

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE IRISINA E MIOSTATINA E EROSÃO ARTICULAR EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

JORDANA MIRANDA DE SOUZA SILVA

Porto Alegre

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE IRISINA E MIOSTATINA E EROÇÃO ARTICULAR EM
PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

JORDANA MIRANDA DE SOUZA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier
Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção de título de Doutor em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em
Medicina: Ciências Médicas

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Miranda de Sousa Silva, Jordana
Estudo da associação entre irisina e miostatina e
erosão articular em pacientes com artrite reumatoide /
Jordana Miranda de Sousa Silva. -- 2020.
85 f.
Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2020.

1. Artrite reumatoide. 2. Irisina. 3. Miostatina.
4. Progressão radiográfica. I. Machado Xavier,
Ricardo, orient. II. Título.

RESUMO

Objetivo. Avaliar a associação entre os níveis basais de irisina e de miostatina com a progressão radiográfica de um ano em pacientes com artrite reumatoide (AR).

Métodos. No tempo basal, irisina e miostatina séricas foram avaliadas em 40 pacientes com AR do sexo feminino e em 30 indivíduos controles pareados por sexo, idade e índice de massa corporal (IMC), por ELISA. Os pacientes com AR tiveram suas radiografias de pés e mãos avaliadas pelo escore de Sharp/van der Heijde (SHS) em dois tempos, basal e após um ano. A atividade de doença foi avaliada pelo escore de atividade de doença-28-proteína C reativa (DAS28-PCR), a composição corporal foi avaliada por densitometria de dupla emissão de raios X (DXA) e a incapacidade foi avaliada pelo Questionário de Avaliação de Saúde (HAQ-DI). A função física foi avaliada pelo teste de sentar e levantar, *timed up and go* (TUG) e teste de preensão manual, e os marcadores inflamatórios proteína C reativa (PCR), velocidade de sedimentação globular (VSG) e interleucina-6 (IL-6) foram medidos.

Resultados. A média de idade dos pacientes com AR foi de 56 anos, a média do DAS28-PCR foi de 3.3, o tempo médio de doença foi de 11.2 anos e o IMC médio foi de 28.1 kg/m². Os níveis séricos de irisina e de miostatina não foram associados com a progressão radiográfica de um ano. Progressão radiográfica rápida e baixa massa magra foram detectadas em 17.5% e 14.8% dos pacientes, respectivamente. A miostatina sérica foi significativamente menor nos pacientes com AR do que nos controles (3021.7 ± 1217.2 vs 4049.0 ± 1610.0 pg/ml), e os pacientes tratados com medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) biológicos apresentaram irisina sérica maior que os pacientes não tratados com MMCD biológicos (31.7 ± 7.6 vs 25.7 ± 6.8 ng/ml). Os níveis séricos de irisina foram positivamente correlacionados com os níveis circulantes de IL-6 ($r= 0.382$; $p= 0.020$) e TUG ($r= 0.338$; $p= 0.35$) nos pacientes com AR.

Conclusão. A maioria dos pacientes não apresentou progressão radiográfica rápida e baixa massa magra. A miostatina sérica foi menor na AR do que nos controles, enquanto a irisina foi maior nos pacientes em uso de MMCD biológicos e associada à IL-6 e TUG. Os níveis séricos de miocinas não foram associados à progressão radiográfica em um ano, o que pode estar relacionado à avaliação a curto prazo. É provável que o uso de MMCD biológicos influencie nas miocinas em circulação, enquanto a irisina pode afetar a expressão de IL-6 e a mobilidade.

ABSTRACT

Objective. To evaluate the association of baseline serum levels of irisin and myostatin with one-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis (RA).

Methods. At baseline, irisin and myostatin serum levels were determined in 40 female RA patients, and in 30 control individuals matched by sex, age, and body mass index (BMI), by ELISA. RA patients had their radiographs of hands and feet evaluated by Sharp/van der Heijde score (SHS) at two timepoints, baseline and after one year. Disease activity was calculated in RA patients by Disease Activity Score 28-C reactive protein (DAS28-CRP), body composition was evaluated using dual X-ray absorptiometry (DXA) and disability was assessed by Health Assessment Questionnaire-Disability Index (HAQ-DI). Physical function was evaluated by chair rising (CRT), timed up and go (TUG) and hand grip tests, and inflammatory the markers erythrocyte sedimentation rate (ESR), CRP and interleukin-6 (IL-6) were measured.

Results. The mean age of RA patients was 56 years old, mean DAS28-CRP was 3.3, mean disease duration was 11.2 years and mean BMI was 28.1 kg/m². Rapid radiographic progression and low lean mass were present in 17.5% and 14.8% of the RA patients, respectively, and showed no correlation with serum irisin and myostatin. Serum myostatin was significantly lower in RA patients than in control subjects (3021.7 ± 1217.2 vs 4049.0 ± 1610.0 pg/ml), and patients treated with biologic disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs) showed higher irisin serum levels than patients non-treated with bDMARDs (31.7 ± 7.6 vs 25.7 ± 6.8 ng/ml). Irisin serum levels were positively correlated with IL-6 ($r=0.382$; $p=0.020$) and TUG ($r=0.338$; $p=0.35$) in RA patients.

Conclusion. Most of the patients did not present rapid radiographic progression and low lean mass. Serum myostatin was lower in RA than in control subjects, while irisin was higher in patients using bDMARDs and associated with IL-6 and TUG. Serum levels of myokines were not associated with one-year radiographic progression, which may be related to the short-term evaluation. The use of bDMARDs is likely to influence in circulating myokines, whereas irisin may impact on IL-6 expression and mobility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégias de busca	12
Figura 2: Células do tecido ósseo.....	17
Figura 3: Avaliação de erosões pelo escore de Sharp van der Heijde	19
Figura 4: Avaliação do estreitamento do espaço articular pelo escore de Sharp van der Heijde	20
Figura 5: Sinalização da irisina	24
Figura 6: Sinalização da miostatina	31
Figura 7: Marco teórico	37
Figura 8: Níveis séricos de irisina e de miostatina em pacientes e controles e de acordo com o uso de medicamentos modificadores do curso da doença	55
Figura 9: Níveis séricos de irisina e de miostatina de acordo com a massa magra e índice de massa magra apendicular entre as categorias de progressão radiográfica.....	57
Figura 10: Correlações entre os níveis séricos de irisina e interleucina-6 e o teste <i>timed up and go</i>	58
Figura 11: Frequência de alterações na composição corporal de pacientes com artrite reumatoide e entre pacientes obesos e não-obesos	71
Figura 12: Níveis séricos de irisina e de miostatina entre categorias de alterações na composição corporal	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características da população em estudo (artigo 1).....	53
Tabela 2: Níveis séricos de irisina e de miostatina de acordo com as categorias do escore de Sharp van der Heijde.....	54
Tabela 3: Níveis séricos de irisina e de miostatina de acordo com as categorias de atividade de doença	56
Tabela 4: Características da população em estudo (artigo 2).....	69
Tabela 5: Índice de massa corporal dos pacientes com artrite reumatoide de acordo com a medicação utilizada	72
Tabela 6: Índice de incapacidade de acordo com as alterações na composição corporal .	73
Tabela 7: Correlações entre os níveis séricos de irisina e de miostatina e alterações na composição corporal	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Artrite reumatoide
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
HLA	Antígeno leucocitário humano
Anti-CCP	Anti-peptídeo cíclico citrulinado
CIA	Artrite induzida por colágeno
Th	Célula T auxiliar
APC	Célula apresentadora de antígenos
Treg	Célula T reguladora
FR	Fator reumatoide
PAD	Enzima peptidil-arginina deiminase
FLS	Fibroblastos sinoviais
DAS-28	Escore de atividade de doença-28
VSG	Velocidade de sedimentação globular
PCR	Proteína C-reativa
MCSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
RANK	Receptor ativador do fator nuclear κ B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B
MMPs	Metaloproteinases de matriz
OPG	Osteoprotegerina
Wnt	Via de sinalização <i>Wingless</i>
Fzd	Receptor <i>Frizzled</i>
GSK3 β	Quinase glicogênio sintase 3 β
Dkk	Proteína <i>Dickkopf</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
IL	Interleucina
AINH	Anti-inflamatórios não hormonais
DMCD	Drogas modificadoras do curso da doença
JAK	Janus quinase
PGC1- α	<i>PPARγ coactivator-1 α</i>
Fndc5	<i>Fibronectin type III domains containing protein 5</i>
MAPK)	Proteínas quinases ativadas por mitógenos

UCP1	Proteína desacopladora 1
Akt	<i>Protein kinase B</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Erk	<i>Extracellular-signal-regulated kinase</i>
MyHC	Miosina de cadeia pesada
MuRF-1	<i>Muscle ring finger 1</i>
GLUT4	Transportadores de glicose tipo 4
r-irisina	Irisina recombinante
NF-κB	Fator nuclear-κB
OA	Osteoartrite
IMC	Índice de massa corporal
ActRIIB	Receptor de activina tipo IIB
ALK-4	<i>Activin-like kinase-4</i>
ALK-5	<i>Activin-like kinase-4</i>
Nfatc1	Fator nuclear de células T ativadas
r-miostatina	Miostatina recombinante

Sumário

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	Estratégias para localizar e selecionar informações	13
2.2	Artrite reumatoide	13
2.2.1	Erosão óssea.....	16
2.2.2	Avaliação da progressão radiográfica	18
2.2.3	Tratamento.....	22
2.3	Miocinas	23
2.4	Irisina	24
2.4.1	Irisina e tecido muscular esquelético.....	25
2.4.2	Irisina e tecido ósseo	27
2.4.3	Irisina e doenças reumáticas.....	29
2.5	Miostatina	31
2.5.1	Miostatina e tecido muscular esquelético	32
2.5.2	Miostatina e tecido ósseo	34
2.5.3	Miostatina e doenças reumáticas	36
3	MARCO CONCEITUAL	38
4	JUSTIFICATIVA	39
5	OBJETIVOS.....	40
5.1	Objetivo primário	40
5.2	Objetivos secundários	40
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
7	ARTIGO	50
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
9	PERSPECTIVAS	66
9.1	Artigo 2	66
10	ANEXOS	84
10.1	ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	84

1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória sistêmica caracterizada por sinovite crônica que leva progressivamente à degradação articular, com acometimento da cartilagem e do osso (1). O dano erosivo das articulações é uma característica da AR e, com o tempo, causa deformidade e contribui para a incapacitação dos pacientes (2). A progressão da erosão articular é variável entre os pacientes com AR e pode ser detectada através de alterações radiográficas nas articulações afetadas (3). Apesar das estratégias atuais de tratamento, visando a redução da atividade da doença de maneira precoce e rápida, a progressão radiográfica ainda ocorre em uma proporção de pacientes com AR (4, 5).

O grupo de citocinas e fatores de crescimento derivados do músculo esquelético, denominados coletivamente de miocinas, como irisina e miostatina, foram recentemente relacionados ao metabolismo fisiológico e patológico do tecido ósseo (6). As miocinas são expressas principalmente no músculo esquelético, que também é seu principal tecido alvo, embora a irisina e a miostatina também sejam consideravelmente ativas no tecido adiposo e ósseo (7, 8). A miostatina é uma miocina crucial, descrita como potente supressor do crescimento e do desenvolvimento da massa muscular esquelética, bem como um inibidor da massa e do remodelamento ósseo. Além disso, foi confirmado o papel da miostatina no aumento da diferenciação de osteoclastos e da destruição óssea na artrite (8). Notavelmente, a expressão da miostatina se comporta de maneira oposta à da irisina, a qual induz à hipertrofia muscular esquelética e resgata a atrofia, além de aumentar a massa e a força óssea pela estimulação de osteoblastos (9, 10).

A relação próxima entre músculo esquelético e tecido ósseo levou ao desenvolvimento do conceito de “unidade ósseo-muscular”, principalmente porque massa e força desses dois tecidos são afetadas positivamente pelo exercício físico, enquanto ambas são comprometidas pelo envelhecimento e por situações de desuso (6). Assim, as miocinas podem estabelecer uma rede de comunicação entre músculo e osso, em adição à estimulação mecânica. Baixa massa, densidade e força muscular foram detectadas em indivíduos com AR e, com o tempo, a redução da densidade muscular esquelética foi relacionada à maior atividade de doença (11, 12). Além disso, demonstrou-se que, na AR, os déficits musculares contribuem com a piora da estrutura óssea cortical e com a redução da densidade mineral óssea trabecular, possivelmente devido a déficits na estimulação mecânica (13). Como músculo esquelético e osso são afetados na AR, e

ambos são fontes de miocinas, é possível que os níveis dessas moléculas possam representar marcadores relevantes para avaliação de desfechos na doença.

A identificação de pacientes em risco de maior dano radiográfico é fundamental para adaptar o tratamento e impedir a progressão da doença, o que enfatiza a necessidade de biomarcadores que prevejam alterações estruturais nas articulações dos pacientes com AR (14). Assim, este estudo teve como objetivo abordar as associações entre concentrações séricas basais de irisina e miostatina com a progressão radiográfica de um ano em pacientes com AR. Secundariamente, também foi avaliada a associação de miocinas séricas com a massa magra, medicamentos utilizados e função física.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados aos mediadores secretados a partir do tecido muscular, no contexto da inflamação crônica da AR, e sua relação com a erosão óssea da doença. A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed, Scielo e Embase. Foram realizadas buscas através dos termos “rheumatoid arthritis”, “bone”, “muscle”, “radiographic progression”, “myokines”, “irisin”, “myostatin” e suas combinações.

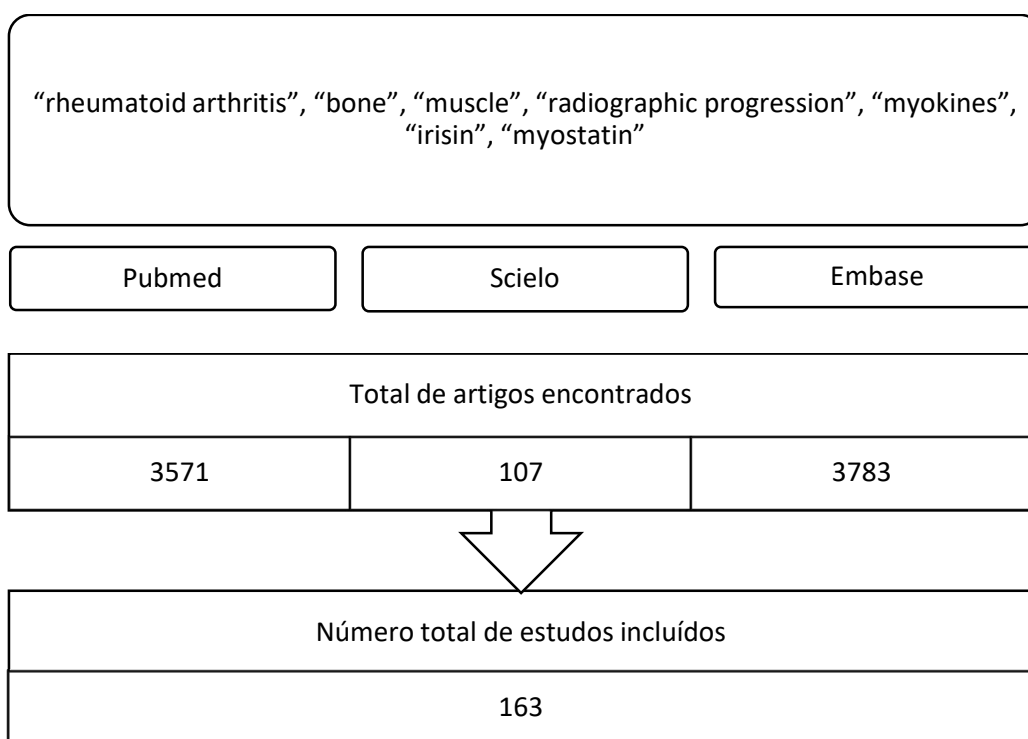


Figura 1. Estratégias de busca.

2.2 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, crônica e apresenta uma prevalência mundial estimada em 0,8%, além de afetar, mais predominantemente, o sexo feminino (15, 16). A doença é influenciada por fatores genéticos e ambientais e caracteriza-se por inflamação e degradação das articulações sinoviais, com consequentes limitações funcionais, incapacidade de trabalho e má qualidade de vida (17). Comumente, há o

acometimento simétrico das pequenas e das grandes articulações, com maior frequência de envolvimento de mãos e pés, enquanto o caráter sistêmico e as manifestações extra-articulares são responsáveis por morbidades relevantes (18).

