

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

**Pesquisa de biomarcadores para perda muscular em
pacientes com artrite reumatoide: uma análise de
metaboloma urinário**

Marianne Schrader de Oliveira

Porto Alegre, Brasil

2021

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

**Pesquisa de biomarcadores para perda muscular em
pacientes com artrite reumatoide: uma análise de
metaboloma urinário**

Autor: Marianne Schrader de Oliveira

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.

Dedicatória

Aos meus amados e abençoados pais,
que através de seu amor incondicional
sempre acreditaram nos meus sonhos
e lutaram para que fossem realizados.

À minha filha e a minha família que
Estiveram presentes ao meu
lado nestes anos e que amadamente
auxiliaram e apoiaram nesta jornada,
tornando-a mais branda.

Banca Examinadora:

Dr. Rafael Mendonça da Silva Chakr

Dr. Odirlei Andre Monticielo

Dra. Priscila Lora

Dr. Marcelo Maraschin

Agradecimentos

À Deus que, por sua bondade infinita guia-me pelos caminhos do bem, dá-me força para superar as dificuldades e sabedoria para enfrentar os problemas.

Ao Professor Dr. Ricardo Machado Xavier, por acreditar no meu trabalho, pelo incentivo, paciência e conhecimentos disponibilizados durante o período de orientação da tese, pelos anos de convivência de estima e dedicação, seu um grande exemplo em meu caminho. Obrigada pelos desafios, pelas ajudas e discussões intelectuais e, principalmente, pelo crescimento profissional e pessoal proporcionado, de maneira direta ou indireta, nesses anos da minha trajetória.

Ao Professor Dr. Steven Paul Young que possibilitou a realização das dosagens de metaboloma e me proporcionou grande conhecimento e uma experiência de intercâmbio na área médica.

Ao Dr. Paulo Gil Alabarse que inicialmente buscou estas análise em modelos animais possibilitando uma semente para o desenvolvimento deste projeto junto aos pacientes, assim como, suas orientações e conselhos.

À Dra. Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo por iniciar o projeto junto aos pacientes e sempre me auxiliar em minhas dúvidas, auxiliando com seus conhecimentos.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio e compartilhamento de conhecimentos durante esta caminhada.

Aos médicos preceptores do Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por toda sua atenção e aprendizados durante estes anos.

À minha família, que sempre me compreendeu e acreditou em mim com muito amor e carinho - anos muito especiais em que fui mãe e pude ficar muito próxima aos meus pais.

A todos os pacientes e responsáveis que participaram deste estudo, despojados de qualquer outro interesse, senão o de contribuir com os avanços médicos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste sonho.

Resumo

Introdução: A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que afeta as articulações e evolui com inflamação crônica e destruição local do tecido. Além disso, pacientes com AR podem apresentar manifestações extra-articulares, como alterações na composição corporal. Frequentemente, perda de músculo esquelético é observada em pacientes com AR. Os métodos de avaliação da perda muscular são caros e pouco disponíveis, limitando seu uso na prática clínica e no desenvolvimento de estudos longitudinais. Estudos recentes de análise do metaboloma têm demonstrado grande potencial na identificação de alterações no perfil metabólico em pacientes com doenças autoimunes e podem fornecer um melhor entendimento dos mecanismos de patogenicidade, diagnóstico precoce e acompanhamento do tratamento. Assim, o perfil metabolômico da urina em pacientes com AR pode ser uma ferramenta útil na identificação de biomarcadores da perda de músculo esquelético.

Objetivo: Avaliar o perfil metabolômico urinário de pacientes com artrite reumatoide e associá-lo à perda de músculo esquelético.

Métodos: Foram recrutados pacientes com AR de acordo com os critérios de classificação ACR / EULAR 2010, com idade entre 40 e 70 anos. Dados clínicos, atividade da doença e composição corporal foram avaliados e amostras de urina foram coletadas. A atividade da doença foi medida pelo Disease Activity Score-28 com proteína C reativa (DAS28-PCR). A massa muscular foi definida pelo índice de massa magra apendicular (ALMI; kg / altura²), derivado de exames de DXA, que é a soma do tecido magro dos braços e pernas. A análise do metaboloma da urina foi realizada por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) utilizando os softwares Bayesil e Metaboanalyst. Foram utilizados os modelos estatísticos PCA e PLSDA seguidos da correlação de Spearman, e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Curva ROC e regressão logística foram utilizadas para estabelecer um modelo diagnóstico.

Resultados: Noventa pacientes com AR foram incluídos. A maioria dos pacientes era do sexo feminino (86,7%), com média de idade de $56,0 \pm 7,3$ anos e mediana do DAS28-CRP de 3,0 (IQR, 1,0–3,0). Nós identificamos 15 metabólitos que mostraram altas pontuações VIP pelo Metaboanalista. Dimetilglicina ($r = 0,2$; $p = 0,053$), oxoisovalerato ($r = - 0,2$; $p = 0,055$) e ácido isobutírico ($r = - 0,249$; $p = 0,018$) apresentaram correlação significativa com ALMI. Área sob a curva ROC (AUC) com base na massa muscular ($\leq 6,0$ kg / m² de ALMI para mulheres e $\leq 8,1$ kg / m² para

homens) regressão logística foi usada para estabelecer um modelo diagnóstico como dimetilglicina (AUC = 0,65), oxoisovalerato (AUC = 0,49) e ácido isobutírico (AUC = 0,83) com sensibilidade e especificidade significativas.

Conclusão: O ácido isobutírico, oxoisovalerato e dimetilglicina observados em amostras de urina foram associados à baixa massa muscular esquelética em pacientes com AR. Esses achados podem sugerir que esse grupo de metabólitos pode ser testado como biomarcador para o diagnóstico de perda muscular.

Palavras chave: Ressonância Nuclear Magnética; perda muscular; artrite reumatoide; biomarcador; metabolômica; caquexia; sarcopenia; autoimunidade

Abstract

Introduction: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that affects joints and progresses with chronic inflammation and local tissue destruction. Additionally, patients with RA may present extra-articular manifestations, such as changes in body composition. Often, skeletal muscle wasting is observed in RA patients. Methods for assessing muscle loss are costly and not widely available, limiting their use in clinical practice and the development of longitudinal studies. Recent studies of metabolome analysis have shown a great potential in identifying changes in the metabolite profile in patients with autoimmune diseases, and can provide a better understanding of pathogenicity mechanisms, early diagnosis, and treatment follow-up. Thus, urine metabolomic profile in RA patients could be a useful tool in identifying skeletal muscle wasting.

Objective: To evaluate the urinary metabolomic profile of patients with rheumatoid arthritis and associate it with skeletal muscle loss.

Methods: Patients with RA according to the 2010 ACR/EULAR classification criteria, aged between 40 and 70 years, were recruited. Clinical data, disease activity and body composition were evaluated and urine samples were collected. Disease activity was measured by the Disease Activity Score-28 with C-reactive protein (DAS28-PCR). Muscle mass was defined by appendicular lean mass index (ALMI; kg/height²), derived from DXA scans, that is the sum of the lean tissue in the arms and legs. The urine metabolome analysis was performed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy using Bayesil and Metaboanalyst software. The statistical models PCA and PLSDA were used followed by Spearman correlation, and $p < 0.05$ was considered statistically

significant. ROC curve and logistic regression was used to establish a diagnostic model.

Results: Ninety RA patients was included. Most patients were women (86.7%), with a mean age of 56.0 ± 7.3 years and a median DAS28-CRP of 3.0 (IQR, 1.0–3.0). We identified 15 metabolites that showed high VIP scores by Metaboanalyst. Dimethylglycine ($r=0.2$; $p=0.053$), oxoisovalerate ($r= - 0.2$; $p=0.055$) and isobutyric acid ($r= - 0.249$; $p= 0.018$) showed significant correlation with ALMI. Area under the ROC curve (AUC) based on muscle mass (≤ 6.0 kg/m² of ALMI for women and ≤ 8.1 kg/m² for men) logistic regression were used to establish a diagnostic model as dimethylglycine (AUC=0.65), oxoisovalerate (AUC=0.49) and isobutyric acid (AUC=0.83) with appropriate sensitivity and specificity.

Conclusion: Isobutyric acid, oxoisovalerate and dimethylglycine observed in urine samples were associated with low skeletal muscle mass in patients with RA. These findings may suggest that this group of metabolites can be tested as biomarkers for diagnosis of muscle loss.

Keywords: Nuclear Magnetic Resonance; muscle loss; rheumatoid arthritis; biomarker; metabolomics; cachexia; sarcopenia; autoimmunity.

Lista de Imagens

Figura 1 - Estratégia de busca de referências bibliográficas através das bases de dados que fundamentaram os objetivos do projeto: Página 15.
Figura 2 - Mecanismos relacionados à Sarcopenia. Página: 19.
Figura 3 – Consequências metabólicas da artrite reumatóide: Página 30.
Figura 4 - Análises ômicas e suas correlações entre genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma na biologia de sistemas. Página 35.
Figura 5 - Etapas do processamento do espectro: Página 38.
Figura 6 - Representação da interface de identificação dos compostos via Chenomx: Página 39.
Figura 7 - Representação da rota do metabólicas do site www.metaboanalyst.ca . Análise da via metabólica e relação de via metabólica: Página 40.
Figura 8 - Metabólitos circulantes inflamatórios descritos em pacientes com artrite reumatóide: Página 46.
Figura 09 - Marco teórico esquemático apresentando a problemática da pesquisa: Página 53.
Figura 10 - Desenho experimental do Estudo: Página 56.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Categorias de Sarcopenia por causa. Página 19.
Tabela 2 - Alterações metabólicas encontradas em caquexia. Página 21.
Tabela 3 - Critérios de classificação para Artrite Reumatóide conforme ACR/EULAR 2010. Página 26.
Tabela 4 - Análise de metabólitos identificados em estudos com pacientes com artrite reumatoide. Página 44.
Tabela 5 - Relação entre metabólitos pró e anti-inflamatórios na patogenia de AR, modulando a função de vários tipos celulares envolvidos na inflamação sinovial. Página 46.

Índice

Resumo	6
Abstract	8
Lista de Imagens	10
Lista de Tabelas	11
Introdução	13
Revisão da Literatura	15
Marco Teórico	53
Justificativa	54
Objetivos	55
Desenho Experimental	56
Referência Bibliográfica	57
Sites Utilizados	76
Artigo	77
Conclusão	107
Pespectivas Futuras	108
Anexo I – Termo de Consentimento	109

1. Introdução

A inflamação é um processo essencial para a manutenção dos seres vivos sendo este processo responsável pela defesa do nosso organismo contra patógenos e pela manutenção de tecidos lesados. Apesar de ser inicialmente benéfico, em doenças inflamatórias crônicas, há distúrbios na homeostase do processo inflamatório [1]. Na inflamação, o metabolismo celular sofre drásticas alterações, 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 [2].

Dentre as doenças inflamatórias crônicas, podemos incluir a artrite reumatoide (AR), cuja prevalência é estimada em 1% da população mundial. A AR é uma doença sistêmica, caracterizada por inflamação da sinóvia, simétrica, produção de autoanticorpos e destruição da cartilagem e do osso subcondral [3]. Consiste em uma doença caracterizada por destruição articular progressiva, com incapacitação e diminuição da sobrevida pelo aumento da mortalidade cardiovascular. Além das manifestações articulares, pacientes com AR podem apresentar distúrbios metabólicos como por exemplo, resistência à insulina e dislipidemia no qual contribuem para este aumento de risco cardiovascular e mortalidade [4]. Por outro lado, estes pacientes também podem apresentar alterações de composição corporal como perda de massa magra, em especial a massa muscular esquelética, e/ou aumento de massa gorda. Além das alterações de composição corporal, os pacientes podem apresentar redução de força muscular e função física. A redução de força muscular associada a uma redução de massa muscular esquelética é um conjunto de alterações que chamamos de sarcopenia. Já a redução de massa magra com uma manutenção ou aumento da massa gorda é um conjunto de alterações que chamamos de caquexia reumatoide. Ambas as condições clínicas estão associadas a um pior prognóstico nos pacientes com AR [5].

A etiologia da sarcopenia e da caquexia reumatóide é multifatorial, incluindo a produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-1 β , alterações hormonais e inatividade física. A prevalência de sarcopenia na AR é de 13-24% na faixa etária de 65 a 70 anos e de mais de 50% nos indivíduos acima dos 80 anos [6]. Já a prevalência estimada de caquexia reumatoide varia de 19% a 32% [7].

Para diagnóstico e monitoramento destas duas condições clínicas, a avaliação de composição corporal é fundamental. Existem diversos métodos de avaliação de composição corporal como ressonância nuclear magnética, tomografia computadorizada, bioimpedância, ultrassonografia, densitometria óssea de corpo total (DXA) e medidas antropométricas [8]. Em relação à avaliação da massa muscular para o diagnóstico da sarcopenia, foi estabelecido que o indivíduo sarcopênico apresente dois desvios padrões abaixo de massa muscular, quando comparados com adultos jovens em testes de análise de imagens (dual energy y X-ray absorptiometry - DXA), e/ou ressonância nuclear magnética (RNM); ou circunferência da panturrilha (CP) menor que 31 centímetros (cm) [9]. No entanto, estes métodos muitas vezes não estão disponíveis e apresentam um custo elevado para sua realização, sendo importante a busca por soluções mais acessíveis.

A metabolômica é um novo ramo de pesquisa que trata da biologia de sistemas, juntamente com a genômica, transcriptômica e proteômica, possibilitando a análise de um perfil de metabólitos [10]. 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 especialmente por permitirem a definição de padrões de analitos correlacionados entre si. A técnica de metabolômica tem sido aplicada para análises de metabólitos em pacientes com artrite reumatoide para busca de marcadores diagnósticos e prognósticos assim como entendimento da patologia [11]. No entanto, esta técnica é pouco estudada para a análise dos metabólitos associados a perda muscular na AR.

Desse modo, a pergunta norteadora da presente tese é se há biomarcadores metabólicos detectados em urina de pacientes com artrite reumatoide que possam ser relacionados com o quadro de perda de massa muscular. Portanto, a tese segue a disposição de: uma revisão da literatura, seguida de um artigo intitulado “Metabolomic biomarker candidates from skeletal muscle wasting in a cohort of rheumatoid arthritis patients”, o qual busca responder a pergunta norteadora desta tese.

2. Revisão da Literatura

2.1. Estratégias de Busca Bibliográficas

O foco desta revisão da literatura são os aspectos de perda muscular relacionados com artrite reumatoide. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: Scielo, PubMed e Lilacs. O período da pesquisa envolveu estudos publicados até 2021.

Foram realizadas buscas através da lista de termos e suas combinações: "cachexia", "muscle", "muscle loss", "muscle wasting", "muscle mass", "sarcopenia", "rheumatoid arthritis", "arthritis", "biomarkers", "marker", "urine", "metabolism", "metabolic change", "metabolomics" e "nuclear magnetic resonance". Busca realizada: "cachexia" AND "sarcopenia" AND "muscle loss" AND "rheumatoid arthritis" OR "arthritis" AND "metabolism" OR "metabolic change" OR "metabolomics" AND "NMR". Os resultados da pesquisa são apresentados na Figura 01.

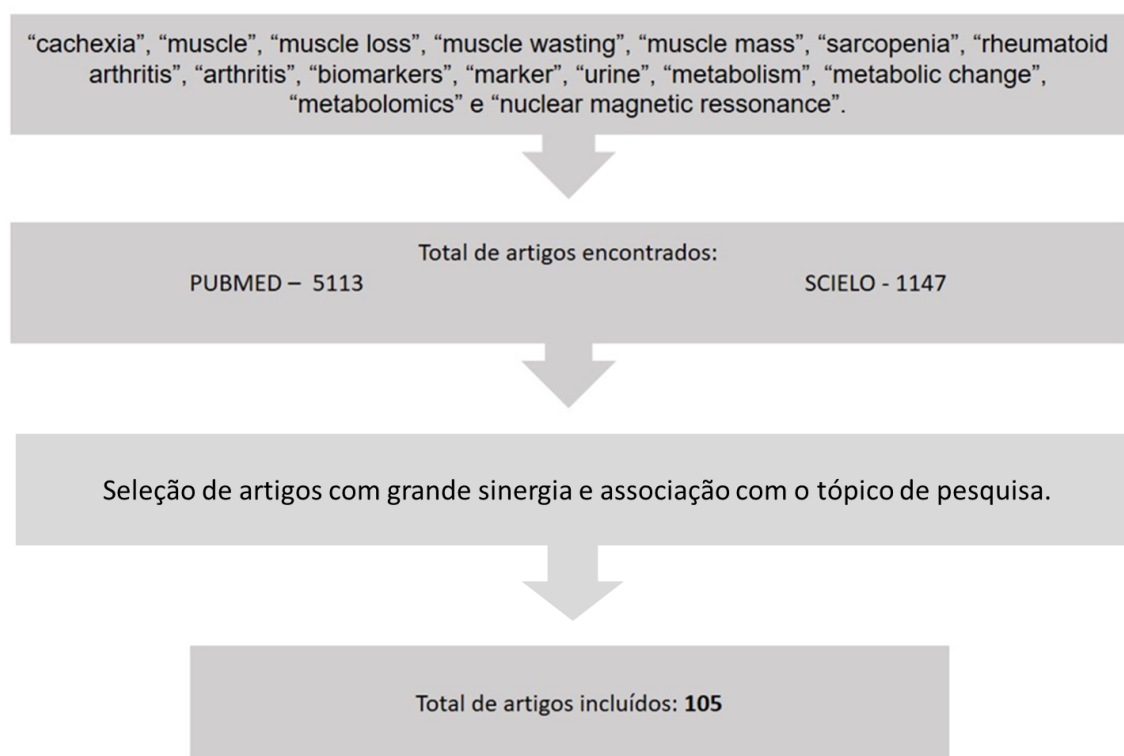


Figura 01. Estratégia de busca de referências bibliográficas através das bases de dados que fundamentaram os objetivos do projeto.

3. Músculo e sua importância

A musculatura esquelética constitui o maior tecido do corpo, compreendendo a maior massa celular e o maior componente proteico do organismo. O tecido muscular é constituído por células alongadas, em forma de fibras, que se dispõem agrupadas, em forma de fibras, e em feixes. Essas células são caracterizadas pelo seu formato alongado, com função de contração e distensão das fibras musculares, formada por numerosos filamentos proteicos de actina (miofilamentos finos) e miosina (miofilamentos grossos). As funções relacionadas ao tecido muscular são: movimento corporal (integrado de ossos, articulações e músculo esquelético); movimento de substâncias do corpo (sangue, alimentos e outros); estabilização das posições do corpo e regulação do volume dos órgãos; produção de calor [12].

Em torno do conjunto de miofibrilas de uma fibra muscular esquelética situa-se o retículo sarcoplasmático (retículo endoplasmático liso), especializado no armazenamento de íons cálcio. As miofibrilas dos músculos estriados contêm quatro proteínas principais: miosina, actina, tropomiosina e troponina. Os filamentos grossos são formados de miosina e as outras 3 proteínas são encontradas nos filamentos finos. O impulso nervoso promove contração muscular, liberando o cálcio que atua sobre a troponina, promovendo o sítio de ligação da actina com a miosina [13].

O tecido muscular, responsável pela autonomia motora do indivíduo, participa não só da homeostase glicêmica e metabólica, com o suprimento de aminoácidos aos demais tecidos, como também da oxidação das gorduras, fixação do oxigênio e modulação do gasto energético de repouso [14].

A quantidade de massa muscular é resultante do equilíbrio entre síntese (anabolismo) e catabolismo (destruição) das suas proteínas, principalmente as miofibrilares. Os fatores catabólicos incluem resistência insulínica e níveis elevados de glicocorticoides, enervação, estresse inflamatório, desuso, restrição calórica, acidose e estresse oxidativo. Além do comprometimento da força, da potência e do equilíbrio, a hipotrofia muscular está associada à resistência insulínica, *diabetes mellitus* tipo II, hiperadiposidade, menor reparo tecidual e incompetência imunitária [15]. Já os fatores anaeróbios não utilizam o oxigênio como fonte de energia, mas sim utilização de carboidratos resultando na produção de ácido láctico e fornecimento de energia as células musculares.

As alterações morfológicas e fisiológicas decorrentes do processo de envelhecimento são caracterizadas por aumento da gordura corporal, especialmente com acúmulo de gordura na região abdominal, e redução de massa corporal magra e líquidos corporais. Essa diminuição é decorrente, basicamente, das perdas de massa muscular esquelética [16]. A partir dos 50 anos de idade, estima-se que a taxa de perda de massa muscular esteja em torno de 1 a 2% ao ano [17], e que está associada à taxa de declínio de força entre os 50 e 60 anos de idade. Após os 50 anos, pode ser percebido um decréscimo dos níveis de força de aproximadamente 8% a 15% por década [18]. A perda muscular é qualitativa e quantitativa, com consequências na composição da fibra muscular, na inervação, na contratilidade, em características da fadiga, na densidade capilar e também no metabolismo da glicose [19].

4. Sarcopenia

Em 1989, Irwin Rosenberg propôs o termo sarcopenia para descrever especificamente a perda de massa muscular relacionada ao envelhecimento [20]. Em 2010, o Grupo Europeu de Trabalho com Pessoas Idosas (EWGSOP) definiu a sarcopenia como uma síndrome distúrbio caracterizada por progressiva e generalizada redução de massa muscular esquelética, associada à redução da força muscular ou desempenho físico. Este conjunto de alterações pode levar a aumento de risco para quedas, fraturas, incapacidade física e mortalidade [21].

Em 2018, o mesmo grupo revisou esta definição e descreveu que a sarcopenia tem seu início por uma redução de força muscular e seu diagnóstico é confirmado a partir da redução da massa muscular esquelética [22]. A definição operacional ocorre a partir dos seguintes critérios:

- Critério 1 = Baixa força muscular
- Critério 2 = Baixa quantidade ou qualidade muscular
- Critério 3 = Baixo desempenho físico

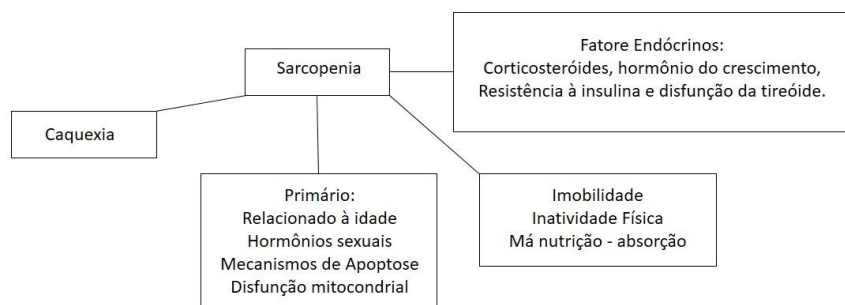
A provável sarcopenia é identificada pelo Critério 1. O diagnóstico é confirmado por documentação adicional do Critério 2. Se os critérios 1, 2 e 3 forem atendidos, a sarcopenia é considerada grave.

Conforme consenso do EWGSOP, define-se que a redução apenas de massa muscular é considerada como pré-sarcopenia e quando há além de redução de massa muscular, redução de força muscular e/ou performance física, considera-se como sarcopenia moderada, sendo que a sarcopenia severa, ocorre quando há alteração nas três variáveis [23]. Assim, considera-se que a perda de massa muscular associada a prejuízos de função constitui entidade sindrômica denominada sarcopenia. A ocorrência mais comum é a senil, no entanto, deficiência energética, infecções e doenças inflamatórias crônicas podem resultar em sarcopenia nos demais casos que não idade avançada [24].

Baumgartner [25] definiu sarcopenia como diminuição de massa muscular esquelética dois desvios-padrões abaixo da média do grupo-controle constituído por indivíduos jovens (29 anos), saudáveis, pareados para mesma etnia. Baseado nesses critérios, encontrou-se prevalência de 13-24% na faixa etária de 65 a 70 anos e de mais de 50% nos indivíduos acima dos 80 anos [26]. Considera-se que a sarcopenia é decorrente da interação de distúrbios da inervação (redução dos motoneurônios acelerada pela grande quantidade de fármacos habitualmente ingerida pelos idosos), diminuição da atividade física, redução de hormônios, aumento dos mediadores inflamatórios e alterações da ingestão proteico-calórica que ocorrem durante o envelhecimento [27].

Os mecanismos envolvidos no aparecimento e na progressão da sarcopenia são multifatoriais. Segundo o Consenso Europeu de Sarcopenia, a etiologia ainda é desconhecida, alguns mecanismos patogênicos como problemas com a síntese proteica, a proteólise, a integridade muscular e o teor de gordura muscular podem estar relacionados. Também podem estar envolvidos na progressão da sarcopenia, os hormônios sexuais, a relação de apoptose e a disfunção mitocondrial, assim como fenômenos relacionados à idade, corticoides, hormônio do crescimento, função inadequada da tireoide e resistência à insulina, relacionados ao sistema endócrino, e outros fatores como imobilidade, inatividade física, nutrição inadequada, mal absorção e caquexia, conforme apresentado na Figura 02 [23].

Figura 02. Mecanismos relacionados à Sarcopenia.



A sarcopenia é uma condição com muitas causas e resultados variados. Embora a sarcopenia seja observada principalmente em pessoas mais velhas, também pode se desenvolver em adultos mais jovens, como é o caso para demência e osteoporose. Assim, as categorias de sarcopenia primária e sarcopenia secundária podem ser úteis na prática clínica. A sarcopenia pode ser considerada "primária" (ou relacionada à idade) quando nenhuma outra causa é evidente, exceto o próprio envelhecimento, enquanto a sarcopenia pode ser considerada "secundária" quando uma ou mais outras causas são evidentes, conforme Tabela 01 [28].

Tabela 01. Categorias de Sarcopenia por causa.

Sarcopenia Primária	Sarcopenia Secundária
Nenhuma causa evidente a não ser a idade.	Relacionado a doenças. associado a falência avançada de órgãos (coração, pulmão, fígado, rim, cérebro), reações inflamatórias crônicas, malignidade ou doença endócrina.

