

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Biomarcadores de caquexia reumatoide  
– uma abordagem metabólica em modelo experimental de artrite

Paulo Vinicius Gil Alabarse

Porto Alegre, Brasil

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Biomarcadores de caquexia reumatoide  
– uma abordagem metabólica em modelo experimental de artrite

Autor: Paulo Vinicius Gil Alabarse

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Tese de Doutorado submetida à avaliação como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

## Banca Examinadora:

Luis Portela (Avaliador externo – Bioquímica UFRGS)

Odirlei Monticielo (Avaliador interno – PPGCM – UFRGS)

Pércio Gulko (Avaliador externo – Icahn School of Medicine at Mount Sinai)

Rafael Chakr (Avaliador interno – PPGCM – UFRGS)

## Agradecimentos

É com grande alegria que agradeço a tantos que contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Em primeiro lugar, ao professor Ricardo M. Xavier, meu orientador, que aceitou o desafio de me orientar mesmo sem me conhecer previamente, que me desafiou a desenvolver pesquisa de ponta junto ao grupo do Laboratório de Doenças Autoimunes. Por toda a orientação, apoio e dedicação, meu muito obrigado!

Agradeço a todas companheiras do Lab DAI pela ajuda contínua, discussões, críticas e atenção, desde aquelas que não trabalharam diretamente com esta pesquisa, Patrícia Oliveira, Mirian Farinon, Vanessa Clarimundo, que tornaram o ambiente de trabalho muito produtivo. Em especial à equipe que aceitou partilhar do desafio de desenvolver este trabalho: às iniciações científicas da graduação mais comprometidas que já conheci – Andrelise Almeida, Mayara Oliveira, Mônica Immig –, às agora mestres, que acompanharam meu crescimento e me desafiaram com muito conhecimento e prática nas atividades diárias – Jordana Souza, Eduarda Freitas, Rafaela Cavalheiro –, às doutoras que acompanharam de perto, atendendo a todas minhas necessidades de aprendizado e contribuindo com as melhores discussões possíveis, trazendo toda a qualidade deste trabalho que, em muito especial, agradeço: à Lidiane Filippin, que trouxe a linha de pesquisa para o laboratório e levantou a hipótese; à Priscila Lora, que não apenas deu todo o apoio, mas acreditou em mim e lutou para que o projeto fosse realizado e meu doutorado sanduíche pudesse existir; à Vivian Teixeira, que é minha amiga desde a graduação, quem me convidou a ingressar neste laboratório impressionante, que desenvolveu inúmeras partes de extrema importância como um braço direito, sempre disponível e atenta para ajudar. Agradeço aos colegas que passaram pelo laboratório e estão na memória com suas contribuições significativas.

Agradeço ao Stephen Young, meu supervisor no Reino Unido, que me acompanhou e ensinou muito e tornou este trabalho de qualidade ímpar. À equipe do Rheumatoid Research Group da University of Birmingham, em especial ao Rowan Hardy, que aceitou me ensinar algo mais do que havia sido proposto, à Camilla Bathrust, que auxiliou lado à lado na bancada da universidade, tirando todas as minhas dúvidas e tornando a experiência de trabalho mais agradável.

Agradeço à minha família, como sempre, pelo apoio, possibilidade de poder chegar até o doutorado, incentivo contínuo, então: Paulo e Bete Alabarse, meu sincero muito obrigado. Aos meus irmãos, que sempre me serviram de estímulo e de exemplo: Frederico e Priscila Alabarse, meu muito obrigado!

Agradeço a amigos, conhecidos e profissionais, que me acompanharam e de alguma forma tornaram possível minha formação.

Por último, e tão especial, agradeço de todo o coração a mulher mais importante da minha vida: Cintia Rosa, a pessoa que mais amo, que tão de perto acompanhou, que tanto entendeu e auxiliou em todos momentos. Esta que aceitou tornar os dias no Reino Unido mais ensolarados e produtivos, que apoiou todos os passos e nunca me deixou esquecer o mais importante.

## Resumo

**Base teórica:** Artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que afeta as articulações e progride de maneira simétrica e erosiva. Além dos achados articulares, pode ocorrer de perda muscular e síndrome da caquexia. Atualmente, não existe um marcador que sirva de preditor da síndrome de caquexia reumatoide. Estudos metabólicos em pacientes com AR demonstram uma complexidade em encontrar um biomarcador para caquexia. Ademais, não há modelo experimental de caquexia descrito na literatura, mas o modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) possui potencial de ser modelo de caquexia reumatoide. A partir deste modelo, pode-se fazer a busca por biomarcadores de caquexia reumatoide via metabólica.

**Objetivo:** Avaliar o modelo de CIA como modelo experimental de caquexia reumatoide. Avaliar o perfil metabólico da urina no modelo de CIA e correlacionar com parâmetros clínicos de caquexia reumatoide em busca de possíveis biomarcadores.

**Métodos:** Camundongos machos DBA/1J foram induzidos (CIA; n=13) no dia zero e receberam reforço 18 dias após, e grupo mantidos saudáveis sem indução (CO; n=11). Nos dias 0, 18, 25, 35, 45, 55 e 65 após a indução, foram realizados: coleta de urinas; teste de desempenho físico; teste de locomoção espontânea; teste de força; medida do volume do edema da pata traseira; avaliação do escore clínico; pesagem; e avaliação da ingestão alimentar. Após os 65 dias, os animais foram eutanasiados e tecidos musculares (gastrocnêmio – GA; e tibial anterior – TA) foram dissecados para pesagem e realização da razão sarcoplasmática. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni, ou teste t de Pearson, com significância a partir de um  $p < 0,05$ . A urina coletada foi submetida à ressonância nuclear magnética (1D e 2D J-res). Os metabolitos foram identificados via Chenomx (1D) e pelo Birmingham Metabolite Library (BML; 2D J-res). Utilizou-se o modelo estatístico de PCA, PLSDA e PLSR para criar ranqueamento de metabolitos (significância a partir de um  $p < 0,05$ ). Analizou-se as rotas metabólicas via Metaboanalyst a partir do ranqueamento de metabolitos obtidos. Os metabolitos obtidos foram filtrados para rotas metabólicas que ocorrem no músculo para identificação de potenciais biomarcadores de perda muscular.

**Resultados:** O grupo CIA apresentou redução de até 24% na locomoção espontânea, de até 66% na força e de até 24% no teste de desempenho físico após 35 dias da indução, bem como redução no peso do GA (24%) e TA (25%), e relação sarcoplasmática (22 e 23%, respectivamente) em relação ao grupo CO. Os modelos estatísticos de PCA, PLSDA e PLSR, e o filtro pelas rotas metabólicas relacionadas com o músculo geraram uma lista de 28 metabolitos e relacionados com o desenvolvimento da doença, sendo eles: 3-metilhistidina, 4-aminobutirato, acetilcolina, arginina, aspartato, carnosina, creatina, creatinina, glutamina, histamina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, lisina, mio-inositol, dimetilglicina, acetilalanina, acetilmetionina, pantotenato, fenilalanina, fosfocolina, fosfocreatina, piridoxina, sarcosina, succinilacetona, tiamina, e urocanato.

**Conclusão:** Em concordância com os resultados de redução nos parâmetros de: massa muscular, locomoção espontânea, força e desempenho físico, somando-se a ausência de anorexia bem como mudança no peso, o modelo animal de CIA representa um modelo experimental próprio para caquexia reumatoide. A análise do perfil metabólico deste modelo permite sugerir 28 metabolitos relacionados ao processo de perda muscular, que podem vir a ser biomarcadores de caquexia reumatoide, objetivando prognóstico, diagnóstico e acompanhamento da síndrome. Destes metabolitos, os principais são pertencentes ao metabolismo de: histidina; arginina e prolina; glicina, serina e treonina; fosfocreatina, bem como outros aminoácidos e vitaminas do complexo B.

**Palavras chave:** Ressonância Nuclear Magnética; perda muscular; artrite induzida por colágeno; biomarcador; metabólica; caquexia; artrite reumatoide; autoimunidade.

## Abstract

**Background:** Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease that affects the joints and has a symmetric development and it is erosive. Besides joint damage, it can develop muscle loss progress into cachexia syndrome. Currently, there is no marker that can predict its development in rheumatoid patients. Metabolomics in RA have shown to be complex to find out a biomarker for this syndrome. Also, there is no experimental model of cachexia described in literature yet; however the collagen-induced arthritis (CIA) animal model seems to be a feasible model for rheumatoid cachexia. With this model, the research for a biomarker of rheumatoid cachexia can be done by metabolomics.

**Objectives:** It will be evaluated if the CIA animal model can be also an animal model of rheumatoid cachexia. Afterwards, it will be evaluated a metabolic profile from urine of this animal model and correlate with clinical signs of rheumatoid cachexia to find out plausible biomarkers of it.

**Methods:** Male DBA/1J mice were submitted to CIA (n=13), immunization occurred at day zero and a booster was performed 18 days after, and a healthy group with no induction (CO; n=11). At the 0, 18, 25, 35, 45, 55 and 65 days after the first injection, it was done: urine collection; physical performance test; free exploratory locomotion test; strength test; hindpaw edema volume measurement; follow up disease development; weighted; and food intake. After the 65 days, animals were euthanized and muscle (gastrocnemius – GA; and tibial anterior – TA) were dissected, and weighted for sarcoplasmic ratio. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc, and t-test of Pearson, and statistical critical limit was set for  $p < 0.05$ . The collected urine was used for nuclear magnetic resonance (1D and 2D J-res). Metabolites were identified by Chenomx (1D) and by the Birmingham Metabolite Library (BML; 2D J-res). Statistical models were performed using PCA, PLS-DA and PLSR to create a ranking list of the metabolites (statistical critical limit was set for  $p < 0.05$ ). It was analyzed the metabolic pathway by Metaboanalyst from the data of metabolite ranking list. Then, the metabolite list was filtered by the metabolic pathways that take place in muscle tissue, in order to identify plausible biomarkers of muscle loss.

**Results:** CIA group has shown reduction in up to 24% of free locomotion fatigue, up to 66% of strength and up to 24% of endurance physical performance after 35 days of the induction, as well as a decrease in GA (24%) and TA (25%) weight, and sarcoplasmic ratio also reduced (22 and 23%, respectively) related to CO group. The PCA, PLS-DA and PLSR statistical models, and the filter by metabolic pathways related to muscle provided a list of 28 metabolites related to disease development, as can be listed: 3-methylhistidine, 4-aminobutyrate, acetylcholine, arginine, aspartate, carnosine, creatine, creatinine, glutamine, histamine, histidine, isoleucine, leucine, methionine, lysine, myo-inositol, dimethylglycine, acetylaniline, acetylmethionine, pantothenate, phenylalanine, phosphocholine, phosphocreatine, pyridoxine, sarcosine, succinylacetone, thiamine, and urocanate.

**Conclusions:** Accordingly with the data with reduction of: muscle mass, spontaneous locomotion, strength and physical performance, added with absence of anorexia as well as weight change, CIA animal model is a feasible experimental model for rheumatoid cachexia. Concerning the metabolic profile from this model, it can be suggested 28 metabolites related to muscle loss in which can be tested for biomarker of rheumatoid cachexia, targeting prognosis, diagnosis, and syndrome follow up. From those metabolites, the main ones are engaged to metabolism of: histidine; arginine and proline; glycine, serine and threonine; phosphocreatine, as well as other amino acids and vitamins from B complex.

**Key Words:** Nuclear Magnetic Resonance; muscle loss; collagen-induced arthritis; biomarker; metabolomics; cachexia; rheumatoid arthritis; autoimmunity.

## Lista de imagens

Figura 1	Efeito de Warburg
Figura 2	Ressonância Nuclear Magnética – Aquisição do sinal
Figura 3	Espectro de RNM em duas dimensões
Figura 4	Alinhamento de espectros
Figura 5	Processamento total de cada espectro
Figura 6	Interface de identificação dos metabólitos via Chenomx
Figura 7	Rota do metabolismo da histidina do Metaboanalyst
Figura 8	Marco Teórico
Figura 9	Desenho experimental

## Índice

Agradecimentos.....	4
Resumo .....	5
Abstract.....	6
Lista de imagens.....	7
Introdução.....	10
Revisão da Literatura .....	12
Estratégias para localizar e selecionar informações.....	12
Inflamação.....	12
Artrite Reumatoide .....	14
Artrite Reumatoide e Síndrome da Caquexia .....	15
Modelo Experimental de Artrite.....	17
Diagnóstico e Marcadores de Caquexia.....	18
Metabolômica.....	19
Metabolômica e AR.....	27
Marco Teórico.....	29
Justificativa.....	30
Objetivos .....	31
Objetivos Gerais.....	31
Objetivos Específicos .....	31
Desenho experimental.....	32
Referências.....	35
Sítios citados .....	40
Artigo.....	41
Conclusão.....	78
Perspectivas Futuras .....	80

*“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância”. Hipócrates*

## Introdução

A longevidade vem aumentando entre os seres humanos, porém sem o acompanhamento da saúde, resulta em uma população idosa mais afetada com processo de perda muscular, levando a uma qualidade de vida cada vez pior [1]. A perda de peso na população mais velha está altamente relacionada à aumentado risco de morte e este risco relaciona-se fortemente aos fatores de: idade avançada, perda de peso e perda de massa do músculo esquelético. Tanto no caso de envelhecimento saudável quanto relacionado as doenças inflamatórias, a perda muscular é observada e, neste último caso, acentuada [1].

A inflamação é um processo essencial para a manutenção dos seres vivos e este processo é responsável pela defesa do nosso organismo contra patógenos e pela manutenção de tecidos lesados [2]. Apesar de ser inicialmente benéfico, em doenças inflamatórias crônicas, há distúrbios na homeostase do processo inflamatório [3].

Na inflamação, o metabolismo celular sofre drásticas alterações [4], como o aumento da taxa de proliferação celular mediado por células inflamatórias e consequente aumento no gasto energético celular. Essas alterações modificam as principais rotas metabólicas.

Outra relação existente entre a inflamação e o metabolismo é observada no metabolismo de lipídios. Como exemplo, a produção de prostaglandinas - importante mediador inflamatório - utiliza como substrato os fosfolipídios que compõe a membrana celular [5]. Além disso, os linfonodos estão situados dentro do tecido adiposo e este tecido adiposo é amplamente infiltrado por macrófagos [6]. Dessa forma, pela presença dos linfonodos justaposto ao tecido adiposo e por este tecido estar repleto de macrófagos, que utilizam grandes quantidades dos lipídeos para a produção de mediadores inflamatórios, ressalta-se assim a interligação entre processo inflamatório e metabolismo de lipídios.

Dentre as doenças inflamatórias crônicas, podemos citar a artrite reumatoide (AR). Esta é uma doença sistêmica, caracterizada por inflamação da sinóvia, simétrica, produção de auto-anticorpos e pela destruição da cartilagem e do osso subcondral [7]. Trata-se de uma doença reumática de alta prevalência e de alta morbidade. Além disso, um distúrbio metabólico comum a estes pacientes é a atrofia muscular acentuada e a chamada síndrome da caquexia, que está associada a um pior prognóstico nos pacientes com AR [8].

A síndrome da caquexia representa uma resistência anabólica que resulta em uma falha no músculo em sintetizar mais proteínas [9]. A caquexia (do grego, “cacos”: ruim e “hexis”: ter, ou seja, condição ruim) é definida como um estado metabólico complexo acentuado pela progressão de doenças e é caracterizada por perda da massa muscular

acelerada em adultos [10, 11]. A caquexia vem ganhando importância cada vez maior tanto na pesquisa quanto na clínica [12].

Em pacientes com AR, a caracterização da síndrome da caquexia apresenta uma perda muscular sem alteração no tecido adiposo, podendo inclusive ser mascarada pela mesma [9]. Dada esta principal diferença da caquexia em pacientes com AR, que não ocorre em pacientes oncológicos e em muitas das outras doenças inflamatórias crônicas, Roubenoff cunhou pela primeira vez o termo caquexia reumatoide [8, 13, 14]. Assim, ofereceu-se um nome que diferenciaria dos demais casos de caquexia ocasionados por outras doenças, dadas a caracterização mais própria decorrente da AR.

A atrofia muscular é um sinal extra-articular relevante na AR, pois estima-se que até 66% dos pacientes apresentem caquexia [15, 16]. São atribuídos diversos fatores causais à atrofia muscular, como: exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias (e.g. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), limitação na atividade física e ativação de distintas cascatas intracelulares induzindo à degradação proteica [15, 16].

Uma importante ferramenta para o estudo da AR são os modelos experimentais, como o da artrite induzida por colágeno (CIA), por mimetizar a AR [17]. Esses modelos são amplamente usados, pois demonstram semelhanças morfológicas com a artrite em humanos, incluindo padrões da sinovite, erosão da cartilagem articular e osso, bem como a exacerbação na produção de citocinas pró-inflamatórias e características clínicas como dor, edema e perda funcional [18].