Na Europa, a prevalência da AR é de 0,5-1,0%, enquanto um levantamento apontou para uma prevalência entre 0,53 e 0,55% nos Estados Unidos (19, 20). No Brasil, a prevalência é de 0,46% e, embora possa ocorrer em qualquer idade, o pico de incidência da AR ocorre por volta dos 50 anos (21). Sabe-se que a doença afeta pelo menos duas vezes mais mulheres que homens, e essa preponderância feminina pode estar relacionada a diferentes hormônios sexuais, seus efeitos no sistema imunológico e, possivelmente, à epigenética ou à microbiota (22).

O componente genético da AR é, frequentemente, associado aos genes do complexo de histocompatibilidade principal (*major histocompatibility complex* – MHC), também designado antígeno leucocitário humano (*human leukocyte antigen* – HLA). Demonstrou-se que o HLA-DR, especialmente o locus HLA-DRB1, fornece susceptibilidade importante para o risco de desenvolvimento de AR, codificando as moléculas do MHC de classe II que podem acomodar uma ampla gama de ligantes peptídicos. Até o momento, sabe-se que a maioria dos alelos HLA-DRB1 associados à RA compartilham sequências semelhantes de aminoácidos na posição 70-74 da cadeia β , denominada epítipo compartilhado, que é altamente prevalente entre os pacientes que apresentam anticorpos contra peptídeos cíclicos citrulinados (anti-CCPs) (23).

O ambiente, incluindo tabagismo, dieta, obesidade, infecções e microbiota, apresenta um papel no desencadear da doença em indivíduos geneticamente predispostos (24). O tabagismo é o fator externo relacionado à AR mais conhecido. O efeito direto da fumaça condensada do cigarro no desenvolvimento da AR foi recentemente demonstrado em modelo de artrite induzida por colágeno (*collagen-induced arthritis* – CIA). O receptor que medeia a atividade dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (componentes da fumaça do cigarro) é capaz de aumentar a diferenciação de células T auxiliares 17 (Th17), exacerbando a artrite (25, 26). Adicionalmente, diversos estudos sugerem que uma resposta inflamatória crônica induzida pela disbiose intestinal pode contribuir criticamente para a patogênese da AR, visto que a microbiota dos pacientes difere da população geral e que os medicamentos antirreumáticos podem exercer efeitos sobre sua regulação (27). Pacientes com AR, particularmente os que apresentam erosão óssea, possuem menor quantidade de bactérias pertencentes à família *Bifidobacterium* e *Bacteroides* e, ao menos nos estágios iniciais da doença, abundância de *Prevotella copri*. Sugere-se uma associação entre desequilíbrio da microbiota intestinal e AR devida a diferentes

mecanismos relacionados ao sistema imunológico do hospedeiro, incluindo: (i) ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs); (ii) capacidade do intestino de constituir uma fonte de peptídeos citrulinados; (iii) mimetismo antigênico; (iv) impacto na permeabilidade da mucosa intestinal; (v) e modulação do sistema imunológico do hospedeiro com desequilíbrio da homeostase entre as células Th17 e T reguladoras (Treg) (28).

Vários autoanticorpos podem ser detectados no soro de pacientes com AR, dos quais o fator reumatoide (FR) e os anti-CCPs são os mais proeminentes. Os anti-CCPs são direcionados contra proteínas citrulinadas e a citrulinação é uma reação mediada pelas enzimas peptidil-arginina deiminases (PADs), as quais convertem o aminoácido arginina em citrulina. Demonstrou-se que múltiplos fatores de risco conhecidos para AR estão relacionados ao desenvolvimento da resposta imune contra proteínas citrulinadas e, portanto, à formação de anti-CCPs (29). Por outro lado, o FR – o qual compreende um amplo espectro de isotipos, incluindo IgM, IgG e IgA – reconhece a porção Fc da imunoglobulina, e foi o primeiro tipo de autoanticorpo detectado na AR (30). Mais recentemente, foram descobertos anticorpos contra proteínas adicionais com modificações pós-traducionais, como anticorpos anti-proteínas carbamiladas e anticorpos anti-proteínas acetiladas (29). A presença de autoanticorpos é preditiva para o desenvolvimento de AR, em pacientes com artrite não diferenciada, e para o desenvolvimento de uma doença mais erosiva ao longo do tempo (30).

É provável que os estressores, por exemplo na fumaça do cigarro, possam atuar nas células locais da mucosa e promover modificações pós-traducionais, como citrulinação ou carbamilação, em uma variedade de proteínas, incluindo proteínas intracelulares (como histonas) e proteínas da matriz (como fibronectina, colágeno, vimentina, etc.). Posteriormente, os peptídeos alterados são apresentados associados às moléculas MHCs de células apresentadoras de antígenos, especialmente aquelas moléculas que contêm o epítipo compartilhado, levando à apresentação de antígenos às células T potencialmente autorreativas que, por sua vez, estimulam as células B a sintetizar auto-anticorpos, como o anti-CCP. Fibroblastos sinoviais (*fibroblast-like synoviocytes* – FLS), APCs e macrófagos podem ser ativados localmente e produzir uma variedade de fatores inflamatórios. Assim, a resposta autoimune pode desencadear diretamente a inflamação sinovial, ou pode exigir um segundo estímulo, como formação de complexos imunes e ativação do complemento, para induzir ou aumentar a produção de citocinas e a migração de células inflamatórias para o compartimento articular. As ações parácrinas e autócrinas das citocinas, juntamente com respostas imunes adaptativas persistentes, podem perpetuar a doença e, finalmente, levar à destruição da cartilagem e do osso (1).

A composição celular da inflamação sinovial da AR inclui células imunes inatas, como monócitos, células dendríticas, mastócitos e células linfoides inatas, e células imunes adaptativas, como células Th1 e Th17 e células B. Uma rede de citocinas e quimiocinas, principalmente TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17, regula o meio inflamatório na articulação, levando à indução e ao agravamento da resposta inflamatória, ativando as células endoteliais e atraindo as células imunes a se acumularem dentro do compartimento sinovial. Além disso, uma resposta tecidual robusta, na qual os FLS assumem um fenótipo inflamatório agressivo e invasivo, juntamente com o aumento do catabolismo dos condrócitos e da osteoclastogênese sinovial, promovem a destruição articular (31).

Por conta da natureza sistêmica da AR, vários eventos imunológicos ocorrem fora da articulação. De fato, pacientes com AR apresentam um risco de mortalidade 1,5 vezes maior que a população em geral (32). As causas mais comuns de mortalidade entre pacientes com AR são doenças cardiovasculares, doenças respiratórias e infecções. As doenças cardiovasculares predominam claramente entre as causas de morte na AR, em parte por conta do aumento dos fatores de risco tradicionais, mas também devido à manutenção da inflamação cronicamente (33). Adicionalmente, pacientes com AR frequentemente apresentam uma composição corporal desfavorável em comparação com controles de mesma idade. Sua condição compreende uma perda de massa muscular esquelética (maior do que o esperado para a idade), na presença de massa gorda estável ou até aumentada (especialmente no abdômen), resultando em um peso estável (34). Essas alterações desfavoráveis na composição corporal afetam, ainda, a capacidade funcional de pacientes com AR, frequentemente resultando em perda de produtividade e emprego, dificuldade nas atividades da vida diária, diminuição da qualidade de vida relacionada à saúde e aumento da mortalidade (35).

2.2.1 Erosão óssea

A erosão óssea é uma característica central da AR e está associada a um curso mais grave da doença, com maior grau de incapacidade e maior mortalidade (36, 37). As erosões são visíveis em radiografias simples como rupturas na superfície do osso cortical e são, frequentemente, acompanhadas por perda do osso trabecular adjacente (38). O monitoramento de danos estruturais, compostos pela erosão óssea e degradação da cartilagem, é utilizado na validação de medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) aprovados para o tratamento da AR. Além disso, a radiografia é amplamente utilizada para avaliar os danos estruturais na prática clínica e para monitorar a eficácia da terapia em retardar os danos estruturais (39).

O equilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea observada nos estados fisiológicos normais é alterado na AR devido à expressão de citocinas pró-inflamatórias pelas células do ambiente articular, resultando em aumento da diferenciação de osteoclastos e em inibição da função de osteoblastos. A diferenciação de osteoclastos está relacionada com a expressão de dois mediadores osteoclastogênicos essenciais: o fator estimulador de colônias de macrófagos (*macrophage colony-stimulating factor* – M-CSF) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear κB (*receptor activator of nuclear factor κB ligand* – RANKL) (40). Esse processo envolve a migração de células da linhagem monocítica da medula óssea para os órgãos linfáticos secundários e, finalmente, para as articulações. Os osteoclastos ativados aderem à superfície do osso e criam um ambiente profundamente ácido na sua borda, por meio de bombas de prótons, promovendo a desmineralização. Então, a secreção de enzimas como metaloproteinases de matriz (MMPs) e catepsina K levam à degradação da matriz orgânica e à reabsorção óssea (41). Além disso, para alcançar a homeostase óssea, os osteoblastos maduros e outros tipos de células secretam a osteoprotegerina (OPG), um inibidor de RANKL. OPG liga-se ao RANKL tornando-o inacessível ao receptor RANK, impedindo a osteoclastogênese e a subsequente reabsorção óssea (42).

Por outro lado, os osteoblastos se diferenciam a partir das células estromais mesenquimais, através da ativação da via de sinalização *Wingless* (Wnt). Na presença do ligante Wnt, o receptor *Frizzled* (Fzd) e seu co-receptor LRP5 são ativados, inibindo a fosforilação citoplasmática de β -catenina pela quinase glicogênio sintase 3 β (GSK3 β). Assim, o nível citoplasmático de β -catenina aumenta e, conseqüentemente, ocorre a sua translocação para o núcleo onde promove a expressão de genes alvo. Na ausência do ligante Wnt, a GSK3 β fosforila constitutivamente a β -catenina, levando à sua ubiquitinação e degradação proteossômica. Na presença das proteínas inibidoras esclerostina ou *Dickkopf* (Dkk), os ligantes Wnt não podem acessar seus receptores para ativar a diferenciação dos osteoblastos (43). No processo de maturação, os osteoblastos tornam-se capazes de formar e mineralizar a matriz óssea e podem, ainda, se diferenciar em osteócitos, os quais são células fixadas na matriz óssea e responsáveis, entre várias funções, pela detecção do estresse mecânico. Esses mecanossensores, então, enviam sinais aos osteoblastos e osteoclastos direcionando a homeostase óssea (44) (Figura 1).

As citocinas pró-inflamatórias, especialmente, TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-17, presentes no processo de inflamação sinovial da AR, regulam positivamente a expressão de RANK em precursores de osteoclastos, bem como a produção de RANKL por FLS, células B e T ativadas e osteoblastos (45-47). Adicionalmente, os anti-CCPs presentes nos pacientes com AR são capazes de reconhecer a vimentina citrulinada expressa na superfície das células precursoras de

osteoclastos. A ligação dos anti-CCPs à superfície celular estimula a liberação de TNF- α que, por sua vez, aumenta a diferenciação dessas células em osteoclastos maduros, propagando ainda mais a resposta imune e a destruição das articulações (48). Além da osteoclastogênese excessiva, prejuízos na diferenciação e na função dos osteoblastos também participam do desenvolvimento da erosão óssea na AR. O TNF- α é um indutor potente da expressão de Dkk-1, sendo que Dkk-1 induz, adicionalmente, a expressão de esclerostina pelos osteócitos (49, 50).

Nota-se que quanto maior a gravidade da sinovite, mais extenso o processo erosivo (51). O controle incompleto da sinovite permite que as erosões ósseas mediadas pela diferenciação contínua de osteoclastos e pela disfunção de osteoblastos avancem, resultando em progressão de danos estruturais (52, 53). A inibição de citocinas através de bloqueadores de TNF e de IL-6, por exemplo, é uma das abordagens mais eficazes para retardar ou interromper o processo erosivo ósseo na AR e pode impedir a progressão da perda óssea sistêmica, tanto pela redução da sinovite, quanto pelos efeitos diretos sobre o processo de osteoclastogênese (54).

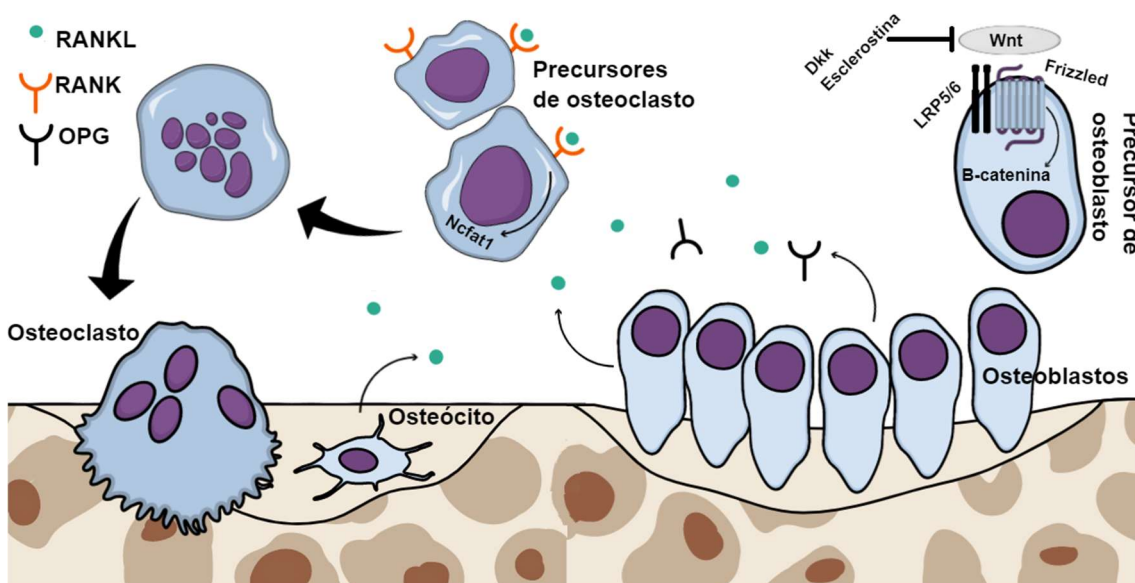


Figura 1. Células do tecido ósseo. Fonte: a autora.

2.2.2 Avaliação da progressão radiográfica

A avaliação do dano articular pode ser realizada através de métodos de imagem, principalmente por meio de radiografias. Essa metodologia também pode ser usada para documentar, quantificar e monitorar a quantidade e a localização da doença articular (55, 56). Existem diversos métodos para a avaliação quantitativa do dano articular a partir de

radiografias, sendo que os mais conhecidos são os métodos de Larsen, Sharp e Sharp van der Heijde. Atualmente o escore de Sharp modificado por van der Heijde é o método de referência utilizado na maioria dos ensaios clínicos e em estudos observacionais longitudinais (3).


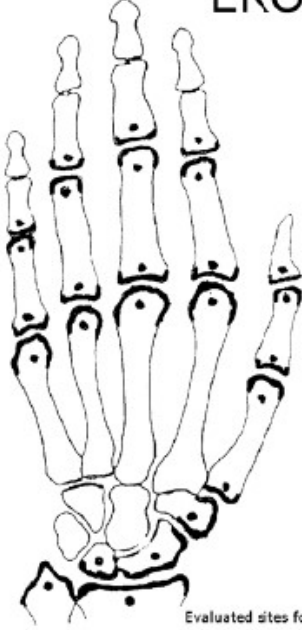
Os achados radiográficos demonstram os primeiros danos estruturais decorrentes da AR, geralmente, em mãos, pulsos e pés. Além disso, edema em tecidos moles, erosões marginais, osteopenia justa-articular e perda uniforme do espaço articular são frequentemente observados cedo no curso da AR. Nas mãos, as alterações da AR são observadas principalmente nas articulações metacarpo-falangeanas e interfalangeanas proximais, enquanto que nos pés, as alterações são mais comuns ocorrem nas articulações metatarso-falangeanas e interfalangeanas proximais (57).

O escore de Sharp van der Heijde avalia separadamente o grau de redução do espaço articular e o grau de erosão óssea, sendo que a somatória dos dois resulta no escore total, com pontuação máxima de 448. As erosões são avaliadas em 16 articulações de cada mão e punho – 5 metacarpo-falangeanas, 4 interfalangeanas proximais, interfalangeanas dos polegares, primeira carpo-metacarpiana, rádio e ulna, trapézio e trapezoide como uma unidade única, escafoide e semilunar – e em 6 articulações de cada pé – 5 metatarso-falangeanas e a primeira interfalangeana (Figura 2). O escore de erosão varia de 1 a 5, sendo que 1 corresponde a erosões discretas, progredindo até 5, que corresponde ao colapso completo do osso. Assim, o após o somatório, o escore de erosão é representado por valores de 0 a 160 nas mãos e de 0 a 120 nos pés. Nas articulações metacarpo-falangeanas, interfalangeanas proximais e interfalangeanas, avalia-se a porção distal e proximal da articulação e cada porção recebe um escore distinto, sendo que o escore máximo para erosão de uma articulação nos pés é de 10, mas somente de 5 nas mãos (3, 58).