É importante ressaltar que sarcopenia é distinta de caquexia causada por doenças inflamatórias, doenças crônicas avançadas, doenças musculares debilitantes ou desnutrição [29]. Nessas situações, ocorrendo a diminuição de massa muscular esquelética (sarcopenia), ela é apenas uma das manifestações da síndrome mais complexa denominada de caquexia. Trata-se, portanto, do componente sarcopênico da caquexia. A síndrome da caquexia é caracterizada pela anorexia, perda de peso,

hipoalbuminemia, anemia, alterações da cicatrização de feridas e da imunocompetência [30].

5. Caquexia

A caquexia clássica (do grego 'kako' ou ruim e 'he'xis' ou condição) é um termo usado para caracterizar a condição envolvendo perda severa de peso, gordura e massa muscular e aumento do catabolismo de proteínas devido a doenças subjacentes. A fisiopatologia é caracterizada por um balanço energético negativo impulsionado por uma combinação variável de redução da ingestão de alimentos e metabolismo anormal. Alguns fatores contribuem para o aparecimento da caquexia. Estes podem ser compreendidos como anorexia e as alterações metabólicas, ou seja, o aumento do estado inflamatório, proteólise muscular, alterações no metabolismo de carboidrato, proteínas e lipídio [31].

Uma característica clínica importante da caquexia é a perda de peso corporal relacionada, em parte, a anorexia e a redução na ingestão de alimentos. Durante a caquexia, os maus resultados de intervenção nutricional sugerem que a anorexia é mais uma consequência do que a causa da perda de peso. A perda de peso é sistematicamente associada ao aumento da mortalidade entre os idosos [32]. O aumento do catabolismo da proteína é o principal fator de redução da massa muscular, mas também é precipitado pela anorexia. Vários fatores, tais como a depressão, a quimioterapia, dor, dispepsia e anorexia do envelhecimento contribuem para a redução da ingestão de alimentos, no contexto de uma doença inflamatória crônica. A caquexia avançada justifica a retenção de água que pode ocorrer como uma consequência da hipoalbuminemia severa [33].

O reconhecimento de caquexia é baseado na presença de perda de peso de pelo menos 5% do peso corporal (durante 12 meses ou menos), ou Índice de Massa Corporal (IMC) $<20 \text{ kg/m}^2$, na ausência de inanição simples associada a três dos seguintes cinco critérios [34]:

- Diminuição da força muscular.
- A fadiga.
- Anorexia.

- Baixo índice de massa livre de gordura (<7,26 kg/m² em homens e <5,45 kg/m² para mulheres).
- Bioquímica anormal: Aumento de marcadores inflamatórios (PCR, IL-6), Anemia (Hb <12 g / dl) e albumina de soro baixo (<3,2 g / dl).

Classifica-se em estágios, sendo a pré-caquexia o início clínico, podendo aparecer sinais metabólicos como anorexia com intolerância a glicose e pode preceder a perda de peso involuntária ≤ 5%. Já considera-se caquexia tendo perda de mais de 5% do peso corporal estável durante os últimos 6 meses, ou um IMC inferior a 20 kg / m² e peso em curso perda de mais de 2%, ou sarcopenia e contínua perda de peso > 2%. A caquexia refratária pode ocorrer como resultado de câncer muito avançado (pré-terminal) ou a presença de câncer rapidamente progressivo que não responde à terapia anticâncer [35].

Atualmente caquexia refere-se à perda de massa celular corpórea por doenças, sendo acompanhada por perda de massa muscular (componente sarcopênico); deve ser entendida como uma adaptação multidimensional abrangendo grande variedade de alterações, desde mudanças fisiológicas até comportamentais [36]. Frequentemente pacientes com doenças crônicas ou terminais, como câncer, HIV, insuficiência cardíaca congestiva, tuberculose, doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística, artrite reumatoide (AR), doença de Crohn e outras, apresentam caquexia. A Tabela 02 apresenta as principais alterações metabólicas encontradas nas caquexias [37].

Tabela 02. Alterações metabólicas encontradas em caquexia.

Proteínas	Lipídicas	Carboidratos
Nitrogenio urinário elevado	Lipólise aumentada	Intolerância à glicose
<i>Turnover</i> proteico elevado	Diminuição da lipogenese	Hiperinsulinemia
Diminuição da síntese de proteínas musculares	Hiperlipidemias	Resistência à insulina
Catabolismo da	<i>Turnover</i> aumentado de	<i>Turnover</i> da glicose

musculatura elevado	ácidos graxos	aumentado
Elevação das proteínas de fase aguda	Atividade da lipase lipoproteica sérica diminuída	Aumento da neoglicogenese

6. Perda Muscular e Doenças Inflamatórias

Alterações ocorridas no músculo esquelético proporcionarão ao indivíduo diminuição do metabolismo basal, bem como comprometimento das funções renais, cardíacas, pulmonar, fazendo com que apareçam patologias como: diabetes, hipertensão osteoporose, obesidade, menor reparo tecidual e incompetência imunológica [38]. Dentre as diversas nomenclaturas que tratam das alterações na composição corporal, é importante distinguir a sarcopenia da caquexia que é causada por doenças inflamatórias, doenças crônicas avançadas, doenças musculares debilitantes ou pela desnutrição [39]. Nessas situações, ocorre a diminuição de massa muscular esquelética, porém ela é apenas uma das manifestações da síndrome mais complexa como a caquexia. Trata-se, portanto, do componente sarcopênico da caquexia que ocorre em doenças inflamatórias crônicas [40].

A perda de massa muscular esquelética progressiva tem consequências clínicas negativas sobre a força muscular, função respiratória, estado funcional, risco de incapacidade e qualidade de vida [41]. Há um desequilíbrio entre as taxas de anabólicos e catabólicos dentro do músculo respondendo pela rápida perda de massa muscular, com aumento da degradação muscular [42]. Acredita-se que a inflamação está envolvida no desarranjo de toda a máquina muscular típica da caquexia [43]. A perda de massa muscular não é específico para caquexia. Envelhecimento, desnutrição, repouso absoluto, inatividade física prolongada, e desnervação também estão associados com a atrofia muscular esquelética sistêmica. A caquexia deve, portanto, ser diferenciada de outras formas de desgaste muscular, em especial sarcopenia relacionada à idade [44].

A inflamação sistêmica é uma característica comum da doença crônica. Esta inflamação desempenha um papel crucial na patogênese da caquexia e a sua presença permite sua identificação [45]. A caquexia é mediada por citocinas pró-inflamatórias que aumentam o catabolismo de proteína. O efeito direto sobre o

metabolismo do músculo é causado por doenças subjacentes que aumentam os níveis sistêmicos a longo prazo de citocinas pró-inflamatórias ou ainda um desequilíbrio entre pró-inflamatórias (por exemplo, fator de necrose tumoral [TNF- α], interleucina-1 [IL-1], interleucina-6 [IL-6], interferon-gamma [IFN- γ]) e anti-inflamatória (por exemplo, IL-4, IL-12, IL-15), como por exemplo doenças autoimunes como a artrite reumatoide [46].

7. 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 [47]. A AR afeta 1% da população adulta com menos de 35 anos e mais de 2% com mais de 60 anos nos Estados Unidos [48]. Já no Brasil, a AR tem uma prevalência de aproximadamente 0,46% [49]. A doença ocorre três vezes mais em mulheres do que em homens e sua prevalência aumenta com a idade [50]. Estimativas recentes sugerem um custo anual para o tratamento de USD\$16 bilhões nos EUA [51], enquanto no Brasil uma estimativa mais recente calculou um gasto anual de R\$18,5 bilhões [52].

Apesar da AR ter sido descrita primeiramente na década de 50 [53], os critérios de diagnóstico começaram a ser melhor estabelecidos somente a partir de 1970 [54]. Estes critérios usados retratam a AR como uma doença séria e de longa duração, com características extra-articulares dominantes, com limitadas opções de tratamento e prognóstico reservado [55]. Uma linha de pensamento mais moderno considera a AR como um síndrome clínica que abrange diversos subtipos de doença [56], os quais resultam na ativação de diversas cascatas inflamatórias [57] 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 [58]. 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 gênicas em que há associações fortes, foram identificadas 30 regiões diretamente relacionadas com a AR [59]. 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 [60].

O fator de risco ambiental mais forte para o desenvolvimento da AR é o fumo [61]. Outros fatores ambientais incluem consumo de álcool, consumo de café, baixos níveis de vitamina D, uso de contraceptivos orais, periodontite bem como outras infecções [62]. Assim, o desencadeamento da AR envolve fatores genéticos, fatores ambientais e defeitos na imunorregulação, que causam uma quebra da autotolerância e ativa mecanismos que levam ao dano tecidual. A presença de autoanticorpos é característica típica da AR. Em estados mais avançados da doença, um número maior de epítopos são reconhecidos pelos autoanticorpos [63].

O fator reumatoide é um autoanticorpo clássico, usado como marcador prognóstico e diagnóstico da doença. Além disso, variados tipos de autoanticorpos 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 [64] e sua presença está associada com maior dano articular e menor probabilidade de remissão [65]. Também se identificaram autoanticorpos contra colágeno [66], que parecem estar relacionados com dano articular mais acentuado no início da doença. De 50 a 80% dos indivíduos com AR apresentam fator reumatoide, ACPA ou ambos [67].

8.1 Fisiopatologia da Artrite Reumatóide

A AR é resultante da ação das células T e B autorreativas, que levam à sinovite, à infiltração celular e a um processo desorganizado de destruição e remodelação óssea. A membrana sinovial é a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias e proteases e, em conjunto com osteoclastos e condrócitos, promove a destruição articular. Projeções de tecido proliferativo penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, formando o pannus, característico da AR [68].

Apesar de a relação entre a positividade para o fator reumatoide (FR) e o desenvolvimento da AR não estar totalmente esclarecida, ambos estão intimamente relacionados. A presença de agregados de imunoglobulina do tipo G

(IgG) ou de complexos de IgG-FR ativa o sistema complemento e resulta em diversos fenômenos inflamatórios. A ativação do sistema complemento pelos imunocomplexos pode ainda iniciar uma inflamação vascular com depósitos de FR em arteríolas, originando vasculites, cujo impacto na qualidade e na expectativa de vida do paciente é significativo. Além disso, o reconhecimento dos complexos imunes por fagócitos promove liberação de diversas citocinas pró-inflamatórias, principalmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o que exacerba ainda mais o processo inflamatório [69].

Uma terceira classe de células T auxiliaadoras foi caracterizada como células CD4+ produtoras de interleucina 17 (IL-17). Células Th17 parecem conferir proteção contra infecções, promovendo a eliminação do microrganismo por meio do recrutamento de neutrófilos e da ativação de macrófagos no sítio da infecção. Estudo recente [70] evidenciou um importante papel das células Th17 na modulação das respostas autoimunes relacionadas com AR e esclerose múltipla, doenças anteriormente consideradas Th1 dependentes. No que diz respeito à AR, as células Th17 parecem determinar o desenvolvimento da sinovite e a destruição articular por meio da interação com células dentríticas, macrófagos e células B [71].

8.2 Manifestações Clínicas da Artrite Reumatóide

A AR constitui uma doença inflamatória crônica progressiva, sendo caracterizada por sinovite com envolvimento preferencial de articulações de mãos e punhos, de caráter simétrico e aditivo. As manifestações clínicas da AR podem ter início em qualquer idade, embora sejam observadas com mais frequência na quarta e quinta décadas de vida. A AR pode se manifestar de forma bastante variável, desde manifestações mais brandas, de menor duração, até uma poliartrite progressiva e destrutiva, associada a vasculite e outras manifestações extra-articulares [72].

As articulações mais frequentemente afetadas são as sinoviais periféricas, como metacarpo e metatarsfalangeanas, tornozelos e punhos. No entanto, também pode haver comprometimento de joelhos, ombros, cotovelos e quadris. Articulações como a temporomandibular, as articulações sinoviais da coluna e a laringe são ocasionalmente afetadas, o que pode dificultar o diagnóstico [73].

Edema, dor e calor local são características das articulações afetadas, que podem ainda apresentar rubor local. Deformações articulares ocasionadas por inflamação persistente, como boutonnière ou em “pescoço de cisne”, são características da AR não tratada. Além dos sintomas articulares, manifestações extra-articulares são observadas em aproximadamente 50% dos pacientes, sendo a síndrome de Sjögren a mais comum. Outra manifestação extra-articular típica da AR é os nódulos reumatoides, que resultam da vasculite de pequenos vasos, e a consequente necrose com proliferação de fibroblastos e histiócitos epiteliais [74].

Complicações cardíacas e infecções estão associadas a altos índices de mortalidade entre os pacientes com AR. Com o advento de novas opções terapêuticas e o reconhecimento da importância do controle agressivo do processo inflamatório, a perspectiva de vida tende a melhorar. Prevenir dano articular e conseguir remissão têm se tornado alvos possíveis de serem alcançados. Embora agentes biológicos como os anti-TNF- α tenham demonstrado atuar de maneira positiva na diminuição da aterosclerose, ainda não se demonstrou redução da taxa de mortalidade em AR nos últimos 50 anos [75].

8.3 Diagnóstico de Artrite Reumatóide

O diagnóstico da AR é feito por meio da associação de dados clínicos, laboratoriais e radiográficos. Estudos têm evidenciado a importância do tratamento precoce e adequado da AR [76]. Em 2010, o Colégio Americano de Reumatologia (ACR, do inglês American College Rheumatology) em conjunto com a Liga Europeia contra o Reumatismo (EULAR, do inglês European Alliance of Associations for Rheumatology) publicaram os novos critérios diagnósticos para AR, que são direcionados para o diagnóstico precoce da doença em pacientes que se apresentam com sintomatologia de curta duração, conforme Tabela 03 [77].

Tabela 03. Critérios de classificação para Artrite Reumatóide conforme ACR/EULAR 2010. Algoritmo baseado em pontuação, somando-se os pontos das categorias A-D. Considera-se pontuação igual ou maior que 6 para diagnóstico de AR.

População-alvo (quem deve ser testado?)	
Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema).*	
Sinovite que não seja mais bem explicada por outra doença.	
*Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições tais como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriática e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.	
Acometimento articular (0-5)	
1 grande articulação	0
2-10 grandes articulações	1
1-3 pequenas articulações (grandes não contadas)	2
4-10 pequenas articulações (grandes não contadas)	3
> 10 articulações (pelo menos uma pequena)	5
Sorologia (0-3)	
FR negativo E ACPA negativo	0
FR positivo OU ACPA positivo em baixos títulos	2
FR positivo OU ACPA positivo em altos títulos	3
Duração dos sintomas (0-1)	
< 6 semanas	0
≥ 6 semanas	1
AProvas de atividade inflamatória (0-1)	
PCR normal E VHS normal	0
PCR anormal OU VHS anormal	1

A determinação do FR é amplamente utilizada no diagnóstico da AR, porém os resultados devem ser criteriosamente ponderados diante da especificidade limitada do exame. Em contrapartida, os anticorpos anti-CCP possuem elevada especificidade e sensibilidade semelhante ao FR, o que torna a determinação do anti-CCP uma ferramenta de grande utilidade para o diagnóstico da AR. Alguns aspectos clínicos e laboratoriais estão relacionados à progressão mais rápida da destruição articular e devem ser identificados desde o momento do diagnóstico. Os fatores de mau prognóstico são: tabagismo, baixo nível socioeconômico, início da doença em idade mais precoce, FR ou anti-CCP em títulos elevados, provas inflamatórias (velocidade de eritrossedimentação ou proteína C reativa) persistentemente elevadas, grande número de articulações edemaciadas, manifestações extra-articulares e presença precoce de erosões na evolução da doença [78].

8. Sarcopenia reumatoide

Nos pacientes com AR é relatado até 66% de perda de função muscular, limitando ainda mais a atividade destes pacientes e sua qualidade de vida. É

importante ressaltar que estes pacientes podem apresentar uma redução na massa muscular mascarada pelo aumento da massa de gordura, levando a uma dificuldade maior na identificação do processo de sarcopenia, sendo um processo sarcopenico secundário à doença inflamatória [79]. A sarcopenia secundária, como pela perda muscular inflamatória do câncer e caquexia reumatóide, parece ser impulsionada principalmente por processos catabólicos. Vias adicionais de perda muscular são ativadas por anorexia, astenia e inatividade associadas à inflamação sistêmica crônica [80].

Os primeiros estudos epidemiológicos sobre a prevalência de sarcopenia na artrite reumatoide foram realizadas apenas com a medida avaliação da perda de massa muscular sem avaliação de força muscular ou capacidade de desempenho físico. Por exemplo, medir a massa muscular apendicular por DEXA e definir a sarcopenia como 2 desvios padrão (DP) abaixo da massa muscular / altura (m)² para controles jovens. Uma avaliação quantitativa não é suficiente para estabelecer o diagnóstico de sarcopenia reumatoide. Uma avaliação abrangente do músculo, força muscular e função muscular também é necessária [81].

Estudos observaram um aumento acentuado na porcentagem de pessoas (50%) com a chamada 'sarcopenia' em pessoas com mais de 80 anos. Com base nos critérios EWGSOP, os dados sobre a prevalência de sarcopenia variam significativamente em diferentes estudos em pessoas com mais de 60 anos, de 8,8 a 41,2% nas mulheres, e de 8,8 a tanto quanto 68,0% em homens [82].

A homeostase muscular é mantida por meio de um equilíbrio preciso entre os processos anabólicos e catabólicos. Embora mal compreendido, o catabolismo inflamado parece ser o principal fator patogênico na sarcopenia reumatóide. Marcadores sistêmicos de inflamação que se correlacionam com a composição corporal alterada, incluindo a taxa de sedimentação de eritrócitos (ESR) [83], Proteína C reativa (CRP) [84], fator de necrose tumoral alfa (TNF) [85] e interleucina (IL)-6 [86].

Uma variedade de citocinas anti e pró-inflamatórias são conhecidas por serem secretadas do músculo esquelético [87]. Foi demonstrado em modelos experimentais anteriores de perda muscular em artrite reumatóide um aumento de TNF derivado do músculo [88]. Verificou-se que o TNF, IL-6 e IL-1 β ativam o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), um via proteolítica comum. Esta UPS pode ser ativada via Fator Nuclear-kappa B (NF- κ B) e p38 - duas principais vias de sinalização intracelular no músculo esquelético [89].

Estudo demonstrou que o papel do UPS na sarcopenia primária é menos pronunciado, com nenhuma alteração ou mesmo diminuição da atividade atrogênica [90]. Em vez disso, o anabolismo prejudicado parece ser a principal fonte de perda muscular na sarcopenia primária. Há evidências que demonstram uma redução de testosterona, fator de crescimento semelhante à insulina, hormônio do crescimento e aumento da miostatina na perda muscular relacionada à idade [91]

Estudos também demonstram que a miostatina parece ser um fator de crescimento negativo, principalmente liberado e atuando no músculo esquelético [92]. O principal mecanismo de perda induzida por miostatina culmina na supressão do anabolismo, com um papel adicional na estimulação catabólica via UPS, estando a miostatina fortemente implicada nas síndromes sarcopênicas primárias e secundárias [93].

Em estudos de AR sobre a composição corporal, sarcopenia reumatoide é geralmente utilizada para se referir à baixa massa magra (ALM, ALMI ou SMI) sozinha usando vários pontos de corte [94, 95]. Por exemplo, nos critérios propostos por Baumgartner et al. [96], os valores médios de ALMI dos grupos de referência de jovens do sexo masculino e feminino, menos dois desvios-padrão (DPs), foram definidos como pontos de corte específicos de gênero para sarcopenia, ou seja, 7,26 kg / m² para homens e 5,5 kg / m² para mulheres.

9. Caquexia reumatoide

A caquexia relacionada à AR foi descrita pela primeira vez em 1873 por Sir James Paget [97]. O termo caquexia reumatoide refere-se à perda de massa corpórea celular e elevado consumo de energia em repouso, que ocorre na AR, e não está necessariamente relacionado ao emagrecimento, uma vez que em muitos pacientes a perda de massa corpórea celular é acompanhada de aumento de massa gorda e o peso continua estável [98]. Esses casos são conhecidos como caquexia obesa [99]. A perda de massa celular é mais nítida na musculatura esquelética sendo o componente sarcopênico, mas também ocorre nas vísceras e no sistema imune com as consequências resumidas na Figura 03 [100].

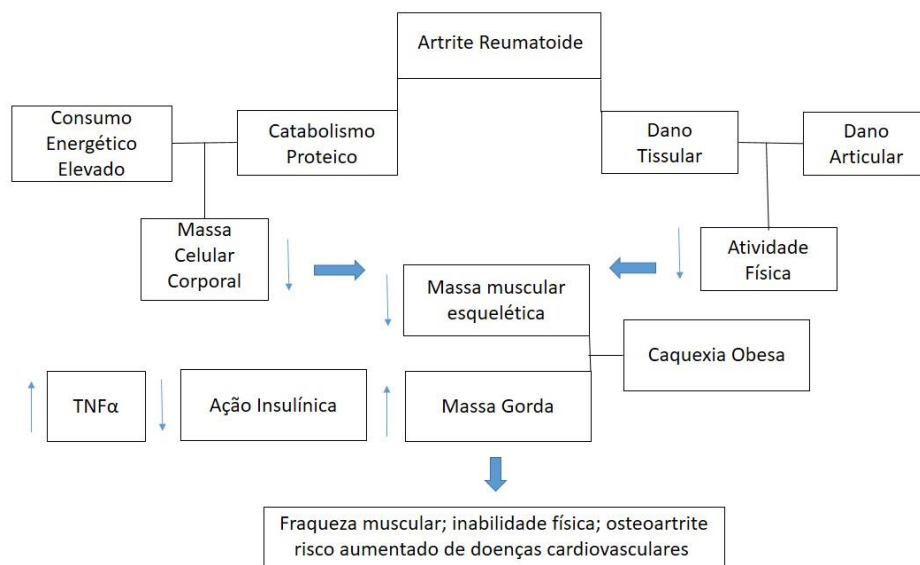


Figura 03. Consequências metabólicas da artrite reumatóide.

Pacientes com AR apresentam aumento de citocinas pró-inflamatórias que conduzem a inflamação e o processo destrutivo progressivo [101]. A produção de citocinas pró-inflamatórias na AR está associada a um metabolismo alterado, resultando em alterações na composição corporal dos pacientes [102]. Este é caracterizado pela redução da massa muscular, associada ao aumento da massa de gordura com pouca ou nenhuma perda de peso e IMC. Este conjunto de alterações de composição corporal é descrito atualmente como caquexia reumatoide (CR) [103].

Em uma meta análise publicada recentemente pelo nosso grupo que utilizou apenas parâmetros de composição corporal como critérios diagnósticos para CR, conclui-se que a prevalência estimada de CR varia de 19% a 32% e que há variabilidade nas taxas de prevalência de acordo com os critérios diagnósticos utilizados para CR. Pacientes com AR têm um risco aumentado de morte quando comparada com população saudável [104]. A inflamação da AR contribui para o surgimento de placas ateroscleróticas inflamatórias, o que pode levar ao aumento no risco de doenças cardiovasculares (DCV) [105]. Este risco de DCV elevado é responsável por cerca de 40-50% da mortalidade prematura e redução da expectativa de vida entre AR em comparação com a população geral [106].

Recentemente, England e colaboradores [107] demonstraram que o IMC e a perda de peso são preditores de mortalidade por causa da AR. A perda de peso é um forte preditor de mortalidade cardiovascular e câncer, enquanto o IMC abaixo do peso é um preditor mais forte da mortalidade por consequência respiratória. A partir desta perspectiva, a CR também pode ser fator de risco independente para acelerar a morbimortalidade na AR [108]. Em 1992, Roubenoff e colaboradores [109] verificaram que baixo índice de massa corporal (BCM) encontrada em 67% de pacientes com AR estava inversamente associada ao número de articulações edemaciadas. Além disto, foi encontrada uma tendência de aumento de incapacidade física com diminuição da BCM após o ajuste para dor nas articulações e duração da doença. Esta redução de BCM associada a um quadro clínico inflamatório aumenta o risco de mortalidade.

Sabe-se que os mecanismos da caquexia reumatoide (CR) são processos complexos. Na AR, o excesso de citocinas pró-inflamatórias é considerado o mecanismo principal da CR [110]. Portanto, o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias na AR resulta em um aumento no turnover proteico, o que, somado às demais alterações metabólicas, caracteriza um hipermetabolismo [111]. Este hipermetabolismo aumenta os processos catabólicos proteicos no músculo esquelético. Assim, o quadro de caquexia reumatoide é uma das mais evidentes condições clínicas que demonstram ligação entre o metabolismo e a inflamação [112].

Huffman e colaboradores [113], em um estudo recente, demonstraram que, em comparação com os controles, os pacientes com AR apresentaram concentrações musculares de proteína IL-6 75% maiores. Os conjuntos de genes diferencialmente expressos nos músculos na AR comparado com controles foram aqueles envolvidos nos processos de reparo do músculo esquelético e no metabolismo glicolítico. O perfil metabólico revelou concentrações 46% maiores de piruvato no músculo na AR e forte correlação positiva entre os níveis de aminoácidos envolvidos na fibrose (arginina, ornitina, prolina e glicina) e incapacidade. Assim, a disfunção do músculo esquelético pode contribuir para um círculo vicioso de atividade de doença, inatividade física e incapacidade física em pacientes com AR.

Engvall e colaboradores [114], em um estudo com 60 pacientes com AR, encontraram associação entre CR e atividade inflamatória, deficiência física e baixo IGF-1 biodisponível. O IGF-1 biodisponível é um importante fator anabólico na manutenção da massa muscular e na inibição da degradação protéica [115] e em níveis reduzidos associa-se ao catabolismo da proteína muscular [116]. Este achado

relacionado ao quadro de inflamação crônica na AR reforça a ideia que catabolismo por baixo IGF-1 e deficiência física pode desencadear a CR. Elkan e colaboradores [117], mostraram alta frequência de CR mesmo em pacientes com atividade inflamatória moderada e função física controlada. Além disso, Elkan e colaboradores [118] analisaram associações entre dieta, composição corporal, lipídios e anticorpos naturais ateroprotetores contra a fosforilcolina (anti-PC) em pacientes com AR.