Como ainda não existem marcadores sensíveis e específicos para a identificação da caquexia decorrente da AR, torna-se necessária a busca por marcadores que permitam identificar a síndrome da caquexia, bem como a sua gravidade. O estudo do perfil metabólico tem sido utilizado para a identificação de biomarcadores em diversas doenças. Modelos animais de AR são convenientes para essa pesquisa inicial de biomarcadores, já que a única variável em questão é a doença e sua gravidade.

## Revisão da Literatura

### Estratégias para localizar e selecionar informações

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: Scielo, PubMed e Web of Knowledge. O período da pesquisa foi de 1963 a 2016. Foram realizadas buscas através da lista de termos e suas combinações: “cachexia”, “muscle”, “muscle loss”, “muscle wasting”, “muscle mass”, “rheumatoid arthritis”, “collagen-induced arthritis”, “experimental arthritis”, “arthritis”, “biomarkers”, “marker”, “metabolism”, “metabolic change”, “metabolomics” e “nuclear magnetic resonance”.

### Inflamação

O processo inflamatório decorrente de doenças inflamatórias crônicas acarreta alterações drásticas no metabolismo celular, modificando as principais rotas metabólicas. Nesse contexto, as células com aumento na taxa de divisão celular, como as neoplásicas ou do sistema imune na inflamação, sofrem mudanças no consumo da glicose. Assim, o produto final do metabolismo da glicose nestas células é alterado, pois, no lugar dos intermediários do ácido cítrico, a glicólise produz lactato (Figura 1) [4]. Essas mudanças são desencadeadas pela elevada demanda de energia em curto espaço de tempo, ou seja, produzir energia transformando o piruvato em lactato, sem a necessidade de oxigênio, acaba sendo mais rápido do que via ciclo do ácido cítrico, que depende de oxigênio e, apesar de ser mais eficiente na produção de energia, é mais demorado. As alterações citadas compõem um fenômeno conhecido como efeito de Warburg.

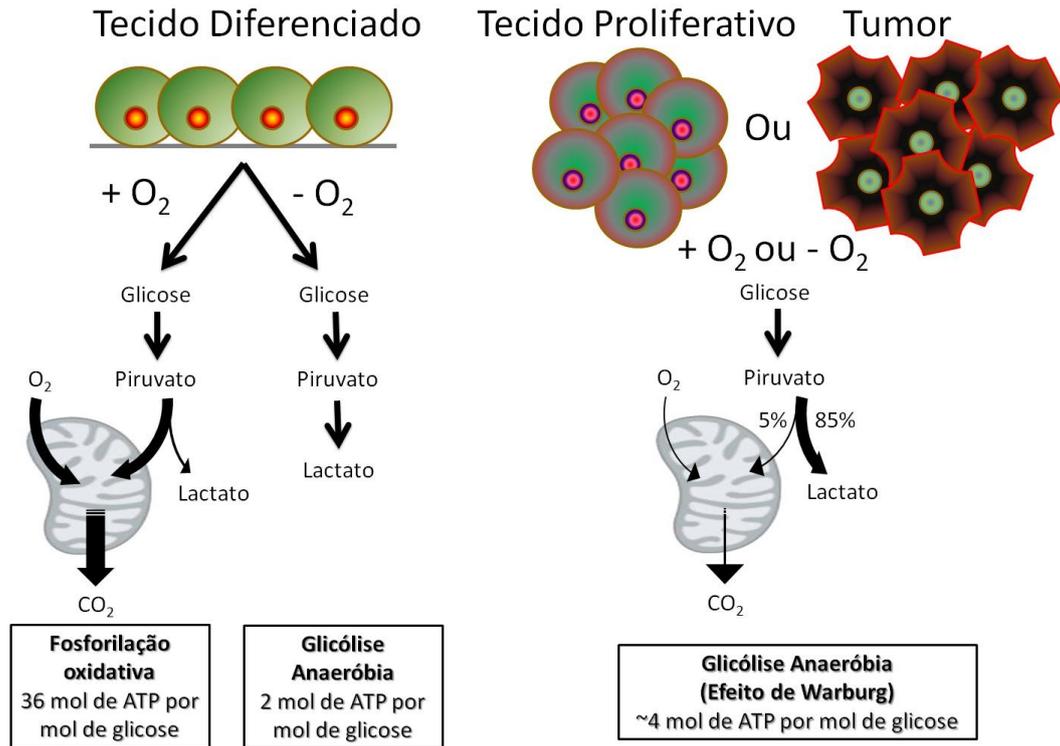


Figura 1. Em tecidos diferenciados (esquerda), em situação com presença de níveis normais de oxigênio ( $+ O_2$ ), a glicose sofre glicólise formando piruvato e, este, por sua vez, dá origem principalmente aos intermediários do ciclo do ácido cítrico na mitocôndria, resultando como produto final dióxido de carbono ( $CO_2$ ), esta chamada de fosforilação oxidativa possui eficiência de produzir 36 mol de ATP por mol de glicose, outra pequena parcela do piruvato formado irá dar origem à lactato. Em situação de níveis abaixo do normal de oxigênio ( $- O_2$ ), a glicose sofre glicólise formando piruvato e este é integralmente convertido em lactato, nesta situação, a glicólise anaeróbia gera apenas 2 mol de ATP por mol de glicose. Em tecidos proliferativos ou tumorais (direita), em níveis normais de oxigênio ( $+ O_2$ ) ou níveis abaixo do normal de oxigênio ( $- O_2$ ), a glicose sofre glicólise formando piruvato, e este, por sua vez, é principalmente convertido à lactato (cerca de 85%), enquanto que apenas uma pequena parcela de piruvato é convertido aos intermediários do ciclo do ácido cítrico (cerca de 5%). Este processo é chamado de Efeito de Warburg e gera aproximadamente 4 mol de ATP por mol de glicose. Esquema adaptado de <https://www.charlifoundation.org/ketogenic-therapy/therapies-2/brain-tumor-cancer/item/1024-the-warburg-effect>.

Dentre as células ativadas na resposta inflamatória que apresentam essa mudança no metabolismo energético, podemos citar neutrófilos e macrófagos. Tanto neutrófilos quanto macrófagos, quando ativadas, produzem citocinas pró-inflamatórias, em especial IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) [18]. Além disso, essas células também produzem moléculas citotóxicas, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são essenciais para promover morte dos patógenos, mas que podem causar lesão celular no organismo hospedeiro [19]. Os neutrófilos são caracterizados pela produção da mieloperoxidase, e os grânulos ricos com essa enzima são liberados em resposta aos patógenos. No entanto, está descrito na literatura que elevados níveis circulantes dessa

proteína estão presentes em pacientes com AR. Níveis elevados desta enzima são capazes de aumentar a produção de espécies reativas no organismo, resultando em dano oxidativo [20].

## Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória, autoimune, de etiologia desconhecida. Ela é caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva preferencialmente de articulações periféricas, resultando em deformidades e incapacitação [21]. Afeta 1% da população adulta com menos de 35 anos e mais de 2% com mais de 60 anos nos Estados Unidos [22]. Já no Brasil tem uma prevalência de aproximadamente 0,46% [23], e 1% na população mundial [24]. A doença ocorre 3 vezes mais em mulheres do que em homens e sua prevalência aumenta com a idade [25]. Estimativas recentes sugerem um custo anual para o tratamento de \$16 bilhões nos EUA [26], enquanto no Brasil uma estimativa mais recente calculou um gasto anual de R\$18,5 bilhões [27].

Apesar da AR ter sido descrita primeiramente na década de 50 [28], os critérios de diagnóstico começaram a ser melhor estabelecidos somente há 50 anos [29]. Estes critérios usados retratam a AR como uma doença séria de longa-duração com características extra-articulares dominantes, limitadas opções de tratamento e pior prognóstico [30]. Uma linha de pensamento mais moderna prefere considerar a AR como um síndrome clínica que abrange diversos subtipos de doença [31], os quais resultam na ativação de diversas cascatas inflamatórias [32] e que levam a uma via final comum, em que inflamação sinovial persistente e dano articular estão presentes.

Em relação ao risco de desenvolver AR, 50% são atribuídos a fatores genéticos [33]. Até o momento, a associação genética está principalmente nos genes de PTPN22 e HLA, enquanto não se encontrou associações fortes com outros grupos gênicos. Dentre as regiões genéticas em que há associações fortes, foram identificadas 30 regiões diretamente relacionadas com a AR [34, 35]. É interessante notar que estas regiões de importância estão contidas em somente 0,1% do total do DNA do ser humano. Estudos genéticos identificaram a associação destes mesmos loci de importância com outras doenças autoimunes, e alguns estão ligados a cascatas inflamatórias. Analisando estes conjuntos de estudos genéticos, pesquisadores acreditam que estes dados enfatizam que a AR é um grupo heterogêneo de síndromes sobrepostas.

O fator de risco ambiental mais forte para o desenvolvimento da AR é o fumo [36]. Outros fatores ambientais incluem consumo de álcool, consumo de café, níveis de vitamina D, uso de contraceptivos orais, periodontite bem como outras infecções [37]. Assim, o

desencadeamento da AR envolve fatores genéticos, fatores ambientais e defeitos na imunorregulação, que causam uma quebra da auto tolerância e ativa mecanismos que levam ao dano tecidual. A presença de auto anticorpos é característica típica da AR. Em estados mais avançados da doença, um número maior de epítomos são reconhecidos pelos auto anticorpos [38]. O fator reumatoide é um auto anticorpo clássico, usado como marcador prognóstico e diagnóstico da doença. Além disso, variados tipos de auto anticorpos contra proteínas citrulinadas (ACPA – anti-citrulinated protein antibodies) foram identificados. ACPA é um tipo de marcador que parece ser mais específico para o diagnóstico da AR [39] e sua presença está associada com maior dano articular e menor probabilidade de remissão [32]. Também se identificaram auto anticorpos contra colágeno [40], que parecem estar relacionados com dano articular mais acentuado no início da doença [41]. De 50 a 80% dos indivíduos com AR apresentam fator reumatoide, ACPA ou ambos [41].

## Artrite Reumatoide e Síndrome da Caquexia

AR é fortemente associada à incapacitação e morte prematura [42]. Alguns sinais e sintomas são característicos desta população, como fadiga, fraqueza e perda muscular. Isso poderia ser explicado pelos altos níveis circulantes de citocinas e proteínas de fase aguda, somados à dor articular e diminuição do exercício físico, que podem causar perda muscular [43]. Nos pacientes com AR têm sido relatado até 66% de problemas relacionados com função muscular, limitando ainda mais a atividade destes pacientes e sua qualidade de vida. É importante ressaltar que estes pacientes por vezes apresentam uma redução na massa muscular mascarada pelo aumento da massa de gordura, levando a uma dificuldade maior na observação do processo de perda muscular [9].

Uma das mais evidentes condições clínicas que demonstram ligação entre o metabolismo e a inflamação é o quadro de caquexia [44]. Do grego, caquexia significa “cacos”: ruim e “hexis”: ter, ou seja, condição ruim, ela é definida como uma complexa mudança metabólica decorrente de doenças inflamatórias crônicas e o progresso da mesma, caracterizada principalmente por uma elevada taxa de perda na massa muscular [10, 11]. Caquexia é uma síndrome metabólica complexa associada à doença inflamatória crônica e caracterizada por perda de peso e perda de massa magra, com ou sem alteração de massa gorda [10]. É clara a participação do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento desta síndrome. Também estão relacionadas com o seu desenvolvimento a IL-6 e a proteína C-reativa (PCR) [10].

A caquexia está associada a um pior prognóstico nos pacientes com AR [8] e alterações significativas no metabolismo energético e proteico têm sido elucidadas. Estudos demonstraram que pacientes com AR têm menor composição de massa celular. Essa redução de massa celular é um fator preditor de morte e morbidade em diversas doenças [45, 46].

A redução na massa celular inclui alterações no gasto energético, como redução no gasto energético diário total, aumento no gasto energético em repouso e baixo gasto energético em atividade física [13]. O metabolismo de proteínas na AR também sofre alterações, representadas pelo aumento no *turnover* proteico, o que, somado as alterações energéticas, caracteriza o um estado de hipermetabolismo proteico [47].

Nos achados clínicos da AR comumente se observa fraqueza muscular generalizada, ocasionado pela atrofia de fibras musculares, que pode desenvolver atrofia acentuada do músculo [48, 49]. Atrofia muscular pode decorrer de diversas condições clínicas, tais como desuso, idade avançada, desnutrição, doenças inflamatórias, infecciosas e autoimunes. Essas condições induzem a perda muscular por diferentes mecanismos de sinalização intracelular, por distintas cascatas, tais como, proteases lisossomais, proteases ativadas por cálcio e o sistema proteossomo [50]. Essas cascatas de sinalização intracelular podem levar à apoptose, ao aumento da degradação proteica ou ainda à diminuição da ativação das células satélites responsáveis pela regeneração muscular [49].

Estudos têm demonstrado que a degradação proteica [51] ou a diminuição da síntese proteica podem estar envolvidas na atrofia muscular [52]. Diversos estudos têm investigado a degradação proteica onde algumas proteínas como MuRF-1 (*muscle-specific ring finger protein-1*), enzima E3 do sistema ubiquitina-proteossomo que está associada ao sarcômero, possuem relativa importância na ativação de cascatas de proteólise [51, 52].

Olhando por outro prisma, a caquexia representa uma resistência anabólica em que há uma falha na capacidade de síntese proteica no músculo [12]. Dada a gravidade desta síndrome e a ausência de tratamentos efetivos, ela vem ganhando mais atenção na clínica [12]. A caquexia é mais comumente observada e documentada por oncologistas, entretanto, desde 1994 foi descrita a relação entre a perda muscular e inflamação crônica, com aumento de citocinas circulantes, em pacientes com perfil de caquexia e AR [13]. Como já ressaltado anteriormente, pacientes com AR podem perder massa magra sem perder peso ou até apresentar o perfil de ganho de peso via massa de gordura. Entretanto, é clara a presença de uma síndrome similar à da caquexia do câncer em pacientes com AR [13].

De acordo com esta principal diferença entre pacientes oncológicos e AR, tem sido sugerido o termo caquexia reumatoide como a síndrome que afeta estes pacientes em que há perda na massa muscular, com concomitante perda na sua função e força, sem apresentar necessariamente perda de peso ou até podendo apresentar ganho de massa de gordura [13]. Este termo não é amplamente aceito, mas será adotado por este estudo, já que as características da síndrome nos pacientes acometidos por diferentes doenças são em suma iguais, exceto pelo aspecto da alteração na massa de gordura.

## Modelo Experimental de Artrite

Modelos animais são amplamente utilizados para estudos de doenças e seus fatores. A principal vantagem para seu uso é a possibilidade de se isolar fatores, já que modelos animais podem possuir: genética idêntica, oferta nutricional e influências ambientais controladas. Com estes fatores isolados, as pesquisas conseguem focar de forma mais específica e sensível para uma única variável e identificar mais claramente suas alterações. Dos vários modelos experimentais usados para mimetizar artrite, o modelo de artrite induzida por colágeno (do inglês, *collagen-induced arthritis* – CIA) é chamado de padrão ouro para estudos referentes à AR [53].

O modelo CIA apresenta inflamação nas articulações periféricas de forma simétrica, apresentando erosão cartilaginosa e óssea, hiperplasia da membrana sinovial, aumento de células mononucleares na articulação, neo angiogênese articular, presença de auto anticorpos (contra o colágeno do tipo II), aumento de citocinas inflamatórias circulantes (como TNF-alfa, IL-1beta e IL-6) e um contexto de inflamação crônica a longo prazo [53]. Todas as características citadas mimetizam o que ocorre com um pacientes com AR. Ademais, o modelo de CIA já foi utilizado amplamente para a avaliação inicial de diversos agentes terapêuticos para AR [54-56].

Por outro lado, está pouco presente na literatura estudos utilizando modelos animais como modelo de caquexia e, quando utilizado, os mesmos não são tidos como convincentes [1, 57]. Essa problemática é levantada porque estes modelos não desenvolvem a síndrome da caquexia de forma isolada, mas sempre resultante de alguma doença inflamatória crônica, como câncer [1]. Neste contexto, observando estudo prévio do nosso grupo, foi demonstrado que camundongos com artrite induzida por colágeno apresentaram achados compatíveis com os da caquexia. No desenvolvimento da doença foi possível observar diferença de peso entre saudável e doente, superior a 5%, com maior perda de massa magra e aumento da IL-6 [58]. Com estas evidências, o modelo de CIA em

camundongos DBA/1J se apresenta como um forte candidato para um modelo de caquexia, sendo mais específico à caquexia reumatoide.