Initials of the patient's name : _____
File CHUS : _____

Date : _____ Visit : 1 2 3 4 5

EROSIONS


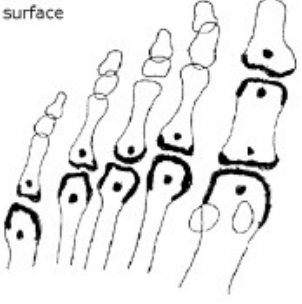


Score
Hands : _____
Feet : _____
Total : _____

SCORE

1 = Discreet lesion
2 to 4 = Surface dependant
3 = Reaches >50% of the joint surface
5 = Bone collapsus

P.S. The erosion noted
can be caused by R.A.
and arthrosis.



Evaluated sites for erosion (*) : 1 to 5

Evaluated sites for erosion (*) :
1 to 10 (5 for each side of the joint)

Signature of the evaluator

Date of the evaluation

Figura 2. Avaliação de erosões pelo escore de Sharp van der Heijde. Fonte: disponível em http://rheumatology.usherbrooke.ca/radiographie_formulaire.pdf. Último acesso em: 20/07/2020.

A redução do espaço articular é avaliada em 15 articulações de cada mão e punho – 5 metacarpo-falangeanas, 4 interfalangeanas proximais, terceira a quinta carpo-metacarpiana, trapézio-escafoide, capitato-escafoide e radio-carpal – e em 6 articulações de cada pé – 5 metatarso-falangeana e a primeira interfalangeana (Figura 3). A redução do espaço articular é avaliada juntamente com a subluxação e pontuada da seguinte forma: 0 = normal; 1 = focal ou duvidosa; 2 = generalizada, 50% do espaço articular acometido ou subluxação; 4 = anquilose ou

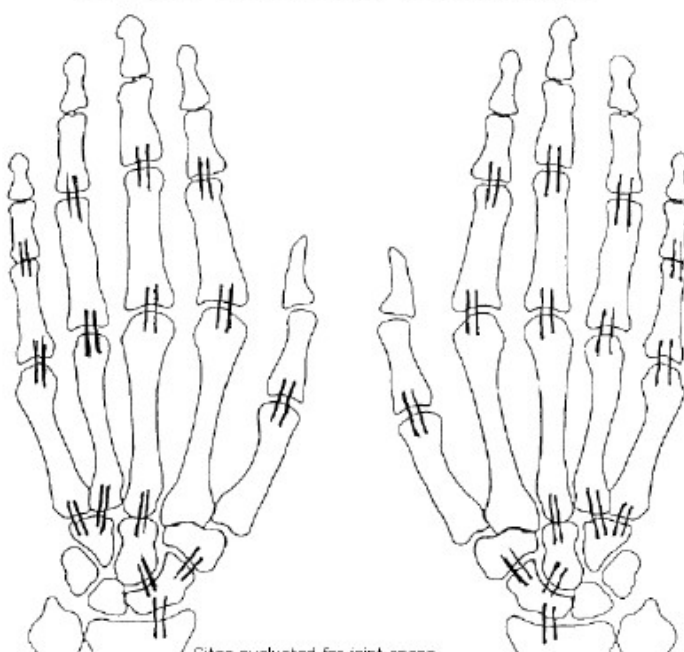
luxação completa. Após o somatório, o escore de redução do espaço articular é representado por valores que variam de 0 a 120 nas mãos e de 0 a 48 nos pés. O escore das mãos tem maior peso, uma vez que um número maior de articulações é avaliado, contabilizando 60% da avaliação final (3, 58).

Initials of the patient's name : _____ Date : _____ Visit : 1 2 3 4 5
 File CHUS : _____


JOINT SPACE NARROWING

Defined periarticular osteopenia

Score
 Hands : _____
 Feet : _____
 Total : _____



Sites evaluated for joint space narrowing (||) : 1 to 4



Sites evaluated for joint space narrowing (||) : 1 to 4

Signature of the evaluator

Date of the evaluation

Figura 3. Avaliação de redução do espaço articular pelo escore de Sharp van der Heijde. Fonte: disponível em http://rheumatology.usherbrooke.ca/radiographie_formulaire.pdf. Último acesso em: 20/07/2020.

2.2.3 Tratamento

As terapias medicamentosas para o tratamento da AR incluem uso de anti-inflamatórios não hormonais (AINH), corticoides, MMCD sintéticos convencionais, MMCD biológicos, MMCD sintéticos alvo-específicos e drogas imunossupressoras (59).

Imediatamente após o diagnóstico, deve ser iniciado o tratamento com os MMCD, tendo como meta a remissão, ou ao menos a indução da baixa atividade, avaliada por índices compostos de atividade da doença, formados a partir de uma combinação de informações como variáveis clínicas e laboratoriais e a impressão geral do paciente (60). A avaliação da atividade da doença, tanto nos ensaios clínicos quanto na prática clínica diária pode ser feita através do escore de atividade de doença-28 (*disease activity score-28* – DAS-28), o qual consiste da contagem de 28 articulações edemaciadas e dolorosas, além de um marcador inflamatório, como velocidade de sedimentação globular (VSG) ou proteína C-reativa (PCR). Ao fim, são gerados valores de corte específicos usados para classificar a AR como em remissão ou em um estado de atividade baixo, moderado ou alto (61).

Os MMDC correspondem ao metotrexato, hidroxiquina, leflunomida e sulfassalazina. A droga de primeira escolha para o tratamento da AR é o metotrexato, o qual deve ser prescrito, preferencialmente, em monoterapia no início do tratamento (59). O metotrexato corresponde a um agente imunomodulador cuja ação consiste na inibição da síntese de DNA, RNA, timidinato e proteínas. Os efeitos anti-inflamatórios do metotrexato na AR estão, possivelmente, relacionados com a modulação do metabolismo da adenosina e das vias de sinalização do TNF- α (62). Havendo contra-indicação, para o metotrexato, sulfassalazina e leflunomida podem ser utilizadas como primeira opção, visto que apresentam efeitos imunomodulatórios, seja na inibição da produção de prostaglandinas, de funções neutrofílicas e linfocitárias e de quimiotaxia, seja na atividade antiproliferativa sobre a síntese de pirimidina, respectivamente (59, 63, 64). Os antimaláricos, como difosfato de cloroquina e sulfato de hidroxiquina, devem ser indicados apenas para pacientes com formas leves e de baixo potencial erosivo (65). Seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, possivelmente envolvendo atividade anti-inflamatória, interferindo na função de enzimas lisossômicas, quimiotaxia, fagocitose de polimorfonucleares, produção de prostaglandinas, entre outros (66). Em casos excepcionais, como pacientes com hipersensibilidade a outros MMCD ou com hepatite viral, sais de ouro podem ser utilizados (65).

Doses baixas de corticoides oral têm efeito MMCD e melhoram a resposta clínica na fase inicial, enquanto os AINH são úteis para diminuir o processo inflamatório e a dor, principalmente no início da doença, devendo ser prescritos em associação aos MMCD (60). Já ciclofosfamida e

azatioprina, as quais são drogas imunossupressoras, podem ser utilizadas em pacientes com manifestações extra-articulares graves como vasculite e/ou envolvimento pulmonar (65, 67, 68).

Os pacientes que não alcançam resposta após a utilização de dois esquemas de MMCD sintéticos convencionais devem ser avaliados para o uso de MMCD biológicos e sintéticos alvo-específicos. Recomenda-se preferencialmente o uso de um MMCD biológico ou, alternativamente, um MMCD sintético alvo-específico combinado, em ambos os casos, com um MMCD sintético convencional (59). Os MMCD biológicos são direcionados a alvos extracelulares, como citocinas solúveis individuais, receptores de citocinas ou outros receptores de superfície celular (69). Os inibidores de TNF foram os primeiros a serem desenvolvidos, com a aprovação, em 1998, para o uso de etanercepte, que é a forma dimérica solúvel do receptor de TNF e inibe a interação da citocina com receptores de superfície celular. O infliximabe, o adalimumabe e o golimumabe são anticorpos monoclonais anti-TNF, enquanto o certolizumabe consiste de um fragmento Fab de um anticorpo anti-TNF humanizado conjugado a moléculas de polietilenoglicol (70). Na presença de contraindicações ou em situações clínicas individualizadas, a terapia biológica pode ser iniciada com outros MMCD biológicos, como moduladores da co-estimulação da célula T (abatacepte) e anticorpos contra o receptor da IL-6 (tocilizumabe) (71-73).

Mais recentemente, houve a aprovação para o uso terapêutico dos inibidores de Janus quinases (*Janus kinase* – JAK), como o tofacitinibe, denominados MMCD alvo-específicos (74). Diferentemente dos MMCD biológicos, eles possuem ação a nível intracelular, com a inibição da fosforilação e da ativação de JAK, levando à diminuição da produção de citocinas e à modulação da resposta imune. Ainda, há o MMCD biológico depletor de células B denominado rituximabe, o qual é formalmente aprovado para o tratamento da AR somente após a falha de inibidor de TNF e tem sido usado como tratamento de terceira linha nessa estratégia terapêutica (59).

2.3 Miocinas

As miocinas são citocinas ou peptídeos sintetizados e liberados pelo tecido muscular em resposta a contrações musculares (75). O termo "miocina" foi introduzido pela primeira vez em 2003 (76). As miocinas estão implicadas na regulação autócrina do metabolismo dos músculos, bem como na regulação parácrina/endócrina de outros tecidos e órgãos, através de seus receptores. A comunicação entre osso e músculo, por exemplo, tem a mecanotransdução como um mecanismo reconhecidamente importante. No entanto, a interação mecânica não explica completamente a relação entre esses dois tecidos. Nesse sentido, várias evidências indicam que

o músculo esquelético, dada a sua atuação como um órgão endócrino, produz e libera miocinas que exercem alguma influência sobre os ossos (77).

Desde a identificação da miostatina em 1997, o secretoma do meio de cultura de miócitos humanos revelou mais de 600 miocinas. No entanto, a maioria dessas miocinas ainda não está suficientemente caracterizada e apenas algumas têm sua atividade e função biológica descritas. Compreender os papéis biológicos e fisiológicos das miocinas em condições de atrofia ou fraqueza do músculo esquelético, bem como em doenças sistêmicas é importante para o estudo de novos alvos de intervenção terapêutica (78).

2.4 Irisina

A irisina foi, primeiramente, descrita por Boström et al. em 2012, como uma miocina capaz de estimular a conversão do tecido adiposo branco em tecido adiposo marrom em resposta ao exercício. Nesse contexto, ressalta-se a importância de PGC1- α (*PPAR γ coactivator-1 α*), um coativador transcricional que medeia muitos dos eventos moleculares induzidos pelo exercício. Nas fibras musculares esqueléticas, PGC1- α regula a expressão do gene *Fndc5* (*fibronectin type III domains containing protein 5*), o qual codifica uma proteína de membrana que é processada proteoliticamente para formar a irisina. Consistindo em um polipeptídeo de 111 aminoácidos, a irisina madura é, então, secretada na circulação sanguínea (79). Recentemente, foi descrito um receptor de irisina em osteócitos, nos quais demonstrou-se que a ligação da irisina ocorre diretamente na integrina $\alpha V/\beta 5$ (80). Em seguida, a irisina atua principalmente através das vias de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases* – MAPK) em vários processos celulares (Figura 4).

A avaliação da sinalização da irisina demonstrou, inicialmente, que essa miocina estimula o tecido adiposo branco a adotar um fenótipo semelhante ao tecido adiposo marrom através do aumento da densidade mitocondrial celular e da expressão da proteína desacopladora 1 (*uncoupling protein 1* – UCP1). Esse processo de diferenciação desencadeia a termogênese, aumentando o gasto total de energia corporal e melhorando a homeostase da glicose (10).

Posteriormente, verificou-se que outros tecidos, além do tecido adiposo, também são alvos da irisina. Existe uma regulação autócrina da irisina no músculo esquelético, como um fator pró-miogênico, bem como uma ação da anabólica da irisina sobre o tecido ósseo.

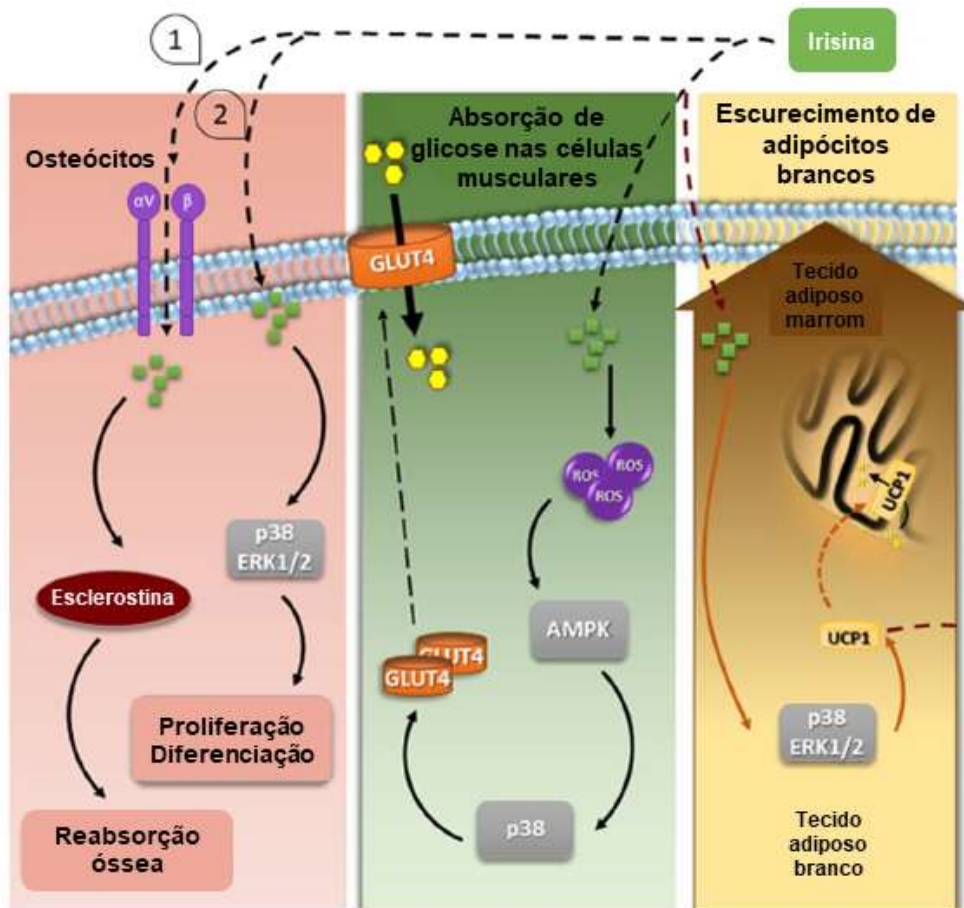


Figura 4. Sinalização da irisina. Adaptado de Rabiee et al, 2020 (81).

2.4.1 Irisina e tecido muscular esquelético

A irisina é uma miocina induzida pela contração do músculo esquelético com implicações e efeitos benéficos atribuídos ao exercício físico (82). O fato de ser predominantemente expressa no músculo levantou a hipótese de que a irisina, assim como outras miocinas, poderia influenciar o metabolismo das células musculares (83).

De fato, verificou-se aumento tanto na expressão gênica quanto na secreção de irisina durante o processo de diferenciação das células satélites responsáveis pela regeneração muscular (83). No mesmo sentido, o tratamento de células musculares murinas com irisina induz a expressão de genes pró-miogênicos e de resposta ao exercício, que favorecem a ativação do processo de regeneração (9). A promoção da proliferação de células musculares pela irisina demonstrou relação com o aumento na expressão de CCL7, e a diferenciação desses miotubos apresentou aumento concomitante com a expressão de IL-6 e com a ativação de suas cascatas de sinalização subsequentes (9, 84). A IL-15, por outro lado, parece não influenciar a expressão gênica e na liberação de irisina *in vivo* (85).

Ainda como um fator anabólico, a irisina é capaz de ativar vias de síntese proteica como Akt (*protein kinase B*), mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e Erk (*extracellular-signal-regulated kinase*), culminando no aumento significativo na expressão de miosina de cadeia pesada (MyHC) (9, 83, 86). Simultaneamente, a irisina é capaz de diminuir a expressão de reguladores negativos do crescimento muscular como a miostatina e as enzimas do sistema ubiquitina-protossomo Atroquina-1 e MuRF-1 (*muscle ring finger-1*) (9, 86, 87).