Assim, a caquexia está associada a um pior prognóstico nos pacientes com AR, e as alterações 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 [119].

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. 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 [120].

Nos achados clínicos da AR comumente se observa fraqueza muscular generalizada, ocasionada pela atrofia de fibras musculares, que pode ser acentuada [121]. 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 ativação de distintas cascatas de degradação proteica, tais como, proteases lisossomiais, proteases ativadas por cálcio e o sistema proteossomo [122]. 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 [123].

Estudos têm demonstrado que a degradação proteica ou a diminuição da síntese proteica podem estar envolvidas na atrofia muscular [124]. 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 [125].

Como a perda de massa muscular é comumente avaliada tanto no caquexia reumatóide quanto na sarcopenia, essas síndromes costumam ser confundidas entre

si. No entanto, o diagnóstico de sarcopenia é estabelecido com base na avaliação apenas do músculo, enquanto o diagnóstico de caquexia é baseado na avaliação do músculo e da gordura [126].

10. Metodologias de avaliação de massa muscular

As variáveis quantificáveis para avaliação de perda muscular são quantidade de massa, força muscular e o rendimento físico ou performance física. Existe uma ampla gama de técnicas utilizadas para avaliar a massa muscular, no entanto tem-se utilizado três técnicas de imagem corporal para estimar a massa muscular. O custo, a disponibilidade e a facilidade do uso de cada uma das técnicas irão determinar se estas estão mais bem adaptadas à prática clínica ou se serão mais úteis para investigação [127].

A tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (RM) e a absorciometria radiológica de dupla energia (DXA) são técnicas de imagem corporal. Tanto a TC quanto a RM são técnicas muito precisas de diagnóstico por imagem, com fins de investigação, acabam sendo métodos de referência, considerados padrão-ouro entre as técnicas não invasivas [128]. Estes métodos são capazes de avaliar separadamente massa muscular esquelética, massa gorda corporal e a gordura infiltrada no músculo. O custo de ambos os métodos é elevado, o acesso é limitado, bem como a disponibilidade de aparelhos e a exposição do paciente à radiação limita o seu uso na prática clínica e investigativa [129].

A DXA é um método alternativo moderno de determinação do compartimento mineral do corpo. Tanto na prática clínica como para fins investigativos, o método permite avaliar a composição corporal por segmentos, diferenciando os tecidos adiposo, massa magra e massa óssea, entretanto, não determina a quantidade muscular, devido à capacidade reduzida para diferenciação da massa magra livre, entre a água e a massa óssea, tendo um erro estimado de 5 a 6% quando comparada à TC. A massa muscular esquelética pode ser superestimada em pacientes com excesso de água extracelular, quando avaliados pela DXA [130].

Além das técnicas de imagem relatadas anteriormente, utiliza-se também como alternativa para análise da composição corporal a Bioimpedância Elétrica (BIA), que é um método rápido e não invasivo. Baseia-se no princípio de que a impedância, resultante da resistência e reactância ao fluxo elétrico, se relacionam ao volume do

corpo como condutor. No corpo humano, o tecido magro, altamente condutivo, contém grande quantidade de eletrólitos e água que são condutores, representando a via de baixa resistência elétrica. Já o tecido adiposo, composto de lipídios e triglicerídeos, e os ossos, são fracos condutores, sendo a via de alta resistência elétrica [131].

As medidas antropométricas também são métodos de avaliação do estado nutricional, sendo considerados os métodos mais populares. São métodos simples, baratos e não invasivos. Destacam-se a circunferência do braço, a circunferência da panturrilha (CP) e as dobras cutâneas. Robert Lee e colaboradores, criaram equações preditivas para a massa muscular a partir de medidas antropométricas e identificaram uma alta correlação com a RM, considerada o padrão-ouro para estimar a massa muscular esquelética [132].

11. Metaboloma

A metabolômica foi introduzida por Roger Williams no final de 1940, com o conceito de que os indivíduos podem ter um “perfil metabólico” que poderia ser refletido na composição de seus fluidos biológicos. Os trabalhos iniciais reportavam o uso de espectrometria de massas com ionização branda (soft ionization mass spectrometry – SIMS) acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), cromatografia gasosa, utilizando a cromatografia em papel para demonstrar padrões metabólicos característicos na urina e a sua associação a doenças, tais como a esquizofrenia [133]. No entanto, foi somente por meio de avanços tecnológicos nas décadas de 1960 e 1970 que se tornou possível a quantificação e medição dos perfis metabólicos pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) [134].

O termo “perfil metabólico” foi introduzido por Horning *et al* [135] depois de terem monitorado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) os metabólitos presentes na urina humana e em extratos de tecido gerando o primeiro banco de dados web do perfil metabólico, METLIN, contendo mais de 10 mil metabólitos. O primeiro esboço do metaboloma humano foi concluído em 2007 pelo projeto Metaboloma Humano, da Universidade de Alberta, no Canadá [136]. Metabolômica é um termo recente que vem sendo muito utilizado nesta era “OMICs”, de genômica, transcriptômica, proteômica, dentre outras (Figura 04) [137].

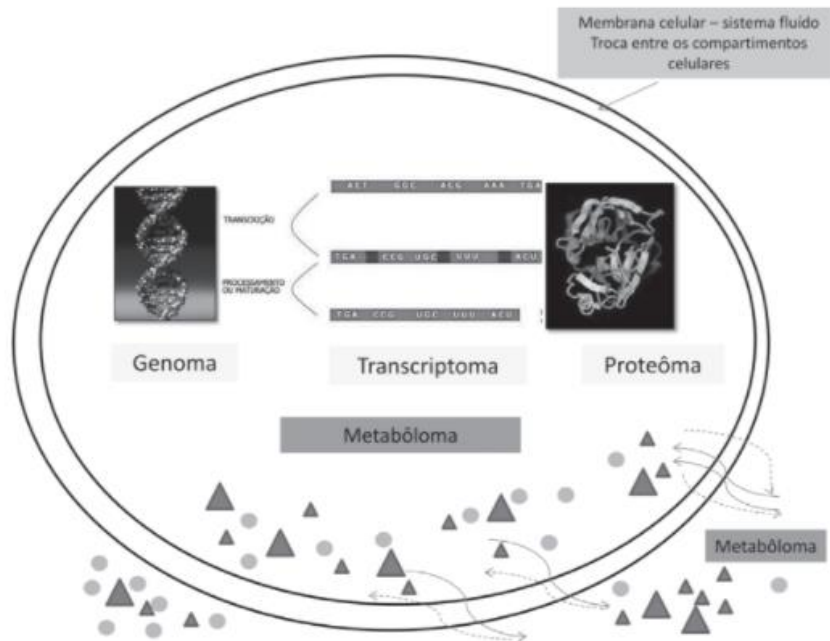


Figura 04. Análises ômicas e suas correlações entre genoma, transcriptoma, proteoma e metaboloma na biologia de sistemas.

Diferentemente do transcriptoma e proteoma, a identificação molecular dos metabólitos não pode ser deduzida a partir da informação genômica, pois a identificação e a quantificação dos metabólitos necessitam de uma instrumentação sofisticada, como a espectrometria de massas (EM), a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a fluorescência induzida por laser (LIF). A seleção otimizada dos metabólitos depende dos objetivos do estudo e é normalmente o ajuste entre sensibilidade e seletividade [138]. A RMN é altamente seletiva, não destrutiva, porém possui menor sensibilidade; já o LIF consiste em uma técnica mais sensível, mas não possui seletividade química, o que é essencial para a identificação estrutural. Em contraste, EM oferece uma boa combinação de seletividade e sensibilidade [139].

Os perfis globais do genoma, dos transcritos e das proteínas estão baseados em análises químicas de sequências-alvos compostas por 4 nucleotídeos diferentes (genoma e transcriptoma) ou 22 aminoácidos (proteoma). Esses compostos são quimicamente semelhantes facilitando a abordagem analítica de alto rendimento. Já no perfil metabólico há uma grande variação nas estruturas químicas e propriedades funcionais. Assim, o metaboloma consiste na determinação de compostos químicos iônicos extremamente diversificados, de espécies inorgânicas hidrofílicas, hidratos de carbono, álcoois voláteis, cetonas, ácidos orgânicos, aminoácidos, lipídios, e produtos

naturaiscomplexos. Essa complexidade torna praticamente impossível determinar, simultaneamente, os metabólitos e seus produtos intermediários [140]. A maioria das funções celulares é coordenada pelos princípios químicos em nível molecular; os compostos simples no interior da célula podem afetar profundamente a nossa biologia. Estudos têm demonstrado que as alterações no metaboloma correlacionam-se com o início e progressão da doença, com o envelhecimento e com diversas condições adversas no crescimento de injúrias e na diferenciação celular [141].

O metaboloma é um sistema capaz de detectar qualitativamente e quantitativamente o perfil de todos os metabólitos de baixa massa molecular (massa molecular inferior a 1.000 Daltons – Da), presentes nas células e / ou secreções que participam de reações metabólicas ou compostos intermediários, necessários para a manutenção, crescimento e ativação de vias de sinalização celular. Em sua maioria, os metabólitos intracelulares produzidos estão envolvidos na regulação de várias reações bioquímicas, sendo estes capazes de estabelecer ligações entre as diferentes vias metabólicas, que no seu conjunto constituem a rede de sinalização metabólica celular, importante na regulação do crescimento, diferenciação e morte celular [142].

A metabolômica 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. Desta forma, a metabolômica é utilizada para evidenciar diferenças entre situações de saúde e doença focando principalmente na pesquisa de biomarcadores para estas doenças [143].

11.1. Ressonância Nuclear Magnética

Existem algumas formas de obter perfis metabólicos a partir de diferentes amostras para busca de biomarcadores. Dentre elas pode-se citar a obtenção deste perfil a partir de ressonância nuclear magnética (RNM). A espectroscopia por RMN é um método rápido e não destrutivo para a análise de amostras *in natura*. É uma importante ferramenta para a determinação de estruturas ao nível atômico, além de propiciar estudos sobre a dinâmica dos mecanismos celulares químicos e bioquímicos e suas interações. Desde os primeiros experimentos nos anos 1940 até os dias de hoje, a RMN tem mostrado uma enorme variabilidade e diversidade de aplicações e

possui, sem dúvida, um lugar na ciência moderna, destacando-se as análises nas áreas de física, química, medicina, biologia e agricultura [144].

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) [145]. 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). 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). 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 [146, 147].

Assim, a RMN consiste na interação de ondas eletromagnéticas (na escala de radiofrequência) com os spins nucleares, na presença de um campo magnético externo (B_0). Existem vários núcleos atômicos que são observáveis por RMN, tais como ^1H , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N , ^{18}O , ^{31}P , entre outros. Entretanto, quando se trata de estudos de interações não covalentes entre moléculas, o núcleo mais observado é o de hidrogênio-1 (^1H) por possuir alta abundância natural e razão magnetogírica (g) grande, o que resulta em maior sensibilidade na detecção. Na presença de campo magnético os spins nucleares dos átomos de ^1H vão se orientar em dois sentidos diferentes (paralelos e antiparalelos). Existe uma pequena diferença de energia entre essas duas orientações, o que gera uma magnetização resultante. Esta magnetização é perturbada com um pulso de radiofrequência (rf) alterando a sua orientação. O detector, localizado perpendicularmente em relação à direção do campo magnético, é induzido pela magnetização resultante, gerando um sinal elétrico que decai no tempo (FID), o qual é digitalizado e sofre um processamento matemático (transformada de Fourier) resultando no espectro de RMN de ^1H no domínio das frequências, conforme Figura 05 [148].

A partir da aquisição dos espectros, inicia-se a etapa de processamento do espectro adquirido do equipamento para que este possa ser utilizado para identificação dos compostos e processamento estatístico. Os espectros são alinhados, de forma que os picos dos mesmos compostos em diferentes amostras estejam em um mesmo intervalo de aquisição. Para diminuir o ruído de fundo, utiliza-se

transformação logarítmica em que sinais de compostos com pequena concentração podem ser perdidos, e todos os sinais que são mais fortes que o ruído são melhor evidenciados. Esta etapa permite que o ruído não participe da análise estatística e uma melhor distinção entre os picos de diferentes amostras [149]. A Figura 05 apresenta detalhadamente todas as etapas do processamento do espectro, desde o momento de sua aquisição.

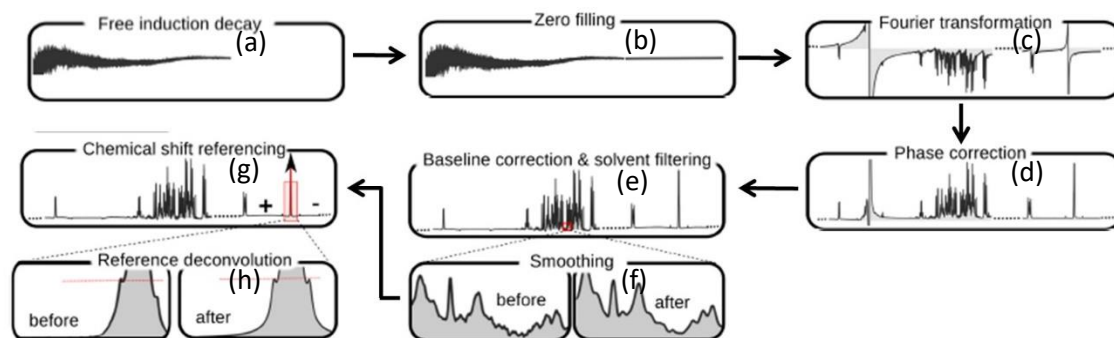


Figura 05. Etapas do processamento do espectro. (a). Espectro recebe um preenchimento de sinal nulo em cada sinal adquirido (b), este preenchimento resulta em maior qualidade e uma melhor definição do sinal. Transformação de Fourier (c), esta transformação faz o sinal obtido por tempo ser decomposto em sua frequência. 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”. Correção na linha de base (e) com retirado sinal do solvente, seguido de remoção do ruído (f). Espectros são alinhados (g) em referência a seu pico de referência e espelhamentodos picos (h).

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, da Chemonix Inc. (Edmonston, Alberta - Canada), é utilizado para a identificação dos compostos a partir dos espectros de uma dimensão(1D) [150]. 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 ele pode identificar um a um cada pico no

espectro (Figura 06) e, após, há uma automação capaz de gerenciar a identificação destes mesmos compostos em todos os outros espectros [151].

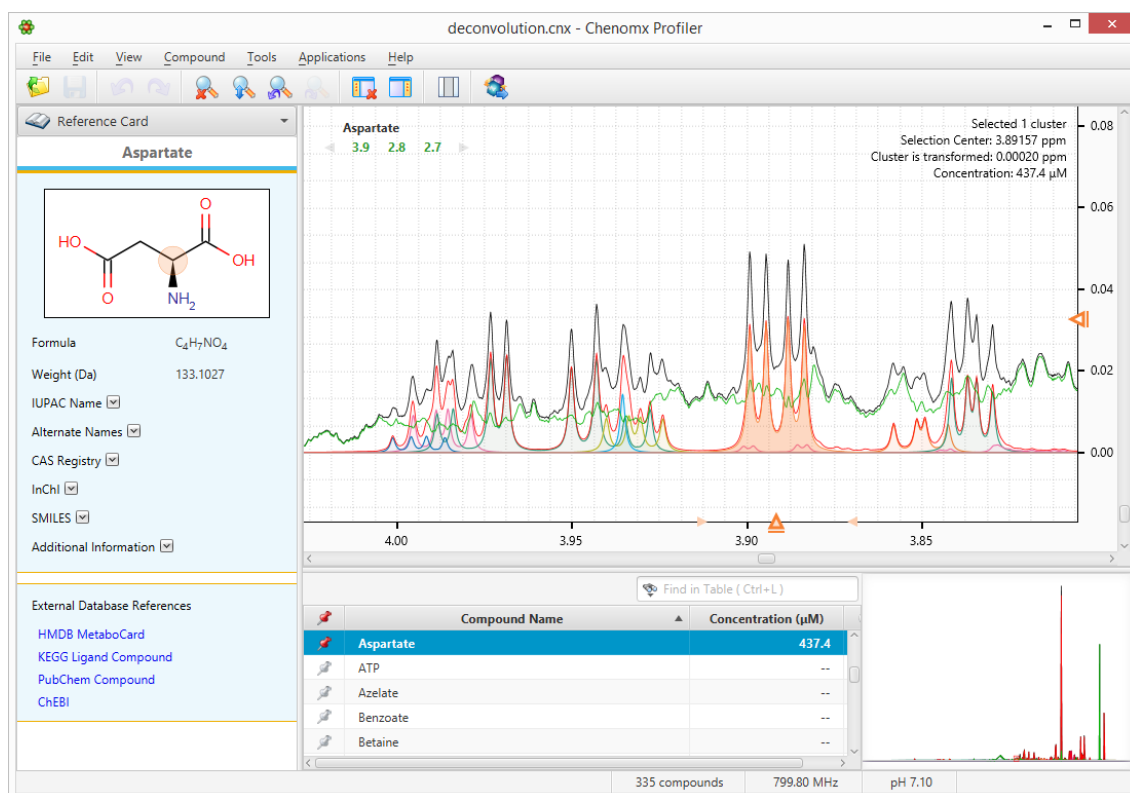


Figura 06. Representação da interface de identificação dos compostos via Chenomx. No painel de maior importância, o espectro adquirido é representado por uma linha preta. Os compostos identificados são apresentados por linhas de diferentes cores.

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 Metaboanalyst é um programa muito utilizado, capaz de processar muitos metabólitos distribuídos em diversos grupos, de forma sensível, reprodutível e estatisticamente robusta [152].

Dos vários testes e modelos que avaliam o grupamento e diferenciação entre grupos dos perfis metabólicos, um amplamente utilizado é o “*Principal Component*

Analysis” (PCA) para grupamento 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[153]. 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.

Após a etapa estatística, 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 website www.metaboanalyst.ca é uma ferramenta muito poderosa para este fim [154]. 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/>) 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 07 para uma representação com rotas de metabólitos [155].

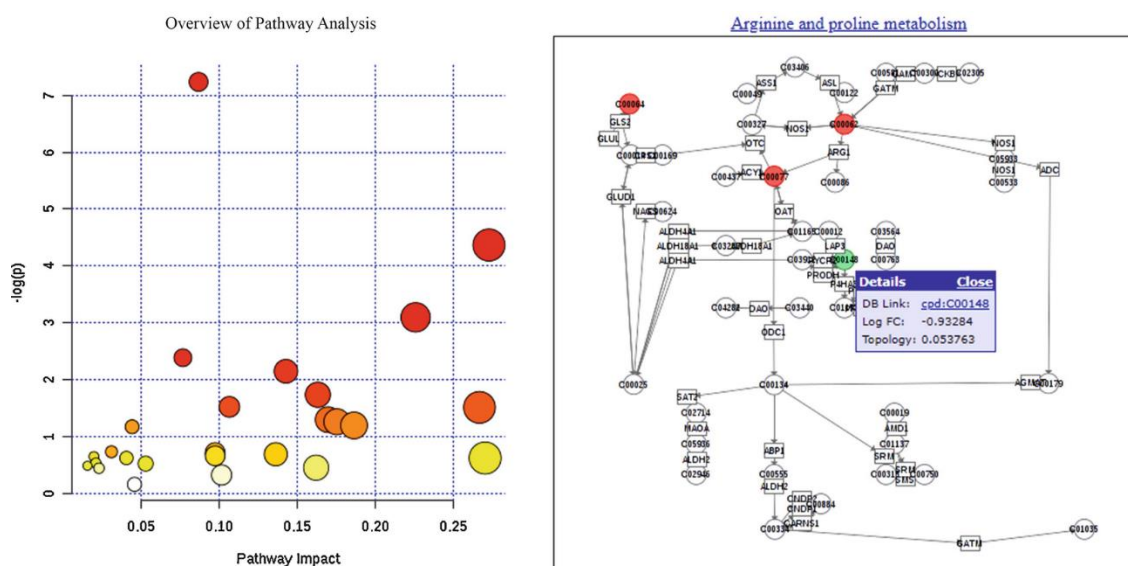


Figura 07. Representação da rota do metabólicas do site www.metaboanalyst.ca.
Análise da via metabólica e relação de via metabólica.

12. Metaboloma em AR

A técnica de metabolômica tem sido aplicada para análises de metabólitos em pacientes com artrite reumatoide para fins de compreensão da doença e busca de marcadores de diagnóstico e prognóstico [156]. 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 influências.

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 [157].

O estudo dessas mudanças metabólicas pode auxiliar a compreender a patogênese da AR, uma vez que os efeitos terapêuticos dos medicamentos podem ser potencialmente impulsionados por alterações normalizando seus valores anormais ou aumentando os metabólitos antiinflamatórios. Por exemplo, utilizando uma abordagem metabolômica direcionada, Fu et al. comparou o efeito dos glicocorticóides orais (GC) em lípidos polares séricos e observou um aumento nas lisofosfatidilcolinas (LPC) elisofosfatidiletanolaminas (LPE) em mulheres, mas não em pacientes do sexo masculino com AR [158]. GC inibe fosfolipase A, uma enzima chave que hidrolisa os fosfolipídios da membrana que é aumentada em tecidos inflamatórios. O efeito do GC na fosfolipase A provavelmente modificará o perfil de fosfolipídios podendo ter relação com risco cardio vascular [159]. Este estudo incluiu 36 pacientes com AR, 18 dos quais estavam recebendo GC e 18 que não estavam recebendo GC, verificaram que os níveis de dimetil arginina estavam mais baixos em pacientes em utilização crônica de GC em comparação com não usuários de GC, sugerindo que o tratamento de longo prazo com esta medicação melhorou a função endotelial e o efeito protetor cardiovascular, modulando o metabolismo da arginina.

Wang et al. [160] estudaram a mudança do perfil metabólico plasmático em 29 pacientes com AR após o início do tratamento com metotrexato (14 pacientes) ou uma combinação de metotrexato com uma planta medicinal chinesa (15 pacientes). Eles encontraram níveis reduzidos de vários aminoácidos (triptofano, treonina, histidina, metionina e glicina), bem como outros metabólitos (carnitina, hipoxantina, citosina, uracila e ácido úrico), enquanto taurina, aspartato, alanina, ácido láctico, adenosina e guanina foram significativamente aumentados em pacientes com AR em comparação com os controles. Curiosamente, o tratamento com metotrexato trouxe os níveis de todos esses metabólitos de volta aos níveis normais, sugerindo um papel causal desses aminoácidos na AR. Embora mais dados sejam necessários para associar as alterações de aminoácidos à resposta imune anormal na AR, dados em células imunes sugerem uma correlação direta entre o metabolismo de aminoácidos e as células T com as respostas dos macrófagos, promovendo a modulação da inflamação, que pode estar potencialmente envolvida na patogênese da AR [161]. Em relação à AR, o triptofano consiste no substrato da enzima indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO2), que foi demonstrado ser necessária para a ativação de células T CD4+, para produção de autoanticorpos patogênicos e o desenvolvimento subsequente de artrite em um modelo de camundongo de artrite [162]. Isso oferece uma possível explicação para a diminuição dos níveis de triptofano que é revertida pela adição de metotrexato.

O TNF é uma potente citocina pró-inflamatória que desempenha um papel fundamental no metabolismo celular, incluindo a glicose e metabolismo lipídico [163]; portanto, mudanças no perfil metabólico são esperadas após a administração de seu inibidor. O primeiro estudo que avaliou as mudanças no perfil metabólico de 16 pacientes com AR e pacientes com artrite psoriática (APs) após tratamento com TNFi (etanercepte e infliximabe) usaram amostras de urina. O estudo descreveu aumentos de ácido hipúrico, citrato e ácido láctico após infliximabe, enquanto aumentos na colina, ácido fenilacético, ureia, creatina e metilamina foram observados após o tratamento com etanercepte [164].

Outro grupo avaliou o perfil metabólico sérico em 20 pacientes com AR antes e depois do tratamento com TNFi (etanercepte ou adalimumabe). Dos 20 pacientes, 55% tiveram uma resposta moderada conforme critérios estabelecidos EULAR, enquanto apenas 20% alcançaram uma boa resposta. Os níveis de glicero-3-fosfolina, histidina e fenilalanina diminuíram, enquanto os níveis de leucina, acetato, betaína e formato aumentaram, distinto das dosagens em controle saudável [165]. As alterações do perfil metabólico sérico em resposta ao tratamento com TNFi, etanercepte, em 27 pacientes com AR ativa também foram avaliados por Priori et al.

Esses pacientes estavam recebendo terapia concomitante com GC e medicamentos anti-reumáticos modificadores da doença. Após 3 meses de tratamento, isoleucina, leucina, valina, alanina, glutamina, tirosina e glicose aumentaram em pacientes com boa resposta ao tratamento conforme definido pelos critérios EULAR-ESR, enquanto os níveis de 3-hidroxiacetato foram reduzidos [166]. A diminuição de 3-hidroxiacetato, acetoacetato e de acetilfosfolina sugerem uma modulação do metabolismo de lipídios após a inibição do TNF. Além disso, o aumento da glicose e outros aminoácidos sugerem uma diminuição do metabolismo destes metabólitos pelos tecidos inflamados.

Anteriormente, nosso grupo demonstrou o perfil metabólico na urina do modelo animal de CIA [167]. Neste estudo, usamos a análise metabólica para investigar potenciais biomarcadores de perda de massa muscular na urina desses camundongos. A utilização de um modelo animal tem como principal vantagem contornar a grande heterogeneidade implícita nos estudos em humanos, aumentando o poder de prospecção de biomarcadores úteis. Neste estudo identificaram-se metabólitos ao longo do desenvolvimento da doença relacionado com perda muscular em modelo animal induzido por pristane, dosando-se alterações em metabólitos urinários vinculados principalmente às vias de histidina, creatina, metionina, carnitina e histamina.