## Diagnóstico e Marcadores de Caquexia

Reconhecendo a importância do processo de atrofia muscular na AR e que até 66% dos pacientes apresentam quadro de caquexia há necessidade de diagnóstico sensível e precoce para esta síndrome, possibilitando o pronto manejo dessa complicação, ainda em suas fases iniciais. Atualmente, os critérios mais citados pela literatura para diagnóstico de caquexia são os definidos por Evans e colaboradores [10], sendo estes: perda de peso (superior a 5% nos últimos 12 meses), como primeiro critério a ser observado, seguindo por mais três dos cinco critérios a seguir: índice de massa corporal (IMC) inferior a 20 kg/m<sup>2</sup>, diminuição da força muscular, diminuição do apetite (anorexia), fadiga, e de alteração de parâmetros bioquímicos e imunológicos, tais como elevação de IL-6, elevação de proteína C reativa, redução de hemoglobina e redução de albumina sérica. Apesar desses critérios de Evans serem precisos e eficientes para diversas situações, ainda não existe um consenso para diagnóstico da caquexia, havendo muitas pesquisas utilizando outros parâmetros para avaliar um paciente com caquexia, como o uso de um ponto de corte para a perda de peso ou até a presença de uma série de sintomas relacionados à função muscular, por exemplo [59].

Até o momento, para tentativa de diagnóstico do processo de perda muscular, o maior problema reside na precisão em avaliar as mudanças e o estado do músculo esquelético nos pacientes [60]. As formas para identificar a perda muscular têm sido diversas, como: medidas antropométricas, análise por bioimpedância elétrica, técnicas de imagem (tomografia computadorizada, imagem por ressonância nuclear, “*dual x-ray absorptiometry*”), pesquisa de moléculas (contagem de potássio-40 total), quantidade de creatinina na urina, ultrassom, e demais testes funcionais focados em músculo. Alguns problemas são observados nas formas de identificar a perda muscular como o exemplo: falham em termos de sensibilidade ou especificidade na hora do diagnóstico, alguns possuem altos custos, ou ainda não poderiam ser realizados com grande frequência por conta do prejuízo à saúde do paciente (por exemplo, exposição frequente à radiação) [60-62].

Ainda, a literatura vem apresentado diversos marcadores com potencial para detecção e diagnóstico de processos relacionados à perda muscular, como: uso isótopo radioativo de 3-metil-histidina [63], quantificação de fragmento C-terminal da agrina [64], quantificação de

creatinina [65, 66], atividade da creatina kinase [67], quantificação de fragmento do colágeno do tipo 6 [63], uso de isótopo radioativo da fenilalanina [68], dentre outros. Muitos destes marcadores podem ser identificados no soro e alguns na urina e ainda há estudos em andamento para o processo de validação, identificação de novos marcadores, testes de sensibilidade e especificidade (para revisão vide [63]).

A partir dos critérios sugeridos por Evans (2008), estes parecem ser mais fidedignos para determinação da síndrome nos pacientes oncológicos do que em outras doenças, como nos pacientes reumatológicos, conforme demonstrado previamente [69]. Desta forma, a busca por marcadores que possam representar o quadro de caquexia poderiam auxiliar o diagnóstico da síndrome na artrite reumatoide, bem como direcionar no tratamento para a mesma [43].

## Metabolômica

A metabolômica é um novo ramo de pesquisa que trata da biologia de sistemas, juntamente com a genômica, transcriptômica e proteômica [70]. Esta abordagem vem ganhando grande força no campo da investigação de biomarcadores que sirvam para prognóstico, diagnóstico e acompanhamento de doenças, por se tratar de uma técnica sensível, abrangente, com alto grau de reprodutibilidade e custo acessível por amostra. Além do mais, esta técnica pode ser utilizada em diversos tipos de amostras, como urina e outras excretas, sendo identificado como “footprinting” metabólico (tradução livre: marca da pegada ou evidência). Desta forma, a metabolômica é utilizada para evidenciar diferenças entre situações de saúde e doença focando principalmente na pesquisa de biomarcadores para estas doenças [71].

Existem algumas formas de obter perfis metabólicos a partir de diferentes amostras para busca de biomarcadores [72]. Pode-se citar a obtenção deste perfil a partir de espectrometria de massas ou por ressonância nuclear magnética (RNM) [72-74]. A técnica de RNM faz com que todos os átomos de hidrogênio presente na amostra se alinhem ao campo gerado e capta o tempo de retorno de cada conjunto de hidrogênios à sua posição inicial (gera um espectro de uma dimensão, 1D; Figura 2) [75]. Ainda, durante a aquisição deste espectro, diferente número de ligações presentes nos átomos ligados ao de hidrogênio irão gerar sinais simples ou múltiplos, de acordo com o tipo de ligação encontrada (ligação simples, dupla, tripla, etc). Outra forma de adquirir informação a partir da ressonância magnética é gerar um campo eletromagnético e fazer mais de um registro referente ao retorno dos átomos à sua orientação original, de forma que há uma aquisição considerada em duas dimensões (2D J-res; Figura 3) [75-77]. Dessa forma, a partir de uma

amostra, pode-se adquirir um espectro contendo informação quanto a sua composição química e concentração pelo perfil de ressonância com o hidrogênio das moléculas que compõe esta amostra.

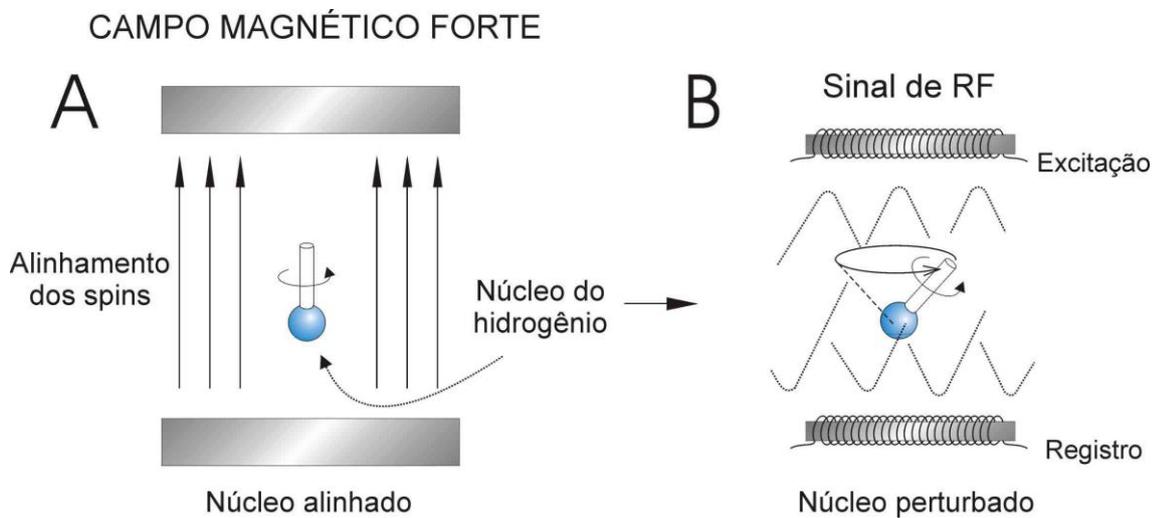


Figura 2. O núcleo atômico produz um sinal de ressonância magnética da seguinte forma: quando elementos com um peso atômico par, como o hidrogênio, são expostos a um campo magnético estático, forte e homogêneo, os núcleos dos átomos se comportam como magnetos e seus spins se alinham na direção do campo aplicado (A). O alinhamento dos spins dos núcleos pode ser perturbado por um pulso curto de ondas de rádio (do inglês, “radio frequency” - RF), como no caso de ressonância nuclear magnética para fins de imagem, ou ondas com maior energia (de 60 à 1000 MHz), como no caso para perfil metabólico. A perturbação referida serve para tirar os spins do núcleo de sua orientação paralela ao campo magnético e para fornecer a energia necessária para movimentos do tipo giroscópio dos spins dos núcleos, denominados de precessão. Quando o pulso de ondas é apagado, o núcleo tende a voltar para sua situação original e, assim fazendo, libera energia em forma de ondas de rádio (B). A frequência dessas ondas de rádio são distintas para diferentes espécies de átomos, assim como para um dado átomo em diferentes meios químicos ou físicos. Portanto, os núcleos ressonantes tornam-se transmissores de ondas de rádio com frequências características e revelam sua presença na amostra pelos seus sinais RF. Núcleos diferentes absorvem energia de ondas de frequência diferente. A habilidade do núcleo atômico de absorver energia de ondas é denominada ressonância magnética nuclear, dando o nome ao experimento. O núcleo atômico, tendo absorvido energia pelas ondas aplicadas externamente, libera esta energia como um sinal ao retornar ao seu estado de menor energia. A taxa com a qual um núcleo volta ao seu estado de energia mais baixa é chamada de relaxação e é inicialmente descrito por sua constante de tempo (T). Há dois tipos de relaxação de importância em ressonância magnética: relaxação “*spin-lattice*” (rotação-quadratura) ou T1 e relaxação “*spin-spin*” (rotação-rotação) ou T2. Para um átomo em particular, esses tempos de relaxação variam de composto para composto. Por exemplo, o hidrogênio tem um tempo de relaxação muito mais curto em lipídios (ou gorduras) do que na água. Tempos de relaxação podem também variar de acordo com a condição local da mostra, tais como, composição principal do diluente sendo água ou outro composto.

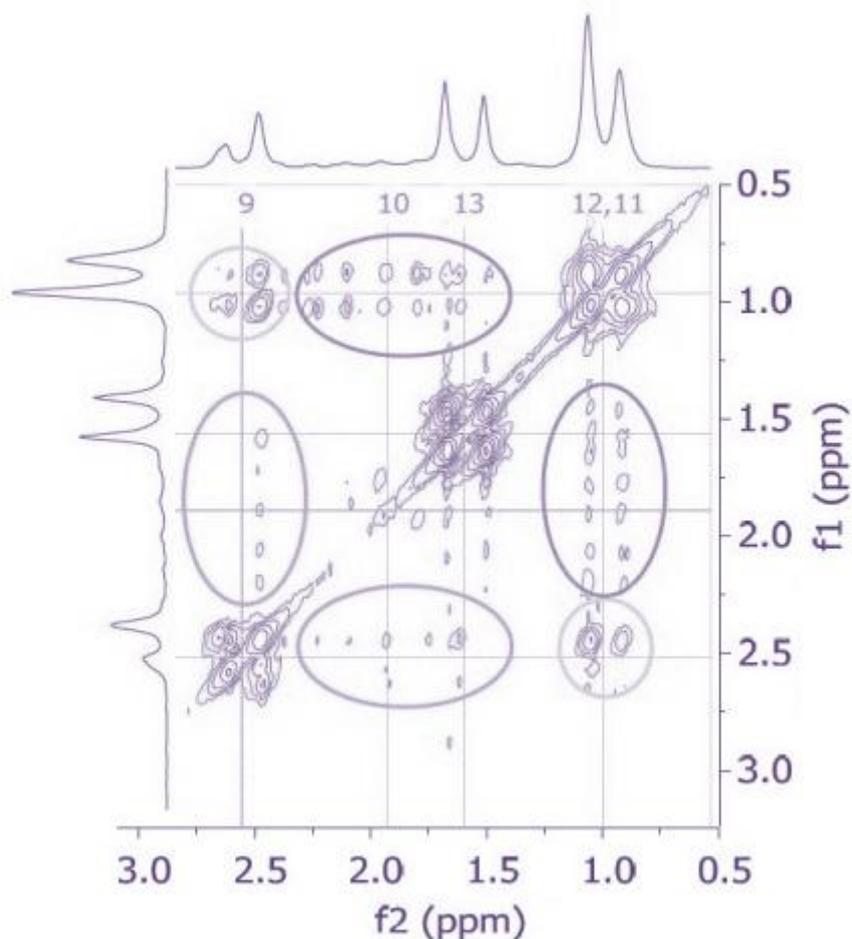


Figura 3. O gráfico representa uma aquisição em duas dimensões. A primeira dimensão é adquirida por uma leitura padrão de ressonância. Já a segunda, é obtida por um acompanhamento do sinal em um tempo secundário e posterior. O segundo sinal valida a posição e intensidade da primeira leitura, facilitando a identificação do composto e possibilitando uma melhor resolução e quantificação dos compostos. Esta leitura em duas dimensões é chamada de 2D J-res. Representação adaptada da leitura parcial da droga ibuprofeno.

A partir da aquisição dos espectros, inicia-se a etapa de processamento do espectro “cru” para que este possa ser utilizado para identificação dos compostos e processamento estatístico [78]. Os espectros “crus” são alinhados, de forma que os picos dos mesmos compostos em diferentes amostras estejam em um mesmo intervalo de aquisição, isto é feito com base em um padrão externo adicionado em todas as amostras na mesma concentração, com a presença de um pico homogêneo, presente como ponto zero da aquisição (Figura 4) [78]. Após, estes picos são separados em intervalos (“binning”) iguais. Esta etapa possibilita que os picos possam ser utilizados nas ferramentas estatísticas.

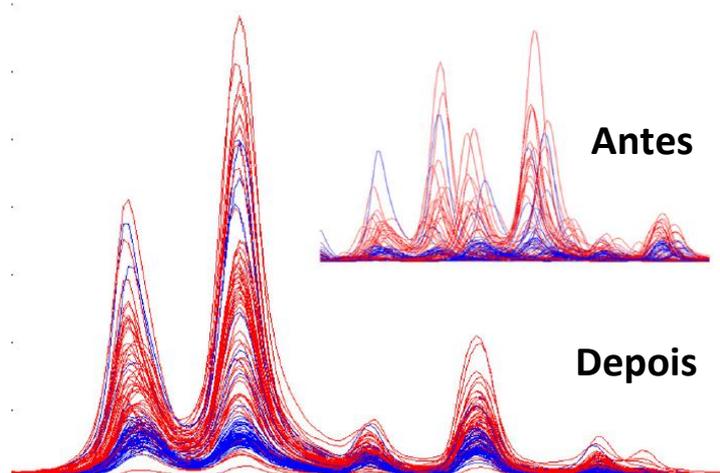


Figura 4. Durante o processo de aquisição de espectro via RNM, pode haver uma demora em valor de tempo muito pequeno, mas que acaba “desalinhando” a aquisição de seu verdadeiro ponto inicial. Para que os espectros possam ser diretamente comparáveis, estes devem ser alinhados de acordo com um padrão externo adicionado em cada amostra. Aqui está a representação de espectros antes (painel superior menor) e após (painel inferior maior) alinhamento através de molécula sintética externa adicionada à amostra [78]. Após o alinhamento dos espectros, é possível identificação das mesmas moléculas e uso na etapa estatística.

No próximo passo do processamento, como não há uma forma de normalização da concentração dos compostos na amostra, já que algumas podem ter conteúdo de água maior que outras ou ter evaporado mais água que outra, gerando fatores de confusão, o que é realizado durante o processamento do espectro é uma normalização pela área total do espectro. Desta forma, todos os espectros possuem um percentual da concentração original, ou seja, somando a concentração de todos os compostos identificados em cada espectro, o total será sempre o mesmo, diferindo apenas no percentual de cada composto encontrado.

Por fim, para diminuir o ruído de fundo, que atrapalha todas as etapas estatísticas, utiliza-se de uma série de transformações matemáticas (por exemplo, transformação logarítmica) em que sinais de compostos com pequena concentração podem ser perdidos, entretanto, todos os sinais que são mais fortes que o ruído, estes são melhor evidenciados. Esta etapa permite que o ruído não participe da análise estatística e, ainda, permite uma melhor distinção entre os picos de diferentes amostras. A Figura 5 apresenta detalhadamente todas as etapas do processamento do espectro, desde o momento de sua aquisição.

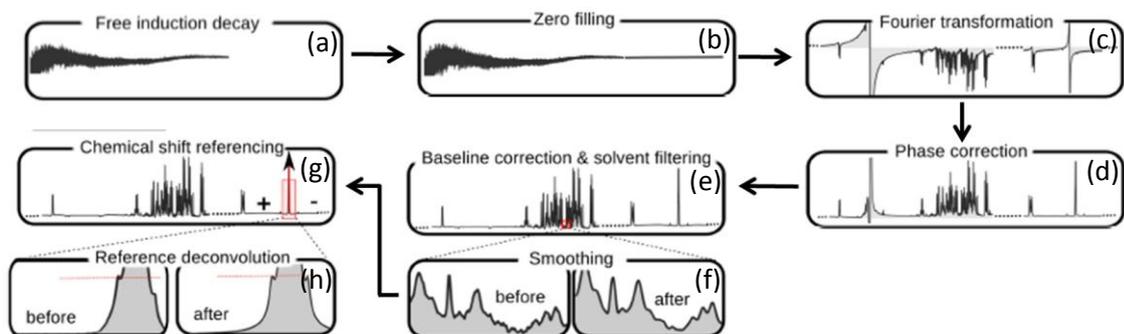


Figura 5. O espectro oriundo da aquisição do equipamento de ressonância nuclear magnética é um sinal com decaimento livre como representado no primeiro painel (a). Este espectro recebe um preenchimento de sinal nulo (“zero filling”) em cada sinal adquirido (b), este preenchimento resulta em maior qualidade e uma melhor definição do sinal. Em seguida, os picos sofrem a transformação de Fourier (c), esta transformação faz o sinal obtido por tempo ser decomposto em sua frequência. No próximo passo, há uma correção na fase do espectro (d), em que todos os picos “inversos” (com relação negativa à linha de base) são espelhados para se tornar “positivos” (em relação positiva à linha de base). Em seguida, Há uma correção na linha de base (e) e se retirando principalmente o sinal do solvente (água, por exemplo), seguido de um efeito que torna o sinal mais suave, em que se remove majoritariamente o ruído (f). Por final, todos os espectros são alinhados (g) em referência a seu pico de referência (composto adicionado a todas as amostras) e, ainda, há a deconvolução dos picos, que faz com que todos os picos se tornem nitidamente espelhados (h) [79].