O aumento da captação de glicose, através do estímulo à translocação de transportadores de glicose tipo 4 (GLUT4) e o aumento da biogênese mitocondrial são algumas das ações da irisina sobre o metabolismo de células musculares (88, 89). Inicialmente, o tratamento com irisina estimula glicólise como fonte de energia, até que o conteúdo mitocondrial seja suficientemente aumentado para suportar as demandas energética por meios oxidativos, indicando uma correlação entre o padrão de expressão autócrina induzida por Fndc5/irisina e o conteúdo mitocondrial no músculo esquelético (90, 91).

Experimentos em camundongos confirmam a potencial ação autócrina da irisina, devido à presença de maior número de fibras musculares positivas para Fndc5 após tratamento com irisina recombinante (r-irisina) em comparação com controles (92). Além disso, administração de r-irisina provoca aumento no peso dos músculos, na área de secção transversa das fibras e na força de preensão palmar em camundongos tratados, sem alteração no consumo alimentar (9). Em modelos animais de perda muscular por denervação e por suspensão pelos membros posteriores, o tratamento com r-irisina é capaz de prevenir a redução no peso muscular, de aproximadamente 63%, e a atrofia de fibras, além de induzir aumento na ativação das células satélites e reduzir a degradação proteossomal de proteínas (9, 91). Assim como no estudo com células musculares, quando camundongos submetidos à suspensão são tratados com r-irisina, não há diminuição da expressão de MyHC do tipo 2 nesses animais, como ocorre nos animais não tratados. MyHC 2A, MyHC 2X e MyHC 2B, classificadas nesta sequência da isoforma mais lenta à mais rápida, foram avaliadas e verificou-se que o tratamento com r-irisina aumentou a expressão gênica de MyHC 2X em relação aos controles (9, 91).

Somado aos dados provenientes de estudos em células e em modelos animais, em humanos, os níveis de irisina podem representar um potencial biomarcador para disfunção muscular, auxiliando na detecção da sarcopenia, no planejamento de estratégias de monitoramento de alterações musculares relacionadas à idade e na tomada de decisões para fins clínicos e terapêuticos (93).

Foram descritos níveis circulantes de irisina significativamente menores em indivíduos sarcopênicos e pré-sarcopênicos do que em indivíduos não-sarcopênicos, tanto em uma população de 18-90 anos incluindo ambos os sexos, quanto em uma amostra de mulheres na pós-menopausa. Além disso, os níveis de irisina foram inversamente correlacionados com a idade e positivamente correlacionados com a massa magra apendicular/altura², com a força de prensão manual e com o índice de massa muscular avaliado pela área da seção transversal do músculo quadríceps/peso corporal (93, 94). Também foi encontrada correlação positiva entre irisina e força de prensão manual em mulheres jovens com excesso de peso (95). Por outro lado, outros estudos reportaram não haver diferença nos níveis séricos de irisina entre indivíduos com sarcopenia e aqueles sem sarcopenia, bem como ausência de correlação entre a irisina circulante e a massa muscular esquelética (96, 97).

Em modelo animal de falência cardíaca, caracterizado por inflamação e atrofia muscular, as concentrações séricas de TNF- α e irisina estiveram negativamente correlacionadas. Adicionalmente, em modelo de perda muscular por injeção de TNF- α , houve redução de 53% e 28% na expressão gênica e proteica de Fndc5, respectivamente, em comparação com os controles. Já em cultura de células musculares, a incubação com TNF- α , IL-1 β ou uma combinação de ambas resultou em uma redução significativa da expressão gênica de Fndc5 e de PGC-1 α (87).

Para determinar se a irisina exerce efeitos miogênicos durante condições atroficas causadas por um glicocorticoide, células musculares foram tratadas com dexametasona. A adição de irisina aboliu a redução na ativação do receptor de fator de crescimento semelhante à insulina (*Insuline-like growth factor-1* – IGF-1) provocada pela dexametasona. Da mesma maneira, a irisina preveniu o aumento da expressão de atrogina-1 e MuRF-1 induzido pela dexametasona. A avaliação da atividade do tipo quimotripsina do proteossomo 26S, considerada representativa da capacidade proteolítica, demonstrou que o tratamento com r-irisina reduziu a atividade proteossomal basal e atenuou também a atividade proteossomal elevada pelo tratamento com dexametasona nas células musculares, além de atuar na preservação do tamanho do miotubo (86).

2.4.2 Irisina e tecido ósseo

A miocina irisina tem demonstrado ser um mediador molecular crucial na conectividade entre os tecidos muscular e ósseo. Inicialmente, a ação da irisina sobre o tecido ósseo foi descrita quando o meio condicionado coletado de mioblastos de camundongos exercitados – portanto

com expressão aumentada de irisina – induziu a diferenciação *in vitro* de osteoblastos em maior extensão do que o meio condicionado coletado de camundongos alojados em repouso. Os osteoblastos diferenciados, ainda, aumentaram a expressão de fosfatase alcalina e de colágeno tipo I por um mecanismo dependente de irisina (98).

Interessantemente, verificou-se que o tecido ósseo é mais sensível à irisina do que as células adiposas. A injeção de r-irisina em camundongos em uma dose semanal baixa (100 µg/kg) estimulou o aumento de massa óssea cortical, bem como de força óssea, sem afetar o compartimento trabecular. Esta ação anabólica foi mediada principalmente pela estimulação da osteoblastogênese, mas também pela diminuição do número de osteoclastos. Uma dose semanal mais alta de irisina (3.500 µg/kg) causou diferenciação do tecido adiposo branco em marrom, o que não foi observado em injeção de dose baixa de r-irisina (92).

Assim, buscou-se avaliar os potenciais efeitos do tratamento com irisina em modelos animais de perda óssea. Na osteoporose induzida por desuso, através da suspensão pelos membros posteriores, demonstrou-se diminuição não apenas da diferenciação de osteoblastos, mas também da expressão de *Fdnc5* em camundongos (99). Já tratamento com irisina recombinante nesses animais evitou a perda óssea no protocolo preventivo (administração durante a suspensão) e induziu a recuperação da massa óssea no protocolo curativo (administração após a suspensão). Ademais, a análise do fêmur por microtomografia mostrou que o tratamento com r-irisina preservou a densidade mineral óssea cortical e trabecular (91). A redução da densidade mineral óssea trabecular também foi identificada em modelo de perda óssea por denervação e prevenida pela irisina (100).

Da mesma maneira que o tratamento *in vivo* com irisina, o nocaute do gene *Fdnc5* em camundongos promoveu aumento significativo na massa óssea trabecular femoral, em comparação com animais controles, embora não tenha havido diferenças nos índices de osso cortical. Na presença de osteoporose induzida por ovariectomia, os camundongos nocautes para *Fdnc5* foram notavelmente resistentes à perda de osso trabecular (80). Os achados relacionados à deleção do gene *Fdnc5*, tanto em animais saudáveis quanto em animais com osteoporose estão relacionados com a sinalização de RANKL – no primeiro caso, os ossos de camundongos nocaute apresentaram expressão gênica de RANKL significativamente menor, enquanto no segundo caso a expressão gênica RANKL permaneceu inalterada, em relação aos controles (80, 100).

Uma vez que a irisina provocou diminuição da expressão de RANKL a partir de osteoblastos primários de camundongos, avaliou-se a modulação pela irisina também em

cultura de células precursoras de osteoclastos e em monócitos de camundongos (100, 101). Os resultados mostraram que a irisina promove a proliferação, mas inibe a diferenciação em células precursoras de osteoclastos. Adicionalmente, verificou-se que r-irisina pode inibir a ativação do fator nuclear- κ B (*nuclear factor kappa B* – NF- κ B) induzida por RANKL (101).

Alterações em vias de sinalização decorrentes do tratamento *in vivo* com a irisina incluem aumento na expressão de β -catenina, mediador chave na diferenciação de osteoblastos e na formação óssea, assim como a neutralização da diminuição de β -catenina induzida pelo modelo de suspensão pelos membros posteriores (99). Ainda nesse modelo, e também em linhagem celular de osteócitos, a irisina impediu a redução de osteócitos viáveis, bem como a ativação das caspases 9 e 3, prevenindo a apoptose dessas células (80, 102). Na osteoporose estabelecida por ovariectomia, a irisina foi capaz de restaurar os níveis de séricos de fosfatase alcalina e os níveis ósseos de TNF- α e de IL-6 nos animais doentes a níveis próximos ao grupo controle. Além disso, genes envolvidos na osteoblastogênese também apresentaram expressão aumentada em culturas de células estromais da medula óssea, subsequente ao tratamento com r-irisina. A ativação desses genes foi sucedida pela fosforilação da via de sinalização Erk, o que caracteriza uma ação direta mediada por receptor na estimulação da formação óssea (92, 103).

A tentativa de identificação do receptor de irisina no tecido ósseo, através de análise proteômica quantitativa em linhagem de osteócitos, identificou a integrina β 1 como candidata. A integrina α V é a mais abundante nos osteócitos, seguida pelas integrinas β 1, α 5, β 5 e β 3, razão pela qual os experimentos posteriores foram concentrados na avaliação de integrina α V/ β 1, α V/ β 3, α V/ β 5 e α 5/ β 1. Ao final, sugeriu-se que, a partir desses dados, que um subconjunto de integrinas, especialmente α V/ β 5, são receptores funcionais da irisina em osteócitos (80).

Por fim, estudos em pacientes demonstraram correlação positiva entre os níveis circulantes de irisina e a densidade mineral óssea. Reportou-se, também, diminuição de irisina sérica em condição de osteoporose, em indivíduos de meia-idade e idosos, e em mulheres na pós-menopausa (104, 105). Nível mais baixo de irisina sérica foi associado a fraturas osteoporóticas prévias, em mulheres na pós-menopausa e em indivíduos com sobrepeso, e ao risco aumentado de fratura de quadril em mulheres idosas (106-108).

2.4.3 Irisina e doenças reumáticas

Um possível papel anti-inflamatório da irisina é alcançado por muitos mecanismos, incluindo supressão da expressão de NF- κ B, TNF- α , IL-1 β , o que pode ter relevância no combate ao processo inflamatório na AR (87, 101).

Em pacientes com osteoartrite (OA) de joelho houve redução significativa da irisina sérica e níveis elevados de PCR em comparação com controles saudáveis. A atividade de doença, no entanto, apresentou aumento no grau de severidade à medida que os níveis de irisina diminuíram. Utilizando o sistema de classificação Kellgren e Lawrence em radiografias, pacientes com grau de severidade 4 apresentaram níveis significativamente mais baixos de irisina no soro e no líquido sinovial, bem como níveis mais altos de PCR sérica, do que aqueles com graus 2 e 3; essas diferenças também foram observadas em pacientes com OA de joelho com grau 3 em comparação com aqueles com grau 2 (109).

Resultados conflitantes foram reportados em pacientes com psoríase. Foram observados níveis séricos de irisina significativamente maiores em pacientes com psoríase, em comparação com indivíduos controles, e correlação positiva com a PCR, destacando que a irisina poderia ser um indicador de inflamação na psoríase. No entanto, não foram encontradas correlações significativas entre irisina e índice de severidade da doença, indicadores de distúrbios metabólicos ou índice de massa corporal (IMC) (110). Por outro lado, também foram reportados níveis séricos de irisina significativamente menores em pacientes com psoríase e associados com atividade de doença e perfil lipídico (111).

Em pacientes com fibromialgia, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis séricos de irisina em comparação com controles, nem associação com a atividade da doença ou marcadores inflamatórios (112). Já em doença de Behçet, os níveis séricos de irisina foram significativamente menores nos pacientes do que no grupo controle, e correlacionados negativamente com um indicador de aterosclerose subclínica (113).

Na AR os níveis séricos de irisina foram inversamente correlacionados com a atividade da doença (DAS28-VSG), sugerindo um possível papel anti-inflamatório da irisina nesses pacientes (114, 115). Em um estudo conduzido na Rússia, foram incluídos 110 pacientes com AR e 60 indivíduos saudáveis como grupo controle. Através dos níveis séricos de irisina médios no grupo controle, que foram de $20,49 \pm 4,82 \mu\text{g/ml}$, os autores estabeleceram que valores entre 10,85 e $30,13 \mu\text{g/ml}$ seriam considerados normais, com base nos valores de média \pm dois desvios padrões. Assim, 37% dos pacientes com AR apresentaram baixos níveis séricos de irisina, além de maior grau de manifestações extra-articulares, duração da doença de 5 a 10 anos e menor nível de vitamina D. Além disso, houve também associação entre o nível de irisina sérica e a presença de fraturas ósseas na anamnese (114).

Outro estudo em AR buscou avaliar a associação entre níveis séricos de irisina e qualidade do sono. As concentrações séricas de irisina foram negativamente associadas aos

escores totais do Índice de Qualidade do Sono de Pittsburgh, sendo que os pacientes com qualidade do sono ruim apresentaram níveis de irisina significativamente mais baixos que pacientes com boa qualidade de sono ($79,7 \pm 35,5$ vs $173,34 \pm 67,06$ ng/ml). Os níveis de irisina nos pacientes com AR foram significativamente menores do que nos controles saudáveis ($326,3 \pm 148,1$ ng/ml), e associados negativamente com a duração da doença ($r = -0.263$, $p = 0.04$) e com a duração da rigidez matinal ($r = -0.348$, $p = 0.006$) (115).

Recentemente, dados preliminares apresentados no Congresso Europeu de Reumatologia (*European Congress of Rheumatology – EULAR*) em 2020 demonstraram correlação negativa entre o nível sérico de irisina e os parâmetros de risco cardiovascular, além de níveis significativamente menores em pacientes do que em controles (9.84 ± 10.56 vs 20.48 ± 13.82 ng/ml) e correlação negativa entre irisina e atividade de doença ($r = -0.455$, $p = 0.005$) e incapacidade ($r = -0.309$, $p = 0.016$). Apesar da importância da irisina como miocina expressa no músculo esquelético e no tecido ósseo, não há estudos em pacientes com AR reportando a associação entre os níveis de irisina e sarcopenia e erosão óssea.

2.5 Miostatina

A miostatina, um membro da superfamília do fator de crescimento transformador- β , foi descrita em 1997, quando McPherron e colaboradores relataram pela primeira vez que camundongos nocaute para o gene de miostatina apresentavam massa muscular significativamente maior em comparação com animais controles (116). A miostatina é expressa, principalmente, no músculo esquelético e funciona como um regulador negativo do seu crescimento, mas também é secretada para a circulação e atua de forma sistêmica (116).

A deficiência de miostatina provoca aumento da massa muscular, enquanto o aumento na sua expressão leva à atrofia muscular. Para exercer seus efeitos, a miostatina se liga e ativa o receptor de activina tipo IIB (ActRIIB). A ativação leva ao recrutamento de um co-receptor tipo I, como ALK-4, ALK-5 que, por sua vez, é fosforilado pelo ActRIIB. O complexo receptor ativado leva à fosforilação de Smad2 e Smad3 que formam um complexo com Smad4. O complexo Smad2/3/4 então, transloca-se para o núcleo e regula a expressão de genes, como fatores reguladores miogênicos. Em adição ao seu papel fundamental na homeostase muscular a atuação da miostatina em outros tecidos, como o ósseo e o adiposo, é bem descrita (117) (Figura 5).

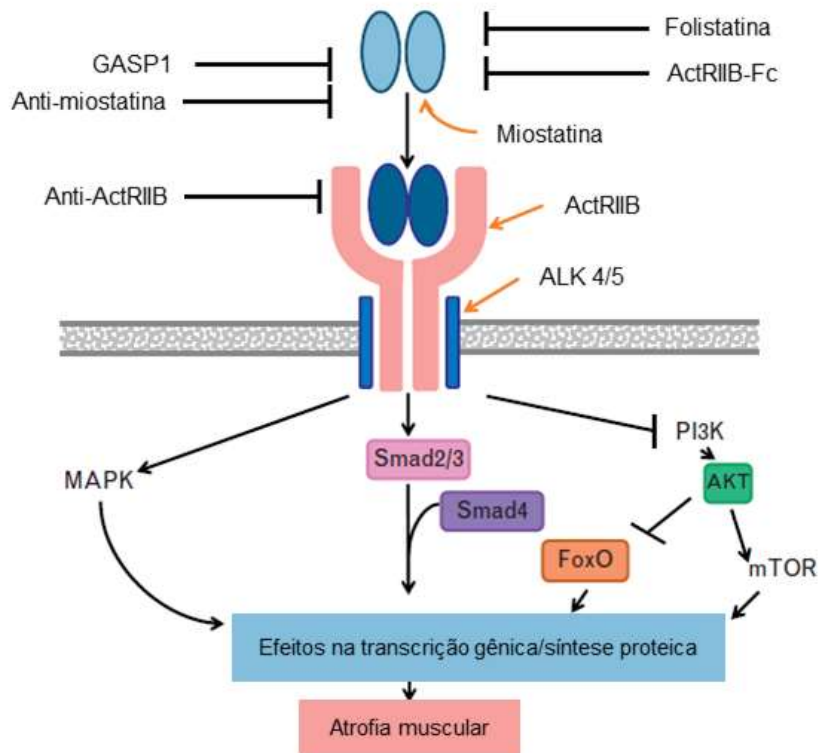


Figura 5. Sinalização da miostatina. Adaptado de Smith et al, 2013 (118).