Estudos buscaram avaliar o perfil metabólico em pacientes com AR 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 nucleicos; metabolismo de espécies reativas de oxigênio; metilação; bem como na resposta macrofágica [168]. Destes estudos, destacam-se os aminoácidos essenciais, aqueles que não podemos produzir *de novo* no corpo humano, que são sugeridos como potenciais biomarcadores de degradação proteica. Ainda, analisando amostras sorológicas de pacientes com AR e artrite psoriásica, estudos metabólicos são capazes de discriminar as amostras com uma sensibilidade de 90% e 94% de especificidade [169], 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 [170], ou seja, esta abordagem possui grande capacidade discriminatória. A tabela 02 apresenta a relação de metabólitos identificados em estudos de metabólica em pacientes com artrite reumatoide.

Tabela 04. Análise de metabólitos identificados em estudos com pacientes com artrite reumatoide.

Autor	Ano	Estudo	n	Resultado
Lauridsen et al [171]	2010	<i>NMR spectroscopy-based interventional metabolic phenotyping: a cohort study of rheumatoid arthritis patients</i>	AR = 47 Controle = 51	Metabólitos elevados em pacientes com AR em comparação com os controles: colina, colesterol, glicoproteína acetilada, lactato elípido insaturado.HDL diminuído em pacientes com AR em comparação com controles.
Young et al [156]	2013	<i>The Impact of Inflammation on Metabolomic Profiles in Patients With Arthritis</i>	AR = 216 Controle = 40	Metabolitos elevado em pacientes com AR em comparação com os controles: 3-hidroxitirato, lactato, acetilglicina,taurina, glicose. Metabolitos diminuídos em pacientes com AR em comparação com controles saudáveis: LDL-CH3,LDL-CH2, alanina, metilguanidina elípido.
Kapoor et al.[172]	2013	<i>Metabolic profiling predicts response to anti-tumor necrosis factor α therapy in patients with rheumatoid arthritis - NMR</i>	AR = 16 PsO = 20	Avaliação de pacientes com AR e com artrite psoriaca antes e durante tratamento com biológicos: Histamina, glutamina, ácido fenilacético, xantina, ácido xanturênico e a creatinina foram regulados positivamente nas amostras de urinados pacientes que tiveram uma boa resposta à terapia TNF, enquanto etanolamina, ácido hidroxifenilpirúvico e fosfocreatina foram regulados negativamente.
Surowiec et al [173]	2016	<i>Metabolomics study of fatigue in patients with rheumatoid arthritis naïve to biological treatment</i>	AR = 24	Relação positiva de fadiga e pacientes com AR: frutose, ácido aradônico, glicerol-3-fosfato, ácido acético e prolina. Relação negativa de fadiga com pacientes com RA: oxoisocaproato, cistina, hidroxiprolina, ácido decosahexaenoico, triptofano, ácido pipercolico, valina, ornitina, arginina, ureia, tirosina e ácido linoleico.
Zhou et al [174]	2016	<i>Exploration of the serum metabolite signature in patients with rheumatoid arthritis using gas chromatography–mass spectrometry</i>	AR = 33 Controle = 32	Os metabólitos que aumentaram na AR em comparação com controles: glicerol, citrato, piruvato,colesterol, ácidos graxos. Metabolitos que diminuíram na AR em comparação com os controles:glicose, urato, alanina, serina, metionina,treonina, leucina, valina,

				isoleucina, aspartato, fenilalanina, tirosina, prolina e ureia
FU et al [175]	2016	<i>Metabolomics profiling of the free and total oxidised lipids in urine by LC-MS/MS: application in patients with rheumatoid arthritis</i>	AR = 702	Estudo observacional com AR (BioCura). Lisofosfatidilcolinas elisofosfatidiletanolaminas elevados em mulheres com uso de glicocorticoides. Nos homens, os níveis de lisofosfolípidios eram semelhantes; DAS 28 mostrou uma associação positiva com Lipoxina. A melhora do DAS28 mostrou associação positiva com PGF3 α , PGF2 α , iPF2a IV, 11,12-EpETrE, 11-HETE, 14,15-DiHETrE e 14-HdoHE.
Yoursi et al [176]	2017	Large Scale Metabolic Profiling identifies Novel Steroids linked to Rheumatoid Arthritis	AR = 132 Controle = 104	Metabólitos aumentados em AR vs. Controle: proiliglicina . Metabólitos diminuíram na AR vs. controle: 4-metil-2-oxopentanoato, 3-metil-2-oxovalerato e sarcosina.
Tatar et al [177]	2017	<i>Variations in the metabolome in response to disease activity of rheumatoid arthritis</i>	AR = 48	Derivados de carboidratos (D-glicose, D-frutose, sacarose e maltose) emergiram como determinantes da resposta terapêutica de pacientes com AR. Identificaram vários marcadores potenciais da doença de AR gravidade, incluindo colesterol total, lactatos, acetil glicoproteína e derivados lipídicos
Fernández-Ochoa et al [178]	2020	Metabolic Disturbances in Urinary and Plasma Samples from Seven Different Systemic Autoimmune Diseases Detected by HPLC-ESI-QTOF-MS	AR = 288 Controle = 55	Os metabólitos de diferenciação entre pacientes com AR e controle consistiam predominantemente em ácidos graxos insaturados, acilglicinas, acilcarnitinas e aminoácidos.
Ahn et al [179]	2020	<i>Variation in the synovial fluid metabolome according to disease activity of rheumatoid arthritis</i>	AR = 48	As intensidades de glicocamina e indol-3-lactato correlacionaram-se positivamente com o valor do DAS28-ESR em pacientes com AR. Por outro lado, β -alanina, asparagina, citrato, ciano-L-alanina, leucina, nicotinamida, citrulina, metionina, oxoprolina e salicilaldeído correlacionaram-se negativamente com o valor DAS28-ESR.

Vários estudos empregaram diferentes métodos analíticos (espectrometria de massa, MS, ressonância magnética nuclear, NMR) para caracterizar o perfil metabólico no sangue (soro ou plasma), urina ou líquido sinovial em pacientes com artrite reumatóide comparando com controles e relacionando com distintos tratamentos. Devido à heterogeneidade dos métodos que foram usados, os resultados da maioria dos estudos não são comparáveis; no entanto, existem metabólitos com mudanças semelhantes em vários estudos, conforme demonstrado na Figura 08 [180]. Importante ressaltar que não há estudos que avaliem metabólitos em relação à perda muscular em pacientes com AR.

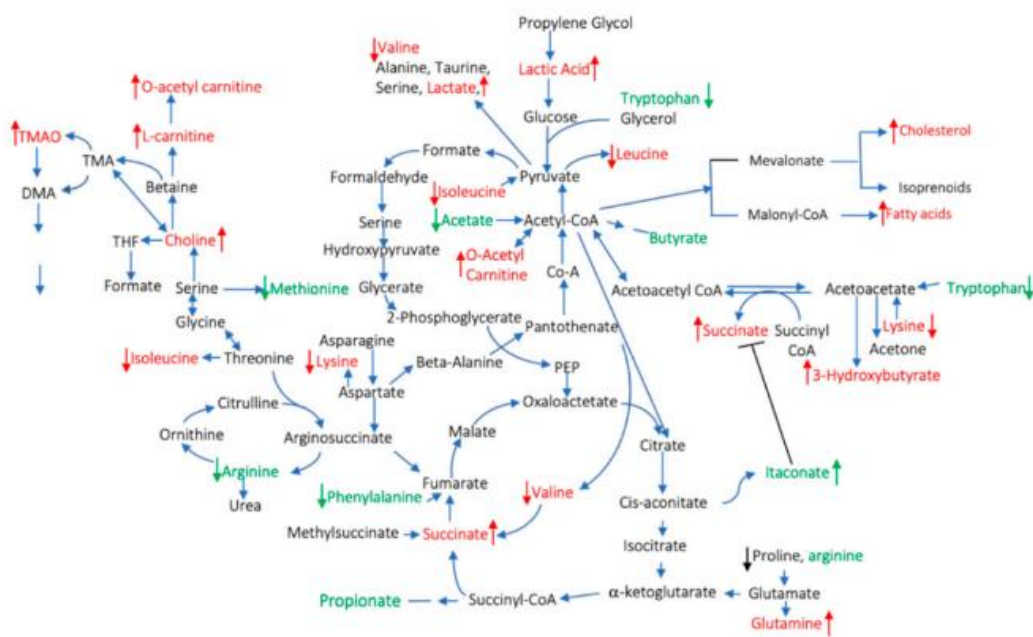


Figura 08. Metabólitos circulantes inflamatórios descritos em pacientes com artrite reumatóide. A cor vermelha indica metabólitos pró-inflamatórios e o verde indica metabólitos anti-inflamatórios. As setas indicam aumento / diminuição das concentrações dos metabólitos em comparação com controles saudáveis.

Pelo fato de a AR ser uma doença autoimune crônica, com uma resposta imune sistêmica a autoantígenos que podem existir anos antes do início dos sintomas clínicos, uma ativação imune local do tecido sinovial o torna inflamado, hiperplásico e invasivo da cartilagem e do osso local [181]. Como os metabólitos pró ou anti-inflamatórios desempenham um papel na patogênese nesta patologia ainda é desconhecido. Contudo, o crescimento do campo do imunometabolismo tecidual e sua descrição de múltiplas vias metabólicas na ativação e diferenciação de células imunes,

como linfócitos T e B, macrófagos, células dendríticas e fibroblastos, entre outros, sugere que a maioria dos metabólitos envolvidos na resposta imune também pode ser importante no desenvolvimento de AR. Na Tabela 05 são descritos metabólitos pró e anti-inflamatórios associados à patogênese da AR [182].

Tabela 05. Relação entre metabólitos pró e anti-inflamatórios na patogenia de AR, modulando a função de vários tipos celulares envolvidos na inflamação sinovial [182].

	Liberação por Tecidos Inflamados	Captação por tecidos Inflamados
Fibroblastos	Colina, Lactato, Succinato, Ácidos Graxos Saturados, Glutamine	Ácidos Biliares, Oxi-lipídeos
Macrófagos	Lactato, BCAA, Citrato, Succinato, Colina, Leucina, Glutamato	Itaconato, Ácidos Biliares, Oxi-lipídeos
Células T	Lactato, Succinato, Citrato	Triptofano, SCFA

13. Metaboloma e degradação muscular

Estudos demonstram possíveis relações de metabólitos com processos inflamatórios como na artrite reumatóide, porém não há na literatura avaliação de metabólitos envolvidos em processos inflamatórios e perda muscular. A seguir são relacionados metabólitos considerados pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.

Metabólitos Pró-Inflamatórios

Colina e Óxido de trimetilamina (TMAO). Os metabólitos relacionados com a via da colina foram identificados em tecido sinovial, líquido sinovial e amostras de sangue (soro / plasma) tanto em modelos animais como em humanos [183]. A dieta é a principal fonte de colina, cujos metabólitos (óxido de trimetilamina - TMAO) já foram relacionados à inflamação cardiovascular [184]. Não há muitos estudos que avaliem o papel do TMAO na AR, porém verificou-se que o TMAO sérico está associado a

medidas de articulação (contagem de articulações doloridas, contagem de articulações inchadas, DAS28-CRP) e inflamação da pele (área de superfície corporal afetada por psoríase) em uma pequena coorte de pacientes com psoríase e PsA [185]. Verificou-se que o TMAO, assim como a colina, estava aumentado em amostras de soro no modelo K / BxN murino de artrite em comparação com camundongos de controle [186]. Importante ressaltar que o metabolismo da colina foi relacionado ao fenótipo RA e à secreção de IL-1 β em macrófagos [187].

Aminoácidos de Cadeia Ramificada (BCAA). Níveis diminuídos de valina, leucina e isoleucina foram encontrados em pacientes com AR. A diminuição dos níveis de BCAA pode ser explicada pelo baixo consumo alimentar ou por uma maior absorção desses aminoácidos pelo tecido inflamado. Estes são aminoácidos essenciais, portanto sua fonte é a dieta e, ultimamente, têm sido relacionados à inflamação por induzir o estresse oxidativo (via NADPH e sinalização Akt-mTOR), assim como, promover a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF) e a migração de células mononucleares do sangue periférico [188]. As aminotransferases¹ de cadeia ramificada (BCAT1), uma enzima que inicia o metabolismo do BCAA, é a isoforma predominante nos macrófagos primários humanos. Sua ação sobre a leucina produz acetil-CoA e glutamato, que entram no ciclo do TCA. O tratamento de macrófagos humanos estimulados por LPS e TNF com um análogo da leucina, que bloqueia a atividade de BCAT1, diminuiu o consumo de oxigênio e a glicólise. Além disso, a administração oral deste análogo da leucina reduziu a gravidade da artrite induzida por colágeno em camundongos [189].

Glutamina. Consiste em um aminoácido usado como fonte de combustível para o metabolismo. A glutaminase 1, enzima responsável pela glutaminólise, é regulada positivamente nos fibroblastos sinoviais de AR, e a inibição desta enzima diminuiu o fenótipo agressivo do FLS e melhorou a gravidade da artrite no modelo murino de artrite [190].

Intermediários Glicolíticos. A articulação RA é caracterizada por uma mudança da fosforilação oxidativa aeróbia para um estado glicolítico, no qual menos ATP é produzido, mas em uma taxa mais rápida, para ser capaz de garantir os requisitos energéticos necessários para as células altamente ativas. Metabólitos relacionados à via glicolítica têm sido detectados em diversos estudos em modelos animais, bem como em estudos de metabolômica humana [191]. O lactato é o produto final da glicólise, uma via metabólica que é regulada positivamente em FLS e macrófagos ativados. Altas concentrações de ácido láctico são encontradas no sangue e no líquido

sinovial de articulações inflamadas em pacientes com AR. Estudos demonstraram que o lactato promove o fenótipo agressivo do FLS, as propriedades pró-inflamatórias dos macrófagos, estimula a secreção de IL-17 pelas células T CD4 + e, ao mesmo tempo, diminui a migração T CD4 +, que está relacionado à manutenção de um infiltrado inflamatório crônico [192].

O succinato é elevado no líquido sinovial de pacientes com AR [193]. O metabólito do TCA promove a inflamação ao estimular a secreção de IL-1 β em macrófagos murinos por meio do HIF-1 α . Além disso, o succinato ativa o inflamassoma de NLRP3 induzindo a secreção de IL-1 β por fibroblastos sinoviais em um modelo de rato de AR [194]. Parece que o succinato também desempenha um papel nas respostas imunes inatas e adaptativas. Os pesquisadores descobriram que a deficiência genética de *Sucnr1*, um receptor de succinato expresso por células imunes, diminui o tráfico de células dendríticas e reduz a expansão de células Th17 nos nódulos linfáticos, reduzindo os sintomas de artrite no modelo de artrite induzida por antígeno de camundongo [195].

O itaconato, um marcador de ativação de macrófagos, desempenhe um papel antiinflamatório, uma vez que inibe a oxidação do succinato mediada pela succinato desidrogenase e, por meio disso, exerce efeitos antiinflamatórios em macrófagos ativadas, conforme mostrado em um modelo in vivo de lesão de isquemia-reperfusão [196]. No entanto, em um modelo animal de AR, descobriu-se que níveis mais elevados de itaconato estavam associados à alta atividade da doença [197].

Colesterol. Proveniente da dieta com níveis estão diminuído em pacientes com AR; descobriu-se que isso é preditivo de AR em mulheres, mas não em homens [198]. O metabolismo lipídico está alterado na AR, mas o metabolismo do colesterol na AR não foi especificamente estudado. Curiosamente, descobriu-se recentemente que o colesterol está alto em condrócitos, devido a uma captação aumentada, regulação positiva de hidroxilases de colesterol e produção aumentada de metabólitos de oxisterol [199].

Ácidos Graxos Livres (AGL). Podem ser retirados da dieta (AG essencial, ácido alfa-linolênico - ômega-3 - e ácido linoléico -ômega-6) ou sintetizados no organismo. Sugere-se que eles eram pró-inflamatórios, uma vez que contribuem para a inflamação de baixo nível em pacientes obesos. Os níveis de ácidos graxos foram

mais elevados no soro dos pacientes com AR do que nos controles e correlacionados com a atividade da doença [200]. Frommer et al. mostraram que ácidos graxos contribuem para a patogênese e danos em AR, OA e PsA, uma vez que a estimulação de fibroblastos com ácido oleico, palmítico e linoléico induziu a secreção de citocina pró-inflamatória IL-6, as quimiocinas IL-8 e MCP-1, como bem como as metaloproteinases de matriz pró-MMP1 e MMP3 [201]. O ácido araquidônico (ARA) é o precursor das prostaglandinas classicamente descritas (PGE₂), que são conhecidas por estarem envolvidas na inflamação em geral, mas também na artrite [202].

Metabólitos Anti-Inflamatórios

Metabólitos relacionados com ácidos graxos poliinsaturados (PUFA). Ácido docosahexaenóico e ácido eicosapentaenóico têm propriedades antiinflamatórias, principalmente porque competem com ARA pela ação das enzimas (ciclooxigenase-COX, lipooxigenase-LOX, citocromo P450), o que resulta em uma produção diminuída de pró-inflamatório derivado de ARA oxilipinas e uma produção aumentada de oxilipinas antiinflamatórias derivadas de DHA e EPA [203]. Níveis reduzidos de EPA e DHA foram descritos em pacientes espanhóis com AR e foram associados a maior duração da doença, positividade para fator reumatóide, doença erosiva e com pior resposta aos inibidores de TNF [204].

Prostaglandinas, Tromboxanos e Leucotrienos. São as oxilipinas classicamente descritas envolvidas na patogênese da AR. Os métodos mais novos de LC / MS e NMR tornam possível identificar várias outras oxilipinas, por exemplo, 8-HETE, 12-HETE e 12-HEPE que são produtos da via da 12-lipoxigenase. Liagre et al. demonstraram a presença de 12-LOX em sinoviócitos do tipo B e descobriram que a estimulação de IL-1 β e TNF aumentou a produção de 12-HETE, enquanto IL-6 e IL-4 não tiveram o mesmo efeito [205]. Esta via também foi estudada por Kronke et al., que mostraram que a deleção de 12/15-LOX em dois modelos de artrite (a transferência de soro K / BxN e um modelo de camundongo transgênico TNF) levou a uma inflamação descontrolada e danos aos tecidos [206]. LTB₄ e 5-HETE são produtos de ARA por meio da via 5-LOX; 5- e 15-LOX que são expressos em ambas as sinovias de OA e RA no revestimento de macrófagos, neutrófilos e mastócitos, demonstrados estar envolvido na patogênese RA, promovendo inflamação [207].

Os Ácidos Graxos de Cadeia Curta (SCFA). São subprodutos do metabolismo da fibra alimentar pelo microbioma intestinal. Eles modulam as respostas imunes e inflamatórias por meio da ativação de receptores de ácidos graxos livres (FFA) tipo 2 e 3 (receptores FFA2 e FFA3) e do receptor acoplado à proteína G 109A (GPR109A) por meio da inibição de histona desacetilases (HDACs). Um estudo metabolômico realizado em um modelo de rato CIA encontrou níveis diminuídos de acetato, propionato, butirato e valerato em amostras fecais de ratos artríticos em comparação com controles [208]. A administração de butirato inibiu a artrite induzida por colágeno via eixo Treg / IL10 / Th17 [209].

Ácidos Biliares (BA). BAs primários são sintetizados no fígado e são liberados no trato gastrointestinal para ajudar na digestão de lipídios. As bactérias intestinais metabolizam os ácidos biliares primários e podem desconjugá-los, sintetizando BAs secundários. BAs foram detectados na circulação sistêmica, onde suas concentrações variam com a dieta, sendo relacionados à resistência à insulina [210]. A ativação do receptor TGR5 por BA endógeno suprimiu a produção de citocinas inflamatórias induzidas por LPS em macrófagos, enquanto nenhum efeito foi observado em macrófagos que careciam desse receptor [211]. A maioria dos estudos enfocamos efeitos dos BAs na imunidade da mucosa intestinal e, portanto, estudos futuros são necessários para elucidar os papéis dos BAs circulantes nos estados de doença.

Triptofano. O triptofano é um aminoácido essencial que deve ser fornecido na dieta. Foi descrito que metabólitos de triptofano derivados de micróbios podem exercer efeitos sistêmicos e antiinflamatórios [212]. Além disso, o triptofano e seus metabólitos catabólicos gerados pela via da quinurenina estão envolvidos na inflamação. A quinurenina tem efeitos antiinflamatórios conhecidos que são tóxicos para as células T e induzem a morte celular por apoptose. A quinurenina é formada a partir do triptofano pela atividade da indolamina 2,3-dioxigenase (IDO). A ativação da IDO está ativamente envolvida na resolução da artrite em camundongos associada a um aumento nos metabólitos da quinurenina [213].

A avaliação de metabólitos circulantes que são diferentes em pacientes com AR em comparação com os controles podem estar relacionados a síndrome metabólica associada, desde o metabolismo da colina (especialmente TMAO e carnitina), aminoácidos (alanina, glutamina, glutamato, arginina, aspartato, asparagina, histidina, metionina, cisteína, lisina, aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), fenilalanina, tirosina e triptofano) e fosfolipídios (fosfatidilcolinas) também se alteram naqueles com

síndrome metabólica [214]. Um trabalho avaliou massa muscular em mulheres com osteoporose e sugeriu alguns metabólitos circulantes que podem ser biomarcadores de sarcopenia. Eles identificaram nove metabólitos, principalmente aminoácidos e lipídios, associados à massa muscular, quatro dos quais também estavam associados à força muscular. Os metabólitos verificados incluem dois aminoácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico) e um aminoácido derivado (ácido pipercolico), um peptídeo (fenilalanil-treonina), um carboidrato (metil beta-Dglucopiranosídeo) e quatro lipídios (12S-HETRE, ácido araquidônico, 12S-HETE e glicerofosfolina) [215]. Mesmo que tanto o tecido adiposo quanto o tecido muscular, bem como as células imunes associadas em esses tecidos inflamados, podem ser fontes de metabólitos, não se sabe o quanto eles podem contribuir ao pool de metabólitos circulantes. Por exemplo, estudos que medem o perfil metabólico no tecido adiposo visceral e soro de pacientes obesos encontraram baixas correlações entre o soro e metabólitos do tecido adiposo [216]. Por outro lado, podemos especular que pode haver uma competição entre tecidos inflamados para a captação de metabólitos antiinflamatórios.

A literatura prevê avanços futuros via abordagem metabólica, com interesse particular às doenças reumáticas, tanto na busca e identificação de novos biomarcadores como no acompanhamento de agentes terapêuticos. Muitos estudos demonstram a relação de metabólitos com processos inflamatórios, inclusive em artrite reumatoide, porém não há estudos que correlacionem esses metabólitos como possíveis marcadores no processo de perda muscular decorrente desta patologia caracterizados por sarcopenia e caquexia reumatoide.

Então, levando-se em conta todos os aspectos de complexidade da AR, de degradação muscular, da síndrome da caquexia reumatoide, da sarcopenia, das influências dos diferentes tratamentos e outros fatores levantados, uma ferramenta muito útil na busca por biomarcadores consiste no estudo do perfil metabólico urinário de pacientes com doenças reumáticas. Portanto, considerando também a gravidade da perda muscular na sarcopenia e caquexia reumatoide, assim como, a ausência de marcadores que indiquem o desenvolvimento desta síndrome, o objetivo deste projeto é identificar biomarcadores relacionados ao processo de perda muscular em pacientes com artrite reumatoide.

14. Marco Teórico

Segue o marco teórico da problemática da pesquisa (Figura 09).

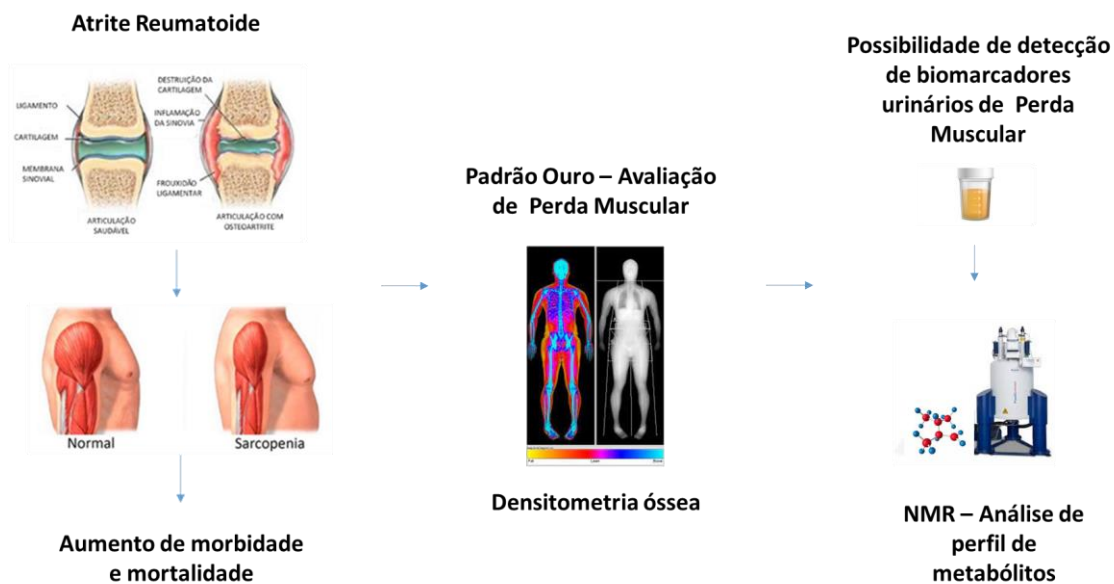


Figura 09. Marco teórico esquemático apresentando a problemática da pesquisa. Identificação de biomarcadores urinários de perda muscular por NMR possibilitando detecção prévia para evitar perda de função muscular em pacientes com artrite reumatóide. Esta técnica possibilita a identificação de perfil de metabólitos – metaboloma.