A partir do momento em que os espectros estão processados, há duas etapas que podem ocorrer de forma concomitante: a identificação dos compostos e o processamento estatístico. A identificação dos compostos ocorre de acordo com o tipo de espectro obtido. O programa Chenomx é utilizado para a identificação dos compostos a partir dos espectros de 1D [79, 80]. Este programa permite que o usuário utilize de um banco de perfis de picos para diversos metabólitos (cerca de 40.000, para bancos relacionados a metabólitos de origem humana) em que o usuário vai identificando um a um cada pico no espectro (Figura 6; vide [79] para detalhamento do processo) e, após, há uma automação capaz de gerenciar a identificação destes mesmos compostos em todos os outros espectros (quando presentes) [70, 79]. Existe outra forma de identificação dos compostos, que é por automação ligada a um banco de dados contendo diversos espectros de compostos puros, as conhecidas bibliotecas, estas podem ser utilizadas para identificação e também quantificação de diversos compostos de forma totalmente automática, mas estas necessariamente se utilizam apenas dos espectros adquiridos pela ferramenta de duas dimensões, ou seja, o 2D J-res. As bibliotecas automáticas são servidores online que possuem a identificação em duas dimensões de diversos padrões de picos puros (um único espectro para um único metabólito). Há limitações nesta aquisição, pois não há nenhuma etapa em que o usuário possa validar o resultado ou confrontar com outras formas de identificação. Outra limitação é que o banco é capaz de identificar apenas os compostos já

apresentados no banco, compostos não presentes no banco são simplesmente ignorados. Para este trabalho, utilizou-se a Birmingham Metabolite Library (BML) [81], que foi possível identificar 208 metabólitos nas amostras de camundongo deste estudo.

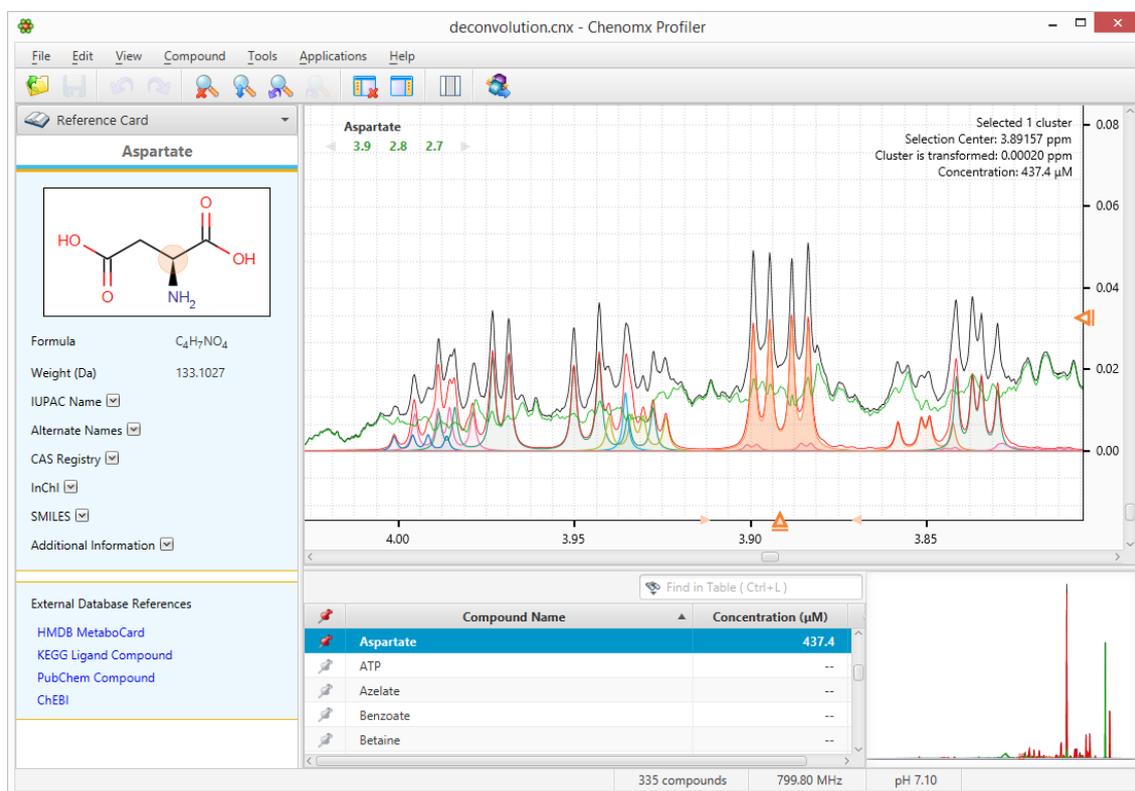


Figura 6. Representação da interface de identificação dos compostos via Chenomx. No painel de maior importância, o espectro adquirido e processado é representado por uma linha preta. Os compostos identificados são apresentados por linhas de diferentes cores. A somatória de compostos apresenta um perfil em vermelho. O composto que está sendo identificado e sua intensidade sendo ajustado para melhor se enquadrar a amplitude do sinal, neste caso o “Aspartate”, fica em vermelho com uma sombra vermelha. O programa possui uma série de ferramentas que permitem que o usuário identifique diversos compostos e oferece quais são as possibilidades de compostos em cada período de tempo da aquisição, restringindo e facilitando o usuário a identificar qual perfil de picos pertence ao perfil observado no intervalo de tempo em questão. Imagem da interface do usuário.

Por final, o maior desafio das técnicas envolvendo a metabolômica é o processamento estatístico e interpretação dos resultados. Para isso, foram criados programas de computador complexos capazes de processar o grande número de dados obtidos pelos perfis metabólicos e criar um sistema de ranqueamento para diferenciação entre os grupos que classificam previamente a amostra. Destes programas, o Matlab é um programa muito utilizado, capaz de processar centenas de milhares de metabólitos distribuídos em diversos grupos, de forma sensível, reproduzível e estatisticamente robusta [82].

Dos vários testes e modelos que avaliam o agrupamento e diferenciação entre grupos dos perfis metabólicos, um amplamente utilizado é o “*Principal Component Analysis*” (PCA)

para agrupamento e avaliação de homogeneidade de um grupo de amostras, enquanto que o “*Partial Least Square Discriminant Analysis*” (PLSDA) é a análise mais amplamente utilizada para distinção entre dois grupos e criação de um ranqueamento de metabólitos com valores de importância de acordo com a homogeneidade do grupo e a diferença entre os grupos testados no modelo [82, 83]. Como ferramenta interna para tornar a análise ainda mais robusta e clara, há o teste concomitante chamado “*Veatinan Blind Test*” (VBT) que seleciona aleatoriamente um grupo de amostras que não serão incluídos no modelo e não serão utilizadas suas informações de qual grupo pertencem e, após a construção do modelo oriundo pela análise de PCA e PLSDA, verifica-se quanto esta amostra se encaixa no modelo, oferecendo, dessa maneira, valores de sensibilidade e especificidade [82].

Apenas para tornar o mais claro possível, no contexto de metabolômica, o teste de PCA serve para avaliar o quanto cada grupo é homogêneo, sem considerar os outros grupos entre si. Já o teste de PLSDA avalia o quanto um grupo é diferente dos demais na análise. Por fim, o VBT apresenta quão sensível e específico são os modelos criados são capazes de classificar uma amostra através de seu perfil metabólico.

Há ainda outras ferramentas que podem ser utilizadas para a análise metabolômica. Algoritmos distintos foram criados em diferentes softwares para obter esta separação e ranqueamento de melhor metabólito. Por exemplo, o Galgo é um algoritmo genético, um *plug-in* do programa R, que é capaz de considerar os metabólitos como genes em um genoma e, via lógica de evolução genética, criar um ranqueamento de importância a partir do perfil metabólico, levando em conta a classificação de grupos [84, 85].

Após a etapa estatística e obtenção do ranqueamento metabólico, realiza-se uma busca por rotas metabólicas que possuem importância para o modelo estudado, que é feita uma busca pela presença de um grupo de metabólitos distinto entre os grupos analisados e comum a uma mesma rota. Dentre as ferramentas utilizadas, o sítio [www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca) é uma ferramenta muito poderosa para este fim [86-88]. O banco de dados utilizado são os mais completos em termos de conteúdo e informação sobre metabólitos, sendo o KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), o PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) os bancos utilizados. Com esta ferramenta, pode-se inferir que uma rota metabólica está se comportando de maneira significativamente diferente entre os grupos comparados; quanto maior o número de metabólitos encontrados como diferentes pelo ranqueamento do PLSDA e de uma mesma rota metabólica, menor é o valor de significância para a rota (valor p), e quanto maior número de metabólitos presente em cada etapa da rota, maior o valor de importância da rota, sendo este valor de importância um total

máximo igual a 100%. Vide Figura 7 para uma representação com o caso do metabolismo da histidina.

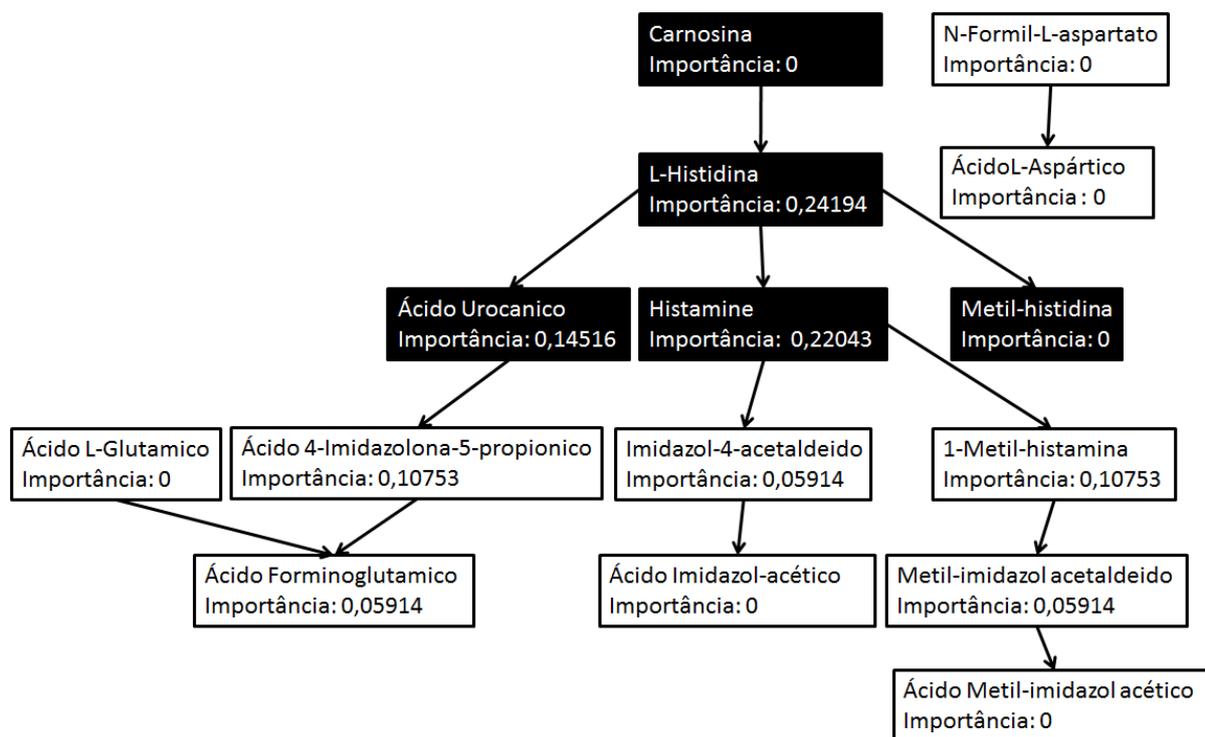


Figura 7. Representação da rota do metabolismo da histidina com os valores de importância do sítio [www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca). Os compostos grifados em cinza representam aqueles que foram identificados pelo ranqueamento através do modelo de PLSDA, por exemplo. Neste exemplo, a rota do metabolismo da histidina possuiria um total de 5 compostos que batem com a rota, de um total de 15, teria um valor  $p$  igual a  $6,35 \times 10^{-11}$  e um impacto de 60,7%.

Em paralelo, muito recentemente foi desenvolvida uma técnica para se aplicar um modelo de regressão de múltiplas análises acoplado com o processamento estatístico do PLSDA, sendo chamado de PLSR [89]. Esta técnica utiliza um parâmetro externo aos metabólitos e relacionado a cada amostra para fazer a regressão. A partir deste parâmetro externo, o programa gera um modelo de quais metabólitos são importantes para o parâmetro em questão e faz-se o ranqueamento destes, incluindo um a um cada metabólito até o último identificado. A cada metabólito adicionado, há um acréscimo ou decréscimo no valor de  $R^2$  no modelo, gerando uma curva do  $R^2$  para todos os metabólitos, sua contribuição para este modelo e em relação ao parâmetro em questão. A limitação desta abordagem é o número de metabólitos que podem ser adicionados à análise para o tempo total de processamento de cada regressão, ou seja, para análise de regressão de aproximadamente 200 metabólitos, um intervalo total de tempo de 12h é o suficiente para a análise. Já um número superior, como 2000 metabólitos, haveria necessidade de cerca de 30 dias para terminar a análise.

## Metabolômica e AR

A técnica de metabolômica parece ser muito bem proveitosa para estudos sobre com artrite reumatoide. Como uma resposta final ao ambiente da doença, os metabólitos podem indicar como os pacientes reumatológicos respondem ao ambiente, nutrição, progressão da doença, infecções, exposição a agentes xenobióticos, ao tratamento farmacológico e dentre outras influencias.

No contexto de AR, ou ainda caquexia reumatoide, ambas as situações são heterogêneas. Para exemplificar a complexidade, podemos citar simplesmente que a gravidade da doença é intimamente correlacionada com o tempo de diagnóstico, começo do tratamento, eficácia do tratamento e gênero do paciente. Quanto mais tarde o paciente leva para iniciar o tratamento, maior a chance de a doença acarretar outras complicações, como aterosclerose e perda muscular. Ademais, pode-se citar diferenças existentes entre os pacientes, que torna um grupo heterogêneo para avaliação do perfil metabólico, como: influências ambientais – tabagismo; hábitos culturais – alimentação; e diferença genética geral – descendência. Estes aspectos influenciam direta ou indiretamente no perfil metabólico, na doença e no seu desenvolvimento. Em se tratando de caquexia reumatoide, hábito alimentar baseada em uma dieta hipercalórica e de falta de atividade física, culminando em um quadro de obesidade, por exemplo, podem dificultar a suspeita de caquexia por haver um ganho de peso e assim mascarar a redução da massa muscular. Pensando na pesquisa de biomarcadores, com todas as variáveis apresentadas, seria necessário um estudo com um número muito elevado de pacientes e uma análise muito complexa para poder identificar algum potencial marcador de perda muscular que serviria como prognóstico, diagnóstico e/ou acompanhamento durante o tratamento.

Quando levamos em conta o tratamento do paciente com AR, o perfil metabólico se altera drasticamente, tornando a busca por um biomarcador ainda mais complexa. Por exemplo, o perfil metabólico de um paciente tratado com antagonista de TNF-alfa resulta em aumento dos níveis urinários de: glutamina, ácido fenilacético e histamina; já o tratamento com infliximabe apresenta um aumento no ácido hipúrico, citrato e ácido láctico; com o uso do etanercepte, observa-se o aumento de colina, ácido fenilacético, uréia, creatina e metilamina [90]. Isso sem citar a redução de diversas outras moléculas relacionadas com cada tratamento (vide [90]).

Estudos anteriores de perfil metabólico em pacientes com AR já mostraram as alterações em relação aos controles saudáveis, podendo ser citadas alterações nas rotas: do metabolismo do inositol fosfato; metabolismo de lipídeos, de ácidos graxos e de

carboidratos; metabolismo energético; metabolismo de ácidos nucléicos; metabolismo de espécies reativas de oxigênio; metilação; bem como na resposta macrofágica [71]. Destes estudos, destacam-se os amino ácidos essenciais, aqueles que não podemos produzir *de novo* no corpo humano, que são sugeridos como potenciais biomarcadores de degradação proteica [44]. Ainda, analisando amostras sorológicas de pacientes com AR e artrite psoriática, estudos metabolômicos são capazes de discriminar as amostras com uma sensibilidade de 90% e 94% de especificidade [91], por outro prisma, a técnica também possui capacidade de prever a resposta ao tratamento com agentes anti-TNF-alfa com sensibilidade de 88,9% e 85,7% de especificidade [90], ou seja, esta abordagem possui grande capacidade discriminatórias.