2.5.1 Miostatina e tecido muscular esquelético

A miostatina é, reconhecidamente, um inibidor do crescimento muscular, e o seu bloqueio, não só por nocaute gênico, mas também pela administração de anticorpo neutralizador ou de receptor solúvel de miostatina, leva a um aumento na massa muscular (119-121). Como tratamento em modelos animais de perda muscular, por imobilização dos membros posteriores e em condições de microgravidade, o bloqueio da ação da miostatina é capaz de atenuar a atrofia muscular e a perda de capacidade funcional, embora em modelo de denervação a atrofia não tenha sido diminuída (122-124). Curiosamente, o efeito da miostatina sobre a massa muscular está relacionado com a composição do tecido por diferentes tipos de fibras. É possível distinguir quatro tipos principais de fibras musculares, chamados tipo 1, 2A, 2X e 2B, com base na presença de isoformas específicas MyHC: MyHC-1 de contração lenta, codificada pelo MYH7; MyHC-2A, codificada por MYH2; MyHC-2X, codificada por MYH1; e MyHC-2B, codificada por MYH4. Essas fibras também diferem no metabolismo oxidativo/glicolítico, sendo as fibras do tipo 1 e 2A mais oxidativas e as fibras do tipo 2B mais glicolíticas. Essas quatro populações de fibras estão presentes em camundongos, ratos e muitas

outras espécies de mamíferos, no entanto, apenas as fibras do tipo 1, 2A e 2X estão presentes na maioria dos músculos humanos (125).

Em camundongos jovens, a inibição de miostatina por nocaute gênico favorece a transição do tipo de fibra de lenta para rápida. Além do aumento na quantidade de fibras tipo 2B, e diminuição concomitante das fibras tipo 2A e tipo 1, esses animais apresentam como consequência funcional o aumento da suscetibilidade à fadiga (126, 127). Portanto, músculos dos camundongos nocautes para miostatina, embora maiores e mais fortes, fatigam extremamente rápido, devido à alteração do metabolismo muscular de aeróbico para anaeróbico. A fadiga muscular aumentada também ocorre quando a miostatina é inibida no animal adulto, embora, nesse caso, não haja efeito sobre a distribuição do tipo de fibra (128). O cultivo de células musculares derivadas de camundongos nocautes para miostatina, resulta em diminuição no número de miotubos nascentes de contração lenta, indicando redução da expressão de MyHC de fibras lentas durante a miogênese (127). Já o tratamento de mioblastos primários com inibidor de miostatina ou com seu receptor solúvel leva ao aumento da expressão de MyHC de fibras lentas e à inibição da expressão de MyHC de fibras rápidas, após a diferenciação (127).

Por outro lado, em camundongos idosos, a inibição de miostatina por anticorpo neutralizante induziu aumento no peso muscular devido à hipertrofia seletiva de fibras com fenótipo glicolítico, sendo que o músculo hipertrófico apresentou propriedades contráteis normais (129). Ainda, camundongos idosos apresentaram aumento na força de preensão, após a inibição da miostatina (130).

A regeneração muscular é regulada negativamente pela miostatina e isso está relacionado, em parte, com a inibição de myoD, um marcador de proliferação das células satélites musculares. O tratamento com miostatina leva à falha da diferenciação de mioblastos em miotubos por conta da interação entre Smad3 e o promotor de myoD e por conta da poliubiquitinação e degradação de myoD pelo proteossomo (131-133). *In vivo*, também observou-se aumento na expressão proteica de enzimas do sistema ubiquitina-proteossomo como consequência do tratamento com miostatina, enquanto a hipertrofia muscular causada pelo nocaute gênico ou pela neutralização da miostatina foi relacionada ao aumento na expressão proteica de myoD e à diminuição da ativação do proteossomo (126, 129, 132). O efeito sobre a regeneração parece envolver a ativação de células satélite e não o seu conteúdo, uma vez que a inibição da miostatina por nocaute não promove alteração no conteúdo de células satélites durante a idade adulta e não torna esses animais resistentes à sarcopenia (134).

Adicionalmente, a degradação proteica pela autofagia em células musculares foi potencializada após tratamento com miostatina, com efeitos sobre a formação de autofagossomos (135).

Um efeito catabólico adicional da miostatina, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, se refere ao seu antagonismo a vias de síntese proteica, uma vez que a hipertrofia subsquente à deficiência de miostatina é resultado de um aumento na ativação da sinalização de IGF-1/PI3K/AKT (132, 136, 137).

Em humanos, níveis circulantes elevados de miostatina costumam estar associados com desfechos negativos. Estudos que reportam níveis de miostatina entre os sexos, apresentam dados conflitantes. Foram detectados níveis séricos de miostatina maiores em homens do que em mulheres e esses níveis correlacionaram-se positivamente com a velocidade da marcha após o ajuste por sexo (138). Em contraste, quando encontrados níveis plasmáticos de miostatina mais altos em mulheres do que os homens, esses níveis foram negativamente correlacionados com a força de prensão em mulheres (139). Embora alguns estudos tenham relatado elevações significativas nos níveis séricos de miostatina com o avanço da idade, outros estudos falharam em apoiar esses achados, culminando em resultados variáveis entre as faixas etárias, tanto entre homens quanto entre mulheres (140-142). Em camundongos, por outro lado, os níveis circulantes de miostatina demonstraram redução progressiva com o envelhecimento (143).

Crítérios como baixa massa muscular, sarcopenia e fragilidade já foram associados aos níveis séricos de miostatina em homens, embora essas associações não tenham sido significativas em mulheres (144-147). Inversamente, a ausência de correlação entre índice de massa muscular e os níveis de miostatina também já foi reportada (148).

2.5.2 Miostatina e tecido ósseo

Assim como no tecido muscular, a miostatina tem apresentado efeitos reguladores negativos sobre o remodelamento do tecido ósseo. Em experimentos *in vitro*, a miostatina demonstrou efeitos inibitórios sobre a proliferação, diferenciação e mineralização de células progenitoras osteoblásticas, através do aumento na expressão de inibidores de Wnt (149, 150). Adicionalmente, há supressão de miR-218 em osteócitos pré-tratados com miostatina e em seus exossomos derivados, os quais podem ser absorvidos pelas células osteoblásticas, resultando em uma redução acentuada da sua diferenciação (150). A avaliação do papel dos diferentes receptores de activina, os quais são ativados pela ligação da miostatina, demonstrou que a regulação negativa da osteoblastogênese ocorre predominantemente através do receptor ActRIIA (121).

A reabsorção óssea tem a miostatina como um regulador direto devido a sua ação positiva sobre a diferenciação de osteoclastos. Mais especificamente, a ligação simultânea de RANKL e de miostatina nos precursores de osteoclastos levam à fosforilação de Smad2, a qual potencializa a expressão intracelular do fator Nfatc1, estimulando a diferenciação em osteoclastos maduros (8, 150).

In vivo, a injeção intraperitoneal de miostatina recombinante reprimiu a formação e acelerou a reabsorção óssea em camundongos (150). Por outro lado, a inibição de miostatina por meio da injeção de receptores solúveis em camundongos, foi relacionada com o aumento do volume e da densidade mineral óssea, e também de marcadores séricos de formação óssea (119, 120). Um estudo reportou que o aumento do volume ósseo está presente em consequência da injeção de receptor solúvel, mas não em decorrência da injeção de anticorpo neutralizante de miostatina, sugerindo a existência de outros possíveis ligantes, além da miostatina, que desempenham papel na regulação da massa óssea (120). No mesmo sentido, a ausência do gene da miostatina em modelos de camundongos nocaute resulta em aumento da osteogênese (151, 152). Dados opostos também já foram reportados, onde a neutralização de miostatina não ocasionou alterações no volume ósseo ou no número de osteoblastos e osteoclastos (153).

O envelhecimento promoveu aumento na expressão proteica de miostatina nos sobrenadantes de culturas de células estromais da medula óssea de camundongos (154). Já o tratamento de camundongos idosos com um anticorpo neutralizador de miostatina é capaz de levar ao aumento do volume ósseo trabecular, além de estimular a formação e reduzir a reabsorção óssea (150).

Vista a influência da miostatina sobre o tecido ósseo, foi investigada a sua associação com o metabolismo ósseo e humanos. Em concordância com os resultados observados em células e em animais, foram reportados níveis plasmáticos de miostatina negativamente associados com a densidade mineral óssea e positivamente associados com marcadores circulantes de reabsorção óssea (149). No entanto, estudos também demonstraram ausência de associação entre a miostatina circulante e a densidade mineral óssea e marcadores séricos de formação óssea em populações idosas (148, 155).

2.5.3 Miostatina e doenças reumáticas

Além dos seus efeitos negativos sobre a homeostase dos tecido muscular e ósseo, a miostatina já foi correlacionada positivamente com níveis de citocinas pró-inflamatórias, o que a caracteriza como um potencial marcador para avaliação de desfechos na AR (156).

Em um estudo com 24 mulheres com AR em remissão, com idade média de 61 anos, detectou-se níveis séricos de miostatina significativamente menores do que em indivíduos controles. Além disso, níveis séricos de miostatina mais altos foram associados a menor força de preensão e a maior incapacidade física. Os autores especularam que, visto que maior parte dos pacientes usavam MMCD biológicos, é possível que essas terapias tenham apresentado efeito positivo em reguladores da massa muscular, influenciando na diminuição da secreção da miostatina (157).

Similarmente, em modelo de artrite induzida por antígeno em coelhos observou-se diminuição da miostatina sérica em comparação aos animais controles, com concomitante redução na expressão de miostatina na sinóvia e no músculo gastrocnêmio (158). No entanto, reportou-se também, em modelo de artrite induzida por colágeno em ratos, expressão proteica de miostatina inalterada no músculo gastrocnêmio, em comparação aos animais controles (159).

Em contrapartida, a análise de membranas sinoviais de pacientes com AR demonstrou alta expressão de miostatina, predominantemente nos FLS, enquanto poucas células expressando miostatina foram encontradas nos tecidos sinoviais de pacientes com OA. Esse achado foi reproduzido na artrite de camundongos transgênicos para o TNF humano, nos quais houve aumento na expressão de miostatina nos tecidos sinoviais em comparação com controles. Esses dados sugeriram que o ambiente inflamatório da sinóvia de pacientes com AR, e de camundongos artríticos, leva a uma regulação positiva da miostatina nas células sinoviais. No mesmo sentido, a estimulação de FLS isolados de indivíduos com OA ou com AR com TNF- α , IL-1 e IL-17 resultou em alta expressão de miostatina. Subsequentemente, para verificar se a expressão de miostatina na articulação sinovial contribui diretamente na reabsorção óssea mediada por osteoclastos, foi realizado o experimento de co-estimulação de células precursoras de osteoclastos com RANKL e miostatina e observou-se aumento significativo na capacidade de precursores em se diferenciarem em osteoclastos maduros. O nocaute gênico de miostatina ou a inibição mediada por anticorpos, por sua vez, reduziu gravidade da artrite experimental, principalmente por menor destruição óssea mediada pela osteoclastogênese. Por fim, demonstrou-se que o efeito da miostatina no desenvolvimento de osteoclastos é mediado pela

fosforilação e ligação de Smad2 ao Nfatc1, e consequente aumento da translocação de Nfatc1 para o núcleo, promovendo regulação positiva dos genes de diferenciação dos osteoclastos (8).

Além da alta expressão de miostatina na sinóvia de pacientes com AR estar relacionada com a osteoclastogênese, há um papel regulador positivo na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e de TNF- α (160, 161). A análise do líquido sinovial demonstrou níveis aumentados e positivamente correlacionados de miostatina e de IL-1 β na AR, em comparação com pacientes com OA. Especificamente, na cultura de FLS isolados desses pacientes, a miostatina promoveu aumento na expressão gênica e proteica de IL-1 β de maneira dose-dependente, através das vias de sinalização ERK, JNK e AP-1. Alta expressão de miostatina e de IL-1 β foi confirmada também nas articulações de camundongos com artrite induzida por colágeno (160). Em adição à IL-1 β , níveis de miostatina também foram positivamente correlacionados com a expressão de TNF- α em FLS de pacientes com AR. O tratamento da cultura de FLS com miostatina levou a aumento na expressão gênica e proteica de TNF- α de maneira dose dependente, através da via de sinalização PI3K-Akt- AP1 (161).

A avaliação dos níveis de miostatina em pacientes com OA, demonstrou maior concentração sérica de miostatina nesses pacientes do que em indivíduos controles. Ainda, pacientes com maior grau de severidade de doença apresentaram maiores concentrações de miostatina no soro e no líquido sinovial em comparação com aqueles com menor grau (162). Em modelo animal de OA, a expressão de miostatina no músculo gastrocnêmio não se mostrou alterada, no entanto (163).

3 MARCO CONCEITUAL

Estudos demonstram que algumas miocinas apresentam efeitos sobre o metabolismo do tecido ósseo. Visto que a AR é uma doença na qual os pacientes são acometidos pela erosão óssea, é válida a investigação a respeito dos níveis de irisina e de miostatina nesses pacientes. Dessa maneira, pode-se entender, ao menos parcialmente, o papel dessas miocinas no curso da doença.

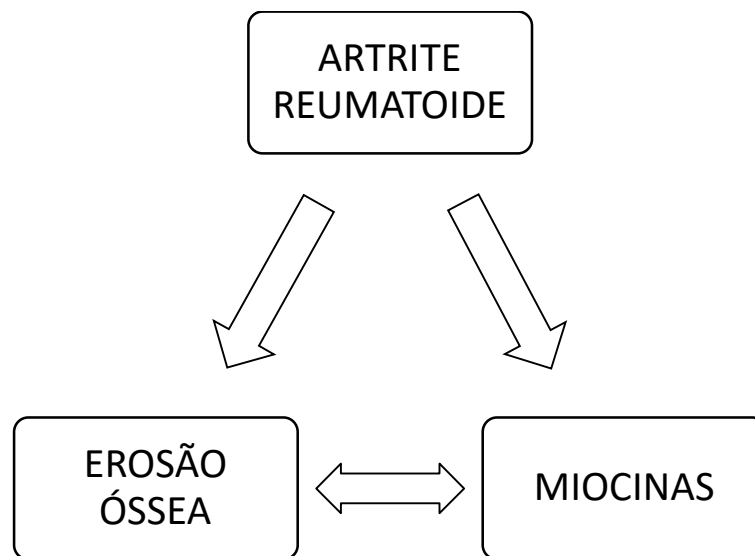


Figura 7. Marco teórico.

4 JUSTIFICATIVA

Diante da base teórica apresentada, sabe-se que a erosão óssea é prevalente e que afeta profundamente a funcionalidade dos pacientes com AR. Estudos recentes têm ressaltado a importância da ação das miocinas em outros tecidos que não o tecido muscular, como no tecido ósseo. Irisina e a miostatina são duas miocinas de destaque e que apresentam efeito sobre a reabsorção óssea. A via pela qual a miostatina contribui para a erosão óssea na AR foi estabelecida por meio de estudos *in vitro*. Já o papel da irisina no envolvimento ósseo da AR ainda não é conhecido. Mesmo assim, não se sabe quais são os níveis séricos desses dois marcadores nos pacientes com AR e nem qual a sua relação com a progressão radiográfica de erosão óssea. Portanto, o conhecimento mais aprofundado acerca dos níveis de irisina e de miostatina, bem como a sua relação com a erosão óssea em pacientes com AR pode ser relevante também para a identificação de potenciais biomarcadores e alvos de manipulação terapêutica.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

O presente estudo pretende avaliar os níveis séricos de irisina e de miostatina, em uma população de pacientes com AR, e relacioná-los com a progressão radiográfica após um ano.