Justificativa

Considerando o pior prognóstico de pacientes com AR que apresentam sarcopenia e/ou caquexia reumatoide pela perda de massa muscular, assim como a ausência de marcadores que indiquem a perda muscular e o desenvolvimento destas condições clínicas, é de grande importância identificar biomarcadores relacionados ao início do processo de perda muscular e ao prognóstico da doença. Foram realizados estudos de perfil metabólico urinário em pacientes com artrite reumatoide, porém não em relação à massa muscular. Já com um estudo extensivo do perfil metabólico relacionado com o progresso da caquexia e sarcopenia reumatoide, há possibilidade de identificação de biomarcadores relacionados com prognóstico e diagnóstico de perda muscular.

15. Objetivos

Objetivos Gerais

Avaliar o perfil metabólico urinário de pacientes com artrite reumatoide e associar com a presença de perda muscular.

Objetivos Específicos

1. Mensurar os parâmetros de perda muscular associados à caquexia e à sarcopenia reumatoide nos pacientes.

2. Identificar potenciais biomarcadores de perda muscular encontrados no perfil metabólico da urina de pacientes com artrite reumatoide;

16. Desenho experimental



Figura 10. 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. Os pacientes tiveram seus dados clínicos e urina coletados; realizado teste de desempenho físico e composição corporal para avaliação de perda muscular. Os espectros foram adquiridos por NMR e processados por metaboanalyst seguido de identificação pelo Chenomx.

17. Referências

- [1] D. Okin, R. Medzhitov, Evolution of Inflammatory Diseases, *Current Biology* 22(17) (2012) R733-R740.
- [2] 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.
- [3] G.S. Firestein, Evolving concepts of rheumatoid arthritis, *Nature*, 2003, pp. 356–361.
- [4] Kerekes G, Nurmohamed MT, González-Gay MA, Seres I, Paragh G, Kardos Z, et al. Rheumatoid arthritis and metabolic syndrome. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10:691–696.
- [5] J. Walsmith, R. Roubenoff, Cachexia in rheumatoid arthritis, *International Journal of Cardiology* 85(1) (2002) 89-99.
- [6] Rocha OM et al. Sarcopenia da caquexia reumatoide: conceituação, mecanismos, consequências clínicas e tratamentos possíveis, 2009.
- [7] Santo, RE, Fernandes, KZ, Lora, PS, Filippin, L, Xavier, RM. Prevalence of rheumatoid cachexia in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 2018.
- [8] Shaw KA, Srikanth VK, Fryer JL, Blizzard L, Dwyer T, Venn AJ. Dual energy X-ray absorptiometry body composition and aging in a population-based older cohort. *Int J Obes* 2007;31(2):279-84.
- [9] Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: report of the European Working Group on sarcopenia in older people. *Age Ageing* 2010;39(4):412-23.
- [10] Semerano L, Romeo PH, Boissier MC, Metabolomics for rheumatic diseases: has the time come?, *Annals of the Rheumatic Diseases* 74(7) (2015) 1325-1326.
- [11] 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.
- [12] Junqueira, LCU & Carneiro, J. *Histologia Básica*. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

- [13] Farinatti PTV. Envelhecimento, promoção da saúde e exercício: bases teóricas e metodológicas. 1ª ed. Barueri: Manole; 2008. Aspectos fisiológicos da aptidão física no envelhecimento: função neuromuscular – força e flexibilidade.
- [14] Mougios V. Muscle Contraction. In: Exercise Biochemistry. chap 7, P 105-19, Human Kinetics, 2006.
- [15] Oswaldo Melo da RochaAndréa de Almeida Peduti BatistaNailza MaestáRoberto Carlos Burinilêda Maria Magalhães Laurindo.Sarcopenia da caquexia reumatoide: conceituação, mecanismos, consequências clínicas e tratamentos possíveis, Rev. Bras. Reumatol. 49, 3, 2009.
- [16] Guccione AA. Fisioterapia geriátrica. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2000.
- [17] Hughes, Virginia A. et al. Longitudinal changes in body composition in older men and women: role of body weight change and physical activity. The American journal of clinical nutrition, v. 76, n. 2, p. 473-481, 2002.
- [18] Deschenes, Michael R. Effects of aging on muscle fibre type and size. Sports medicine, v. 34, n. 12, p. 809-824, 2004.
- [19] Carrazco Peña, Karla Berenice; Tene, Carlos Enrique; Río Valdivia, José del. Sarcopenia y dependencia funcional (DF) en el anciano. 2016.
- [20] Rosenberg, Irwin H. Sarcopenia: origins and clinical relevance. Clinics in geriatric medicine, v. 27, n. 3, p. 337-339, 2011.
- [21] Cruz-Jentoft, Alfonso J. et al. Writing Group for the European Working Group on Sarcopenia in Older People 2 (EWGSOP2), and the Extended Group for EWGSOP2. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. Age Ageing, v. 48, n. 1, p. 16-31, 2019.
- [22] Teixeira, VOM, Filippin, VL, Xavier, MR. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia,Rev. Bras. Reumatol. 52 (2), 2012.
- [23] Cruz-Jentoft, Alfonso J. et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosisReport of the European Working Group on Sarcopenia in Older PeopleA. J. Cruz-Gentoft et al. Age and ageing, v. 39, n. 4, p. 412-423, 2010.
- [24] Greenlund LJS, Nair KS. Sarcopenia – consequences, mechanisms and potential therapies. Mech Ageing Dev 2003;124:287-99.

- [25] Baumgartner RN, Koehler KM, Romero LJ, Lindeman RD, Garry PJ. Epidemiology of sarcopenia in elderly people in New Mexico. *Am J Epidemiol* 1998;147:744-63.
- [26] Silva TAA, Junior AF, Pinheiro MM, Szejnfeld VL. Sarcopenia Associado ao Envelhecimento: Aspectos Etiológicos e Opções Terapêuticas. *Rev Brás Reumatol* 2006;46:391-7.
- [27] Doherty TJ. Aging and Sarcopenia. *J Appl Physiol* 2003;95:1717-27.
- [28] Cruz-Jentoft A, Landi F, Topinková E et al. Understanding sarcopenia as a geriatric syndrome. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 1–7.
- [29] Rall LC, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology* 2004;43: 1219-23.
- [30] Roubenoff R, Heymsfield SB, Kehayias JJ, Cannon JG, Rosenberg IH. Standardization of nomenclature of body composition in weight loss. *Am J Clin Nutr* 1997;66:192-6.
- [31] Fearon, K. *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* v. 12, p. 489–95, 2011.
- [32] Morley, J. E. Anorexia, weight loss, and frailty. *J Am Med Dir Assoc.* v. 11, p. 225–228, 2010.
- [33] Barendregt, K.; Soeters, P. B.; Allison, S. P. Influence of malnutrition on physiological function. In: Sobotka L (editor). *Basics in clinical nutrition.* p. 18–20. 3rd ed. Galen, 2004.
- [34] Yancik, R. M.; Ries, L. A. Cancer in the older person: magnitude of the problem and efforts to advance the aging/cancer research interface. In: BALDUCCI, L. *et al.* *Comprehensive geriatric oncology.* p. 38–46, London and New York: Taylor & Francis; 2004.
- [35] Fearon, K. *et al.* Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* v. 12, p. 489–95, 2011.
- [36] Kotler DP. Cachexia (Review). *Ann Intern Med* 2000;133:622-34.
- [37] Roubenoff R, Roubenoff RA, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, Dawson-Hughes B *et al* Rheumatoid Cachexia: Cytokine-driven Hypermetabolism

Accompanying Reduced Body Cell Mass in Chronic Inflammation. *J Clin Invest* 1994;93:2379-86.

[38] Mougios, V. Muscle Contraction. In: *Exercise Biochemistry* (org.) chap 7, p. 105-19, Human Kinetics, 2006.

[39] Rall, L. C.; Roubenoff, R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology*. v. 43, n. 10, p. 1219-23, 2004.

[40] Tracey, K. J.; Cerami, A. Tumor Necrose Factor: A Pleiotropic Cytokine and Therapeutic Target. *Annual Rev Med*. v. 45, p. 491-50, 1994.

[41] Mantovani, G. Cachexia and wasting: a modern approach. p. 161–2, Springer, 2006.

[42] Costelli, P.; Baccino, F. M. Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. v. 6, n. 4, p. 407–12, 2003.

[43] Saini, A.; Al-Shanti, N.; Stewart, C. E. Waste management – cytokines, growth factors and cachexia. *Cytokine Growth Factor Rev*. v. 17, n. 6, p. 475–86, 2006.

[44] Biolo, G. *et al.* Microgravity as a model of ageing. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. v. 6, n. 1, p. 31–40, 2003.

[45] Fearon, K. C.; Voss, A. C.; Hustead, D. S.; Cancer Cachexia Study Group. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am J Clin Nutr*. v. 83, n. 6, p. 1345–50, 2006.

[46] Evans, W. J. *et al.* Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*. v. 27, p. 793–9, 2008.

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

[48] 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.

[49] 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.

- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] T. Pincus, T. Sokka, F. Wolfe, Premature mortality in patients with rheumatoid arthritis: Evolving concepts, *Arthritis and Rheumatism* 44(6) (2001) 1234-1236.
- [56] 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).
- [57] 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.
- [58] 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.

[59] E.A. Stahl, S. Raychaudhuri, E.F. Remmers, G. Xie, S. Eyre, B.P. Thomson, Y. Li, F.A.S. Kurreeman, A. Zhernakova, 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.

[60] 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) I9-I9.

[61] 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.

[62] K.P. Liao, L. Alfredsson, E.W. Karlson, Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis, *Current Opinion in Rheumatology* 21(3) (2009) 279-283.

[63] 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.

[64] 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.

[65] 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.

[66] 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).

[67] 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.

[68] Feldmann, M.; Brennan, F. M. Rheumatoid arthritis. *Cell*, v. 85, p. 307-10, 1996.

[69] Clavel, C. et al. Induction of macrophage secretion of TNF α through Fc γ receptor IIa engagement by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies to citrullinated proteins complexed with fibrinogen. *Arthritis Rheum*, v. 58, n. 3, p. 678-88, 2008.

[70] Paradowska, A. et al. The function of interleukin 17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arch Immunol Ther Exp*, v. 55, n. 5, p. 329-34, 2007.

[71] Miossec, P.; Korn, T.; Kuchroo, V. K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med*, v. 361, p. 888-98, 2009.

[72] Tehlirian, C. V.; Bathon, J. M. Rheumatoid arthritis: clinical and laboratory manifestations. In: Stone, J. H.; Crofford, L. J.; White, P. H. *Primer on the rheumatic diseases*. 30. ed. New York: Springer, 2008. p. 114-21.

[73] Hellmann, D. B.; Stone, J. H. Arthritis & Musculoskeletal Disorders. In: Tierney, L. M. et al. *Curr Med Diag Treat*. 43. ed. New York: McGraw-Hill, 2004. p. 797-825.

[74] Albani, S.; Carson, D.A. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Koopman, W. J. *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*. 13. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1997, p. 979-92.

[75] Ozbalkan, Z. et al. An update on the relationships between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, v. 212, n. 2, p. 377-82).

- [76] Egsmose, C. et al. Patients with rheumatoid arthritis benefit from early 2nd line therapy: 5-year followup of a prospective double blind placebo controlled study. *J Rheumatol*, v. 22, p. 2208-13, 1995.
- [77] Aletaha, D. et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*, Atlanta (GA), v. 62, n. 9, p. 2569-2581.
- [78] Arnett, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 31, p. 315-24, 1988.
- [79] G.D. Summers, C.M. Deighton, M.J. Rennie, A.H. Booth, Rheumatoid cachexia: a clinical perspective, *Rheumatology* 47(8) (2008) 1124-1131.
- [80] Phillips, S. M., Glover, E. I. & Rennie, M. J. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 107, 645–654, 2009.
- [81] Cruz-Jentoft, Alfonso J. et al. Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age and ageing*, v. 43, n. 6, p. 748-759, 2014.
- [82] Lang, T. et al. Sarcopenia: etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. *Osteoporosis international*, v. 21, n. 4, p. 543-559, 2010.
- [83] Chen, Y.-M. et al. A close association of body cell mass loss with disease activity and disability in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Clinics* 66, 1217–1222, 2011.
- [84] Munro, R. & Capell, H. Prevalence of low body mass in rheumatoid arthritis: association with the acute phase response. *Ann. Rheum. Dis.* 56, 326–329, 1997.
- [85] Walsmith, J., Abad, L., Kehayias, J. & Roubenof, R. Tumor Necrosis Factor- α Production Is Associated with Less Body Cell Mass in Women with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 31, 23–29, 2004.
- [86] Engvall, I. L. et al. Cachexia in rheumatoid arthritis is associated with inflammatory activity, physical disability, and low bioavailable insulin-like growth factor activity, physical disability, and low bioavailable insulin-like growth. *Scand. J. Rheumatol.* 37, 321–328, 2008.

- [87] Raschke, S. & Eckel, J. Adipo-Myokines: Two Sides of the Same Coin — Mediators of Inflammation and Mediators of Exercise. *Mediators Inflamm.* 2013, 320724, 2013.
- [88] Castellero, E., Martín, A. I., López-Menduiña, M., Villanúa, M. A. & López-Calderón, A. Eicosapentaenoic acid attenuates arthritis-induced muscle wasting acting on atrogenin-1 and on myogenic regulatory factors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 297, R1322–31, 2009.
- [89] Vilchez, D., Saez, I. & Dillin, A. The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat. Commun.* 5, 1–13, 2014.
- [90] Whitman, S. A., Wacker, M. J., Richmond, S. R. & Godard, M. P. Contributions of the ubiquitin – proteasome pathway and apoptosis to human skeletal muscle wasting with age. *Eur J Physiol* 450, 437–446, 2005.
- [91] Sakuma, K. & Yamaguchi, A. Sarcopenia and Age-Related Endocrine Function. *Int. J. Endocrinology* 2012, 127362, 2012.
- [92] Dschietzig, T. B. Myostatin — From the Mighty Mouse to cardiovascular disease and cachexia. *Clin. Chim. Acta* 433, 216–224, 2014.
- [93] Argilés, J. M., Orpí, M., Busquets, S. & López-Soriano, F. J. Myostatin: more than just a regulator of muscle mass. *Drug Discov. Today* 17, 702–9, 2012.
- [94] Wang, Z, Wang, Z-M, Heymsfield, SB. History of the study of human body composition: a brief review. *Am J Hum Biol* 1999; 11: 157–165.
- [95] Ward, LC. Human body composition: yesterday, today, and tomorrow. *Eur J Clin Nutr* 2018; 72: 1201–1207.
- [96] Baumgartner, RN, Cesari, M, Kritchevsky, SB, et al. Sarcopenia, obesity, and inflammation—results from the trial of angiotensin converting enzyme inhibition and novel cardiovascular risk factors study. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 428–434.
- [97] Paget J. Nervous mimicry of organic diseases. *Lancet* 1873, 727-9.
- [98] Rall LC, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology* 2004;43:1219-23.
- [99] Walsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *Int J Cardiol* 2002;85:89-99.

- [100] Roubenoff R, Roubenoff RA, Ward LM, Holland SM, Hellmann DB. Rheumatoid cachexia: depletion of lean body mass in rheumatoid arthritis: possible association with tumor necrosis factor. *J Rheumatol* 1992;19:1505-10.
- [101] Toledano E1, Candelas G, Rosales Z, Martínez Prada C, León L, Abásolo L, et al. A meta-analysis of mortality in rheumatic diseases. *Reumatol Clin* 2012;8:334-41.
- [102] Walsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *Int J Cardiol.* 2002;85:89-99.
- [103] Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr* 2008;27:793-9.
- [104] Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, et al. Survival in rheumatoid arthritis: A population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum.* 2003;48(1):54–8.
- [105] Full LE, Ruisanchez C, Monaco C. The inextricable link between atherosclerosis and prototypical inflammatory diseases rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(2):217.
- [106] Avina-Zubieta JA, Thomas J, Sadatsafavi M, Lehman AJ, Lacaille D. Risk of incident cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(9):1524–9.
- [107] England., Joshua F. Baker, Harlan Sayles, Kaleb Michaud, Liron Caplan, Lisa A. Davis. Body Mass Index, Weight Loss, and Cause Specific Mortality in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2018;70(1):11–8.
- [108] Walsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *Int J Cardiol.* 2002;85(1):89–99. [109] Roubenoff R, Roubenoff RA, Ward LM, Holland SM, Hellmann DB. Rheumatoid cachexia: depletion of lean body mass in rheumatoid arthritis. Possible association with tumor necrosis factor. *J Rheumatol.* 1992;19(10):1505–10.
- [110] Roubenoff R, Roubenoff R a, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, Dawson-Hughes B, et al. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest.* 1994;93(6):2379–86.

- [111] Rall LC, Rosen CJ, Dolnikowski G, Hartman WJ, Lundgren N, Abad LW, et al. Protein metabolism in rheumatoid arthritis and aging. Effects of muscle strength training and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1996;39(7):1115–24.
- [112] Muscaritoli M, Anker SD, Argilés J, Aversa Z, Bauer JM, Biolo G, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics.” *Clin Nutr.* 2010;29(2):154–9.
- [113] Huffman KM, Jessee R, Andonian B, Davis BN, Narowski R, Huebner JL, et al. Molecular alterations in skeletal muscle in rheumatoid arthritis are related to disease activity, physical inactivity, and disability. *Arthritis Res Ther.* 2017;19:12.
- [114] Engvall IL, Elkan AC, Tengstrand B, Cederholm T, Brismar K, Hafstrom I. Cachexia in rheumatoid arthritis is associated with inflammatory activity, physical disability, and low bioavailable insulin-like growth factor. *Scand J Rheumatol.* 2008;37(5):321–8.
- [115] Fryburg DA. Insulin-like growth factor I exerts growth hormone- and insulin-like actions on human muscle protein metabolism. *Am J Physiol.* 1994; 267(2 Pt 1):E331-6.
- [116] Frost RA, Lang CH. Growth factors in critical illness: regulation and therapeutic aspects. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1998;1(2):195–204.
- [117] Elkan A-C, Engvall I-L, Cederholm T, Hafst I. Rheumatoid cachexia, central obesity and malnutrition in patients with low-active rheumatoid arthritis: feasibility of anthropometry, Mini Nutritional Assessment and body composition techniques. *Eur J Nutr.* 2009;48(5):315–22. [118] Elkan A-C, Hakansson N, Frostegard J, Cederholm T, Hafstrom I. 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 Res Ther.* 2009;11(2):R37.
- [119] 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.
- [120] 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.

[121] R. Khurana, S.M. Berney, Clinical aspects of rheumatoid arthritis, *Pathophysiology*, 2005, pp. 153-165.

[122] V.e.O. Teixeira, L.I. Filippin, R.M. Xavier, Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia, *Rev Bras Reumatol* 52(2) (2012) 252-9.

[123] T.-P. Lee, B.-L. Chiang, Sex differences in spontaneous versus induced animal models of autoimmunity, *Autoimmunity Reviews* 11(6-7) (2012) A422-A429.

[124] 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.

[125] 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.

[126] 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.

[127] Book, C, Karlsson, MK, Akesson, K, et al. Early rheumatoid arthritis and body composition. *Rheumatol Oxf Engl* 2009; 48: 1128–1132.

[128] Beudart, Charlotte Et Al. Quality Of Life And Physical Components Linked To Sarcopenia: The Sarcophage Study. *Experimental Gerontology*, V. 69, P. 103-110, 2015.

[129] Chien, Meng-Yueh; Huang, Ta-Yi; Wu, Ying-Tai. Prevalence Of Sarcopenia Estimated Using A Bioelectrical Impedance Analysis Prediction Equation In Community-Dwelling Elderly People In Taiwan. *Journal Of The American Geriatrics Society*, V. 56, N. 9, P. 1710-1715, 2008.

[130] Martinez, Bruno Prata; Camelier, Fernanda Warken Rosa; Camelier, Aquiles Assunção. Sarcopenia Em Idosos: Um Estudo De Revisão. *Revista Pesquisa Em Fisioterapia*, V. 4, N. 1, P. 62-70, 2014.

[131] Rosa, G. Avaliação Nutricional Do Paciente Hospitalizado: Uma Abordagem Teórico-Prática. Rio De Janeiro. Editora Guanabara, 2008.

- [132] Lee, Wei-Ju Et Al. Comparisons Of Sarcopenia Defined By Iwgs And Ewgsop Criteria Among Older People: Results From The I-Lan Longitudinal Aging Study. *Journal Of The American Medical Directors Association*, V. 14, N. 7, P. 528. E1-528. E7, 2013.
- [133] Van Der Greef J, Mcburney R. Rescuing drug discovery and drug development: in vivo systems pathology and systems pharmacology. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;19:376-86.
- [134] Nicholson JK, Sadler PJ, Cain K, Holt DE, Webb V, Hawkes GE. Studies of native rat liver metallothioneins. *Biochem J*. 1983;211:251-5.
- [135] Horning EC, Horning MG. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites, clinical chemistry. 1971;17(8):802-80.
- [136] Lenz EM, Wilson ID. Analytical strategies in metabonomics. *J Proteome Res*. 2007;6(2):443-58.
- [137] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nat Biotechnol*. 2000;18(11):1157-61.
- [138] Lei Z, Huhman DV, Sumner LW. Mass spectrometry strategies in metabolomics. *J Biol Chem*. 2011 ;286(29):25435-42.
- [139] Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Pattern recognition methods and applications in biological magnetic resonance. *Prog NMR Spectrosc*. 2001;39:1-40.
- [140] Nicholson JK. Global systems biology, personalized medicine and molecular epide-miology. *Mol Syst Biol*. 2006;2(1):52.
- [141] Chen SZ, Qiu ZG. Combined treatment with GH, insulin, and indomethacin allevia-tes cancer cachexia in a mouse model. *J Endocrinol*. 2011;208:131-136.
- [142] Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *trends in analytical chemistry*. 2005;24:285-294.
- [143] 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.
- [144] 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.
- [145] 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.
- [146] 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.

[147] Pons M, Martins LG, Garcia J. NMR spectroscopy in solution. In: *Supramolecular chemistry: from molecules to nanomaterials*. J. W. Steed; P. A. Gale/John Wiley & Sons; 2012. p.297-318.

[148] 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)

[149] 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.

[150] 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.

[151] 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.

[152] 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.

[153] M.R. Viant, Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310(3) (2003) 943-948.

[154] 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.

[155] 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.

[156] SP 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.

[157] 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.

[158] Fu, J.; Cuppen, B.V.; Welsing, P.M.; van Wietmarschen, H.; Harms, A.C.; Berger, R.; Koval, S.; Fritsch-Stork, R.D.; Bijlsma, J.W.; Hankemeier, T.; et al. Differences between serum polar lipid profiles of male and female rheumatoid arthritis patients in response to glucocorticoid treatment. *Inflammopharmacology* 2016, 24, 397–402.

[159] Radhakutty, A.; Mangelsdorf, B.L.; Drake, S.M.; Rowland, A.; Smith, M.D.; Mangoni, A.A.; Thompson, C.H.; Burt, M.G. Opposing effects of rheumatoid arthritis

and low dose prednisolone on arginine metabolomics. *Atherosclerosis* 2017, 266, 190–195.

[160] Wang, M.; Huang, J.; Fan, H.; He, D.; Zhao, S.; Shu, Y.; Li, H.; Liu, L.; Lu, S.; Xiao, C.; et al. Treatment of Rheumatoid Arthritis Using Combination of Methotrexate and Tripterygium Glycosides Tablets-A Quantitative Plasma Pharmacochemical and Pseudotargeted Metabolomic Approach. *Front. Pharmacol.* 2018, 9, 1051.

[161] Nouwen, L.V.; Everts, B. Pathogens MenTORing Macrophages and Dendritic Cells: Manipulation of mTOR and Cellular Metabolism to Promote Immune Escape. *Cells* 2020, 9, 161.

[162] Collison, J. Experimental arthritis: Do you want to treat arthritis? IDO2! *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017, 13, 196–197.

[163] Shi, J.; Fan, J.; Su, Q.; Yang, Z. Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2019, 10, 703.

[164] Priori, R.; Casadei, L.; Valerio, M.; Scrivo, R.; Valesini, G.; Manetti, C. 1H-NMR-Based Metabolomic Study for Identifying Serum Profiles Associated with the Response to Etanercept in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* 2015, 10, e0138537.

[165] Zabek, A.; Swierkot, J.; Malak, A.; Zawadzka, I.; Deja, S.; Bogunia-Kubik, K.; Mlynarz, P. Application of (1) H NMR-based serum metabolomic studies for monitoring female patients with rheumatoid arthritis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 117, 544–550.

[166] Kapoor, S.R.; Filer, A.; Fitzpatrick, M.A.; Fisher, B.A.; Taylor, P.C.; Buckley, C.D.; McInnes, I.B.; Raza, K.; Young, S.P. Metabolic profiling predicts response to anti-tumor necrosis factor alpha therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2013, 65, 1448–1456.

[167] Alabarse, PV, Santos, RE, Silva, J, Oliveira, MS, Xavier, R.. Metabolomic Biomarker Candidates for Skeletal Muscle Loss in the Collagen-Induced Arthritis (CIA) Model, 2021, *Journal of Personalized Medicine* 11(9):837.

[168] 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.

[169] 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.

[170] 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).

[171] Lauridsen, M.B.; Bliddal, H.; Christensen, R.; Danneskiold-Samsøe, B.; Bennett, R.; Keun, H.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; Dorff, M.H.; Jaroszewski, J.W.; et al. 1H NMR spectroscopy-based interventional metabolic phenotyping: A cohort study of rheumatoid arthritis patients. *J. Proteome Res.* 2010, 9, 4545–4553.

