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology* 2009; 39(8):2040-4.
21. Chappell JD, Yu B, Kirkendall DT, Garrett WE. A comparison of knee kinetics between male and female recreational athletes in stop-jump tasks. *Am J Sports Med* 2002; 30(2):261-7.
22. Larsson P, Goldschmidt TJ, Klareskog L, Holmdahl R. Oestrogen-mediated suppression of collagen-induced arthritis in rats. Studies on the role of the thymus and of peripheral CD8⁺ T lymphocytes. *Scand J Immunol* 1989; 30(6):741-7.
23. Niedbala W, Cai B, Wei X, Patakas A, Leung BP, McInnes IB, Liew FY. Interleukin 27 attenuates collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(10):1474-9.
24. Song H, Qiao F, Atkinson C, Holers VM, Tomlinson S. A complement C3 inhibitor specifically targeted to sites of complement activation effectively ameliorates collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *J Immunol* 2007; 179(11):7860-7.
25. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Cheng Y, Kojda G, Harrison DG. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 105(11):1631-9.
26. Lau YS, Patki G, Das-Panja K, Le WD, Ahmad SO. Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *European Journal of Neuroscience* 2011; 33(7):1264-74.
27. Brukner PD, Brown WJ. 3. Is exercise good for you? *Medical Journal of Australia* 2005; 183(10):538-41.
28. Richards SCM, Scott DL. Prescribed exercise in people with fibromyalgia: parallel group randomised controlled trial. *British Medical Journal* 2002; 325(7357):185-7.
29. Navarro F, Bacurau AVN, Almeida SS, *et al.* Exercise prevents the effects of experimental arthritis on the metabolism and function of immune cells. *Cell Biochemistry and Function* 2010; 28(4):266-73.
30. Plasqui G. The role of physical activity in rheumatoid arthritis. *Physiology & Behavior* 2008; 94(2):270-5.
31. Van Den Ende CHM, Vlieland T, Munneke M, Hazes JMW. Dynamic exercise therapy in rheumatoid arthritis: A systematic review. *British Journal of Rheumatology* 1998; 37(6):677-87.
32. Nader GA, Lundberg IE. Exercise as an anti-inflammatory intervention to combat inflammatory diseases of muscle. *Current Opinion in Rheumatology* 2009; 21(6):599-603.
33. Council NR. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eighth edn. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.
34. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols* 2007; 2(5):1269-75.
35. Oliveira PG, Grespan R, Pinto LG, *et al.* Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 2011; 63(10):2956-65.
36. Douni E, Armaka M, Kontoyiannis DL, Kollias G. Functional genetic and genomic analysis of modeled arthritis. *Adv Exp Med Biol* 2007; 602:33-42.
37. Song SK, Shimada N, Anderson PJ. Orthogonal diameters in the analysis of muscle fibre size and form. *Nature* 1963; 200:1220-1.

38. Brooke MH, Engel WK. The histographic analysis of human muscle biopsies with regard to fiber types. I. Adult male and female. *Neurology* 1969; 19(3):221-33.
39. Rioja I, Bush KA, Buckton JB, Dickson MC, Life PF. Joint cytokine quantification in two rodent arthritis models: kinetics of expression, correlation of mRNA and protein levels and response to prednisolone treatment. *Clinical and Experimental Immunology* 2004; 137(1):65-73.
40. Torres R, Macdonald L, Croll SD, *et al.* Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2009; 68(10):1602-8.
41. Duarte J, Agua-Doce A, Oliveira VG, Fonseca JE, Graca L. Modulation of IL-17 and foxp3 expression in the prevention of autoimmune arthritis in mice. *Plos One* 2010; 5(5).
42. Wipke BT, Allen PM. Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology* 2001; 167(3).
43. Brenner M, Meng HC, Yarlett NC, Joe B, Griffiths MM, Remmers EF, Wilder RL, Gulko PS. The non-MHC quantitative trait locus Cia5 contains three major arthritis genes that differentially regulate disease severity, pannus formation, and joint damage in collagen-and pristane-induced arthritis. *Journal of Immunology* 2005; 174(12):7894-903.
44. Neuberger GB, Aaronson LS, Gajewski B, Embretson SE, Cagle PE, Loudon JK, Miller PA. Predictors of exercise and effects of exercise on symptoms, function, aerobic fitness, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research* 2007; 57(6).
45. van den Berg MH, Roday HK, Peeters AJ, le Cessie S, van der Giesen FJ, Breedveld FC, Vlieland TPMV. Using Internet technology to deliver a home-based physical activity intervention for patients with rheumatoid arthritis: A randomized controlled trial. *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research* 2006; 55(6).
46. Okiura T, Nagatomo F, Gu N, Taguchi Y, Morimatsu F, Ishihara A. Bone density of the femur and fiber cross-sectional area and oxidative enzyme activity of the tibialis anterior muscle in type II collagen-induced arthritic mice. *J Physiol Sci* 2008; 58(4):221-7.
47. Matschke V, Murphy P, Lemmey AB, Maddison P, Thom JM. Skeletal muscle properties in rheumatoid arthritis patients. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2010; 42(12):2149-55.
48. Cooper WG, Konigsberg IR. Dynamics of myogenesis in vitro. *Anatomical Record* 1961; 140(3).
49. Hawke TJ, Geary DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. (vol 91, pg 534, 2001). *Journal of Applied Physiology* 2001; 91(6).
50. Lemmey AB, Marcora SM, Chester K, Wilson S, Casanova F, Maddison PJ. Effects of high-intensity resistance training in patients with rheumatoid arthritis: A randomized controlled trial. *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research* 2009; 61(12).
51. Marcora SM, Lemmey AB, Maddison PJ. Can progressive resistance training reverse cachexia in patients with rheumatoid arthritis? Results of a pilot study. *Journal of Rheumatology* 2005; 32(6).
52. Pedersen BK, Fischer CP. Beneficial health effects of exercise - the role of IL-6 as a myokine. *Trends in Pharmacological Sciences* 2007; 28(4).
53. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of Applied Physiology* 2005; 98(4).

54. de Jong Z, Munneke M, Zwinderman AH, *et al.* Is a long-term high-intensity safe in patients with exercise program effective and rheumatoid arthritis? Results of a randomized controlled trial. *Arthritis and Rheumatism* 2003; 48(9).
55. Lemmey A. Exercise for rheumatoid arthristis patients. *Rheumatology* 2012; 51:3-.
56. Lyngberg KK, Ramsing BU, Nawrocki A, Harreby M, Danneskioldsamsoe B. Safe and effective isokinetic knee extension training in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1994; 37(5).
57. Carotti M, Salaffi F, Manganelli P, Salera D, Simonetti B, Grassi W. Power Doppler sonography in the assessment of synovial tissue of the knee joint in rheumatoid arthritis: a preliminary experience. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2002; 61(10).
58. Rannou FO, Francois M, Corvol MT, Berenbaum F. Cartilage breakdown in rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 2006; 73(1).
59. Galois L, Etienne S, Grossin L, Cournil C, Pinzano A, Netter P, Mainard D, Gillet P. Moderate-impact exercise is associated with decreased severity of experimental osteoarthritis in rats. *Rheumatology* 2003; 42(5).