5.2 Objetivos secundários

- Comparar os níveis de miocinas dos pacientes com AR com os de uma população controle;
- Identificar as medicações utilizadas;
- Avaliar a atividade da doença;
- Avaliar os níveis de marcadores inflamatórios séricos;
- Avaliar a composição corporal;
- Avaliar a presença de baixa massa magra;
- Avaliar a função física.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18001.
2. Scott DL, Pugner K, Kaarela K, Doyle DV, Woolf A, Holmes J, et al. The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39(2):122-32.
3. van der Heijde D. How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol*. 2000;27(1):261-3.
4. van den Broek M, Dirven L, de Vries-Bouwstra JK, Dehpoor AJ, Goekoop-Ruiterman YP, Gerards AH, et al. Rapid radiological progression in the first year of early rheumatoid arthritis is predictive of disability and joint damage progression during 8 years of follow-up. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(9):1530-3.
5. Vermeer M, Kuper HH, Moens HJ, Drossaers-Bakker KW, van der Bijl AE, van Riel PL, et al. Sustained beneficial effects of a protocolized treat-to-target strategy in very early rheumatoid arthritis: three-year results of the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring remission induction cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65(8):1219-26.
6. Laurent MR, Dubois V, Claessens F, Verschueren SM, Vanderschueren D, Gielen E, et al. Muscle-bone interactions: From experimental models to the clinic? A critical update. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;432:14-36.
7. Roca-Rivada A, Castela C, Senin LL, Landrove MO, Baltar J, Belén Crujeiras A, et al. FND5/irisin is not only a myokine but also an adipokine. *PLoS One*. 2013;8(4):e60563.
8. Dankbar B, Fennen M, Brunert D, Hayer S, Frank S, Wehmeyer C, et al. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice. *Nat Med*. 2015;21(9):1085-90.
9. Reza MM, Subramaniyam N, Sim CM, Ge X, Sathiakumar D, McFarlane C, et al. Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy. *Nat Commun*. 2017;8(1):1104.
10. Colaianni G, Sanesi L, Storlino G, Brunetti G, Colucci S, Grano M. Irisin and Bone: From Preclinical Studies to the Evaluation of Its Circulating Levels in Different Populations of Human Subjects. *Cells*. 2019;8(5).
11. Baker JF, Von Feldt J, Mostoufi-Moab S, Noaiseh G, Taratuta E, Kim W, et al. Deficits in Muscle Mass, Muscle Density, and Modified Associations With Fat in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care & Research*. 2014;66(11):1612-8.
12. Baker JF, Mostoufi-Moab S, Long J, Taratuta E, Leonard MB, Zemel B. Low Muscle Density is Associated with Deteriorations in Muscle Strength and Physical Functioning in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2019.
13. Baker JF, Long J, Mostoufi-Moab S, Denburg M, Jorgenson E, Sharma P, et al. Muscle Deficits in Rheumatoid Arthritis Contribute to Inferior Cortical Bone Structure and Trabecular Bone Mineral Density. *J Rheumatol*. 2017;44(12):1777-85.
14. van der Heijde D, Landewé R. Should radiographic progression still be used as outcome in RA? *Clin Immunol*. 2018;186:79-81.
15. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2010;376(9746):1094-108.
16. Myasoedova E, Crowson CS, Kremers HM, Therneau TM, Gabriel SE. Is the Incidence of Rheumatoid Arthritis Rising? Results From Olmsted County, Minnesota, 1955-2007. *Arthritis and Rheumatism*. 2010;62(6):1576-82.
17. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *Journal of Autoimmunity*. 2010;35(1):10-4.

18. Silvagni E, Giollo A, Sakellariou G, Ughi N, D'Amico ME, Scirè CA, et al. One year in review 2020: novelties in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2020;38(2):181-94.
19. van der Woude D, van der Helm-van Mil AHM. Update on the epidemiology, risk factors, and disease outcomes of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2018;32(2):174-87.
20. Hunter TM, Boytsov NN, Zhang X, Schroeder K, Michaud K, Araujo AB. Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases, 2004-2014. *Rheumatol Int*. 2017;37(9):1551-7.
21. Senna ER, De Barros AL, Silva EO, Costa IF, Pereira LV, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004;31(3):594-7.
22. Krasselt M, Baerwald C. Sex, Symptom Severity, and Quality of Life in Rheumatology. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2019;56(3):346-61.
23. Ting YT, Petersen J, Ramarathinam SH, Scally SW, Loh KL, Thomas R, et al. The interplay between citrullination and HLA-DRB1 polymorphism in shaping peptide binding hierarchies in rheumatoid arthritis. *J Biol Chem*. 2018;293(9):3236-51.
24. Croia C, Bursi R, Sutera D, Petrelli F, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2019: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2019;37(3):347-57.
25. Takeno M, Kitagawa S, Yamanaka J, Teramoto M, Tomita H, Shirai N, et al. 5-Hydroxy-2-methylpyridine Isolated from Cigarette Smoke Condensate Aggravates Collagen-Induced Arthritis in Mice. *Biol Pharm Bull*. 2018;41(6):877-84.
26. Talbot J, Peres RS, Pinto LG, Oliveira RDR, Lima KA, Donate PB, et al. Smoking-induced aggravation of experimental arthritis is dependent of aryl hydrocarbon receptor activation in Th17 cells. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):119.
27. Alpízar-Rodríguez D, Finckh A. Environmental factors and hormones in the development of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol*. 2017;39(4):461-8.
28. Guerreiro CS, Calado Â, Sousa J, Fonseca JE. Diet, Microbiota, and Gut Permeability-The Unknown Triad in Rheumatoid Arthritis. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:349.
29. Trouw LA, Rispen T, Toes REM. Beyond citrullination: other post-translational protein modifications in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2017;13(6):331-9.
30. Mewar D, Wilson AG. Autoantibodies in rheumatoid arthritis: a review. *Biomed Pharmacother*. 2006;60(10):648-55.
31. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023-38.
32. Dadoun S, Zeboulon-Ktorza N, Combescure C, Elhai M, Rozenberg S, Gossec L, et al. Mortality in rheumatoid arthritis over the last fifty years: systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine*. 2013;80(1):29-33.
33. Pappas DA, Nyberg F, Kremer JM, Lampl K, Reed GW, Horne L, et al. Prevalence of cardiovascular disease and major risk factors in patients with rheumatoid arthritis: a multinational cross-sectional study. *Clin Rheumatol*. 2018;37(9):2331-40.
34. Turk SA, van Schaardenburg D, Boers M, de Boer S, Fokker C, Lems WF, et al. An unfavorable body composition is common in early arthritis patients: A case control study. *PLoS One*. 2018;13(3):e0193377.
35. Giles JT, Bartlett SJ, Andersen RE, Fontaine KR, Bathon JM. Association of body composition with disability in rheumatoid arthritis: impact of appendicular fat and lean tissue mass. *Arthritis Rheum*. 2008;59(10):1407-15.
36. Ødegård S, Landewé R, van der Heijde D, Kvien TK, Mowinckel P, Uhlig T. Association of early radiographic damage with impaired physical function in rheumatoid arthritis: a ten-year, longitudinal observational study in 238 patients. *Arthritis Rheum*. 2006;54(1):68-75.

37. Welsing PM, van Gestel AM, Swinkels HL, Kiemeneij LA, van Riel PL. The relationship between disease activity, joint destruction, and functional capacity over the course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2001;44(9):2009-17.
38. Sharp JT, Lidsky MD, Collins LC, Moreland J. Methods of scoring the progression of radiologic changes in rheumatoid arthritis. Correlation of radiologic, clinical and laboratory abnormalities. *Arthritis Rheum.* 1971;14(6):706-20.
39. Schett G, Gravallese E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol.* 2012;8(11):656-64.
40. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(6):429-42.
41. Delaissé JM, Andersen TL, Engsig MT, Henriksen K, Troen T, Blavier L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. *Microsc Res Tech.* 2003;61(6):504-13.
42. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 2007;9 Suppl 1:S1.
43. Kim JH, Liu X, Wang J, Chen X, Zhang H, Kim SH, et al. Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2013;5(1):13-31.
44. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5866-75.
45. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1481-8.
46. Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J, et al. TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(28):11742-7.
47. Axmann R, Böhm C, Krönke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum.* 2009;60(9):2747-56.
48. Harre U, Georgess D, Bang H, Bozec A, Axmann R, Ossipova E, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. *J Clin Invest.* 2012;122(5):1791-802.
49. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, et al. Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 2007;13(2):156-63.
50. Walsh NC, Reinwald S, Manning CA, Condon KW, Iwata K, Burr DB, et al. Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res.* 2009;24(9):1572-85.
51. Haavardsholm EA, Bøyesen P, Østergaard M, Schildvold A, Kvien TK. Magnetic resonance imaging findings in 84 patients with early rheumatoid arthritis: bone marrow oedema predicts erosive progression. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(6):794-800.
52. Cohen G, Gossec L, Dougados M, Cantagrel A, Goupille P, Daures JP, et al. Radiological damage in patients with rheumatoid arthritis on sustained remission. *Ann Rheum Dis.* 2007;66(3):358-63.
53. Brown AK, Conaghan PG, Karim Z, Quinn MA, Ikeda K, Peterfy CG, et al. An explanation for the apparent dissociation between clinical remission and continued structural deterioration in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(10):2958-67.
54. Schett G, Stach C, Zwerina J, Voll R, Manger B. How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008;58(10):2936-48.
55. van der Heijde D, Simon L, Smolen J, Strand V, Sharp J, Boers M, et al. How to report radiographic data in randomized clinical trials in rheumatoid arthritis: guidelines from a roundtable discussion. *Arthritis Rheum.* 2002;47(2):215-8.
56. Boini S, Guillemin F. Radiographic scoring methods as outcome measures in rheumatoid arthritis: properties and advantages. *Ann Rheum Dis.* 2001;60(9):817-27.

57. Ory PA. Interpreting radiographic data in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2003;62(7):597-604.
58. Dias DNG. Avaliação radiográfica quantitativa em pacientes com artrite reumatoide, pelo escore de Sharp van der Heijde, acompanhados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná: Universidade Federal do Paraná; 2019.
59. Mota LMHD, Kakehasi AM, Gomides APM, Duarte ALBP, Cruz BA, Brenol CV, et al. 2017 recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. *Adv Rheumatol.* 2018;58(1):2.
60. Knevel R, Schoels M, Huizinga TW, Aletaha D, Burmester GR, Combe B, et al. Current evidence for a strategic approach to the management of rheumatoid arthritis with disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(6):987-94.
61. van Riel PL, Renskers L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2016;34(5 Suppl 101):S40-S4.
62. Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65(3):168-73.
63. Behrens F, Koehm M, Burkhardt H. Update 2011: leflunomide in rheumatoid arthritis - strengths and weaknesses. *Curr Opin Rheumatol.* 2011;23(3):282-7.
64. Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine: a review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *Drugs.* 2005;65(13):1825-49.
65. da Mota LM, Cruz BA, Brenol CV, Pereira IA, Rezende-Fronza LS, Bertolo MB, et al. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol.* 2012;52(2):152-74.
66. Suarez-Almazor ME, Belseck E, Shea B, Homik J, Wells G, Tugwell P. Antimalarials for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(4):CD000959.
67. Suarez-Almazor ME, Belseck E, Shea B, Wells G, Tugwell P. Cyclophosphamide for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(4):CD001157.
68. Suarez-Almazor ME, Spooner C, Belseck E. Azathioprine for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000(4):CD001461.
69. Hodge JA, Kawabata TT, Krishnaswami S, Clark JD, Telliez JB, Dowty ME, et al. The mechanism of action of tofacitinib - an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2016;34(2):318-28.
70. Radner H, Aletaha D. Anti-TNF in rheumatoid arthritis: an overview. *Wien Med Wochenschr.* 2015;165(1-2):3-9.
71. Shetty A, Hanson R, Korsten P, Shawagfeh M, Arami S, Volkov S, et al. Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond. *Drug Design Development and Therapy.* 2014;8:349-64.
72. Lopez-Olivo MA, Amezcua Urruela M, McGahan L, Pollono EN, Suarez-Almazor ME. Rituximab for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;1:CD007356.
73. Blair HA, Deeks ED. Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs.* 2017;77(11):1221-33.
74. Taylor PC. Clinical efficacy of launched JAK inhibitors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2019;58(Suppl 1):i17-i26.
75. Pedersen BK, Akerström TC, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol (1985).* 2007;103(3):1093-8.
76. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil.* 2003;24(2-3):113-9.
77. Kaji H. Effects of myokines on bone. *Bonekey Rep.* 2016;5:826.

78. Lee JH, Jun HS. Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function. *Front Physiol.* 2019;10:42.
79. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 2012;481(7382):463-8.
80. Kim H, Wrann CD, Jedrychowski M, Vidoni S, Kitase Y, Nagano K, et al. Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via α V Integrin Receptors. *Cell.* 2018;175(7):1756-68.e17.
81. Rabiee F, Lachinani L, Ghaedi S, Nasr-Esfahani MH, Megraw TL, Ghaedi K. New insights into the cellular activities of Fndc5/Irisin and its signaling pathways. *Cell Biosci.* 2020;10:51.
82. Pekkala S, Wiklund PK, Hulmi JJ, Ahtiainen JP, Horttanainen M, Pöllänen E, et al. Are skeletal muscle FNDC5 gene expression and irisin release regulated by exercise and related to health? *J Physiol.* 2013;591(21):5393-400.
83. Huh JY, Dincer F, Mesfum E, Mantzoros CS. Irisin stimulates muscle growth-related genes and regulates adipocyte differentiation and metabolism in humans. *Int J Obes (Lond).* 2014;38(12):1538-44.
84. Lee J, Park J, Kim YH, Lee NH, Song KM. Irisin promotes C2C12 myoblast proliferation via ERK-dependent CCL7 upregulation. *PLoS One.* 2019;14(9):e0222559.
85. Quinn LS, Anderson BG, Conner JD, Wolden-Hanson T. Circulating irisin levels and muscle FNDC5 mRNA expression are independent of IL-15 levels in mice. *Endocrine.* 2015;50(2):368-77.
86. Chang JS, Kong ID. Irisin prevents dexamethasone-induced atrophy in C2C12 myotubes. *Pflugers Arch.* 2020;472(4):495-502.
87. Matsuo Y, Gleitsmann K, Mangner N, Werner S, Fischer T, Bowen TS, et al. Fibronectin type III domain containing 5 expression in skeletal muscle in chronic heart failure-relevance of inflammatory cytokines. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2015;6(1):62-72.
88. Lee HJ, Lee JO, Kim N, Kim JK, Kim HI, Lee YW, et al. Irisin, a Novel Myokine, Regulates Glucose Uptake in Skeletal Muscle Cells via AMPK. *Mol Endocrinol.* 2015;29(6):873-81.
89. Xin C, Liu J, Zhang J, Zhu D, Wang H, Xiong L, et al. Irisin improves fatty acid oxidation and glucose utilization in type 2 diabetes by regulating the AMPK signaling pathway. *Int J Obes (Lond).* 2016;40(3):443-51.
90. Vaughan RA, Gannon NP, Barberena MA, Garcia-Smith R, Bisoffi M, Mermier CM, et al. Characterization of the metabolic effects of irisin on skeletal muscle in vitro. *Diabetes Obes Metab.* 2014;16(8):711-8.
91. Colaianni G, Mongelli T, Cuscito C, Pignataro P, Lippo L, Spiro G, et al. Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):2811.
92. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Pignataro P, Buccoliero C, Liu P, et al. The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(39):12157-62.
93. Chang JS, Kim TH, Nguyen TT, Park KS, Kim N, Kong ID. Circulating irisin levels as a predictive biomarker for sarcopenia: A cross-sectional community-based study. *Geriatr Gerontol Int.* 2017;17(11):2266-73.
94. Park HS, Kim HC, Zhang D, Yeom H, Lim SK. The novel myokine irisin: clinical implications and potential role as a biomarker for sarcopenia in postmenopausal women. *Endocrine.* 2019;64(2):341-8.
95. Martínez Muñoz IY, Camarillo Romero EDS, Correa Padilla T, Santillán Benítez JG, Camarillo Romero MDS, Montenegro Morales LP, et al. Association of Irisin Serum Concentration and Muscle Strength in Normal-Weight and Overweight Young Women. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:621.
96. Choi HY, Kim S, Park JW, Lee NS, Hwang SY, Huh JY, et al. Implication of circulating irisin levels with brown adipose tissue and sarcopenia in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(8):2778-85.