[172] Kapoor,SR; Filer,A; Fitzpatrick,MA; Fisher,BA; Taylor, PC; Buckley,DE; McInnes,IB; Raza,K; and Young, SP. *Metabolic Profiling Predicts Response to Anti-*

Tumor Necrosis Factor Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis. *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 65, No. 6, June 2013, pp 1448–1456.

[173] Surowiec, I.; Gjesdal, C.G.; Jonsson, G.; Norheim, K.B.; Lundstedt, T.; Trygg, J.; Omdal, R. Metabolomics study of fatigue in patients with rheumatoid arthritis naïve to biological treatment. *Rheumatol. Int.* 2016, 36, 703–711.

[174] Zhou, J.; Chen, J.; Hu, C.; Xie, Z.; Li, H.; Wei, S.; Wang, D.; Wen, C.; Xu, G. Exploration of the serum metabolite signature in patients with rheumatoid arthritis using gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 127, 60–67.

[175] Fu, J.; Cuppen, B.V.; Welsing, P.M.; van Wietmarschen, H.; Harms, A.C.; Berger, R.; Koval, S.; Fritsch-Stork, R.D.; Bijlsma, J.W.; Hankemeier, T.; et al. Differences between serum polar lipid profiles of male and female rheumatoid arthritis patients in response to glucocorticoid treatment. *Inflammopharmacology* 2016, 24, 397–402.

[176] Yousri, N.A.; Bayoumy, K.; Elhaq, W.G.; Mohny, R.P.; Emadi, S.A.; Hammoudeh, M.; Halabi, H.; Masri, B.; Badsha, H.; Uthman, I.; et al. Large Scale Metabolic Profiling identifies Novel Steroids linked to Rheumatoid Arthritis. *Sci. Rep.* 2017, 7, 9137.

[177] Tatar, Z; Migne, C; Petera, M; Gaudin, P; Lequerre, T;Marotte, H; Tebib, J; Guillot,EP; Soubrier, M. Variations in the metabolome in response to disease activity of rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders* (2016) 17:353.

[178] Fernández-Ochoa, A; Brunius, C; Isabel Borrás-Linares 2, Rosa Quirantes-Piné 2, María de la Luz Cádiz-Gurrea 1 2, Precisesads Clinical Consortium, Marta E Alarcón Riquelme 4 5, Antonio Segura-Carretero. Metabolic Disturbances in Urinary and Plasma Samples from Seven Different Systemic Autoimmune Diseases Detected by HPLC-ESI-QTOF-MS. *J Proteome Res.* 2020 Aug 7;19(8):3220-3229.

[179] Ahn JK, Kim J, Cheong YE, Kim KH, Cha H. Variation in the synovial fluid metabolome according to disease activity of rheumatoid arthritis, *Clin Exp Rheumatol*2020;38(3):500-507.

[180] Roxana Coras, Jessica D. Murillo-Saich and Monica Guma. Circulating Pro- and Anti-Inflammatory Metabolites and Its Potential Role in Rheumatoid Arthritis Pathogenesis *Cells* 2020, 9, 827.

[181] Falconer, J.; Murphy, A.N.; Young, S.; Clark, A.R.; Tiziani, S.; Guma, M.; Buckley, C.D. Synovial cell metabolism and chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol.* 1002.

[182] Ryan, D.G.; O'Neill, L.A.J. Krebs Cycle Reborn in Macrophage Immunometabolism. *Annu. Rev. Immunol.* 2020 eWeyand, C.M.; Goronzy, J.J. Immunometabolism in the development of rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.* 2020, 294, 177–187.

[183] Zeisel S.H., Mar M.H., Howe J.C., Holden J.M. Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J. Nutr.* 2003;133:1302–1307. doi: 10.1093/jn/133.5.1302.

[184] Guasch-Ferré M., Hu F.B., Ruiz-Canela M., Bulló M., Toledo E., Wang D.D., Corella D., Gómez-Gracia E., Fiol M., Estruch R., et al. Plasma Metabolites From Choline Pathway and Risk of Cardiovascular Disease in the PREDIMED (Prevention With Mediterranean Diet) Study. *J. Am. Heart Assoc.* 2017.

- [185] Coras R., Kavanaugh A., Boyd T., Huynh D., Lagerborg K.A., Xu Y.J., Rosenthal S.B., Jain M., Guma M. Choline metabolite, trimethylamine N-oxide (TMAO), is associated with inflammation in psoriatic arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 2019;37:481–484.
- [186] Wu Y., Lau B., Smith S., Troyan K., Barnett Foster D.E. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection triggers host phospholipid metabolism perturbations. *Infect. Immun.* 2004;72:6764–6772.
- [187] Sanchez-Lopez E., Zhong Z., Stubelius A., Sweeney S.R., Booshehri L.M., Antonucci L., Liu-Bryan R., Lodi A., Terkeltaub R., Lacal J.C., et al. Choline Uptake and Metabolism Modulate Macrophage IL-1 β and IL-18 Production. *Cell Metab.* 2019;29:1350–1362 e1357.
- [188] Zhenyukh O., Civantos E., Ruiz-Ortega M., Sánchez M.S., Vázquez C., Peiró C., Egido J., Mas S. High concentration of branched-chain amino acids promotes oxidative stress, inflammation and migration of human peripheral blood mononuclear cells via mTORC1 activation. *Free Radic. Biol. Med.* 2017;104:165–177.
- [189] (Papathanassiou A.E., Ko J.H., Imprialou M., Bagnati M., Srivastava P.K., Vu H.A., Cucchi D., McAdoo S.P., Ananieva E.A., Mauro C., et al. BCAT1 controls metabolic reprogramming in activated human macrophages and is associated with inflammatory diseases. *Nat. Commun.* 2017;8:16040.
- [190] Takahashi S., Saegusa J., Sendo S., Okano T., Akashi K., Irino Y., Morinobu A. Glutaminase 1 plays a key role in the cell growth of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2017;19:76.
- [191] Shime H., Yabu M., Akazawa T., Kodama K., Matsumoto M., Seya T., Inoue N. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J. Immunol.* 2008;180:7175–7183.
- [192] Haas R., Smith J., Rocher-Ros V., Nadkarni S., Montero-Melendez T., D'Acquisto F., Bland E.J., Bombardieri M., Pitzalis C., Perretti M., et al. Lactate Regulates Metabolic and Pro-inflammatory Circuits in Control of T Cell Migration and Effector Functions. *PLoS Biol.* 2015;13:e1002202.
- [193] Tannahill G.M., Curtis A.M., Adamik J., Palsson-McDermott E.M., McGettrick A.F., Goel G., Frezza C., Bernard N.J., Kelly B., Foley N.H., et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α *Nature.* 2013;496:238–242.
- [194] Li Y., Zheng J.Y., Liu J.Q., Yang J., Liu Y., Wang C., Ma X.N., Liu B.L., Xin G.Z., Liu L.F. Succinate/NLRP3 Inflammasome Induces Synovial Fibroblast Activation: Therapeutical Effects of Clematichinenoside AR on Arthritis. *Front. Immunol.* 2016;7:532.
- [195] Saraiva A.L., Veras F.P., Peres R.S., Talbot J., de Lima K.A., Luiz J.P., Carballido J.M., Cunha T.M., Cunha F.Q., Ryffel B., et al. Succinate receptor deficiency attenuates arthritis by reducing dendritic cell traffic and expansion of T. *FASEB J.* 2018.
- [196] Lampropoulou V., Sergushichev A., Bambouskova M., Nair S., Vincent E.E., Loginicheva E., Cervantes-Barragan L., Ma X., Huang S.C., Griss T., et al. Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.* 2016;24:158–166.

- [197] Michopoulos F., Karagianni N., Whalley N.M., Firth M.A., Nikolaou C., Wilson I.D., Critchlow S.E., Kollias G., Theodoridis G.A. Targeted Metabolic Profiling of the Tg197 Mouse Model Reveals Itaconic Acid as a Marker of Rheumatoid Arthritis. *J. Proteome Res.* 2016;15:4579–4590.
- [198] Turesson C., Bergström U., Pikwer M., Nilsson J., Jacobsson L.T. High serum cholesterol predicts rheumatoid arthritis in women, but not in men: A prospective study. *Arthritis Res. Ther.* 2015;17:284.
- [199] Choi W.S., Lee G., Song W.H., Koh J.T., Yang J., Kwak J.S., Kim H.E., Kim S.K., Son Y.O., Nam H., et al. The CH25H-CYP7B1-ROR α axis of cholesterol metabolism regulates osteoarthritis. *Nature.* 2019;566:254–258.
- [200] Tang M.W., Koopman F.A., Visscher J.P., de Hair M.J., Gerlag D.M., Tak P.P. Hormone, metabolic peptide, and nutrient levels in the earliest phases of rheumatoid arthritis-contribution of free fatty acids to an increased cardiovascular risk during very early disease. *Clin. Rheumatol.* 2017;36:269–278.
- [201] Frommer K.W., Schäffler A., Rehart S., Lehr A., Müller-Ladner U., Neumann E. Free fatty acids: Potential proinflammatory mediators in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 2015;74:303–310.
- [202] McCoy J.M., Wicks J.R., Audoly L.P. The role of prostaglandin E2 receptors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* 2002;110:651–658.
- [203] Peng A., Lu X., Huang J., He M., Xu J., Huang H., Chen Q. Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts promote TREM-1 expression in monocytes via COX-2/PGE. *Arthritis Res. Ther.* 2019;21:169.
- [204] Rodriguez-Carrio J., Alperi-Lopez M., Lopez P., Ballina-Garcia F.J., Suarez A. Non-Esterified Fatty Acids Profiling in Rheumatoid Arthritis: Associations with Clinical Features and Th1 Response. *PLoS ONE.* 2016;11:e0159573.
- [205] Liagre B., Vergne P., Rigaud M., Beneytout J.L. Expression of arachidonate platelet-type 12-lipoxygenase in human rheumatoid arthritis type B synoviocytes. *FEBS Lett.* 1997;414:159–164.
- [206] Krönke G., Katzenbeisser J., Uderhardt S., Zaiss M.M., Scholtysek C., Schabbauer G., Zarbock A., Koenders M.I., Axmann R., Zwerina J., et al. 12/15-lipoxygenase counteracts inflammation and tissue damage in arthritis. *J. Immunol.* 2009;183:3383–3389.
- [207] Gheorghe K.R., Korotkova M., Catrina A.I., Backman L., af Klint E., Claesson H.E., Rådmark O., Jakobsson P.J. Expression of 5-lipoxygenase and 15-lipoxygenase in rheumatoid arthritis synovium and effects of intraarticular glucocorticoids. *Arthritis Res. Ther.* 2009;11:R83.
- [208] Shan J., Peng L., Qian W., Xie T., Kang A., Gao B., Di L. Integrated Serum and Fecal Metabolomics Study of Collagen-Induced Arthritis Rats and the Therapeutic Effects of the Zushima Tablet. *Front. Pharmacol.* 2018;9:891.
- [209] Hui W., Yu D., Cao Z., Zhao X. Butyrate inhibit collagen-induced arthritis via Treg/IL-10/Th17 axis. *Int. Immunopharmacol.* 2019;68:226–233.
- [210] Ginos B.N.R., Navarro S.L., Schwarz Y., Gu H., Wang D., Randolph T.W., Shojaie A., Hullar M.A.J., Lampe P.D., Kratz M., et al. Circulating bile acids in healthy

adults respond differently to a dietary pattern characterized by whole grains, legumes and fruits and vegetables compared to a diet high in refined grains and added sugars: A randomized, controlled, crossover feeding study. *Metabolism*. 2018;83:197–204.

[211] Yoneno K., Hisamatsu T., Shimamura K., Kamada N., Ichikawa R., Kitazume M.T., Mori M., Uo M., Namikawa Y., Matsuoka K., et al. TGR5 signalling inhibits the production of pro-inflammatory cytokines by in vitro differentiated inflammatory and intestinal macrophages in Crohn's disease. *Immunology*. 2013;139:19–29.

[212] Roager H.M., Licht T.R. Microbial tryptophan catabolites in health and disease. *Nat. Commun*. 2018;9:3294.

[213] Szanto S., Koreny T., Mikecz K., Glant T.T., Szekanecz Z., Varga J. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan catabolism accelerates collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Res. Ther*. 2007;9:R50.

[214] Lent-Schochet, D.; McLaughlin, M.; Ramakrishnan, N.; Jialal, I. Exploratory metabolomics of metabolic syndrome: A status report. *World J. Diabetes* 2019, 10, 23–36.

[215] Zhao, Q.; Shen, H.; Su, K.J.; Tian, Q.; Zhao, L.J.; Qiu, C.; Garrett, T.J.; Liu, J.; Kakhniashvili, D.; Deng, H.W. A joint analysis of metabolomic profiles associated with muscle mass and strength in Caucasian women. *Aging (Albany NY)* 2018, 10, 2624–2635.

[216] Petrus, P.; Lecoutre, S.; Dollet, L.; Wiel, C.; Sulen, A.; Gao, H.; Tavira, B.; Laurencikiene, J.; Rooyackers, O.; Checa, A.; et al. Glutamine Links Obesity to Inflammation in Human White Adipose Tissue. *Cell Metab*. 2020, 31, 375–390.

18. Sites citados

<http://www.chenomx.com/software/>

www.metaboanalyst.ca

<http://www.genome.jp/kegg/>

<http://www.hmdb.ca/>

19. 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/>.

O presente estudo foi aceito pela Comissão Científica do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, respeitando suas normas e orientações (projeto de pesquisa aprovado pelo CEP/HCPA - CAAE 43461415.2.0000.5327).

STROBE

	Item No
Title and abstract	77 - 78
Background	80
Objectives	81
Study design	81
Setting	81
Participants	82
Variables	82
Data sources/ measurement	82
Bias	83
Study size	82
Quantitative variables	83
Statistical methods	83
Main results	84
Other analyses	85
Key results	85
Limitations	88
Interpretation	89

Urinary metabolomic biomarker candidates for skeletal muscle wasting in patients with rheumatoid arthritis

Marianne S Oliveira^{1,2}, Rafaela CE Santo^{1,2}, Jordana MS Silva^{1,2}, Paulo VG Alabarse³, Claiton V Brenol^{1,2}, Steve P Young⁴, Ricardo M Xavier^{1,2}

¹ Autoimmune Disease Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

² Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³ University of California, San Diego, San Diego, USA.

⁴ Rheumatology Research Group, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom.

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 that affects the joints, leading to chronic synovial inflammation and local tissue destruction. Extra-articular manifestations may also occur, such as changes in body composition. Skeletal muscle wasting is often observed in patients with RA, but methods for assessing loss of muscle mass are expensive and not widely available, limiting their use in clinical practice and their evaluation in longitudinal studies. Metabolomic analysis has shown great potential for identifying changes in the metabolite profile of patients with autoimmune diseases and can advance our understanding of pathogenic mechanisms, early diagnosis, treatment, and follow-up. In this setting, urine metabolomic profiling in patients with RA may be a useful tool to identify skeletal muscle wasting.

Methods: We recruited patients aged 40–70 years with RA according to the 2010 ACR/EULAR classification criteria. We measured disease activity by the Disease Activity Score in 28 joints using the C-reactive protein level (DAS28-CRP). We determined muscle mass according to DXA-derived appendicular lean mass index (ALMI) by summing the lean mass measurements for both arms and legs and dividing them by height squared ($\text{kg}/\text{height}^2$). We performed urine metabolomic analysis by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy using the BAYESIL and MetaboAnalyst software packages. We performed principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), followed by Spearman's correlation analysis. We set the significance level at $p < 0.05$ for all analyses. We combined Receiver Operating Characteristic Curve (ROC) and logistic regression analyses to establish a diagnostic model.

Results: We included 90 patients with RA. Most patients were women (86.7%), with a mean age of 56.5 (SD, 7.3) years and a median DAS28-CRP of 3.0 (IQR, 1.0–3.0). We identified 15 metabolites that showed high variable importance in projection (VIP scores) by MetaboAnalyst. Of these, dimethylglycine ($r = 0.205$; $p = 0.053$), oxoisovalerate ($r = -0.203$; $p = 0.055$) and isobutyric acid ($r = -0.249$; $p = 0.018$) were significantly correlated with ALMI. Based on low muscle mass (ALMI $\leq 6.0 \text{ kg}/\text{m}^2$ for women and $\leq 8.1 \text{ kg}/\text{m}^2$ for men), we established a diagnostic model with dimethylglycine (Area Under the Curve - AUC=0.65), oxoisovalerate (AUC=0.49) and isobutyric acid (AUC=0.83), with significant sensitivity and specificity.

Conclusions: Isobutyric acid, oxoisovalerate and dimethylglycine from urine samples were associated with low skeletal muscle mass in patients with RA. These findings suggest that this group of metabolites may be further tested as biomarkers for identification of skeletal muscle wasting.

Keywords: nuclear magnetic resonance; loss of muscle mass; rheumatoid arthritis; metabolomics; cachexia; sarcopenia

INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is one of the most common autoimmune disorders. It affects approximately 1% of the population worldwide and is more likely to affect women [01]. RA is characterized by persistent joint synovial tissue inflammation that leads to joint damage/deformity and physical disability [02]. Besides articular involvement, extra-articular manifestations frequently occur probably due to the persistent inflammatory state, such as changes in body composition. Patients with RA often experience decreased fat-free mass and increased or stable fat mass [03], a condition referred to as rheumatoid cachexia. In a recent systematic review and meta-analysis conducted by our group, we estimated a prevalence of rheumatoid cachexia of 15%–32%, whereas classic cachexia was absent [04–05]. Sarcopenia is also commonly observed in patients with RA. It is characterized by a quantitative and qualitative reduction in skeletal muscle mass and strength and has been reported to occur in 28%–37% of patients with RA. Both rheumatoid cachexia and sarcopenia have been associated with inflammation intensity and disease severity [06].

Lack of precise assessment of skeletal muscle status and its changes over time potentially hinders proper diagnosis and treatment of sarcopenia and cachexia [07]. Several methods are currently used to estimate muscle mass, including anthropometry (e.g., body mass index), bioelectrical impedance analysis, imaging techniques (e.g., computed tomography, nuclear magnetic resonance [NMR] imaging, dual-energy X-ray absorptiometry [DXA], ultrasound), and more recently the D₃-creatine dilution method [08]. However, the diagnostic performance of these methods is limited by high cost and low availability [09]. It is therefore important to search for novel biomarkers related to skeletal muscle mass to provide the attending physician with viable options to predict the development, progression, and staging of skeletal muscle wasting during routine follow-up of patients with RA.

Metabolomic analysis based on NMR spectroscopy of biofluids can be used to assess skeletal muscle mass, and a urine-based approach would provide an easy, noninvasive collection method and a metabolite-rich source. Metabolites are small molecules that serve as substrates, intermediates, and products of cellular pathways. The metabolome is formed by the full spectrum of metabolites in a biologic system and represents the culmination of gene expression, epigenetics, protein activity, and environmental influences [10]. Therefore, metabolites directly and functionally reflect the biochemical processes occurring in a particular phenotype. Small shifts in biochemical pathways can produce changes in cellular metabolism, which drive the relationship between the metabolome and health status [11].

This approach has allowed the identification of several metabolites in cancer and in cardiovascular and autoimmune diseases, providing insights into disease mechanisms and highlighting their potential role as biomarkers of disease activity and treatment response [13]. Several studies have used metabolomic analysis in patients and animal models of inflammatory disease [11 – 17]. To date, a few metabolomic studies have analyzed urine from patients with RA in an attempt to identify distinct biomarkers that can indicate autoimmune disease activity and distinct biomarkers that can predict/monitor treatment response [14 - 15], but there are no studies that have identified biomarkers of loss of skeletal muscle mass in patients with RA. The present study aimed to investigate the urine metabolomic profile of patients with RA and correlate it with the process of skeletal muscle wasting.

METHODS

Study design and population

We conducted this longitudinal study between June 2015 and July 2017 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a tertiary public hospital located in Rio Grande do Sul, Brazil. The HCPA Institutional Review Board (IRB) approved the study (registration number 15-0297), which followed the tenets of the Declaration of Helsinki. All participants provided written informed consent prior to inclusion in the study.

Eligible participants were all patients aged 40–70 years with a diagnosis of RA according to the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) criteria [20]. Exclusion criteria were presence of dysphagia, illicit drug use, alcohol abuse, severe heart failure (New York Heart Association class III or IV), severe chronic obstructive pulmonary disease, abnormal hepatic function, uncontrolled diabetes (fasting glucose > 140 mg/dL or random glucose levels > 200 mg/dL), thyroid dysfunction (hypothyroidism or hyperthyroidism), severe kidney disease (glomerular filtration rate < 15 mL/min), or other diffuse connective tissue diseases. We also excluded patients with malignant disease, lower-extremity deformities, or surgery in the past year.

Data collection and assessments

We reviewed patients' medical records to collect data on age, disease duration (years), current smoking, rheumatoid factor, anti-citrullinated protein antibodies (ACPA), erosions, level of physical activity, disease activity, physical disability, and pharmacological treatment.

For each patient, we recorded disease activity by the Disease Activity Score in 28 joints using the C-reactive protein level (DAS28-CRP) [22] and categorized disease activity as remission (DAS28-CRP < 2.6), low (2.6 > DAS28-CRP < 3.2), moderate (3.2 > DAS28-CRP < 5.1), or high (DAS28-CRP > 5.1).

DXA was used (Lunar Prodigy Primo, GE Medical Systems) to assess body composition. We performed whole-body DXA to estimate fat-free mass, total fat mass, and appendicular lean mass. We calculated fat-free mass index and fat mass index by dividing their estimates by height squared [24, 25], appendicular lean mass index (ALMI) by summing the lean mass measurements for both arms and legs and dividing them by height squared. We divided the patients into tertiles according to ALMI for evaluation of loss of muscle mass.

Urine samples were collected from each participant upon enrollment in the study, which were filtered through a 0.22- μ m filter and stored at -80°C . For NMR preparation, we thawed the urine samples on ice and centrifuged them at 13,000xg for 5 minutes at 4°C . We collected supernatants and mixed them with a Chenomx standard solution (final concentration at 100 mM phosphate, 2 mM difluorotrimethylsilylphosphonic acid, 10% D₂O, 0.1% azide, and 0.5 mM 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) by centrifuging the samples at 13,000xg for 5 minutes at 4°C . We transferred the supernatants to glass vials, which were capped and frozen at -80°C . For NMR analysis, we transferred the samples to NMR tubes and subjected them to NMR spectroscopy using a Bruker Avance 600 MHz spectrometer equipped with a 2.7-mm TXI cryoprobe [16].

Non-targeted metabolomic analysis was performed to identify all metabolites present in the urine of patients with RA that were associated with loss of muscle mass. We identified the compounds in 1D NMR spectra and quantified their intensities using the BAYESIL software package (HMDB Inc., Canada) and Chenomx software. We used the MetaboAnalyst website (<http://www.metaboanalyst.ca/>) to identify the pathways to which the most relevant metabolites belonged [17 - 18]. We then subjected all metabolic pathways to enrichment and topology analysis, and only those with a significant p-value ($p < 0.05$) were selected and further analyzed for identification of associated biological processes. Compounds, pathways, and the relationships between them provided the initial framework for metabolomic data analysis [19].

Sample size

Because there is no longitudinal study with cachexia as an outcome in patients with RA, we calculated the sample size based on a previous study that demonstrated a 38% prevalence of rheumatoid cachexia in patients with RA [15]. Assuming an error of 10% and a significance level of 5%, a sample size of 90 patients was necessary. Considering that RA is a rare disease (worldwide prevalence of approximately 1%) and that patients with other diffuse connective tissue diseases were excluded, we considered 90 patients to be a representative sample size.

Statistical analysis

We tested data distributions for normality using the Kolmogorov–Smirnov test and expressed the results as mean (SD), median and interquartile range (IQR), or frequency and percentage (%) as appropriate. To analyze NMR-based metabolomic data, we performed principal component analysis (PCA) using spectra that were binned, normalized, and log-transformed. We used partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) to analyze the results [30]. We performed pathway impact analysis by applying Fisher’s exact test using the MetaboAnalyst software package [15-17]. We set the level of statistical significance at $p < 0.05$ for all analyses. The PLS-DA model set the selection criteria of the variable of importance in projection (VIP) score at values $> 1 \times 10^0$ and statistical significance at the level of $p\text{-value} < 0.05$. We manually selected the list of metabolites through KEGG (www.genome.jp/kegg), PUBCHEM (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), and HMDB (www.hmdb.ca) websites, where we checked whether there was a direct relationship with muscle metabolism. We also performed a correlation analysis for the identified metabolites using Spearman’s correlation coefficients. We used the selected metabolites to build a prediction model and determined the accuracy of the model by using receiver operating characteristic (ROC) curves. We combined ROC curve and logistic regression analyses to establish a diagnostic accuracy between muscle mass and the metabolites. We assessed the diagnostic performance of each biomarker model by calculating the area under the ROC curve (AUC) and determining sensitivity and specificity of this relation.

RESULTS

Patient characteristics

We included 90 patients with RA. Most patients were women (86.7%), with a mean age of 56.5 (SD, 7.3) years. The median disease duration was 8.5 (IQR, 3–18) years, and the median DAS28-CRP

was 3.0 (1.0–3.0). Twenty-four patients (27.0%) were treated with biological disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs); 93.3% (84/90) were receiving conventional synthetic DMARDs and 50.0% (45/90) were receiving glucocorticoids (Table 1).

In our sample, the lowest tertile of ALMI was ≤ 6.0 kg/m² for women and ≤ 8.1 kg/m² for men, and the highest tertile of ALMI was ≥ 6.7 kg/m² for women and ≥ 8.7 kg/m² for men. Thirty patients (33.3%) were in the first tertile, 29 (32.3%) in the second tertile, and 31 (34.4%) in the third tertile.

Metabolic profile

The non-targeted metabolomic analysis using BAYESIL software followed by Chenomx software identified 73 metabolites in urine samples from patients with RA (Table 2).