A literatura prevê avanços futuros via abordagem metabolômica, com interesse particular às doenças reumáticas, tanto na busca e identificação de novos biomarcadores como no acompanhamento de agentes terapêuticos [70]. Então, levando-se em conta todos os aspectos de complexidade da AR, da síndrome da caquexia reumatoide, das influências dos diferentes tratamentos e outros fatores levantados, um modelo animal que possa mimetizar a doença e suas complicações, mas com contexto controlável, ou seja, genética, ambiente e hábitos alimentares controlados, este modelo animal seria uma ferramenta muito útil na busca por biomarcadores através do estudo do perfil metabólico. Portanto, considerando também a gravidade da caquexia reumatoide e a ausência de marcadores que indiquem o desenvolvimento desta síndrome, o objetivo deste projeto é identificar biomarcadores relacionados ao início do processo de caquexia (prognóstico) e diagnóstico do mesmo.

## Marco Teórico

Segue o marco teórico da problemática da pesquisa (Figura 8).

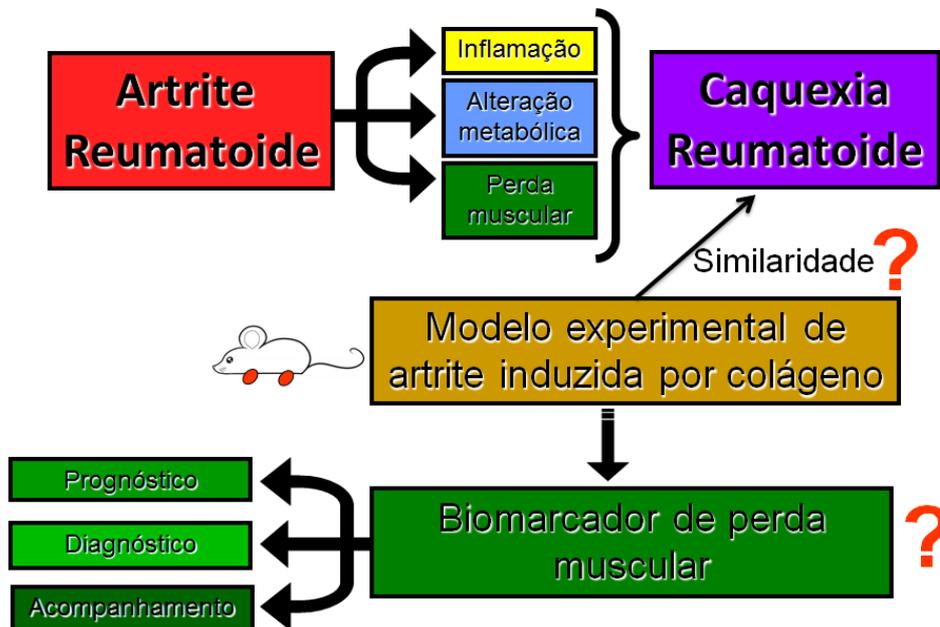


Figura 8. Marco teórico esquemático apresentando a problemática da pesquisa. Boa parte dos pacientes com AR apresentam inflamação, alteração metabólica e perda muscular, em um quadro que pode progredir para a chamada síndrome da caquexia (caquexia reumatoide). Para estudos científicos, não existe ainda um modelo experimental que apresente o mesmo quadro que o observado em pacientes com AR e caquexia. Ademais, pacientes com AR podem desenvolver caquexia e apenas ser diagnosticados por técnicas que, em sua maioria, são de alto custo ou baixa sensibilidade ou baixa especificidade, entretanto, atualmente não há método de análise para predição desenvolvimento da síndrome e acompanhamento para o caso de efeito de possíveis tratamentos.

## Justificativa

Considerando a gravidade da caquexia reumatoide, a ausência de modelo experimental para pesquisa experimental e ausência de marcadores que indiquem o desenvolvimento desta síndrome, é de suma importância a identificação de um modelo experimental que possa ser utilizado para estudos da síndrome bem como identificar biomarcadores relacionados ao início do processo e ao prognóstico da mesma. Com a identificação de um modelo experimental que se comporte de forma similar ao paciente, oportunidades surgem para melhoria na pesquisa com benefícios diretos na área clínica e de pesquisa. Já com um estudo extensivo do perfil metabólico relacionado com o progresso da síndrome da caquexia reumatoide, há possibilidade de identificação de biomarcadores relacionados com prognóstico e diagnóstico.

## Objetivos

### Objetivos Gerais

Avaliar se o modelo de artrite induzida por colágeno também desenvolve características da caquexia reumatoide.

Estudar o perfil metabólito obtido via ressonância nuclear magnética para identificar diferenças metabólicas na urina de CIA que podem potencialmente ser usadas para prever e acompanhar o progresso da caquexia.

### Objetivos Específicos

1. Estudar os parâmetros clínicos associados à síndrome de caquexia no modelo experimental de artrite, através das medidas de:

- Peso;
- Ingestão de alimento (Anorexia);
- Força;
- Locomoção espontânea;
- Teste de desempenho físico;
- Determinação da perda de massa magra (peso do músculo e relação sarcoplasmática).

2. Identificar potenciais biomarcadores de perda muscular encontrados no perfil metabólico da urina no modelo experimental de artrite;

3. Correlacionar os parâmetros clínicos associados à síndrome de caquexia reumatoide com o perfil metabólico da urina no modelo experimental de artrite.

## Desenho experimental

O desenho experimental a seguir foi realizado neste trabalho para aquisição de todos os resultados (Figura 9).

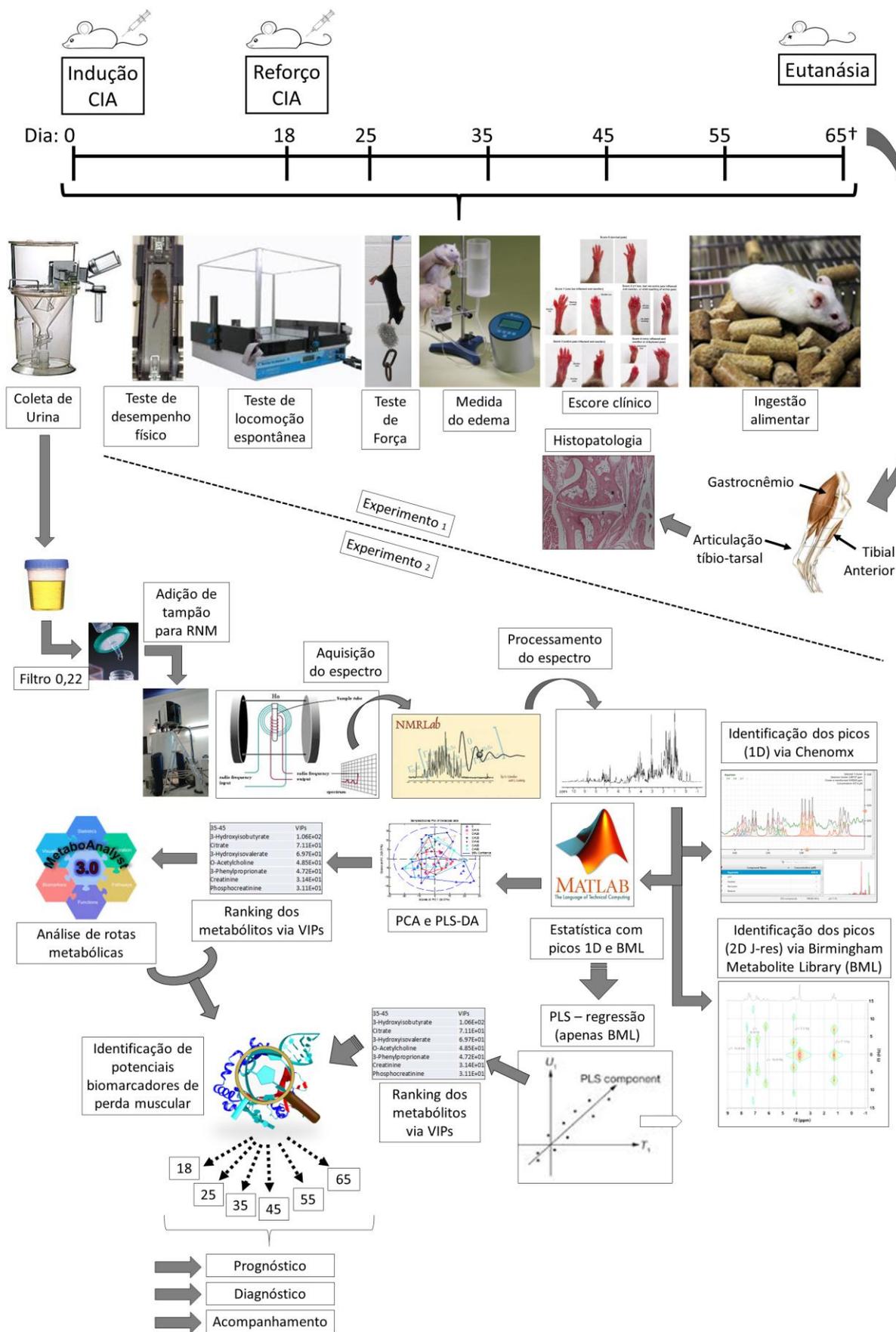


Figura 9. Desenho experimental esquemático apresentando todas as etapas experimentais para aquisição dos resultados. Os materiais e métodos necessários estão todos apresentados neste esquema, respeitando a ordem necessária para sua execução. O experimento 1 foi todo realizado no HCPA enquanto o experimento 2 foi todo realizado na University of Birmingham, Reino Unido. No experimento 1, os camundongos machos DBA/1J com 8 à 12 semanas de idade foram induzidos (CIA, n=13) com

(continuação Figura 9): colágeno bovino do tipo II (data estabelecida como dia zero), receberam reforço 18 dias após a primeira injeção ou mantidos saudáveis sem indução (CO, n=11). Os animais foram acompanhados nas datas de 0, 18, 25, 35, 45, 55 e 65 dias após a primeira injeção, foram: coletadas urinas por 6h em gaiolas metabólicas; realizado teste de desempenho físico; realizado teste de locomoção espontânea; realizado teste de força; medida do volume do edema da pata traseira com pletismômetro; acompanhado desenvolvimento da doença pela avaliação do escore clínico; foram pesados; e acompanhada a ingestão alimentar. Após 65 dias, os animais foram eutanasiados e foram coletados tecidos musculares (gastrocnêmio e tibial anterior) para pesagem e realização da razão sarcoplasmática, e a articulação tíbio-tarsal foi coletada para realização de histologia e confirmação da histopatologia. No experimento 2, a urina coletada dos animais CO e CIA foram filtrados, adicionado tampão para realização de ressonância nuclear magnética e aquisição do espectros (1D e 2D J-res). Os espectros adquiridos foram processados pelo NMRlab. Estes espectros processados foram utilizados para identificação pelo Chenomx (1D), e identificados e quantificados pelo Birmingham Metabolite Library (BML; 2D J-res). Foi realizada a estatística apropriada dos espectros processados e as quantificações obtidas pelo BML via Matlab, utilizando a técnica de PCA e PLSDA. O ranqueamento de metabólitos obtidos pelos modelos estatisticamente significantes foram analisadas as rotas metabólicas envolvidas via Metaboanalyst. Em paralelo, os dados obtidos pelo BML foram utilizados para as regressões (PLSR) envolvendo todos os parâmetros obtidos durante o experimento 1 in vivo. Por final, metabólitos obtidos pelos modelos de PCA, PLSDA e PLSR que apresentaram significância foram filtrados para rotas metabólicas que ocorrem no músculo para identificação de potenciais biomarcadores de perda muscular e distribuídos em relação ao tempo em que foram obtidas para uma análise tempo dependente, ou seja, para classificação de potencial biomarcador para prognóstico, diagnóstico e acompanhamento do processo de perda muscular.

## Referências

- [1] M. Romanick, L.V. Thompson, H.M. Brown-Borg, Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1832(9) (2013) 1410-1420.
- [2] G.Y. Chen, G. Nunez, Sterile inflammation: sensing and reacting to damage, *Nature Reviews Immunology* 10(12) (2010) 826-837.
- [3] D. Okin, R. Medzhitov, Evolution of Inflammatory Diseases, *Current Biology* 22(17) (2012) R733-R740.
- [4] E.M. Palsson-McDermott, L.A.J. O'Neill, The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases, *Bioessays* 35(11) (2013) 965-973.
- [5] C.N. Serhan, N. Chiang, T.E. Van Dyke, Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators, *Nature Reviews Immunology* 8(5) (2008) 349-361.
- [6] G.S. Hotamisligil, E. Erbay, Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases, *Nature Reviews Immunology* 8(12) (2008) 923-934.
- [7] G.S. Firestein, **Evolving concepts of rheumatoid arthritis**, *Nature*, 2003, pp. 356–361.
- [8] J. Walsmith, R. Roubenoff, Cachexia in rheumatoid arthritis, *International Journal of Cardiology* 85(1) (2002) 89-99.
- [9] D.R. Thomas, Loss of skeletal muscle mass in aging: Examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia, *Clinical Nutrition* 26(4) (2007) 389-399.
- [10] W.J. Evans, J.E. Morley, J. Argiles, C. Bales, V. Baracos, D. Guttridge, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W.E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F.R. Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe, S.D. Anker, A. Boyce, G. Nuckolls, Cachexia: A new definition, *Clinical Nutrition* 27(6) (2008) 793-799.
- [11] M. Muscaritoli, S. Lucia, A. Molino, T. Cederholm, F. Rossi Fanelli, Muscle atrophy in aging and chronic diseases: is it sarcopenia or cachexia?, *Internal and Emergency Medicine* 8(7) (2013) 553-560.
- [12] C. Lok, THE LAST ILLNESS, *Nature* 528(7581) (2015) 182-183.
- [13] R. Roubenoff, R.A. Roubenoff, J.G. Cannon, J.J. Kehayias, H. Zhuang, B. Dawsonhughes, C.A. Dinarello, I.H. Rosenberg, RHEUMATOID CACHEXIA - CYTOKINE-DRIVEN HYPERMETABOLISM ACCOMPANYING REDUCED BODY CELL MASS IN CHRONIC INFLAMMATION, *Journal of Clinical Investigation* 93(6) (1994) 2379-2386.
- [14] L.C. Rall, R. Roubenoff, Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions, *Rheumatology* 43(10) (2004) 1219-1223.
- [15] R.W. Jackman, S.C. Kandarian, The molecular basis of skeletal muscle atrophy, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287(4) (2004) C834-C843.
- [16] N. Nishimoto, K. Yoshizaki, N. Miyasaka, K. Yamamoto, S. Kawai, T. Takeuchi, J. Hashimoto, J. Azuma, T. Kishimoto, Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial., *Arthritis Rheum* 50(6) (2004) 1761-9.
- [17] G. Kollias, P. Papadaki, F. Apparailly, M.J. Vervoordeldonk, R. Holmdahl, V. Baumans, C. Desaintes, J. Di Santo, J. Distler, P. Garside, M. Hegen, T.W.J. Huizinga, A. Juengel, L. Klareskog, I. McInnes, I. Ragoussis, G. Schett, B. t Hart, P.P. Tak, R. Toes, W. van den Berg, W. Wurst, S. Gay, Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment, *Annals of the Rheumatic Diseases* 70(8) (2011) 1357-1362.
- [18] D.L. Asquith, A.M. Miller, I.B. McInnes, F.Y. Liew, Animal models of rheumatoid arthritis, *European Journal of Immunology* 39(8) (2009) 2040-2044.
- [19] M.A. Abegg, R. Lucietto, P.V.G. Alabarse, M.F.A. Mendes, M.S. Benfato, Differential Resistance to Oxidants and Production of Hydrolytic Enzymes in *Candida albicans*, *Mycopathologia* 171(1) (2011) 35-41.
- [20] K.M. Maki-Petaja, J. Cheriyan, A.D. Booth, F.C. Hall, J. Brown, S.M.L. Wallace, M.J. Ashby, C.M. McEnery, I.B. Wilkinson, Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with

rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction, *International Journal of Cardiology* 129(3) (2008) 399-405.

[21] D.L. Scott, F. Wolfe, T.W.J. Huizinga, Rheumatoid arthritis, *Lancet* 376(9746) (2010) 1094-1108.

[22] I. Navarro-Millan, J.A. Singh, J.R. Curtis, Systematic Review of Tocilizumab for Rheumatoid Arthritis: A New Biologic Agent Targeting the Interleukin-6 Receptor, *Clinical Therapeutics* 34(4) (2012) 788-802.