97. Hwang YC, Jeon WS, Park CY, Youn BS. The ratio of skeletal muscle mass to visceral fat area is a main determinant linking circulating irisin to metabolic phenotype. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:9.
98. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Oranger A, Mori G, Brunetti G, et al. Irisin enhances osteoblast differentiation in vitro. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:902186.
99. Chen Z, Zhang Y, Zhao F, Yin C, Yang C, Wang X, et al. Recombinant Irisin Prevents the Reduction of Osteoblast Differentiation Induced by Stimulated Microgravity through Increasing β -Catenin Expression. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4).
100. Kawao N, Moritake A, Tatsumi K, Kaji H. Roles of Irisin in the Linkage from Muscle to Bone During Mechanical Unloading in Mice. *Calcif Tissue Int*. 2018;103(1):24-34.
101. Ma Y, Qiao X, Zeng R, Cheng R, Zhang J, Luo Y, et al. Irisin promotes proliferation but inhibits differentiation in osteoclast precursor cells. *FASEB J*. 2018:fj201700983RR.
102. Storlino G, Colaianni G, Sanesi L, Lippo L, Brunetti G, Errede M, et al. Irisin Prevents Disuse-Induced Osteocyte Apoptosis. *J Bone Miner Res*. 2020;35(4):766-75.
103. Xu L, Shen L, Yu X, Li P, Wang Q, Li C. Effects of irisin on osteoblast apoptosis and osteoporosis in postmenopausal osteoporosis rats through upregulating Nrf2 and inhibiting NLRP3 inflammasome. *Exp Ther Med*. 2020;19(2):1084-90.
104. Zhou K, Qiao X, Cai Y, Li A, Shan D. Lower circulating irisin in middle-aged and older adults with osteoporosis: a systematic review and meta-analysis. *Menopause*. 2019;26(11):1302-10.
105. Engin-Üstün Y, Çağlayan EK, Göçmen AY, Polat MF. Postmenopausal Osteoporosis Is Associated with Serum Chemerin and Irisin but Not with Apolipoprotein M Levels. *J Menopausal Med*. 2016;22(2):76-9.
106. Yan J, Liu HJ, Guo WC, Yang J. Low serum concentrations of Irisin are associated with increased risk of hip fracture in Chinese older women. *Joint Bone Spine*. 2018;85(3):353-8.
107. Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P, Gkiomisi A, Bisbinas I, Katsarou A, et al. Circulating irisin is associated with osteoporotic fractures in postmenopausal women with low bone mass but is not affected by either teriparatide or denosumab treatment for 3 months. *Osteoporos Int*. 2014;25(5):1633-42.
108. Palermo A, Strollo R, Maddaloni E, Tuccinardi D, D'Onofrio L, Briganti SI, et al. Irisin is associated with osteoporotic fractures independently of bone mineral density, body composition or daily physical activity. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(4):615-9.
109. Mao Y, Xu W, Xie Z, Dong Q. Association of Irisin and CRP Levels with the Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2016;20(2):86-9.
110. Baran A, Myśliwiec H, Kiluk P, Świdarska M, Flisiak I. Serum irisin levels in patients with psoriasis. *J Dermatolog Treat*. 2017;28(4):304-8.
111. Bulur I, Erdogan HK, Kocatürk E, Saracoglu ZN, Alataş Ö, Yildiz P, et al. The role of irisin in the relationship between psoriasis and insulin resistance. *G Ital Dermatol Venereol*. 2018;153(4):477-82.
112. Samanci R, Ataoglu S, Ozsahin M, Ankarali H, Admis O. An investigation of serum irisin levels and inflammatory markers in fibromyalgia syndrome. *North Clin Istanbul*. 2019;6(4):341-7.
113. Icli A, Cure E, Cumhuri Cure M, Uslu AU, Balta S, Arslan S, et al. Novel myokine: irisin may be an independent predictor for subclinical atherosclerosis in Behçet's disease. *J Investig Med*. 2016;64(4):875-81.
114. Lavrova DP, Zavadovsky BV, Akhverdyan YR, Polyakova YV, Sivordova LE, Zborovskaya IA, et al. [Irisin as a new marker for the early diagnosis of low-traumatic fractures in rheumatoid arthritis.]. *Klin Lab Diagn*. 2018;63(11):702-6.
115. Gamal RM, Mohamed ME, Hammam N, El Fetoh NA, Rashed AM, Furst DE. Preliminary study of the association of serum irisin levels with poor sleep quality in rheumatoid arthritis patients. *Sleep Med*. 2020;67:71-6.
116. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 1997;387(6628):83-90.

117. Buehring B, Binkley N. Myostatin--the holy grail for muscle, bone, and fat? *Curr Osteoporos Rep.* 2013;11(4):407-14.
118. Smith RC, Lin BK. Myostatin inhibitors as therapies for muscle wasting associated with cancer and other disorders. *Curr Opin Support Palliat Care.* 2013;7(4):352-60.
119. Chiu CS, Peekhaus N, Weber H, Adamski S, Murray EM, Zhang HZ, et al. Increased muscle force production and bone mineral density in ActRIIB-Fc-treated mature rodents. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2013;68(10):1181-92.
120. Bialek P, Parkington J, Li X, Gavin D, Wallace C, Zhang J, et al. A myostatin and activin decoy receptor enhances bone formation in mice. *Bone.* 2014;60:162-71.
121. Goh BC, Singhal V, Herrera AJ, Tomlinson RE, Kim S, Faugere MC, et al. Activin receptor type 2A (ACVR2A) functions directly in osteoblasts as a negative regulator of bone mass. *J Biol Chem.* 2017;292(33):13809-22.
122. Murphy KT, Cobani V, Ryall JG, Ibebunjo C, Lynch GS. Acute antibody-directed myostatin inhibition attenuates disuse muscle atrophy and weakness in mice. *J Appl Physiol (1985).* 2011;110(4):1065-72.
123. Smith RC, Cramer MS, Mitchell PJ, Lucchesi J, Ortega AM, Livingston EW, et al. Inhibition of myostatin prevents microgravity-induced loss of skeletal muscle mass and strength. *PLoS One.* 2020;15(4):e0230818.
124. MacDonald EM, Andres-Mateos E, Mejias R, Simmers JL, Mi R, Park JS, et al. Denervation atrophy is independent from Akt and mTOR activation and is not rescued by myostatin inhibition. *Dis Model Mech.* 2014;7(4):471-81.
125. Ciciliot S, Rossi AC, Dyar KA, Blaauw B, Schiaffino S. Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(10):2191-9.
126. Hennebry A, Berry C, Siriett V, O'Callaghan P, Chau L, Watson T, et al. Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(3):C525-34.
127. Wang M, Yu H, Kim YS, Bidwell CA, Kuang S. Myostatin facilitates slow and inhibits fast myosin heavy chain expression during myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;426(1):83-8.
128. Mouisel E, Relizani K, Mille-Hamard L, Denis R, Hourdé C, Agbulut O, et al. Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;307(4):R444-54.
129. Collins-Hooper H, Sartori R, Macharia R, Visanuvimol K, Foster K, Matsakas A, et al. Propeptide-mediated inhibition of myostatin increases muscle mass through inhibiting proteolytic pathways in aged mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014;69(9):1049-59.
130. Camporez JP, Petersen MC, Abudukadier A, Moreira GV, Jurczak MJ, Friedman G, et al. Anti-myostatin antibody increases muscle mass and strength and improves insulin sensitivity in old mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(8):2212-7.
131. Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem.* 2002;277(51):49831-40.
132. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF-kappaB-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol.* 2006;209(2):501-14.
133. Lokireddy S, Wijesoma IW, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R, Sharma M. Identification of atrogen-1-targeted proteins during the myostatin-induced skeletal muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012;303(5):C512-29.
134. Wang Q, McPherron AC. Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation. *J Physiol.* 2012;590(9):2151-65.
135. Lee JY, Hopkinson NS, Kemp PR. Myostatin induces autophagy in skeletal muscle in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2011;415(4):632-6.

136. Rodriguez J, Vernus B, Toubiana M, Jublanc E, Tintignac L, Leibovitch S, et al. Myostatin inactivation increases myotube size through regulation of translational initiation machinery. *J Cell Biochem.* 2011;112(12):3531-42.
137. Morissette MR, Cook SA, Buranasombati C, Rosenberg MA, Rosenzweig A. Myostatin inhibits IGF-I-induced myotube hypertrophy through Akt. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;297(5):C1124-32.
138. Han DS, Chang KV, Li CM, Lin YH, Kao TW, Tsai KS, et al. Skeletal muscle mass adjusted by height correlated better with muscular functions than that adjusted by body weight in defining sarcopenia. *Sci Rep.* 2016;6:19457.
139. Fife E, Kostka J, Kroc Ł, Guligowska A, Pięłowska M, Sołtysik B, et al. Relationship of muscle function to circulating myostatin, follistatin and GDF11 in older women and men. *BMC Geriatr.* 2018;18(1):200.
140. Hofmann M, Halper B, Oesen S, Franzke B, Stuparits P, Tschan H, et al. Serum concentrations of insulin-like growth factor-1, members of the TGF-beta superfamily and follistatin do not reflect different stages of dynapenia and sarcopenia in elderly women. *Exp Gerontol.* 2015;64:35-45.
141. Bergen HR, Farr JN, Vanderboom PM, Atkinson EJ, White TA, Singh RJ, et al. Myostatin as a mediator of sarcopenia versus homeostatic regulator of muscle mass: insights using a new mass spectrometry-based assay. *Skelet Muscle.* 2015;5:21.
142. Ratkevicius A, Joyson A, Selmer I, Dhanani T, Grierson C, Tommasi AM, et al. Serum concentrations of myostatin and myostatin-interacting proteins do not differ between young and sarcopenic elderly men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2011;66(6):620-6.
143. Poggioli T, Vujic A, Yang P, Macias-Trevino C, Uygur A, Loffredo FS, et al. Circulating Growth Differentiation Factor 11/8 Levels Decline With Age. *Circulation Research.* 2016;118(1):29-37.
144. Tay L, Ding YY, Leung BP, Ismail NH, Yeo A, Yew S, et al. Sex-specific differences in risk factors for sarcopenia amongst community-dwelling older adults. *Age (Dordr).* 2015;37(6):121.
145. Chen LY, Wu YH, Liu LK, Lee WJ, Hwang AC, Peng LN, et al. Association Among Serum Insulin-Like Growth Factor-1, Frailty, Muscle Mass, Bone Mineral Density, and Physical Performance Among Community-Dwelling Middle-Aged and Older Adults in Taiwan. *Rejuvenation Res.* 2018;21(3):270-7.
146. Peng LN, Lee WJ, Liu LK, Lin MH, Chen LK. Healthy community-living older men differ from women in associations between myostatin levels and skeletal muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018;9(4):635-42.
147. Chew J, Tay L, Lim JP, Leung BP, Yeo A, Yew S, et al. Serum Myostatin and IGF-1 as Gender-Specific Biomarkers of Frailty and Low Muscle Mass in Community-Dwelling Older Adults. *J Nutr Health Aging.* 2019;23(10):979-86.
148. Moriwaki K, Matsumoto H, Tanishima S, Tanimura C, Osaki M, Nagashima H, et al. Association of serum bone- and muscle-derived factors with age, sex, body composition, and physical function in community-dwelling middle-aged and elderly adults: a cross-sectional study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2019;20(1):276.
149. Wu LF, Zhu DC, Wang BH, Lu YH, He P, Zhang YH, et al. Relative abundance of mature myostatin rather than total myostatin is negatively associated with bone mineral density in Chinese. *J Cell Mol Med.* 2018;22(2):1329-36.
150. Chen YS, Guo Q, Guo LJ, Liu T, Wu XP, Lin ZY, et al. GDF8 inhibits bone formation and promotes bone resorption in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(4):500-8.
151. Elkasrawy MN, Hamrick MW. Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2010;10(1):56-63.
152. Suh J, Kim NK, Lee SH, Eom JH, Lee Y, Park JC, et al. GDF11 promotes osteogenesis as opposed to MSTN, and follistatin, a MSTN/GDF11 inhibitor, increases muscle mass but weakens bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(9):4910-20.

153. Arounleut P, Bialek P, Liang LF, Upadhyay S, Fulzele S, Johnson M, et al. A myostatin inhibitor (propeptide-Fc) increases muscle mass and muscle fiber size in aged mice but does not increase bone density or bone strength. *Exp Gerontol.* 2013;48(9):898-904.
154. Bowser M, Herberg S, Arounleut P, Shi X, Fulzele S, Hill WD, et al. Effects of the activin A-myostatin-follistatin system on aging bone and muscle progenitor cells. *Exp Gerontol.* 2013;48(2):290-7.
155. Ma Y, Li X, Zhang H, Ou Y, Zhang Z, Li S, et al. Serum myostatin in central south Chinese postmenopausal women: Relationship with body composition, lipids and bone mineral density. *Endocr Res.* 2016;41(3):223-8.
156. Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab.* 2012;16(2):153-66.
157. Kerschanch-Schindl K, Ebenbichler G, Foeger-Samwald U, Leiss H, Gesslbauer C, Herceg M, et al. Rheumatoid arthritis in remission: Decreased myostatin and increased serum levels of periostin. *Wiener Klinische Wochenschrift.* 2019;131(1-2):1-7.
158. Little RD, Prieto-Potin I, Perez-Baos S, Villalvilla A, Gratal P, Cicuttini F, et al. Compensatory anabolic signaling in the sarcopenia of experimental chronic arthritis. *Scientific Reports.* 2017;7.
159. de Oliveira Nunes Teixeira V, Filippin LI, Viacava PR, de Oliveira PG, Xavier RM. Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013;238(12):1421-30.
160. Hu S-L, Chang A-C, Huang C-C, Tsai C-H, Lin C-C, Tang C-H. Myostatin Promotes interleukin-1 beta expression in rheumatoid arthritis synovial Fibroblasts through inhibition of mir-21-5p. *Frontiers in Immunology.* 2017;8.
161. Su CM, Hu SL, Sun Y, Zhao J, Dai CQ, Wang LH, et al. Myostatin induces tumor necrosis factor-alpha expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the PI3K-Akt signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology.* 2019;234(6):9793-801.
162. Zhao C, Shao Y, Lin C, Zeng C, Fang H, Pan J, et al. Myostatin serum concentrations are correlated with the severity of knee osteoarthritis. *J Clin Lab Anal.* 2017;31(5).
163. Silva JMS, Alabarse PVG, Teixeira VON, Freitas EC, de Oliveira FH, Chakr RMDS, et al. Muscle wasting in osteoarthritis model induced by anterior cruciate ligament transection. *PLoS One.* 2018;13(4):e0196682.

7 ARTIGO

O artigo seguinte será submetido na revista *"The Journal of Rheumatology"*.

Association of irisin and myostatin serum levels with radiographic progression, lean mass, and biologics in patients with established rheumatoid arthritis

Jordana Miranda de Souza Silva^{1, 2}; Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo^{1, 2}; Deborah Negrão Gonçalves³; Nayara Felicidade Tomaz Braz⁴; Érica Leandro Marciano Vieira^{4, 5}; Eduarda Correa Freitas¹; Ana Cristina Simões e Silva^{4, 5}; Rafael Mendonça da Silva Chakr^{1, 2}; Adriana Maria Kakehasi⁵; Ricardo Machado Xavier^{1, 2}

¹Laboratório de Doenças Autoimunes, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

² Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

³ Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

⁴Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

⁵Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Key indexing terms: Rheumatoid arthritis, irisin, myostatin, radiographic progression, bDMARD.

Abstract

Objective. To evaluate the association of baseline serum levels of irisin and myostatin with one-year radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis (RA).

Methods. At baseline, irisin and myostatin serum levels were determined in 40 female RA patients, and in 30 control individuals matched by sex, age, and body mass index (BMI), by ELISA. RA patients had their radiographs of hands and feet evaluated by Sharp/van der Heijde score (SHS) at two timepoints, baseline and after one year. Disease activity was calculated in RA patients by Disease Activity Score 28-C reactive protein (DAS28-CRP), body composition was evaluated using dual X-ray absorptiometry (DXA) and disability was assessed by Health Assessment Questionnaire-Disability Index (HAQ-DI). Physical function was evaluated by chair rising (CRT), timed up and go (TUG) and hand grip tests, and inflammatory the markers erythrocyte sedimentation rate (ESR), CRP and interleukin-6 (IL-6) were measured.

Results. The mean age of RA patients was 56 years old, mean DAS28-CRP was 3.3, mean disease duration was 11.2 years and mean BMI was 28.1 kg/m². Rapid radiographic progression and low lean mass were present in 17.5% and 14.8% of the RA patients, respectively, and showed no correlation with serum irisin and myostatin. Serum myostatin was significantly lower in RA patients than in control subjects (3021.7 ± 1217.2 vs 4049.0 ± 1610.0 pg/ml), and patients treated with biologic disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs) showed higher irisin serum levels than patients non-treated with bDMARDs (31.7 ± 7.6 vs 25.7 ± 6.8 ng/ml). Irisin serum levels were positively correlated with IL-6 (r= 0.382; p= 0.020) and TUG (r= 0.338; p= 0.35) in RA patients.