We compared the identified metabolites in relation to the tertiles of ALMI. For comparison purposes, we defined the first tertile of ALMI (≤ 6.0 kg/m² for women and ≤ 8.1 kg/m² for men) as low muscle mass, and the second and third tertiles of ALMI as normal muscle mass. We compared metabolite profiles between low and normal muscle mass tertiles to characterize the metabolite profile of patients with RA and its changes over the process of muscle wasting. By the PLS-DA analysis we could identify the distinct urinary metabolite signatures of the 2 groups (low vs normal muscle mass), and the latent variable of each sample was plotted (Figure 1). Figure 2 provides a heatmap of the variation of each metabolite in relation to muscle mass (low vs normal).

Biomarker identification

We identified 15 metabolites associated with pathways of muscle tissue (variable importance in projection - VIP score), including muscle catabolic and anabolic processes: serine, methylhistidine, formic acid, dimethylamine, L-phenylalanine, dimethylglycine, oxoisovalerate, isobutyric acid, L-tyrosine, betaine, ethanolamine, phenylacetic acid, aspartic acid, pyroglutamic acid, and isopropanol. Figure 3 shows the variation of each metabolite related to muscle quantity, considering low and normal muscle mass.

Metabolite correlation with muscle mass

Spearman's correlation analysis of muscle mass (ALMI) with urinary metabolite concentration identified 3 metabolites that significantly correlated with muscle mass: dimethylglycine ($r=0.205$; $p=0.053$), oxoisovalerate ($r=-0.203$; $p=0.055$), and isobutyric acid ($r=-0.249$; $p=0.018$) (Figure S1).

Dimethylglycine, oxoisovalerate, and isobutyric acid correlated with low muscle mass at the concentrations in media of 21.88, 13.02, and 41,90 μM , respectively, and with normal muscle mass at the concentrations of 85.19, 0.00, and 9.85 μM (Figure 4).

Performance measurement

Based on the correlation with low muscle mass ($\text{ALMI} \leq 6.0 \text{ kg/m}^2$ for women and $\leq 8.1 \text{ kg/m}^2$ for men), the combined ROC curve and logistic regression analyses established a diagnostic model with dimethylglycine (AUC = 0.65), oxoisovalerate (AUC = 0.49) and isobutyric acid (AUC = 0.83), with significant sensitivity and specificity (Figure 5).

Pathway analysis

Several metabolites are associated with pathways of muscle tissue and of amino acid metabolism. Among the identified metabolites, the glycine, isobutyric acid and isovalerate metabolism pathways were the ones most commonly associated with the muscle wasting process. Figure 6 shows the correlation of metabolic pathways involved in the muscle catabolism and anabolism processes according to the metabolites identified as associated with the process of loss of muscle mass.

DISCUSSION

The metabolomic analysis of urine collected from patients with RA revealed different metabolites associated with skeletal muscle wasting, which were related to muscle catabolism or anabolism. Of the 73 metabolites identified by metabolomic analysis, 15 showed an important relationship with muscle mass: serine, methylhistidine, formic acid, dimethylamine, L-phenylalanine, dimethylglycine, oxoisovalerate, isobutyric acid, L-tyrosine, betaine, ethanolamine, phenylacetic acid, aspartic acid, pyroglutamic acid, and isopropanol. Of these, we identified the glycine, isobutyric acid and isovalerate metabolism pathways as associated with the muscle wasting process. These altered profiles,

which we identified by correlating them with different amounts of muscle mass, may be useful for the clinical assessment of skeletal muscle wasting, an important feature of RA.

Muscle alterations and cachexia have been described in different debilitating diseases, but the number of studies of rheumatic diseases is limited and the association with secondary sarcopenia in patients with RA is unclear. Previous metabolomic studies of RA have addressed profiles for disease activity, drug exposure, and prognosis in early disease, demonstrating the feasibility of the metabolomic approach [21], but no study has focused on loss of muscle mass. Several pathways have been found to be altered in patients with RA, such as inositol phosphate metabolism, lipid, fatty acid, and carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, glucose metabolism, energy metabolism, nucleic acid metabolism, reactive oxygen species metabolism, methylation, and macrophage response [22]. Essential amino acids, which cannot be synthesized by humans, also provide a useful general marker of protein degradation [23]. A study evaluated muscle mass in women with osteoporosis and suggested some circulating metabolites that could be biomarkers of sarcopenia. They identified nine metabolites, mainly amino acids and lipids, associated with muscle mass, four of which were also associated with muscle strength. The metabolites verified include two amino acids (aspartic acid and glutamic acid) and a derivative amino acid (pipecolic acid), a peptide (phenylalanyl-threonine), a carbohydrate (methyl beta-D-glucopyranoside) and four lipids (12S-HETRE, arachidonic acid, 12S -HETE and glycerophosphocholine) [24].

A systematic review and meta-analysis of data from several metabolomic studies of RA showed that some metabolites play an important role in RA, including glucose, lactic acid, citric acid, leucine, glycine, methionine, isoleucine, valine, phenylalanine, threonine, serine, proline, glutamate, histidine, alanine, cholesterol, glycerol, and ribose [25]. The findings of the present study reinforces the literature reports indicating that metabolomics can provide important new opportunities for further diagnostic and pathogenetic research on RA, and on different comorbidities associated with it, such as muscle wasting. Isobutyric acid, dimethylglycine, and isovalerate were identified to be correlated with muscle waisting.

Our group has previously demonstrated the urine metabolomic profile associated with loss of skeletal muscle in an animal model of collagen-induced arthritis (CIA) [26]. A major advantage of using an animal model is the ability to overcome the great heterogeneity inherent in human studies, thus enhancing the search for useful biomarkers. In the present study, we found metabolites that were associated with muscle tissue, including muscle catabolism or anabolism processes. Among the metabolites with a statistically significant importance in relation to muscle wasting, we highlight

hydroxyphenylacetic acid, galactose, L-threonine, sorbitol, dimethyl sulfone, glycine, alanine, methanol, sarcosine, L-asparagine, and butyric acid. It is important to note that, in the present study, we validated our previous findings in animal model CIA urine and confirmed the relationship of glycine and butyric acid metabolisms with muscle loss.

Isobutyric acid was one the metabolites identified in the urine of our patients with RA that correlated with muscle wasting. Isobutyric acid is a non-protein amino acid originating from the catabolism of thymine and valine. Because β -aminoisobutyric acid is further catabolized by β -aminoisobutyrate aminotransferases to methylmalonic acid semialdehyde and propionyl-CoA, its concentration is typically low in urine. Persons with deficiency of R(-)- β -aminoisobutyrate-pyruvate aminotransferase have shown persistently increased levels of β -aminoisobutyric acid, whereas transiently increased levels of β -aminoisobutyric acid have been reported in many pathologic conditions, such as lead poisoning, starvation, total body irradiation, and several malignancies [27]. The β -aminoisobutyric acid is predominantly derived from the catabolism of valine. Altered homeostasis of β -alanine has been suggested as the underlying mechanism of some clinical abnormalities in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency [28]. The accumulation of aminoisobutyric acid is important due to the catabolism of thiamine, which is one of the key substances used for bodybuilding with direct participation in the protein synthesis from food required for normal growth of muscle tissue [29]. The β -Aminoisobutyric acid induces browning of white fat and hepatic β -oxidation and is inversely correlated with cardiometabolic risk factors [30].

Isobutyric acid is also one of the three most common short-chain fatty acids (SCFAs) in the human gut, along with acetic acid and propionic acid, which together account for 90%–95% of the SCFAs in the colon [31]. Butyric acid is an endogenous agonist of hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA2), which is a protein receptor that can inhibit fat breakdown, thus giving butyric acid a key role in lipid metabolism [32]. Butyric acid may also increase acetylation of histone H3, thus influencing the behavior of regulatory T cells, which can inhibit the immune response [33]. Through this mechanism, SCFAs link a crosstalk between the human microbiome and the immune system, although it remains unclear whether this occurs by increasing microbiome tolerance or by reducing the inflammatory response [34]. Growing evidence suggests that SCFAs support the immune system and metabolism through gut-liver inflammatory pathways [35]. Our study was the first to show a correlation of isobutyric acid with loss of muscle mass. This suggests that reduction of muscle mass could be involved due to

greater excretion of isobutyric acid in urine by the muscle degradation due to the release of β -aminoisobutyric acid in the blood. The increase of isobutyric acid when low muscle mass also could be involved in the inflammatory process of SCFAs.

Isovalerate is produced exclusively by bacterial fermentation of proteinaceous material (polypeptides and amino acids). These SCFAs are putrefactive, and their presence suggests underlying maldigestion and/or malabsorption resulting from dysfunctional states, such as hypochlorhydria, exocrine pancreatic insufficiency, and small intestine bacterial overgrowth. Other causes include gastrointestinal disease (resulting from the fermentation of blood or mucosal cells delivered to the colon) and rapid transit time (resulting from inadequate time for digestion and absorption of peptides and amino acids). Increased levels of SCFAs, including acetate, propionate, butyrate, and valerate, have been associated with increased adiposity and obesity, whereas decreased SCFA levels have been associated with colorectal cancer [36]. Our study was also the first to show a correlation of oxoisovalerate with muscle mass, which probably occurs through the relationship of SCFAs with systemic inflammation that can be involved in muscle degradation in RA.

Glycine, serine, and threonine are metabolic pathways related to amino acids, and N,N-dimethylglycine, sarcosine, and phosphocholine were frequent metabolites in the PLS-DA models. N,N-dimethylglycine has been positively correlated with fat-free mass in patients with chronic obstructive pulmonary disease [37]. Glycine is a major amino acid synthesized from serine, threonine, choline, and hydroxyproline via inter-organ metabolism, involving mainly the liver and kidneys. Based on its multiple beneficial effects and insufficient de novo synthesis, glycine is considered a conditionally essential and functional amino acid for mammals [38]. In a model of grip strength, N,N-dimethylglycine contributed to muscle function supporting the previously described potential role of glycine in fatigue [39]. In RA, serum glycine was able to differentiate patients with RA into categories of physical disability [40]. Therefore, whether directly or indirectly, this pathway can be regarded as a good biomarker candidate for skeletal muscle wasting in RA. We have performed ROC analysis to further characterize the predictive value of these individual metabolites independently. We found 3 metabolites (dimethylglycine, oxoisovalerate and isobutyric acid) with an area under the curve (AUC) >0.5. Among the metabolites, we found with highest significant the isobutyric acid (AUC = 0.83), demonstrating more sensibility and specificity to correlate to muscle loss.

A limitation of this study is the lack of a control group without inflammatory disease for comparison. Another limitation is that most of the patients included in the study had low disease activity, which hindered a proper comparison of skeletal muscle status in different states of the disease. In addition, this study has a transversal characteristic that the follow up of those patients are being done to estimate the muscle wasting over the time.

In conclusion, we identified in the urine of patients with RA some metabolites related to muscle metabolism whose concentration correlated with skeletal muscle wasting: isobutyric acid, dimethylglycine, and isovalerate. Identifying and quantifying metabolites in the urine of patients with RA can be particularly useful for prediction and follow-up of complex diseases, such as cachexia and sarcopenia. NMR provides an interesting tool to identify metabolites related to loss of muscle mass, and urine metabolomic profiling appeared to be a useful tool to develop better biomarkers for the detection of parameters of muscle wasting and poor prognosis in RA. The next step in our research project is to validate this list of metabolites in a 5-year follow-up study of patients with RA and to correlate the metabolite profiles in blood samples to define the pathways involved.

Acknowledgments

We thank the Universidade Federal do Rio Grande do Sul and University of Birmingham for supporting our experimental procedures. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brazil (CAPES) - Finance Code 001. This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brazil (CNPq). The authors of this manuscript certify that they comply with the ethical guideline for authorship and publishing in the *Journal of Cachexia, Sarcopenia, and Muscle*.

Conflict of interest

The authors declare no potential conflicts of interest.

Authors' contributions

Marianne S de Oliveira, Paulo VG Alabarse, and Rafaela CE Santo have contributed to the study planning and metabolomic experiments, statistical analysis, scientific discussion, and writing; Jordana MS Silva has contributed to the study planning, scientific discussion, and writing; Ricardo M Xavier was the supervisor for the research development, and has contributed to the study planning, scientific discussion, and paper corrections.

REFERENCES

- [01] Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO 3rd, et al. 2010 RHEUMATOID ARTHRITIS CLASSIFICATION CRITERIA: AN AMERICAN COLLEGE OF RHEUMATOLOGY/EUROPEAN LEAGUE AGAINST RHEUMATISM COLLABORATIVE INITIATIVE. *Arthritis Rheum.* 2010; 62(9):2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584> PMID: 20872595R.
- [02] Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. RHEUMATOID ARTHRITIS. *Lancet.* 2016; 388(10055): 2023–2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8) PMID: 27156434.
- [03] Deane KD, Demoruelle MK, Kelmenson LB, Kuhn KA, Norris JM, Holers VM. GENETIC AND ENVIRONMENTAL RISK FACTORS FOR RHEUMATOID ARTHRITIS. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2017; 31(1):3–18. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2017.08.003> PMID: 29221595
- [04] 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.
- [05] 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).
- [06] 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.
- [07] L. Vlietstra, S. Stebbings, K. Meredith-Jones, J. H. Abbott, D. L. Waters. SARCOPENIA IN OSTEOARTHRITIS AND RHEUMATOID ARTHRITIS: THE ASSOCIATION WITH SELF-REPORTED FATIGUE, PHYSICAL FUNCTION AND OBESITY *Plos One* (2019), 14(6): e0217462.
- [08] Evans, WJ, Hellerstein, M, Orwoll, E, Cummings, S, Cawthon, PM. D3-Creatine dilution and the importance of accuracy in the assessment of skeletal muscle mass, *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2019; 10: 14–21S. 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.
- [09] 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.
- [10] G. Scharf, J. Heineke, FINDING GOOD BIOMARKERS FOR SARCOPENIA, *JOURNAL OF CACHEXIA SARCOPENIA AND MUSCLE* 3(3) (2012) 145-148.
- [11] Surowiec I, Arlestig L, Rantapaa-Dahlqvist S, Trygg J. METABOLITE AND LIPID PROFILING OF BIOBANK PLASMA SAMPLES COLLECTED PRIOR TO ONSET OF RHEUMATOID ARTHRITIS. *PLoS One.* 2016; 11(10):e0164196. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164196> PMID: 27755546.
- [12] Li J, Che N, Xu L, Zhang Q, Wang Q, Tan W, et al. LC-MS-BASED SERUM METABOLOMICS REVEALS A DISTINCTIVE SIGNATURE IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS. *Clin Rheumatol.* 2018; 37(6):1493–1502. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4021-6> PMID: 29442259.

- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] M.A. Fitzpatrick, S.P. Young, METABOLOMICS - A NOVEL WINDOW INTO INFLAMMATORY DISEASE, *Swiss Medical Weekly* 143 (2013).
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Gao J, Tarcea VG, Karnovsky A, Mirel BR, Weymouth TE, Beecher CW, Cavalcoli JD, Athey BD, Omenn GS, Burant CF, Jagadish HV. METSCAPE: A CYTOSCAPE PLUG-IN FOR VISUALIZING AND INTERPRETING METABOLOMIC DATA IN THE CONTEXT OF HUMAN METABOLIC NETWORKS. *BIOINFORMATICS*. 2010 Apr 1;26(7):971-3.
- [20] AC Elkan, ILEngvall, T Cederholm, I Hafström. RHEUMATOID CACHEXIA, CENTRAL OBESITY AND MALNUTRITION IN PATIENTS WITH LOW-ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS: FEASIBILITY OF ANTHROPOMETRY, Mini Nutritional Assessment and body composition techniques *Eur J Nutr* (2009)48(5):315-22.
- [21] Sasaki C, Hiraishi T, Oku T, Okuma K, Suzumura K, Hashimoto M, et al. METABOLOMIC APPROACH TO THE EXPLORATION OF BIOMARKERS ASSOCIATED WITH DISEASE ACTIVITY IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *PLoS One*. 2019;14(7):e0219400.
- [22] Li C, Chen B, Fang Z, Leng YF, Wang DW, Chen FQ, et al. METABOLOMICS IN THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF RHEUMATOID ARTHRITIS: A SYSTEMATIC REVIEW. *Joint Bone Spine*. 2020.
- [23] He M, Harms AC, van Wijk E, Wang M, Berger R, Koval S, et al. ROLE OF AMINO ACIDS IN RHEUMATOID ARTHRITIS STUDIED BY METABOLOMICS. *Int J Rheum Dis*. 2019;22(1):38-46.
- [24] Zhao, Q.; Shen, H.; Su, K.J.; Tian, Q.; Zhao, L.J.; Qiu, C.; Garrett, T.J.; Liu, J.; Kakhniashvili, D.; Deng, H.W. A JOINT ANALYSIS OF METABOLOMIC PROFILES ASSOCIATED WITH MUSCLE MASS AND STRENGTH IN CAUCASIAN WOMEN. *Aging (Albany NY)* 2018, 10, 2624–2635.
- [25] Li C, Chen B, Fang Z, Leng Y, Wang D, Chen F, Xu X, Sun Z. (2020) METABOLOMICS IN THE DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF RHEUMATOID ARTHRITIS: A SYSTEMATIC REVIEW. *Joint Bone Spine*, 27;S1297-319X(20)30091-9. Doi: 10.1016/j.jbspin.2020.05.005.
- [25] BAWDEN D. THE ESTIMATION OF BETA AMINO-ISOBUTYRIC ACID IN HUMAN URINE. *J Clin Pathol*, 1963 May;16(3):284-7
- [26] Alabarse, PV, Santos, RE, Silva, J, Oliveira, MS, Xavier, R.. METABOLOMIC BIOMARKER CANDIDATES FOR SKELETAL MUSCLE LOSS IN THE COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS (CIA) MODEL, 2021, *Journal of Personalized Medicine* 11(9):837.

- [27] André B P Van Kuilenburg, Alida E M Stroomer, Henk Van Lenthe, Nico G G M Abeling, Albert H Van Gennip. NEW INSIGHTS IN DIHYDROPYRIMIDINE DEHYDROGENASE DEFICIENCY: A PIVOTAL ROLE FOR BETA-AMINOISOBUTYRIC ACID? *Biochem J*, 2004 Apr 1;379(Pt 1):119-24
- [27] Evered DF, Barley JF. INFREQUENCY OF URINARY EXCRETION OF BETA-AMINOISOBUTYRIC ACID BY HEALTHY HUMANS. *Clin Chim Acta*. 1978 Mar 15;84(3):339-46.
- [28] Roberts LD, Boström P, O'Sullivan JF, Schinzel RT, Lewis GD, Dejam. "B-AMINOISOBUTYRIC ACID INDUCES BROWNING OF WHITE FAT AND HEPATIC B-OXIDATION AND IS INVERSELY CORRELATED WITH CARDIOMETABOLIC RISK FACTORS" *Cell Metabolism*. 19 (1): 96–108, 2014.
- [29] Ríos-Cavián, Patricia Ruas-Madiedo, Abelardo Margolles, Miguel Gueimonde, Nuria Salazar. INTESTINAL SHORT CHAIN FATTY ACIDS AND THEIR LINK WITH DIET AND HUMAN HEALTH, *Front. Microbiol.*, 17. 2016.
- [30] Hong F, Pan S, Gou P, Xu P, Zhai Y. PPARs AS NUCLEAR RECEPTORS FOR NUTRIENT AND ENERGY Metabolism. *Molecules* 2019, 24(14), 2545.
- [31] Katarzyna Borycka-Kiciak, Tomasz Banasiewicz, Grażyna Rydzewska. REVIEW PAPER BUTYRIC ACID – A WELL-KNOWN MOLECULE REVISITED. *Gastroenterology Rev* 2017; 12 (2): 83–89.
- [32] Morrison D and Preston T. FORMATION OF SHORT CHAIN FATTY ACIDS BY THE GUT MICROBIOTA AND THEIR IMPACT ON HUMAN METABOLISMO. *Gut Microbes Volume 7 (3)*, 2016.
- [33] Luhrs H, Gerke T, Muller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberge F, Scheppach W, Menzel T. Butyrate inhibits NF-KAPPAB ACTIVATION IN LAMINA PROPRIA MACROPHAGES OF PATIENTS WITH ULCERATIVE COLITIS. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:458-66.
- [34] Wang Y, Wang H, Howard A, Meyer K, Tsilimigras M, Avery C, Sha W, Sun S, Zhang J, Su W, Wang Z, Zhang B, Fodor A, Gordon-Larsen P. CIRCULATING SHORT-CHAIN FATTY ACIDS ARE POSITIVELY ASSOCIATED WITH ADIPOSITY MEASURES IN CHINESE ADULTS. *Nutrient*, 2020 Jul; 12(7): 2127.
- [36] V LeMaire, C Aussel, A Hernvann, J M Launay, O G Ekindjian. STIMULATION OF ALPHA-(METHYLAMINO) ISOBUTYRIC ACID UPTAKE BY INTERLEUKIN-1 IN HUMAN SYNOVIAL CELLS. Involvement of a cAMP dependent pathway. *Eur Cytokine Network*, 1994; 5(5):449-53. PMID: 7880975.
- [37] Ubhi BK, Riley JH, Shaw PA, Lomas DA, Tal-Singer R, MacNee W, et al. METABOLIC PROFILING DETECTS BIOMARKERS OF PROTEIN DEGRADATION IN COPD PATIENTS. *Eur Respir J*. 2012;40(2):345-55.
- [38] Weiwei Wang, Zhenlong Wu, Zhaolai Dai, Ying Yang, Junjun Wang, Guoyao Wu. GLYCINE METABOLISM IN ANIMALS AND HUMANS: IMPLICATIONS FOR NUTRITION AND HEALTH. *Amino Acids*. 2013 Sep;45(3):463-77.
- [39] Ma H, Liu X, Wu Y, Zhang N. The Intervention EFFECTS OF ACUPUNCTURE ON FATIGUE INDUCED BY EXHAUSTIVE PHYSICAL EXERCISES: A METABOLOMICS INVESTIGATION. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015.
- [40] Urbaniak B, Plewa S, Klupczynska A, Sikorska D, Samborski W, Kokot ZJ. SERUM FREE AMINO ACID LEVELS IN RHEUMATOID ARTHRITIS ACCORDING TO THERAPY AND PHYSICAL DISABILITY. *Cytokine*. 2019;113:332-9.