[23] E.R. Senna, A.L. De Barros, E.O. Silva, I.F. Costa, L.V. Pereira, R.M. Ciconelli, M.B. Ferraz, Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach, *J Rheumatol* 31(3) (2004) 594-7.

[24] D.M. Lee, M.E. Weinblatt, Rheumatoid arthritis, *Lancet* 358(9285) (2001) 903-911.

[25] J.K. Pedersen, N.K. Kjaer, A.J. Svendsen, K. Horslev-Petersen, Incidence of rheumatoid arthritis from 1995 to 2001: impact of ascertainment from multiple sources, *Rheumatology International* 29(4) (2009) 411-415.

[26] D.D. Dunlop, L.M. Manheim, E.H. Yelin, J. Song, R.W. Chang, The costs of arthritis, *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research* 49(1) (2003) 101-113.

[27] J.d.O. Costa, A.M. Almeida, A.A. Guerra Junior, M.L. Cherchiglia, E.I. Gurgel Andrade, F.d.A. Acurcio, Treatment of rheumatoid arthritis in the Brazilian Unified National Health System: expenditures on infliximab compared to synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs, 2003-2006, *Cadernos De Saude Publica* 30(2) (2014) 283-295.

[28] G.O. Storey, M. Comer, D.L. Scott, CHRONIC ARTHRITIS BEFORE 1876 - EARLY BRITISH CASES SUGGESTING RHEUMATOID-ARTHRITIS, *Annals of the Rheumatic Diseases* 53(9) (1994) 557-560.

[29] F.C. Arnett, S.M. Edworthy, D.A. Bloch, D.J. McShane, J.F. Fries, N.S. Cooper, L.A. Healey, S.R. Kaplan, M.H. Liang, H.S. Luthra, T.A. Medsger, D.M. Mitchell, D.H. Neustadt, R.S. Pinals, J.G. Schaller, J.T. Sharp, R.L. Wilder, G.G. Hunder, THE AMERICAN-RHEUMATISM-ASSOCIATION 1987 REVISED CRITERIA FOR THE CLASSIFICATION OF RHEUMATOID-ARTHRITIS, *Arthritis and Rheumatism* 31(3) (1988) 315-324.

[30] T. Pincus, T. Sokka, F. Wolfe, Premature mortality in patients with rheumatoid arthritis: Evolving concepts, *Arthritis and Rheumatism* 44(6) (2001) 1234-1236.

[31] A.H.M. van der Helm-van Mil, T.W.J. Huizinga, Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets, *Arthritis Research & Therapy* 10(2) (2008).

[32] M. van Oosterhout, I. Bajema, E.W.N. Levarht, R.E.M. Toes, T.W.J. Huizinga, J.M. van Laar, Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 58(1) (2008) 53-60.

[33] D. van der Woude, J.J. Houwing-Duistermaat, R.E.M. Toes, T.W.J. Huizinga, W. Thomson, J. Worthington, A.H.M. van der Helm-van Mil, R.R.P. de Vries, Quantitative Heritability of Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive and Anti-Citrullinated Protein Antibody-Negative Rheumatoid Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 60(4) (2009) 916-923.

[34] E.A. Stahl, S. Raychaudhuri, E.F. Remmers, G. Xie, S. Eyre, B.P. Thomson, Y. Li, F.A.S. Kurreeman, A. Zernakova, A. Hinks, C. Guiducci, R. Chen, L. Alfredsson, C.I. Amos, K.G. Ardlie, A. Barton, J. Bowes, E. Brouwer, N.P. Burt, J.J. Catanese, J. Coblyn, M.J.H. Coenen, K.H. Costenbader, L.A. Criswell, J.B.A. Crusius, J. Cui, P.I.W. de Bakker, P.L. De Jager, B. Ding, P. Emery, E. Flynn, P. Harrison, L.J. Hocking, T.W.J. Huizinga, D.L. Kastner, X. Ke, A.T. Lee, X. Liu, P. Martin, A.W. Morgan, L. Padyukov, M.D. Posthumus, T.R.D.J. Radstake, D.M. Reid, M. Seielstad, M.F. Seldin, N.A. Shadick, S. Steer, P.P. Tak, W. Thomson, A.H.M. van der Helm-van Mil, I.E. van der Horst-Bruinsma, C.E. van der Schoot, P.L.C.M. van Riel, M.E. Weinblatt, A.G. Wilson, G.J. Wolbink, B.P. Wordsworth, C. Wijmenga, E.W. Karlson, R.E.M. Toes, N. de Vries, A.B. Begovich, J. Worthington, K.A. Siminovitch, P.K. Gregersen, L. Klareskog, R.M. Plenge, B. Consortium, Y. Consortium, Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci, *Nature Genetics* 42(6) (2010) 508-U56.

- [35] E. Stahl, S. Eyre, A. Hinks, A. Barton, E. Flynn, A. Lee, J. Coblyn, G. Xie, L. Padyukov, R. Chen, K. Siminovitch, L. Klareskog, S. Raychaudhuri, P. Gregersen, R. Plenge, J. Worthington, META-ANALYSIS OF SIX GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES IN > 25,000 CASE-CONTROL SAMPLES IDENTIFIES SEVEN NEW RHEUMATOID ARTHRITIS RISK LOCI, *Rheumatology* 49 (2010) 19-19.
- [36] C. Carlens, M.-P. Hergens, J. Grunewald, A. Ekblom, A. Eklund, C.O. Hoglund, J. Askling, Smoking, Use of Moist Snuff, and Risk of Chronic Inflammatory Diseases, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181(11) (2010) 1217-1222.
- [37] K.P. Liao, L. Alfredsson, E.W. Karlson, Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis, *Current Opinion in Rheumatology* 21(3) (2009) 279-283.
- [38] K.N. Verpoort, C.M. Jol-van der Zijde, E.A.M. Papendrecht-van der Voort, A. Ioan-Facsinay, J.W. Drijfhout, M.J.D. van Tol, F.C. Breedveld, T.W.J. Huizinga, R.E.M. Toes, Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response, *Arthritis and Rheumatism* 54(12) (2006) 3799-3808.
- [39] M.P.M. van der Linden, D. van der Woude, A. Ioan-Facsinay, E.W.N. Levarht, G. Stoeken-Rijsbergen, T.W.J. Huizinga, R.E.M. Toes, A.H.M. van der Helm-van Mil, Value of Anti-Modified Citrullinated Vimentin and Third-Generation Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Compared With Second-Generation Anti-Cyclic Citrullinated Peptide and Rheumatoid Factor in Predicting Disease Outcome in Undifferentiated Arthritis and Rheumatoid Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 60(8) (2009) 2232-2241.
- [40] H.K. Beard, R. Ryvar, J. Skingle, C.L. Greenbury, ANTI-COLLAGEN ANTIBODIES IN SERA FROM RHEUMATOID-ARTHRITIS PATIENTS, *Journal of Clinical Pathology* 33(11) (1980) 1077-1081.
- [41] M. Mullazehi, M.C. Wick, L. Klareskog, R. van Vollenhoven, J. Ronnelid, Anti-type II collagen antibodies are associated with early radiographic destruction in rheumatoid arthritis, *Arthritis Research & Therapy* 14(3) (2012).
- [42] G. Sindhu, M. Ratheesh, G.L. Shyni, B. Nambisan, A. Helen, Anti-inflammatory and antioxidative effects of mucilage of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) on adjuvant induced arthritic rats, *International Immunopharmacology* 12(1) (2012) 205-211.
- [43] G.D. Summers, C.M. Deighton, M.J. Rennie, A.H. Booth, Rheumatoid cachexia: a clinical perspective, *Rheumatology* 47(8) (2008) 1124-1131.
- [44] M.A. Fitzpatrick, S.P. Young, Metabolomics - a novel window into inflammatory disease, *Swiss Medical Weekly* 143 (2013).
- [45] R. Tierney, N. Pierson, Magnitude of body-cell-mass depletion death from wasting in AIDS13 and the timing, 1989, pp. 444-447.
- [46] W.D. Dewys, C. Begg, P.T. Lavin, P.R. Band, J.M. Bennett, J.R. Bertino, M.H. Cohen, H.O.J. Douglass, P.F. Engstrom, E.Z. Ezdinli, J. Horton, G.J. Johnson, C.G. Moertel, M.M. Oken, C. Perlia, C. Rosenbaum, M.N. Silverstein, R.T. Skeel, R.W. Sponzo, D.C. Tormey, Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients., *The American Journal of Medicine*, 1980, pp. 491-497.
- [47] L.C. Rall, C.J. Rosen, G. Dolnikowski, W.J. Hartman, N. Lundgren, L.W. Abad, C.A. Dinarello, R. Roubenoff, Protein metabolism in rheumatoid arthritis and aging - Effects of muscle strength training and tumor necrosis factor alpha, *Arthritis and Rheumatism* 39(7) (1996) 1115-1124.
- [48] R. Khurana, S.M. Berney, *Clinical aspects of rheumatoid arthritis*, Pathophysiology, 2005, pp. 153-165.
- [49] V.e.O. Teixeira, L.I. Filippin, R.M. Xavier, Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia, *Rev Bras Reumatol* 52(2) (2012) 252-9.
- [50] T.-P. Lee, B.-L. Chiang, Sex differences in spontaneous versus induced animal models of autoimmunity, *Autoimmunity Reviews* 11(6-7) (2012) A422-A429.
- [51] E. Castellero, A.I. Martin, M. Lopez-Menduina, M. Granado, M.A. Villanua, A. Lopez-Calderon, IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting, *Molecular and Cellular Endocrinology* 309(1-2) (2009) 8-16.
- [52] S.M. Phillips, E.I. Glover, M.J. Rennie, Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle, *Journal of Applied Physiology* 107(3) (2009) 645-654.

- [53] P.G. Oliveira, R. Grespan, L.G. Pinto, L. Meurer, J.C.T. Brenol, R. Roesler, G. Schwartzmann, F.Q. Cunha, R.M. Xavier, Protective Effect of RC-3095, an Antagonist of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, in Experimental Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 63(10) (2011) 2956-2965.
- [54] E.-M. Choi, Ligularia fischeri leaf extract prevents the oxidative stress in DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis, *Journal of Applied Toxicology* 27(2) (2007) 176-182.
- [55] E.-M. Choi, Oxidative status of DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis, *Journal of Applied Toxicology* 27(5) (2007) 472-481.
- [56] E.-M. Choi, Suppressing effects of potato (*Solanum tuberosum*) on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice, *Food Science and Biotechnology* 16(1) (2007) 43-48.
- [57] K. Kalantar-Zadeh, C. Rhee, J.J. Sim, P. Stenvinkel, S.D. Anker, C.P. Kovesdy, Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(2) (2013) 89-94.
- [58] L.I. Filippin, V.N. Teixeira, P.R. Viacava, P.S. Lora, L.L. Xavier, R.M. Xavier, Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2013).
- [59] S. Ali, J.M. Garcia, Sarcopenia, Cachexia and Aging: Diagnosis, Mechanisms and Therapeutic Options - A Mini-Review, *Gerontology* 60(4) (2014) 294-305.
- [60] S. Palus, S. von Haehling, J. Springer, Muscle wasting: An overview of recent developments in basic research, *International Journal of Cardiology* 176(3) (2014) 640-644.
- [61] M. Cesari, R.A. Fielding, M. Pahor, B. Goodpaster, M. Hellerstein, G.A. Van Kan, S.D. Anker, S. Rutkove, J.W. Vrijbloed, M. Isaac, Y. Rolland, C. M'Rini, M. Aubertin-Leheudre, J.M. Cedarbaum, M. Zamboni, C.C. Sieber, D. Laurent, W.J. Evans, R. Roubenoff, J.E. Morley, B. Vellas, S. Int Working Grp, Biomarkers of sarcopenia in clinical trials-recommendations from the International Working Group on Sarcopenia, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 3(3) (2012) 181-190.
- [62] G. Scharf, J. Heineke, Finding good biomarkers for sarcopenia, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 3(3) (2012) 145-148.
- [63] A. Nedergaard, M.A. Karsdal, S. Sun, K. Henriksen, Serological muscle loss biomarkers: an overview of current concepts and future possibilities, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(1) (2013) 1-17.
- [64] L. Steinbeck, N. Ebner, M. Valentova, A. Sandek, T. Bekfani, W. Doehner, S.D. Anker, S. Von Haehling, C-terminal agrin-fragment as a novel diagnostic marker for muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure, *European Heart Journal* 34 (2013) 939-940.
- [65] S.S. Patel, M.Z. Molnar, J.A. Tayek, J.H. Ix, N. Noori, D. Benner, S. Heymsfield, J.D. Kopple, C.P. Kovesdy, K. Kalantar-Zadeh, Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: results of a cross-sectional study and review of literature, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(1) (2013) 19-29.
- [66] J.H. Ix, C.L. Wassel, L.A. Stevens, G.J. Beck, M. Froissart, G. Navis, R. Rodby, V.E. Torres, Y. Zhang, T. Greene, A.S. Levey, Equations to Estimate Creatinine Excretion Rate: The CKD Epidemiology Collaboration, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 6(1) (2011) 184-191.
- [67] P. Brancaccio, N. Maffulli, R. Buonauro, F.M. Limongelli, Serum enzyme monitoring in sports medicine, *Clinics in Sports Medicine* 27(1) (2008) 1-+.
- [68] Z.A. Puthuchery, J. Rawal, M. McPhail, B. Connolly, G. Ratnayake, P. Chan, N.S. Hopkinson, R. Padhke, T. Dew, P.S. Sidhu, C. Velloso, J. Seymour, C.C. Agley, A. Selby, M. Limb, L.M. Edwards, K. Smith, A. Rowlerson, M.J. Rennie, J. Moxham, S.D.R. Harridge, N. Hart, H.E. Montgomery, Acute Skeletal Muscle Wasting in Critical Illness, *Jama-Journal of the American Medical Association* 310(15) (2013) 1591-1600.
- [69] M.A.E. van Bokhorst-de van der Schueren, N.P.C. Konijn, I.E.M. Bultink, W.F. Lems, C.P. Earthman, L.H.D. van Tuyl, Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis, *Clinical Nutrition* 31(6) (2012) 1008-1010.

- [70] L. Semerano, P.-H. Romeo, M.-C. Boissier, *Metabolomics for rheumatic diseases: has the time come?*, *Annals of the Rheumatic Diseases* 74(7) (2015) 1325-1326.
- [71] R. Priori, R. Scrivo, J. Brandt, M. Valerio, L. Casadei, G. Valesini, C. Manetti, *Metabolomics in rheumatic diseases: The potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis, and treatment efficacy*, *Autoimmunity Reviews* 12(10) (2013) 1022-1030.
- [72] D. Drogan, W.B. Dunn, W. Lin, B. Buijsse, M.B. Schulze, C. Langenberg, M. Brown, A. Floegel, S. Dietrich, O. Rolandsson, D.C. Wedge, R. Goodacre, N.G. Forouhi, S.J. Sharp, J. Spranger, N.J. Wareham, H. Boeing, *Untargeted Metabolic Profiling Identifies Altered Serum Metabolites of Type 2 Diabetes Mellitus in a Prospective, Nested Case Control Study*, *Clinical Chemistry* 61(3) (2015) 487-497.
- [73] D. Calligaris, D.R. Feldman, I. Norton, P.K. Brastianos, I.F. Dunn, S. Santagata, N.Y.R. Agar, *Molecular typing of meningiomas by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging for surgical decision-making*, *International Journal of Mass Spectrometry* 377 (2015) 690-698.
- [74] W.B. Dunn, W. Lin, D. Broadhurst, P. Begley, M. Brown, E. Zelena, A.A. Vaughan, A. Halsall, N. Harding, J.D. Knowles, S. Francis-McIntyre, A. Tseng, D.I. Ellis, S. O'Hagan, G. Aarons, B. Benjamin, S. Chew-Graham, C. Moseley, P. Potter, C.L. Winder, C. Potts, P. Thornton, C. McWhirter, M. Zubair, M. Pan, A. Burns, J.K. Cruickshank, G.C. Jayson, N. Purandare, F.C.W. Wu, J.D. Finn, J.N. Haselden, A.W. Nicholls, I.D. Wilson, R. Goodacre, D.B. Kell, *Molecular phenotyping of a UK population: defining the human serum metabolome*, *Metabolomics* 11(1) (2015) 9-26.
- [75] W.B. Dunn, D.I. Broadhurst, H.J. Atherton, R. Goodacre, J.L. Griffin, *Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy*, *Chemical Society Reviews* 40(1) (2011) 387-426.
- [76] C. Ludwig, M.R. Viant, *Two-dimensional J-resolved NMR Spectroscopy: Review of a Key Methodology in the Metabolomics Toolbox*, *Phytochemical Analysis* 21(1) (2010) 22-32.
- [77] H.M. Parsons, C. Ludwig, M.R. Viant, *Line-shape analysis of J-resolved NMR spectra: application to metabolomics and quantification of intensity errors from signal processing and high signal congestion*, *Magnetic Resonance in Chemistry* 47 (2009) S86-S95.
- [78] C. Ludwig, U.L. Guenther, *MetaboLab - advanced NMR data processing and analysis for metabolomics*, *Bmc Bioinformatics* 12 (2011).
- [79] S. Ravanbakhsh, P. Liu, T.C. Bjordahl, R. Mandal, J.R. Grant, M. Wilson, R. Eisner, I. Sinelnikov, X. Hu, C. Luchinat, R. Greiner, D.S. Wishart, *Accurate, Fully-Automated NMR Spectral Profiling for Metabolomics*, *Plos One* 10(5) (2015).
- [80] A.M. Weljie, J. Newton, P. Mercier, E. Carlson, C.M. Slupsky, *Targeted profiling: Quantitative analysis of H-1 NMR metabolomics data*, *Analytical Chemistry* 78(13) (2006) 4430-4442.
- [81] C. Ludwig, J.M. Easton, A. Lodi, S. Tiziani, S.E. Manzoor, A.D. Southam, J.J. Byrne, L.M. Bishop, S. He, T.N. Arvanitis, U.L. Guenther, M.R. Viant, *Birmingham Metabolite Library: a publicly accessible database of 1-D H-1 and 2-D H-1 J-resolved NMR spectra of authentic metabolite standards (BML-NMR)*, *Metabolomics* 8(1) (2012) 8-18.
- [82] S.P. Young, S.R. Kapoor, M.R. Viant, J.J. Byrne, A. Filer, C.D. Buckley, G.D. Kitas, K. Raza, *The Impact of Inflammation on Metabolomic Profiles in Patients With Arthritis, Arthritis and Rheumatism* 65(8) (2013) 2015-2023.
- [83] M.R. Viant, *Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310(3) (2003) 943-948.
- [84] S.P. Young, M. Nessim, F. Falciani, V. Trevino, S.P. Banerjee, R.A.H. Scott, P.I. Murray, G.R. Wallace, *Metabolomic analysis of human vitreous humor differentiates ocular inflammatory disease*, *Molecular Vision* 15(125-29) (2009) 1210-1217.
- [85] V. Trevino, F. Falciani, *GALGO: an R package for multivariate variable selection using genetic algorithms*, *Bioinformatics* 22(9) (2006) 1154-1156.
- [86] J. Xia, I.V. Sinelnikov, B. Han, D.S. Wishart, *MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful*, *Nucleic Acids Research* 43(W1) (2015) W251-W257.

- [87] J. Xia, R. Mandal, I.V. Sinelnikov, D. Broadhurst, D.S. Wishart, MetaboAnalyst 2.0-a comprehensive server for metabolomic data analysis, *Nucleic Acids Research* 40(W1) (2012) W127-W133.
- [88] J. Xia, N. Psychogios, N. Young, D.S. Wishart, MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation, *Nucleic Acids Research* 37 (2009) W652-W660.
- [89] F. Chauchard, R. Cogdill, S. Roussel, J.M. Roger, V. Bellon-Maurel, Application of LS-SVM to non-linear phenomena in NIR spectroscopy: development of a robust and portable sensor for acidity prediction in grapes, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 71(2) (2004) 141-150.
- [90] S.R. Kapoor, A. Filer, M.A. Fitzpatrick, B.A. Fisher, P.C. Taylor, C.D. Buckley, I.B. McInnes, K. Raza, S.P. Young, Metabolic Profiling Predicts Response to Anti-Tumor Necrosis Factor alpha Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 65(6) (2013) 1448-1456.
- [91] R.K. Madsen, T. Lundstedt, J. Gabrielsson, C.-J. Sennbro, G.-M. Alenius, T. Moritz, S. Rantapaa-Dahlqvist, J. Trygg, Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis, *Arthritis Research & Therapy* 13(1) (2011).
- [92] S. Thornton, L.E. Duwel, G.P. Boivin, Y.H. Ma, R. Hirsch, Association of the course of collagen-induced arthritis with distinct patterns of cytokine and chemokine messenger RNA expression, *Arthritis and Rheumatism* 42(6) (1999) 1109-1118.
- [93] S. Subramanian, M. Tovey, M. Afentoulis, A. Krogstad, A.A. Vandembark, H. Offner, Ethinyl estradiol treats collagen-induced arthritis in DBA/1LacJ mice by inhibiting the production of TNF-alpha and IL-1 beta, *Clinical Immunology* 115(2) (2005) 162-172.

## Sítios citados

<https://www.charlifoundation.org/ketogenic-therapy/therapies-2/brain-tumor-cancer/item/1024-the-warburg-effect> (Visitado em 14/Março/2016).

<http://www.chenomx.com/software/> (Visitado em 14/Março/2016).

[www.metaboanalyst.ca](http://www.metaboanalyst.ca) (Visitado em 14/Março/2016).

<http://www.genome.jp/kegg/> (Visitado em 14/Março/2016).

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Visitado em 14/Março/2016).

<http://www.hmdb.ca/> (Visitado em 14/Março/2016).

<http://www.springer.com/medicine/internal/journal/13539> (Visitado em 14/Março/2016).

## Artigo

Artigo científico que a ser submetido no *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. As diretrizes podem ser obtidas na página <http://www.springer.com/medicine/internal/journal/13539> .

Este projeto foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental do HCPA e financiado pelo mesmo sob numeração: FIPE-HCPA 14-0297.

## Rheumatoid cachexia biomarker

### – a metabolomics approach in experimental arthritis

Paulo VG Alabarse<sup>1,2,3</sup>, Priscila S Lora<sup>1,4</sup>, Jordana MS Silva<sup>1,2</sup>, Andrelise S Almeida<sup>1,5</sup>, Mayara S de Oliveira<sup>1,5</sup>, Mônica Immig<sup>1,5</sup>, Rafaela CE Santo<sup>1,2</sup>, Eduarda C Freitas<sup>1,2</sup>, Vivian ON Teixeira<sup>1,2</sup>, Camilla L Bathurst<sup>3</sup>, Lidiane I Filippin<sup>1,6</sup>, Stephen P Young<sup>3</sup>, Ricardo M Xavier<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Doenças Autoimunes, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

<sup>3</sup>Rheumatology Research Group, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom

<sup>4</sup>Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Brazil.

<sup>5</sup>Faculdade de Biomedicina, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Brazil.

<sup>6</sup>Centro Universitário La Salle, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Ricardo M Xavier, e-mail: rxavier10@gmail.com , telephone: +55 51 3359 8837; fax number: +55 51 3359 8340.

#### Abstract.

**Background:** Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease in which impaired muscle function is observed in up to 66% of RA patient, it can progress into rheumatoid cachexia. Currently, there is no diagnose or treatment consensus. Collagen-induced arthritis (CIA) animal model may also cachexia similarly to patients and could be used to search for biomarkers through metabolomics. The focuses in this research is to confirm that CIA animal model develops cachexia and search for metabolites related to cachexia development.

**Methods:** CIA and healthy animals were tested for: physical performance test; free exploratory locomotion test; strength test; hindpaw edema volume measurement; follow up disease development; weighted; and food intake followed at 0, 18, 35, 45, 55, and 65 days after disease induction. After that, animals were euthanized and muscle (gastrocnemius – GA; and tibial anterior – TA) were dissected, and weighted. Urine was collected and used for nuclear magnetic resonance (NMR). Metabolites were identified by Chenomx and by the Birmingham Metabolite Library. Statistical model were performed using PCA, PLSDA, PLSR, followed by metabolic pathway analysis. Final list were filtered for muscle metabolism related pathways.

**Results:** CIA group has shown increased fatigue, strength and free locomotion reduction, and reduced relative muscle weight compared to CO group. A list of potential biomarkers for rheumatoid cachexia reached 28 metabolites.

**Conclusions:** CIA animal model is a feasible experimental model for rheumatoid cachexia regarding its similarities to RA patients. Concerning the metabolic profile from this model, a group of metabolites related to muscle loss can be suggested, which can be tested as biomarkers of rheumatoid cachexia, targeting prognosis, diagnosis, and follow up.

**Key words:** NMR, CIA, muscle loss, metabolomics, cachexia, biomarkers

Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Conflict of interest:**

No conflict of interest.

**References:**

- [1] R. Roubenoff, R.A. Roubenoff, J.G. Cannon, J.J. Kehayias, H. Zhuang, B. Dawsonhughes, C.A. Dinarello, I.H. Rosenberg, RHEUMATOID CACHEXIA - CYTOKINE-DRIVEN HYPERMETABOLISM ACCOMPANYING REDUCED BODY CELL MASS IN CHRONIC INFLAMMATION, *Journal of Clinical Investigation* 93(6) (1994) 2379-2386.
- [2] K. Sakuma, A. Yamaguchi, Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 3(2) (2012) 77-94.
- [3] W.J. Evans, J.E. Morley, J. Argiles, C. Bales, V. Baracos, D. Guttridge, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W.E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F.R. Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe, S.D. Anker, A. Boyce, G. Nuckolls, Cachexia: A new definition, *Clinical Nutrition* 27(6) (2008) 793-799.
- [4] M. Muscaritoli, S. Lucia, A. Molino, T. Cederholm, F. Rossi Fanelli, Muscle atrophy in aging and chronic diseases: is it sarcopenia or cachexia?, *Internal and Emergency Medicine* 8(7) (2013) 553-560.
- [5] C. Lok, THE LAST ILLNESS, *Nature* 528(7581) (2015) 182-183.
- [6] I. Navarro-Millan, J.A. Singh, J.R. Curtis, Systematic Review of Tocilizumab for Rheumatoid Arthritis: A New Biologic Agent Targeting the Interleukin-6 Receptor, *Clinical Therapeutics* 34(4) (2012) 788-802.
- [7] G. Sindhu, M. Ratheesh, G.L. Shyni, B. Nambisan, A. Helen, Anti-inflammatory and antioxidative effects of mucilage of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) on adjuvant induced arthritic rats, *International Immunopharmacology* 12(1) (2012) 205-211.
- [8] M.A.E. van Bokhorst-de van der Schueren, N.P.C. Konijn, I.E.M. Bultink, W.F. Lems, C.P. Earthman, L.H.D. van Tuyl, Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis, *Clinical Nutrition* 31(6) (2012) 1008-1010.
- [9] A.-C. Elkan, N. Hakansson, J. Frostegard, T. Cederholm, I. Hafstrom, Rheumatoid cachexia is associated with dyslipidemia and low levels of atheroprotective natural antibodies against phosphorylcholine but not with dietary fat in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study, *Arthritis Research & Therapy* 11(2) (2009).
- [10] R. Munro, H. Capell, Prevalence of low body mass in rheumatoid arthritis: Association with the acute phase response, *Annals of the Rheumatic Diseases* 56(5) (1997) 326-329.
- [11] R. Roubenoff, R.A. Roubenoff, L.M. Ward, S.M. Holland, D.B. Hellmann, RHEUMATOID CACHEXIA - DEPLETION OF LEAN BODY-MASS IN RHEUMATOID-ARTHRITIS - POSSIBLE ASSOCIATION WITH TUMOR-NECROSIS-FACTOR, *Journal of Rheumatology* 19(10) (1992) 1505-1510.
- [12] W. Fukuda, A. Omoto, S. Oku, T. Tanaka, Y. Tsubouchi, M. Kohno, Y. Kawahito, Contribution of rheumatoid arthritis disease activity and disability to rheumatoid cachexia, *Modern Rheumatology* 20(5) (2010) 439-443.
- [13] G.D. Summers, C.M. Deighton, M.J. Rennie, A.H. Booth, Rheumatoid cachexia: a clinical perspective, *Rheumatology* 47(8) (2008) 1124-1131.
- [14] D.D. Dunlop, L.M. Manheim, E.H. Yelin, J. Song, R.W. Chang, The costs of arthritis, *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research* 49(1) (2003) 101-113.
- [15] S. Palus, S. von Haehling, J. Springer, Muscle wasting: An overview of recent developments in basic research, *International Journal of Cardiology* 176(3) (2014) 640-644.

- [16] M. Cesari, R.A. Fielding, M. Pahor, B. Goodpaster, M. Hellerstein, G.A. Van Kan, S.D. Anker, S. Rutkove, J.W. Vrijbloed, M. Isaac, Y. Rolland, C. M'Rini, M. Aubertin-Leheudre, J.M. Cedarbaum, M. Zamboni, C.C. Sieber, D. Laurent, W.J. Evans, R. Roubenoff, J.E. Morley, B. Vellas, S. Int Working Grp, Biomarkers of sarcopenia in clinical trials-recommendations from the International Working Group on Sarcopenia, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 3(3) (2012) 181-190.
- [17] G. Scharf, J. Heineke, Finding good biomarkers for sarcopenia, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 3(3) (2012) 145-148.
- [18] S. Ali, J.M. Garcia, Sarcopenia, Cachexia and Aging: Diagnosis, Mechanisms and Therapeutic Options - A Mini-Review, *Gerontology* 60(4) (2014) 294-305.
- [19] P.G. Oliveira, R. Grespan, L.G. Pinto, L. Meurer, J.C.T. Brenol, R. Roesler, G. Schwartzmann, F.Q. Cunha, R.M. Xavier, Protective Effect of RC-3095, an Antagonist of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, in Experimental Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 63(10) (2011) 2956-2965.
- [20] E.-M. Choi, Ligularia fischeri leaf extract prevents the oxidative stress in DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis, *Journal of Applied Toxicology* 27(2) (2007) 176-182.
- [21] E.-M. Choi, Oxidative status of DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis, *Journal of Applied Toxicology* 27(5) (2007) 472-481.
- [22] E.-M. Choi, Suppressive effects of potato (*Solanum tuberosum*) on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice, *Food Science and Biotechnology* 16(1) (2007) 43-48.
- [23] R. Roubenoff, L.M. Freeman, D.E. Smith, L.W. Abad, C.A. Dinarello, J.J. Kehayias, Adjuvant arthritis as a model of inflammatory cachexia, *Arthritis and Rheumatism* 40(3) (1997) 534-539.
- [24] T. Yamada, N. Place, N. Kosterina, T. Ostberg, S.J. Zhang, C. Grundtman, H. Erlandsson-Harris, I.E. Lundberg, B. Glenmark, J.D. Bruton, H. Westerblad, Impaired Myofibrillar Function in the Soleus Muscle of Mice With Collagen-Induced Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 60(11) (2009) 3280-3289.
- [25] A. Hartog, J. Hulsman, J. Garssen, Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis, *Bmc Musculoskeletal Disorders* 10 (2009).
- [26] L.I. Filippin, V.N. Teixeira, P.R. Viacava, P.S. Lora, L.L. Xavier, R.M. Xavier, Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2013).
- [27] V.d.O. Nunes Teixeira, L.I. Filippin, P.R. Viacava, P.G. de Oliveira, R.M. Xavier, Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy, *Experimental Biology and Medicine* 238(12) (2013) 1421-1430.
- [28] L. Semerano, P.-H. Romeo, M.-C. Boissier, Metabolomics for rheumatic diseases: has the time come?, *Annals of the Rheumatic Diseases* 74(7) (2015) 1325-1326.
- [29] R. Priori, R. Scivo, J. Brandt, M. Valerio, L. Casadei, G. Valesini, C. Manetti, Metabolomics in rheumatic diseases: The potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis, and treatment efficacy, *Autoimmunity Reviews* 12(10) (2013) 1022-1030.
- [30] S.P. Young, S.R. Kapoor, M.R. Viant, J.J. Byrne, A. Filer, C.D. Buckley, G.D. Kitis, K. Raza, The Impact of Inflammation on Metabolomic Profiles in Patients With Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 65(8) (2013) 2015-2023.
- [31] S.R. Kapoor, A. Filer, M.A. Fitzpatrick, B.A. Fisher, P.C. Taylor, C.D. Buckley, I.B. McInnes, K. Raza, S.P. Young, Metabolic Profiling Predicts Response to Anti-Tumor Necrosis Factor alpha Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 65(6) (2013) 1448-1456.
- [32] M.A. Fitzpatrick, S.P. Young, Metabolomics - a novel window into inflammatory disease, *Swiss Medical Weekly* 143 (2013).
- [33] E.F. Rosloniec, M. Cremer, A.H. Kang, L.K. Myers, D.D. Brand, Collagen-induced arthritis., *Curr Protoc Immunol Chapter 15* (2010) Unit 15.5.1-25.
- [34] R.M.J. Deacon, Measuring the strength of mice, *Journal of visualized experiments*, 2013, p. 2610.