TABLES

Table 1. Demographic characteristics of the population

Characteristic	N = 90 patients
Age (years), mean \pm SD	56.5 \pm 7.3
Disease duration (years), median (IQR)	8.5 (3–18)
Women, n (%)	78 (86.7)
Men, n (%)	12 (13.3)
Tabagism, (%)	20
Positive rheumatoid factor, n (%)	77 (85.6)
C-reactive protein, median (IQR)	4.15 (3–9)
Physical disability (HAQ-DI), mean \pm SD	1.2 \pm 0.1
Presence of erosion, n (%)	64 (71.1)
Disease activity (DAS28-CRP), median (IQR)	3.2 (1 -5.4)
Disease remission, n (%)	25 (27.8)
MTX monotherapy, n	52
MTX with sDMARDs, n	14
sDMARDs, n	27
Glucocorticoids, n	53
Muscle Mass (ALMI), median (IQR)	6.67 (4.9-9.0)
Sarcopenia, %	52.2
Severe sarcopenia, %	7.8

SD, standard deviation; IQR, interquartile range; HAQ-DI, Health Assessment Questionnaire-Disability Index; DAS28-CRP, Disease Activity Score in 28 joints using the C-reactive protein level; MTX, methotrexate; sDMARDs, synthetic disease-modifying antirheumatic drugs; ALMI, appendicular muscle mass

Table 2. Urine metabolomic profile of patients with rheumatoid arthritis

Compound name	Metabolite class	CAS number	HMDB number
Isobutyric acid	Carboxylic/Short chain fatty acid	79-31-2	HMDB0001873
Acetone	Organic compound – ketone	67-64-1	HMDB0001659
Trimethylamine	Amine	75-50-3	HMDB0000906
Hydroxyisovaleric acid	Organic compound - hydroxy fatty acids	77220-86-1	HMDB0002011
Hippuric acid	Acyl glycine	495-69-2	HMDB0000714
Methionine	Alpha-amino acid	63-68-3	HMDB0000696
Malonic acid	Dicarboxylic acid	595-46-0	HMDB0002001
Leucine	Alpha-amino acid	61-90-5	HMDB0000687
Gluconic acid	Organic compound – sugar acid	526-95-4	HMDB0000625
Creatinine	Non-protein nitrogenous compound	60-27-5	HMDB0000562
Methylhistidine	Methylamino acid	332-80-9	HMDB0000001
Glutamic acid	Alpha-amino acid	56-86-0	HMDB0000148
Taurine	Sulfur amino acid	107-35-7	HMDB0000251
Pyruvic acid	Alpha-keto acid	127-17-3	HMDB0000243
Serine	Alpha-amino acid	56-45-1	HMDB0000187
Lysine	Alpha-amino acid	56-87-1	HMDB0000182
Fucose	Hexose deoxy sugar	2438-80-4	HMDB0000174
Isoleucine	Alpha-amino acid	73-32-5	HMDB0000172
Proline	Alpha-amino acid	147-85-3	HMDB0000162
Hypoxanthine	Organic compounds - purine	68-94-0	HMDB0000157
Ethanolamine	Organic compounds – aminoalcohols	141-43-5	HMDB0000149
Glutamic acid	Alpha-amino acid	56-86-0	HMDB0000148
Galactose	Aldohexose	3646-73-9	HMDB0000143
Formic acid	Carboxylic acid	64-18-6	HMDB0000142
Furamic acid	Carboxylic acid	110-17-8	HMDB0000134
Glycine	Alpha-amino acid	56-40-6	HMDB0000123
Glucose	Monosaccharide	492-61-5	HMDB0000122
Citric acid	Tricarboxylic acid	77-92-9	HMDB0000094
Dimethylglycine	Amino acid	1118-68-9	HMDB0000092
Dimethylalanine	Organic compound - dialkylarylamines	121-69-7	HMDB0001020

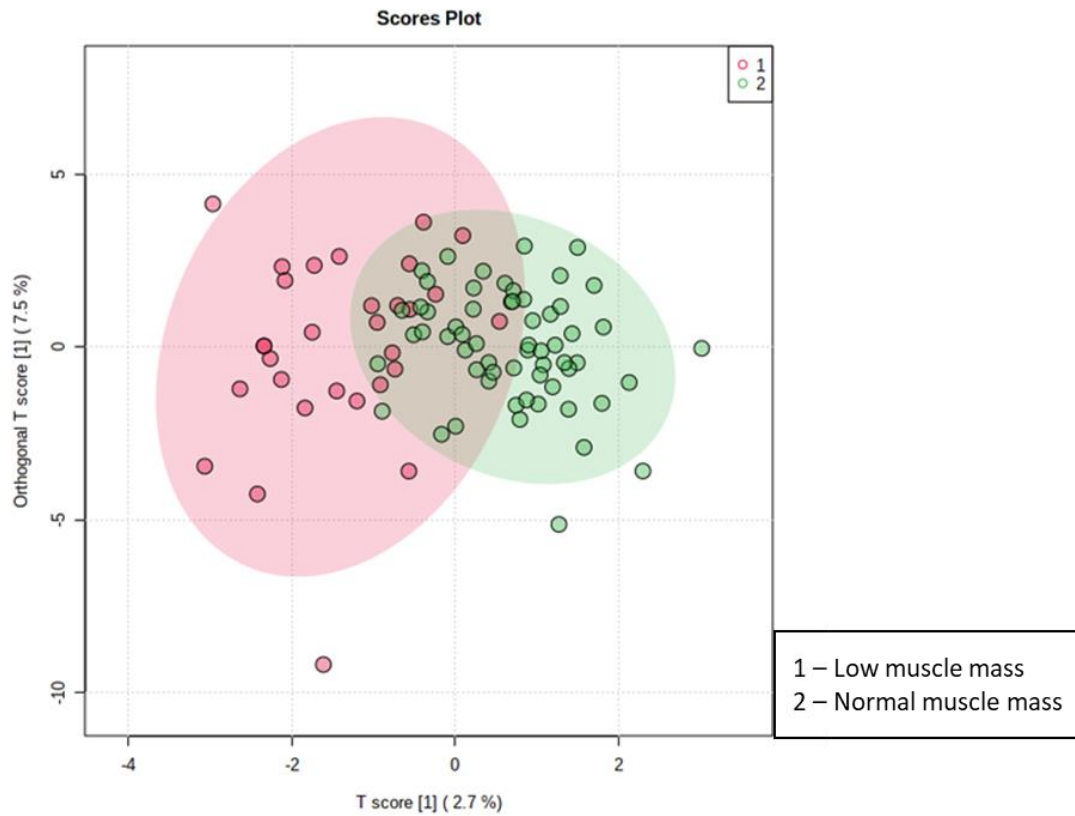
Carnitine	Amino acid - ammonium compound	541-15-1	HMDB0000062
Acetoacetate	Organic acid	541-50-4	HMDB0000060
Betaine	Amino acid	6915-17-9	HMDB0000043
Butyric acid	Short-chain fatty acid	107-92-6	HMDB0000039
Hydroxyisobutyrate	Organic acid	1910-47-0	HMDB0000336
Hydroxybutyrate	Product of branched-chain amino acids	625-72-9	HMDB0000011
Methanol	Organic compound - primary alcohol	67-56-1	HMDB0001875
Phosphorylcholine	Organic compound – phosphocholine	3616-04-4	HMDB0001565
Tryptophan	Alpha-amino acid	73-22-3	HMDB0000929
Valine	Alpha-amino acid	72-18-4	HMDB0000883
Isopropanol	Organic compound - secondary alcohol	67-63-0	HMDB0000863
Hydroxyphenyl acid	Antioxidant substrate	621-37-4	HMDB0000440
Isovalerate	Organic compound - fatty alcohol ester	68922-10-1	HMDB0038954
Fructose	Monosaccharide	53188-23-1	HMDB0000660
Glutamine	Alpha-amino acid	56-85-9	HMDB0000641
Cysteine	Alpha-amino acid	52-90-4	HMDB0000574
Urea	Organic compound - deamination of amino acids	57-13-6	HMDB0000294
Arginine	Alpha-amino acid	74-79-3	HMDB0000517
Hydroxybutyric acid	Branched-chain amino acid	625-72-9	HMDB0000011
Uracil	Organic compound – pyrimidones	66-22-8	HMDB0000300
Xanthine	Organic compound – xanthines	69-89-6	HMDB0000292
Sarcosine	N-methyl derivative of glycine	107-97-1	HMDB0000271
Succinic acid	Dicarboxylic acid	110-15-6	HMDB0000254
Oxalacetic acid	Dicarboxylic acid	144-62-7	HMDB0002329
Ornithine	Alpha-amino acid	3184-13-2	HMDB0000214
Myoinositol	Sugar alcohol	87-89-8	HMDB0000211
Phenylacetic acid	Carboxylic acid ester	103-82-2	HMDB0000209
Methylmalonic acid	Organic compound – dicarbonyl	516-05-2	HMDB0000202
Cysteine	Alpha-amino acid	52-90-4	HMDB0000574
Aspartic acid	Alpha-amino acid	56-84-8	HMDB0000191
Lactic acid	Organic acid	79-33-4	HMDB0000190
Lactose	Sugar	63-42-3	HMDB0000186
Histidine	Alpha-amino acid	71-00-1	HMDB0000177
Mannose	Alpha-amino acid	3458-28-4	HMDB0000169

Asparagine	Hexose	70-47-3	HMDB0000168
Threonine	Alpha-amino acid	72-19-5	HMDB0000167
Methylamine	Alpha-amino acid	74-89-5	HMDB0000164
Alanine	Organic compound – amine	56-41-7	HMDB0000161
Phenylalanine	Alpha-amino acid	63-91-2	HMDB0000159
Tyrosine	Alpha-amino acid	60-18-4	HMDB0000158
Creatine	Alpha-amino acid	57-00-1	HMDB0000064
Choline	Phospholipid	62-49-7	HMDB0000097

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. PLS-DA score plots of the metabolites identified as associated with (1) low and (2) normal muscle mass. Each dot represents a single metabolite in one of two clusters of muscle mass (low vs normal), as quantified by appendicular lean mass index. A. Shows the difference of distinct groups. B. 3-D representation of the groups showing also the metabolites difference related to muscle mass.

A.



B.

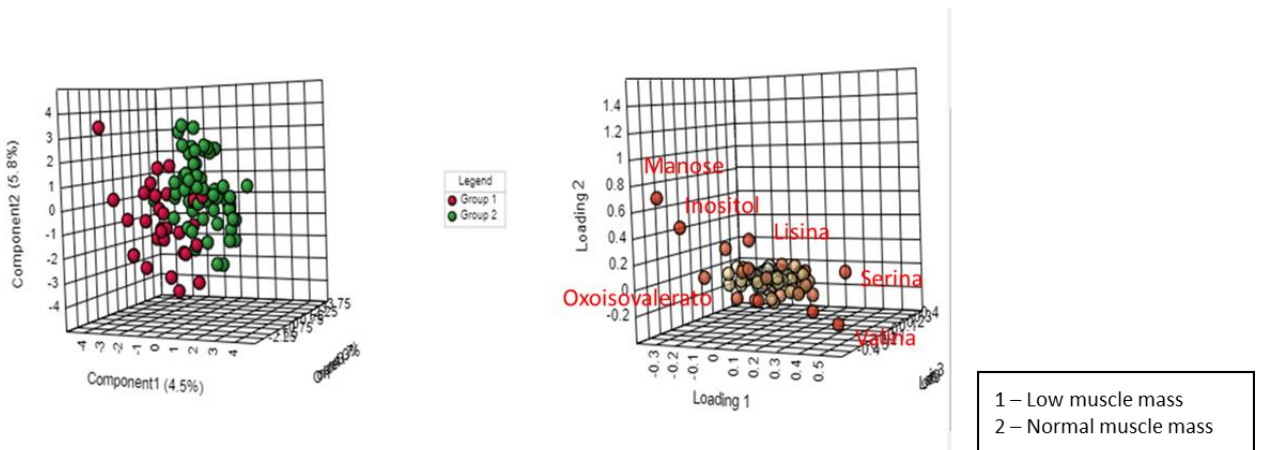


Figure 2. Heatmap of the metabolites that are significantly correlated (Spearman's correlation analysis) with muscle mass: (1) low and (2) normal muscle mass. Red indicates increased and blue indicates decreased metabolite levels in relation to skeletal muscle quantity.



Figure 3. Metabolites associated with pathways of muscle tissue (VIP score). Metabolite concentration related to muscle quantity considering (1) low and (2) normal muscle mass.

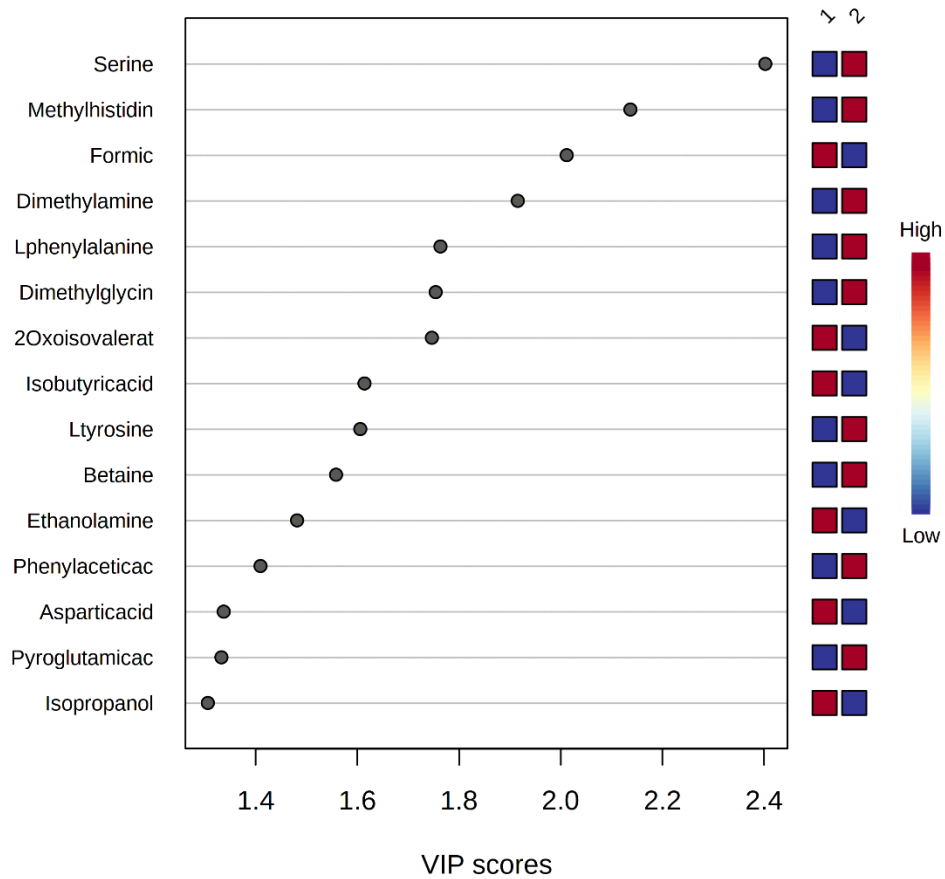


Figure 4. Difference in urinary dimethylglycine, oxoisovalerate, and isobutyric acid concentrations in relation to low muscle mass (in red) and normal muscle mass (in green). A, Dimethyl-glycine. B. Oxoisovalerate. C. Isobutyric acid.

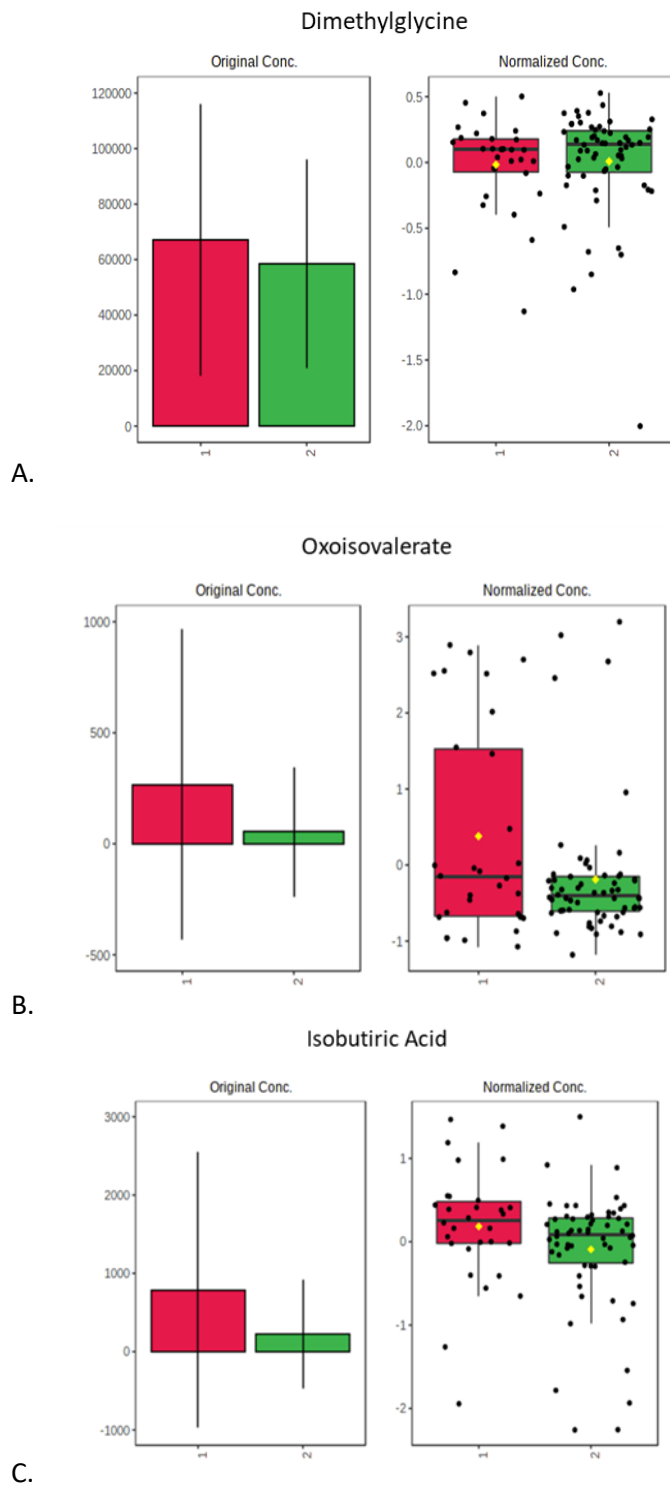


Figure 5. Diagnostic model with dimethylglycine, oxoisovalerate, and isobutyric acid as established by ROC curve and logistic regression analyses, with sensitivity and specificity.

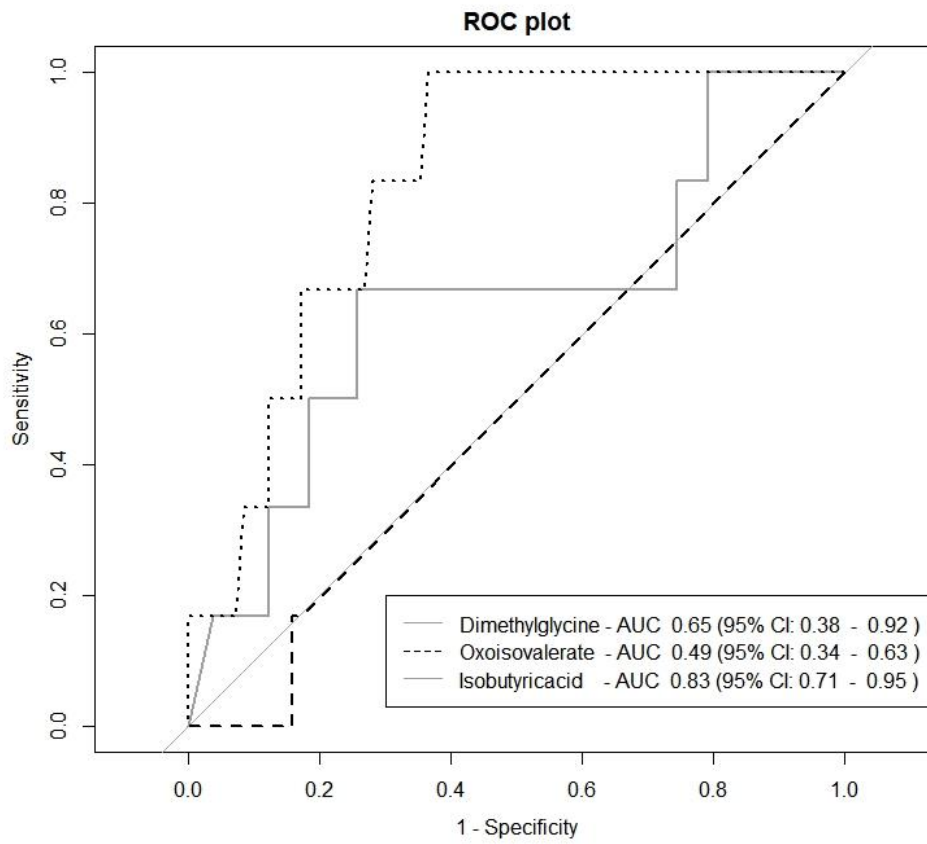
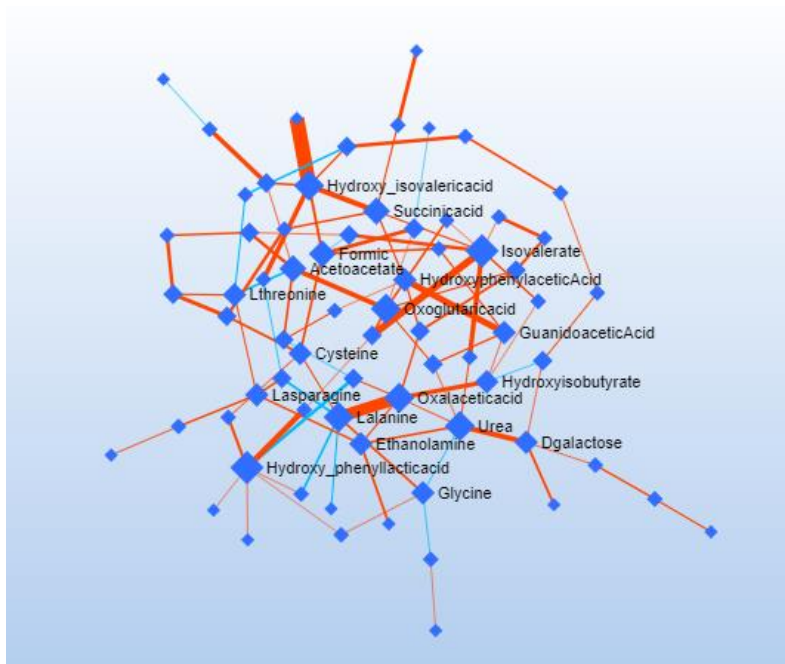


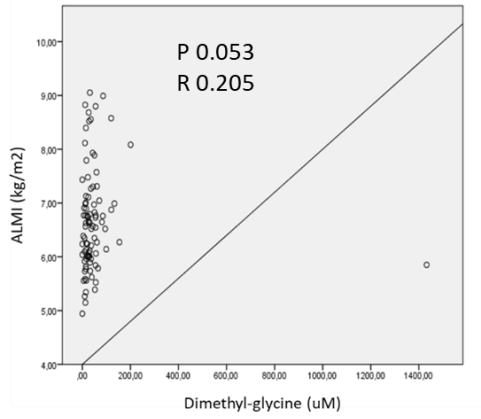
Figure 6. Correlation of metabolic pathways involved in the process of loss of muscle mass from urine samples of patients with rheumatoid arthritis. Blue edges represent negative correlations, whereas red edges represent positive correlations.



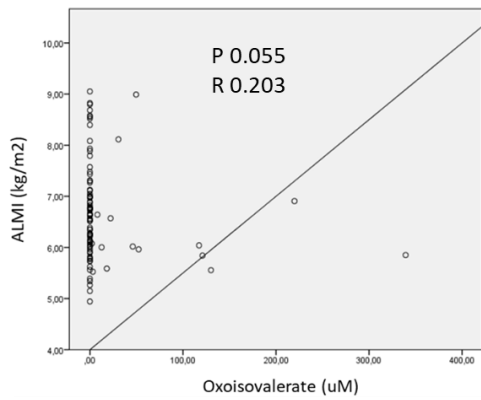
SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Spearman's correlation between metabolites and muscle mass. ALMI, appendicular lean mass index. A, Dimethyl-glycine. B. Oxoisovalerate. C. Isobutyric acid.

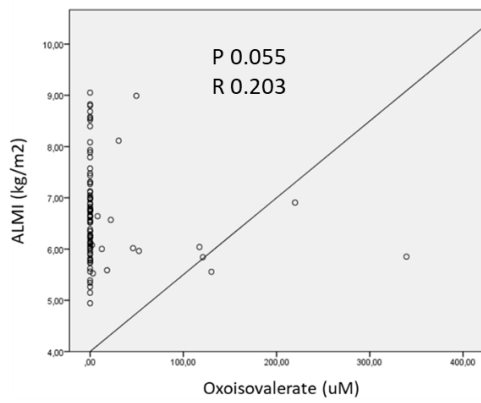
A.



B.



C.



20. Conclusão

Em conclusão, alguns metabólitos foram encontrados na urina de pacientes com AR relacionados ao metabolismo muscular que podem ser correlacionados com a perda muscular: ácido isobutírico, metilglicina e isovalerato. Verificou-se que o ácido isobutírico e o isovalerato apresentam maior concentração urinária quando há menor massa muscular, enquanto a metilglicina encontra-se diminuída. Como limitação desta pesquisa podemos incluir a comparação com um grupo controle sem doença inflamatória e pouca diferença de atividade da doença e variação de massa muscular dos pacientes analisados.

Pudemos identificar metabólitos relacionados à massa muscular, correlacionando a concentração de metabólitos na urina com a ondulação muscular. Seria muito útil identificar e quantificar metabólitos na urina de pacientes com AR para prever e acompanhar doenças complexas como caquexia e sarcopenia. A RMN parece ser uma ferramenta interessante para identificar metabólitos relacionados à perda muscular. Foi demonstrado que o perfil metabolômico pode ser útil para gerar melhores biomarcadores para a identificação dos parâmetros de perda muscular e pior prognóstico da AR.

21. Perspectivas Futuras

→ Analisar se o mesmo perfil de metabólitos é identificado na urina dos pacientes em 5 anos de acompanhamento possibilitando a identificação de outros biomarcadores em relação à piora ou melhora da doença.

→ Realizar a validação e a correlação dos resultados obtidos na urina em soro de pacientes com artrite reumatoide.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO

Aplicação e comparação dos critérios estabelecidos para diagnóstico para caquexia reumatoide

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

A caquexia é uma doença que pode se associar à artrite reumatoide e interferir na qualidade de vida dos pacientes. Como consequência, ela pode trazer limitações para as atividades do dia a dia. Este estudo tem como objetivo avaliar componentes como ossos, musculatura e gordura corporal, além de capacidade física, força muscular, cansaço durante o exercício, substâncias no sangue e na urina que mostram a caquexia em pacientes com artrite reumatoide. Portanto, convidamos você a participar do presente estudo.

O QUE SERÁ FEITO NESTE NOVO ESTUDO?

Será aplicada uma ficha com as seguintes informações: nome, idade, história clínica incluindo as outras doenças de base. Também será aplicado questionário de capacidade funcional que se propõem a avaliar a dificuldade para realização de atividades do dia a dia e um questionário de apetite. Também faremos um teste de levantar-sentar da cadeira e depois um teste de força de mão e de coxa. Para avaliação da estrutura corporal será realizado a densitometria corporal total, que é do que um exame parecido com uma radiografia (Rx). A densitometria corporal total possui radiação menor que uma radiografia, 10 vezes menor do que um raio X de tórax, com duração de seis minutos, indolor, sem risco para a saúde e sem risco de reação adversa, visto que não usa nenhum contraste nem medicamento. E por fim, será realizada uma coleta de sangue e de urina. Esses exames servirão para vermos

alterações no seu metabolismo. Os exames que não forem realizados no dia da consulta serão previamente agendados. Após 6 meses, iremos repetir estes testes. Todos os exames serão realizados no Hospital de Clínicas. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

QUAIS SÃO AS VANTAGENS E DESVANTAGENS EM PARTICIPAR DO ESTUDO?

Não existem benefícios diretos pela sua participação neste estudo. No entanto, participando deste estudo você ajudará na melhor compreensão da caquexia em pacientes com artrite reumatoide e esclarecendo ainda quais os melhores critérios para diagnosticar esta síndrome em pacientes com artrite reumatoide. Com isto, poderemos direcionar o tratamento e possibilitar o sucesso da terapia, bem como reduzir custos de medicações. Não existem desvantagens, na medida em que o presente estudo não oferece riscos à sua saúde.

DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE

- A. Os dados coletados neste estudo serão confidenciais e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes.
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, o paciente é quem decidirá se quer participar ou não.
- C. A decisão de não participar não vai interferir nos atendimentos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- D. O participante pode desistir do estudo a qualquer momento sem necessitar qualquer justificativa para tal.
- E. O participante receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- F. Não haverá qualquer custo relacionado ao estudo.

COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO

Depois de ler este termo e esclarecer minhas dúvidas, aceito participar deste estudo.

Participante:

Registro: _____

Assinatura: _____

Pesquisador:

Assinatura do pesquisador:

Porto Alegre, ____ de _____ de 20____.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier: telefone:

(51) 3359 8340

Comitê de Pesquisa e Ética em Saúde: telefone: (51) 3359 8304