- [35] J. Xia, N. Psychogios, N. Young, D.S. Wishart, MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation, *Nucleic Acids Research* 37 (2009) W652-W660.
- [36] J. Xia, R. Mandal, I.V. Sinelnikov, D. Broadhurst, D.S. Wishart, MetaboAnalyst 2.0-a comprehensive server for metabolomic data analysis, *Nucleic Acids Research* 40(W1) (2012) W127-W133.
- [37] J. Xia, I.V. Sinelnikov, B. Han, D.S. Wishart, MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful, *Nucleic Acids Research* 43(W1) (2015) W251-W257.
- [38] M. Brenner, H.C. Meng, N.C. Yarlett, M.M. Griffiths, E.F. Remmers, R.L. Wilder, N.S. Gulko, The non-major histocompatibility complex quantitative trait locus Cia10 contains a major arthritis gene and regulates disease severity, pannus formation, and joint damage, *Arthritis and Rheumatism* 52(1) (2005) 322-332.
- [39] L.I. Filippin, A.J. Moreira, N.P. Marroni, R.M. Xavier, Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury, *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 21(3-4) (2009) 157-163.
- [40] L.C. Rall, R. Roubenoff, Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions, *Rheumatology* 43(10) (2004) 1219-1223.
- [41] M. Romanick, L.V. Thompson, H.M. Brown-Borg, Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1832(9) (2013) 1410-1420.
- [42] K. Kalantar-Zadeh, C. Rhee, J.J. Sim, P. Stenvinkel, S.D. Anker, C.P. Kovesdy, Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(2) (2013) 89-94.
- [43] M.-F. Penet, M.M. Gadiya, B. Krishnamachary, S. Nimmagadda, M.G. Pomper, D. Artemov, Z.M. Bhujwala, Metabolic Signatures Imaged in Cancer-Induced Cachexia, *Cancer Research* 71(22) (2011) 6948-6956.
- [44] M.A. McNurlan, P.J. Garlick, R.T. Steigbigel, K.A. DeCristofaro, R.A. Frost, C.H. Lang, R.W. Johnson, A.M. Santasier, C.J. Cabahug, J. Fuhrer, M.C. Gelato, Responsiveness of muscle protein synthesis to growth hormone administration in HIV-infected individuals declines with severity of disease, *Journal of Clinical Investigation* 100(8) (1997) 2125-2132.
- [45] J.A. Tayek, J.A. Brasel, EFFECTS OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA ON SKELETAL-MUSCLE AND WALKER 256 CARCINOSARCOMA PROTEIN-METABOLISM STUDIED INVIVO, *Cancer Research* 50(9) (1990) 2765-2768.
- [46] B.K. Ubhi, J.H. Riley, P.A. Shaw, D.A. Lomas, R. Tal-Singer, W. MacNee, J.L. Griffin, S.C. Connor, Metabolic profiling detects biomarkers of protein degradation in COPD patients, *European Respiratory Journal* 40(2) (2012) 345-355.
- [47] P.J. Flakoll, S.L. Nissen, J.A. Rathmacher, Determination of human muscle mass | using metabolic marker for 3-methyl-histidine for e.g. monitoring athletic condition or wasting diseases, Univ Vanderbilt; Univ Iowa State Res Found Inc.
- [48] S.S. Patel, M.Z. Molnar, J.A. Tayek, J.H. Ix, N. Noori, D. Benner, S. Heymsfield, J.D. Kopple, C.P. Kovesdy, K. Kalantar-Zadeh, Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: results of a cross-sectional study and review of literature, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(1) (2013) 19-29.
- [49] K. Bauerová, S. Poništ, D. Mihalová, F. Dráfi, V. Kuncírová, Utilization of adjuvant arthritis model for evaluation of new approaches in rheumatoid arthritis therapy focused on regulation of immune processes and oxidative stress, *Interdiscip Toxicol*, 2011.
- [50] F. Drafi, K. Bauerova, V. Kuncirova, S. Ponist, D. Mihalova, T. Fedorova, J. Harmatha, R. Nosal, Pharmacological influence on processes of adjuvant arthritis: Effect of the combination of an antioxidant active substance with methotrexate, *Interdiscip Toxicol* 5(2) (2012) 84-91.
- [51] P. Arner, F. Henjes, J.M. Schwenk, S. Darmanis, I. Dahlman, B.-M. Iresjo, P. Naredi, T. Agustsson, K. Lundholm, P. Nilsson, M. Ryden, Circulating Carnosine Dipeptidase 1 Associates with Weight Loss and Poor Prognosis in Gastrointestinal Cancer, *Plos One* 10(4) (2015).
- [52] M. Watanabe, M.E. Suliman, A.R. Qureshi, E. Garcia-Lopez, P. Barany, O. Heimbürger, P. Stenvinkel, B. Lindholm, Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease

- patients: associations with inflammation, oxidative stress, and mortality, *American Journal of Clinical Nutrition* 87(6) (2008) 1860-1866.
- [53] F.B. Stifel, R.H. Herman, IS HISTIDINE AN ESSENTIAL AMINO-ACID IN MAN, *American Journal of Clinical Nutrition* 25(2) (1972) 182-&.
- [54] Y. Endo, T. Tabata, H. Kuroda, T. Tadano, K. Matsushima, M. Watanabe, Induction of histidine decarboxylase in skeletal muscle in mice by electrical stimulation, prolonged walking and interleukin-1, *Journal of Physiology-London* 509(2) (1998) 587-598.
- [55] D.J. Ham, M.K. Caldow, G.S. Lynch, R. Koopman, Arginine protects muscle cells from wasting in vitro in an mTORC1-dependent and NO-independent manner, *Amino Acids* 46(12) (2014) 2643-2652.
- [56] C. Goto, K. Nishioka, T. Umemura, D. Jitsuiki, A. Sakaguchi, M. Kawamura, K. Chayama, M. Yoshizumi, Y. Higashi, Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through oxide bioavailability an increase in nitric in humans, *American Journal of Hypertension* 20(8) (2007) 825-830.
- [57] T.L. Merry, G.R. Steinberg, G.S. Lynch, G.K. McConell, Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298(3) (2010) E577-E585.
- [58] L.I. Filippin, M. Jose Cuevas, E. Lima, N.P. Marroni, J. Gonzalez-Gallego, R.M. Xavier, The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle, *Inflammation Research* 60(4) (2011) 347-356.
- [59] L.I. Filippin, M. Jose Cuevas, E. Lima, N.P. Marroni, J. Gonzalez-Gallego, R.M. Xavier, Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle, *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 24(1) (2011) 43-49.
- [60] J.M. Kelley, L.B. Hughes, S.L. Bridges, Jr., Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic inflammation in rheumatoid arthritis?, *Journal of Neuroinflammation* 5 (2008).
- [61] H. Ma, X. Liu, Y. Wu, N. Zhang, The Intervention Effects of Acupuncture on Fatigue Induced by Exhaustive Physical Exercises: A Metabolomics Investigation, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2015).
- [62] R. Eisner, C. Stretch, T. Eastman, J. Xia, D. Hau, S. Damaraju, R. Greiner, D.S. Wishart, V.E. Baracos, Learning to predict cancer-associated skeletal muscle wasting from H-1-NMR profiles of urinary metabolites, *Metabolomics* 7(1) (2011) 25-34.
- [63] T.J. Wilkinson, A.B. Lemmey, F. Sheikh, Y. Ahmad, S. Chitale, J. Jones, P. Maddison, T.D. O'Brien, CAN CREATINE SUPPLEMENTATION IMPROVE BODY COMPOSITION AND OBJECTIVE PHYSICAL FUNCTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS? A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL, *Rheumatology* 54 (2015) 82-82.
- [64] P.D. Wagner, Skeletal muscles in chronic obstructive pulmonary disease: Deconditioning, or myopathy?, *Respirology* 11(6) (2006) 681-686.
- [65] G.K. Sakkas, M. Schambelan, K. Mulligan, Can the use of creatine supplementation attenuate muscle loss in cachexia and wasting?, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 12(6) (2009) 623-627.
- [66] G. Biolo, T. Cederholm, M. Muscaritoli, Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: From sarcopenic obesity to cachexia, *Clinical Nutrition* 33(5) (2014) 737-748.
- [67] M.J. Rennie, P.A. MacLennan, H.S. Hundal, B. Weryk, K. Smith, P.M. Taylor, C. Egan, P.W. Watt, SKELETAL-MUSCLE GLUTAMINE TRANSPORT, INTRAMUSCULAR GLUTAMINE CONCENTRATION, AND MUSCLE-PROTEIN TURNOVER, *Metabolism-Clinical and Experimental* 38(8) (1989) 47-51.
- [68] T. Sato, Y. Ito, T. Nagasawa, Lysine suppresses myofibrillar protein degradation by regulating the autophagic-lysosomal system through phosphorylation of Akt in C2C12 cells, *Springerplus* 3 (2014).

- [69] S. Chevalier, A. Winter, Do patients with advanced cancer have any potential for protein anabolism in response to amino acid therapy?, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 17(3) (2014) 213-218.
- [70] S.J. Peters, A. Van Helvoort, D. Kegler, J.M. Argiles, Y.C. Luiking, A. Laviano, J. Van Bergenhenegouwen, N.E.P. Deutz, H.P. Haagsman, M. Gorselink, K. Van Norren, Dose-dependent effects of leucine supplementation on preservation of muscle mass in cancer cachectic mice, *Oncology Reports* 26(1) (2011) 247-254.
- [71] A. Bevington, J. Brown, J. Walls, Leucine suppresses acid-induced protein wasting in L6 rat muscle cells, *European Journal of Clinical Investigation* 31(6) (2001) 497-503.
- [72] M.R.N. Ranjbar, Y. Luo, C. Di Poto, R.S. Varghese, A. Ferrarini, C. Zhang, N.I. Sarhan, H. Soliman, M.G. Tadesse, D.H. Ziada, R. Roy, H.W. Ransom, GC-MS Based Plasma Metabolomics for Identification of Candidate Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Cohort, *Plos One* 10(6) (2015).
- [73] M.J. Toth, M.M. LeWinter, P.A. Ades, D.E. Matthews, Impaired muscle protein anabolic response to insulin and amino acids in heart failure patients: relationship with markers of immune activation, *Clinical Science* 119(11-12) (2010) 467-476.
- [74] Z.A. Puthuchery, J. Rawal, M. McPhail, B. Connolly, G. Ratnayake, P. Chan, N.S. Hopkinson, R. Padhke, T. Dew, P.S. Sidhu, C. Velloso, J. Seymour, C.C. Agley, A. Selby, M. Limb, L.M. Edwards, K. Smith, A. Rowlerson, M.J. Rennie, J. Moxham, S.D.R. Harridge, N. Hart, H.E. Montgomery, Acute Skeletal Muscle Wasting in Critical Illness, *Jama-Journal of the American Medical Association* 310(15) (2013) 1591-1600.
- [75] H.J. Smith, N.A. Greenberg, M.J. Tisdale, Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice, *British Journal of Cancer* 91(2) (2004) 408-412.
- [76] K.K.A. Witte, A.L. Clark, J.G.F. Cleland, Chronic heart failure and micronutrients, *Journal of the American College of Cardiology* 37(7) (2001) 1765-1774.
- [77] M. Liu, A.P. Alimov, H. Wang, J.A. Frank, W. Katz, M. Xu, Z.J. Ke, J. Luo, THIAMINE DEFICIENCY INDUCES ANOREXIA BY INHIBITING HYPOTHALAMIC AMPK, *Neuroscience* 267 (2014) 102-113.
- [78] R.J. Woodward, Synergistic dietary supplement for treating e.g. arthritis - contains D-phenylalanine, a vitamin B and glucosamine sulphate, WOODWARD R J (WOOD-Individual) WOODWARD R J (WOOD-Individual).
- [79] P.C. Even, A. Decrouy, A. Chinet, DEFECTIVE REGULATION OF ENERGY-METABOLISM IN MDX-MOUSE SKELETAL-MUSCLES, *Biochemical Journal* 304 (1994) 649-654.
- [80] J.F. Lescuyer, Food composition, useful to prevent/limit loss of muscle mass, loss of bone mineral density and cognitive decline, comprises pea/milk protein, potassium, calcium, selenium, vitamins D3, E, C, B2, B6, B9, and B12, choline and polyphenol, HOLYMARK (HOLY-Non-standard).
- [81] S.T. Russell, P.M.A. Siren, M.J. Siren, M.J. Tisdale, Attenuation of skeletal muscle atrophy in cancer cachexia by d-myo-inositol 1,2,6-triphosphate, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64(3) (2009) 517-527.
- [82] S.T. Russell, P.M.A. Siren, M.J. Siren, M.J. Tisdale, Mechanism of attenuation of protein loss in murine C2C12 myotubes by D-myo-inositol 1,2,6-triphosphate, *Experimental Cell Research* 316(2) (2010) 286-295.

*“Algumas vezes o esperado simplesmente perde importância comparado ao inesperado”.* Meredith Grey

## Conclusão

Com base nos achados, pode-se concluir que o modelo experimental de artrite induzida por colágeno representa um modelo com semelhanças muito próximas aos sintomas, comportamento e alterações morfológicas encontrados em pacientes com artrite reumatoide e síndrome de caquexia reumatoide. Os animais CIA apresentaram uma redução de 25% de massa muscular do gastrocnêmio e 24% para o tibial anterior comparado ao CO e, quando normalizado pelo peso do animal, a diferença se mantém para 23 e 22% para estes mesmos músculos, a atrofia muscular já havia sido observado anteriormente em nosso grupo [58], sugerindo que estes animais também poderiam apresentar perda muscular similar ao processo de caquexia reumatoide.

Os testes físicos e funcionais no grupo CIA apresentaram uma redução de >20% na locomoção espontânea e de >20% no tempo total do teste de desempenho físico a partir dos 35 dias da indução da doença, bem como uma redução crescente de 25 à 66% da força muscular a partir dos 25 dias da indução da doença comparado com o grupo CO. Então, este modelo experimental também apresenta alteração muscular, funcional e comportamental em relação com os pacientes com AR, que possuem aumento de fraqueza, redução na atividade física diária e fadiga aumentada. Os animais CIA não apresentaram alteração no peso e nem na ingestão alimentar comparado com o CO, novamente, estes achados são similares aos pacientes com caquexia reumatoide e distintos dos da síndrome da caquexia causada por outras doenças, em que há redução do peso e recorrentes casos de anorexia.

Adicionalmente, a literatura já apresentou aumento das citocinas inflamatórias nos animais CIA [58, 92, 93]. Reunindo todos estes achados e confrontando-os com os critérios de Evans [10], os animais CIA apresentam: redução de força muscular (e atividade física diária), aumento na fadiga, alteração nos marcadores sanguíneos (aumento de citocinas inflamatórias); em ressonância com os pacientes com AR e caquexia reumatoide, o modelo de CIA não condiz com os critérios de Evans [10], mas acompanham os pacientes, nos seguintes aspectos: normalidade no peso e ausência de anorexia. Portanto, apresentamos esse modelo para ser utilizado futuramente como modelo experimental de caquexia reumatoide.

Empregando esse modelo, tornou-se possível a análise do perfil metabólico ao longo do desenvolvimento da artrite, bem como correlacionar este perfil com o desenvolvimento da perda muscular concomitante. Realizando a técnica de metabolômica, filtrando os resultados para os metabólitos que participam de rotas

metabólicas no tecido muscular, obteve-se um perfil tempo dependente de quase 30 metabólitos e que participam de quase 20 rotas metabólicas que ocorrem no tecido muscular. Determinando-se um ponto de corte em 45 dias para o modelo como desenvolvimento de caquexia reumatoide, baseado em estudo anterior de nosso grupo [58], pode-se observar que, antes deste período, os seguintes metabólitos deverão ser validados em pacientes para prognóstico, em ordem alfabética: 3-metilhistidina, 4-aminobutirato, acetilcolina, arginina, aspartato, carnosina, creatina, creatinina, glutamina, histamina, histidina, isoleucina, leucina, L-metionina, lisina, mio-inositol, N,N-dimetilglicina, N-acetilalanina, N-acetilmethionina, pantotenato, fenilalanine, fosfocolina, fosfocreatina, piridoxina, sarcosina, succinilacetona e tiamina. Já para diagnóstico, sugere-se a validação dos metabólitos, em ordem alfabética: 3-metilhistidina, 4-aminobutirato, acetilcolina, arginina, carnosina, creatina, creatinina, glutamina, histamina, histidina, isoleucina, leucina, L-metionina, lisina, mio-inositol, N,N-dimetilglicina, N-acetilalanina, N-acetilmethionina, pantotenato, fosfocolina, fosfocreatina, piridoxina, sarcosina, succinilacetona e urocanato. Com os achados desta pesquisa, sugere-se esta gama de metabólitos que serão validados em um estudo envolvendo pacientes com artrite reumatoide bem como o acompanhamento do processo de perda muscular, análise dessas moléculas e, por fim, estabelecendo um ou mais metabólitos como biomarcadores de caquexia reumatoide, objetivando prognóstico, diagnóstico e acompanhamento da síndrome.

## Perspectivas Futuras

→ Analisar resultados do metaboloma de camundongos com os de cultura celular de músculo incubados com mediadores inflamatórios (e.g. TNF-alfa) que sabidamente induzem o processo de perda muscular.

→ Realizar a validação dos resultados obtidos nos camundongos em pacientes com artrite reumatoide concomitantemente acometidos com a síndrome de caquexia.