Conclusion. Most of the patients did not present rapid radiographic progression and low lean mass. Serum myostatin was lower in RA than in control subjects, while irisin was higher in patients using bDMARDs and associated with IL-6 and TUG. Serum levels of myokines were not associated with one-year radiographic progression, which may be related to the short-term evaluation. The use of bDMARDs is likely to influence in circulating myokines, whereas irisin may impact on IL-6 expression and mobility.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory disease characterized by chronic synovitis that leads to cartilage and bone destruction (1). Erosive joint damage is a hallmark of RA and over time causes deformity and contributes to disability in patients (2). The progression of joint erosion is variable among RA patients and is usually detectable as radiographic damage in affected joints (3). Despite current treatment strategies, aiming the early and rapid decrease of disease activity, radiographic progression still occurs in a significant proportion of patients (4, 5).

The group of skeletal muscle-derived humoral cytokines and growth factors, collectively termed myokines, which includes irisin and myostatin, have recently been implicated in physiological and pathological bone metabolism (6). Myokines are mainly expressed in skeletal muscle, which is also their main target tissue, although irisin and myostatin are also active to a considerable extent in bone (7, 8). Myostatin is a crucial myokine, described as potent suppressor of skeletal muscle mass growth and development, upregulating proteolysis pathways and inhibiting muscle protein synthesis and regeneration (9). Myostatin also acts as an inhibitor of bone mass and remodeling and, specifically in arthritis, increases osteoclast formation and bone destruction (8). Notably, the myostatin expression undergoes opposite

direction to irisin, which functions as a pro-myogenic factor and enhances muscle protein synthesis, in addition to playing a role in bone mass and strength gain by osteoblastogenesis stimulation (10, 11).

The intimate relationship between skeletal muscle and bone led to the concept of the “bone-muscle unit”, partly because muscle and bone mass and strength are positively affected by physical exercise, while both are compromised by ageing and situations of disuse (6). Thus, myokines may establish a communication network between the two tissues, in addition to the mechanotransduction. Low muscle area, density and strength were detected in RA subjects, and over time the worsening of skeletal muscle density was related to higher disease activity (12-14). Additionally, muscle deficits were shown to contribute to inferior cortical bone structure and trabecular bone mineral density in RA, which was speculated to be related the loss of mechanical loading (15). As skeletal muscle and bone are affected in RA, and both are sources of myokines, it is possible that the levels of these markers may correlate with clinical outcomes.

The identification of patients at risk of greater radiographic damage is critical to adapt the treatment and prevent disease progression, which stresses the need for biomarkers predicting structural changes in the joints of RA patients (16). Thus, this study aimed to address the associations of baseline serum irisin and myostatin concentrations with one-year radiographic progression in RA patients. Secondly, association of serum myokines with lean mass, medication and physical function was also assessed.

Materials and Methods

Patients. Forty RA patients attending the Rheumatology Division at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, who fulfilled the America College of Rheumatology/European League Against Rheumatism 2010 criteria, were enrolled in the study (17). Thirty healthy individuals matched by sex, age, and body mass index (BMI) were enrolled as controls for the evaluation of myokines serum levels at baseline. RA patients’ radiographs of hands and feet were evaluated at two timepoints, baseline and after one year. RA patients’ disease activity, body composition, physical function, and inflammatory markers were also evaluated at baseline. Medication use was assessed in the medical record. All subjects signed informed consent forms approved by the Hospital Ethics Committee (CEP 2018-0223).

Radiographic progression. One-year progression of joint damage was assessed with the use of the van der Heijde modification of the total Sharp score (SHS) method. Baseline radiographs of

hands and feet were performed \pm 3 months from the blood collection visit. The scoring was performed by a single experienced reader blinded to patient characteristics and aware of image sequence. The intrareader variability described by the intraclass correlation coefficient (ICC) was 0.92 for the radiographic progression rate. Among the 40 RA patients completing the study, 37 had evaluable x-rays from both timepoints.

Laboratory assessments. Fasting blood samples were collected, and serum was stored at -80°C for subsequent measurements. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to evaluate irisin (Phoenix Pharmaceuticals) and myostatin (R&D Systems) serum levels according to manufacturer's instructions. Clinical laboratory assays [Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) and C-Reactive Protein (CRP)] were performed using standard methods in Hospital Clinical Pathology Department. Interleukin-6 (IL-6) serum levels were measured by ELISA (BioLegend) according to manufacturer's instructions.

Body composition. Subjects underwent total body dual-emission x-ray absorptiometry (DXA) scanning using a Hologic densitometer (Delphi Systems, Hologic, Inc., Bedford, MA) to measure appendicular lean mass and total fat mass. Body composition estimates were adjusted for height² to generate appendicular lean mass index (ALMI, kg/m²) and fat mass index (FMI, kg/m²). Additionally, fat-adjusted ALMI (ALMI_{FMI}) Z-Scores were generated, based on residuals obtained from the regression of ALMI Z-Score on FMI Z-Score within age, sex, and race categories. Thus, "low fat-adjusted lean for age" was defined as ALMI_{FMI} Z-score \leq -1 (18).

Physical function. Disability was assessed by the Health Assessment Questionnaire-Disability Index (HAQ-DI), which ranges from 0.0 to 3.0 and higher values represent worst functional status (19). The chair rising test (CRT) is a timed test of lower limb muscle strength evaluation. The participant is asked to stand up and sit down from a chair five times in a row, as fast as possible, without using the arms (20). In the timed up and go (TUG) test, an individual sit on a standard height armchair with his hands placed on the armrest. The person is asked to stand up (using the arms), walk 3 meters at a normal speed, turn around, return to the chair, and sit down again. The more time needed to complete the test, the greater the restriction of mobility and the higher the risk of falling (21). The handgrip strength describes the power or strength of the hand muscles used to grasp or grip, and its evaluation was performed using a Jamar Hydraulic Hand Dynamometer. The patient was instructed to squeeze the equipment as hard as possible for 5 seconds for the maximal isometric voluntary contraction of each hand to be quantified.

Statistical analysis. Data distribution was preliminarily checked for normality with the Kolmogorov-Smirnov test. According to number of groups, nonparametric tests Kruskal-Wallis

test or Mann-Whitney U test were used. Data are presented as median (interquartile range). The Kruskal-Wallis test was utilized to compare the difference of myokines serum levels and ALMI among radiographic progression and DAS28-PCR categories. The Mann-Whitney U test was used to compare the difference of myokines serum levels between patients and controls, between patients using or not using biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs), and between ALMI_{FMI} categories. Spearman's correlation analysis was used to analyze the correlation among myokines serum levels and mean SHS score, ALMI, DAS28-CRP, HAQ-DI, ESR, CRP and IL-6. P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0 was used to analyze the data.

Results

Patient demographics and baseline characteristics. Baseline characteristics of patients are shown in Table 1. RA patients included in the study presented mean age of 56 years, mean disease duration of 11.2 years and mean BMI of 28.1 kg/m². Most patients presented SHS higher than 25 units. Mean disease activity score was 3.3, approximately 32% of the patients were using bDMARDs and 17.5% of the patients were classified as having low fat-adjusted lean for age (ALMI_{FMI} Z-score ≤ -1) (Table 1).

Table 1. Characteristics of the study population.

RA patients (n = 40)	
Age in years (mean \pm SD)	56.3 \pm 7.8
RA duration in years (mean \pm SD)	11.2 \pm 9.27
Irisin in ng/ml (mean \pm SD)	27.7 \pm 7.5
Myostatin in pg/ml (mean \pm SD)	3021.5 \pm 1217.1
SHS (mean \pm SD)	29.8 \pm 35.5
SHS, n (%)	
0	1 (2.7)
0.1-5	11 (29.7)
5.1-25	9 (24.3)
>25	16 (43.2)
DAS28-CRP score (mean \pm SD)	3.3 \pm 1.3
bDMARDs, n (%)	13 (32.5)

BMI in kg/m ² (mean ± SD)	28.1 ± 5.1
ALMI in kg/m ² (mean ± SD)	6.3 ± 0.7
FMI in kg/m ² (mean ± SD)	11.9 ± 3.6
ALMI _{FMI} Z-score (mean ± SD)	0.07 ± 1
ALMI _{FMI} Z-score ≤ -1, n (%)	7 (17.5)
HAQ score (mean ± SD)	1.1 ± 0.7
CRT in seconds (mean ± SD)	17.5 ± 12.2
TUG in seconds (mean ± SD)	10.9 ± 4.1
Handgrip strength in kg (mean ± SD)	9.9 ± 6.8
ESR in mm/h (mean ± SD)	34.1 ± 18.7
CRP in mg/dl (mean ± SD)	9.8 ± 10.8
IL-6 in pg/ml (mean ± SD)	81.6 ± 274.3

SD, standard deviation; RA, rheumatoid arthritis; SHS, Sharp van der Heijde Score; DAS28-CRP, disease activity score 28- C-reactive protein; bDMARDs, biological disease-modifying antirheumatic drugs; BMI, body mass index; ALMI, appendicular lean mass index; FMI, fat mass index; ALMI_{FMI} Z-score, appendicular lean mass index adjusted by fat mass index Z-score; HAQ, health assessment questionnaire; CRT, chair rising test; TUG, timed up and go test; ESR, erythrocyte sedimentation rate; CRP, C-reactive protein; IL-6, interleukin-6.

Radiographic progression. Irisin and myostatin serum levels were not associated with mean baseline and one-year SHS ($r=-0.06$, $p=0.68$ and $r=0.01$, $p=0.95$). Irisin and myostatin serum levels did not differ when RA patients were grouped into categories of radiographic progression: non-progressor ($\Delta =0$), slow progressor ($\Delta 0\leq 5$) or rapid progressor ($\Delta >5$) (Table 2).

Table 2. Irisin and myostatin serum levels according to Sharp van der Heijde Score categories.

	n	Irisin (ng/ml)	Myostatin(pg/ml)
Mean SHS			
0	1	45.9	3543.5
0.1-5	11	29.9 (25.4-31.3)	2940.5 (1381.7-3341.3)
5.1-25	9	25.7 (24.5-33.3)	3753.1 (1958.4-4015.1)
>25	16	27.3 (20.7-31.3)	3461.2 (2242.2-4098.5)
Progression			

$\Delta = 0$	4	30.3 (24.9-38.3)	3153.3 (2445.4-3442.4)
$\Delta 0 \leq 5$	28	26.1 (23.5-31.3)	3588.0 (1958.4-4098.5)
$\Delta > 5$	5	31.8 (28.4-37.0)	2242.2 (1892.5-3212.4)

Values are expressed as the median (interquartile range). Data were analyzed by Kruskal-Wallis test. SHS, Sharp van der Heijde Score.

Myokines serum levels. Myostatin serum levels were significantly lower in RA patients than in control subjects (3096.7 (1958.4-3903.1) vs 3743.5 (3043.3-4827.3) pg/ml; $p=0.011$), while irisin levels did not differ between RA and control groups (27.5 (23.5-31.8) vs 28.0 (23.9-33.1) ng/ml; $p=0.590$) (Figure 1A and 1B). RA patients treated with bDMARDs presented irisin serum levels significantly higher than patients non-treated with bDMARDs (33.3 (25.4-37.0) vs 26.7 (22.5-30.2) ng/ml; $p=0.033$). Myostatin serum levels tended to be lower in RA patients treated with bDMARDs, compared to patients non-treated (2683.2 (1381.7-3781.8) vs 3325.5 (2520.1-4098.5) pg/ml; $p=0.144$) (Figure 1C and 1D). ESR and the circulating levels of CRP were not correlated with irisin and myostatin serum levels. IL-6 levels were positively correlated with irisin levels ($r=0.382$; $p=0.020$), while myostatin showed no correlation (Figure 3).

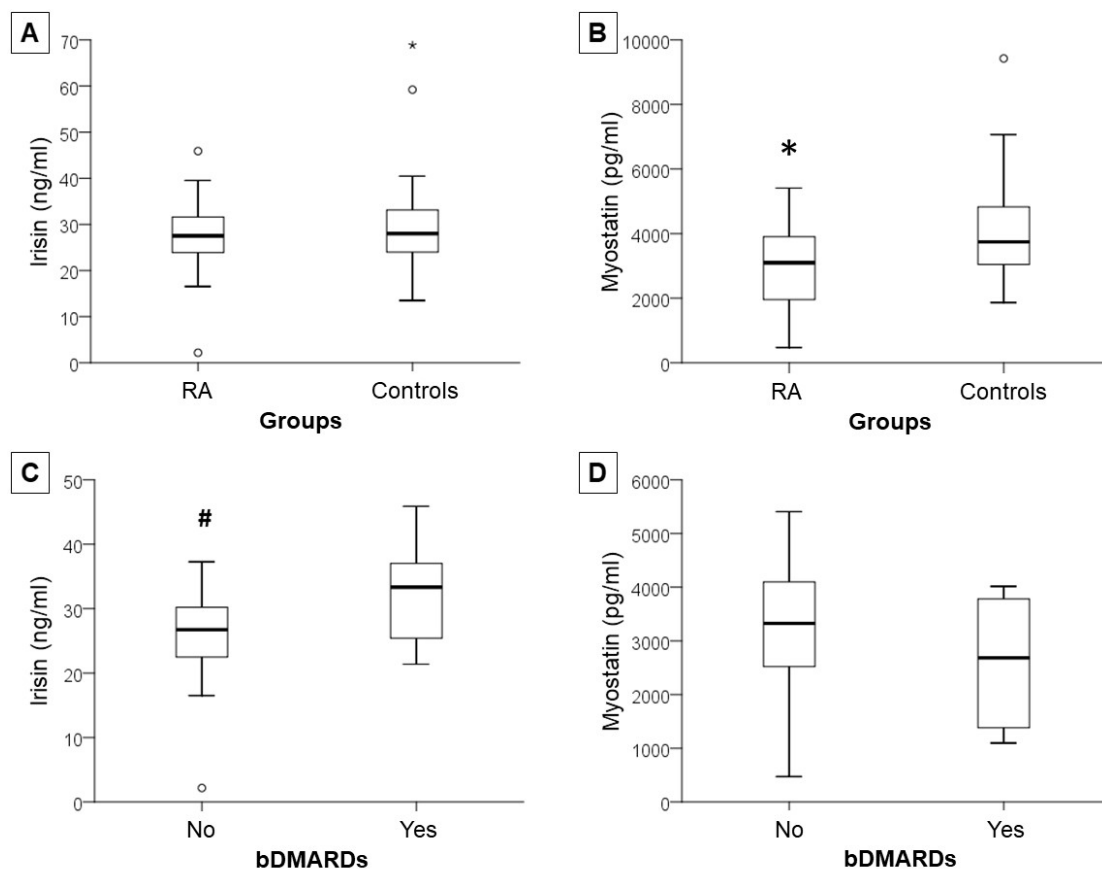


Figure 1. Irisin (A) and myostatin (B) serum levels of RA patients and control individuals. Irisin (C) and myostatin (D) serum levels of RA patients treated with bDMARDs and non-treated with bDMARDs. Data were analyzed by Mann-Whitney U test and are represented by median (interquartile range). * $p \leq 0,05$ RA patients vs controls. # $p \leq 0,05$ RA patients treated with bDMARDs vs RA patients non-treated with bDMARDs.

Disease activity and inflammatory markers. Irisin and myostatin were not associated with DAS28-CRP ($r = 0.081$; $p = 0.630$ and $r = -0.041$; $p = 0.811$) or different among the categories of disease activity severity ($p = 0.147$ and $p = 0.601$) (Table 3) (22).

Table 3. Irisin and myostatin serum levels of RA patients into disease activity categories.

	n	Irisin (ng/ml)	Myostatin(pg/ml)
DAS28-CRP			
Remission	11	26.1 (20.7-30.8)	3212.4 (1381.7-4285.3)
Low	3	27.6 (22.5-35.15)	3325.5 (2977.8-4362.8)
Moderate	13	26.4 (23.9-37.1)	3648.3 (2601.6-3898.4)
High	11	29.9 (25.4-31.3)	2467.2 (1265.7-2965.4)

Values are expressed as the median (interquartile range). Data were analyzed by Kruskal-Wallis test. DAS28-CRP, disease activity score 28-C reactive protein.

Lean mass. When RA patients were grouped into low fat-adjusted lean for age ($ALMI_{FMI}$ Z-score ≤ -1) or normal fat-adjusted lean for age ($ALMI_{FMI}$ Z-score > -1) categories, no differences in irisin (24.5 (20.7-27.5) vs 28.1 (24.5-32.6) ng/ml; $p = 0.138$) or myostatin (3325.5 (2242.2-5043.2) vs 2977.8 (1907.5-3781.8) pg/ml; $p = 0.181$) serum levels were observed, respectively (Figure 2A and 2B). $ALMI$ was not significantly different among the categories of SHS radiographic progression (non-progression 6.6 (6.4-6.9); slow progression 6.4 (5.7-6.7); rapid progression 5.6 (5.5-6.0); $p = 0.271$).

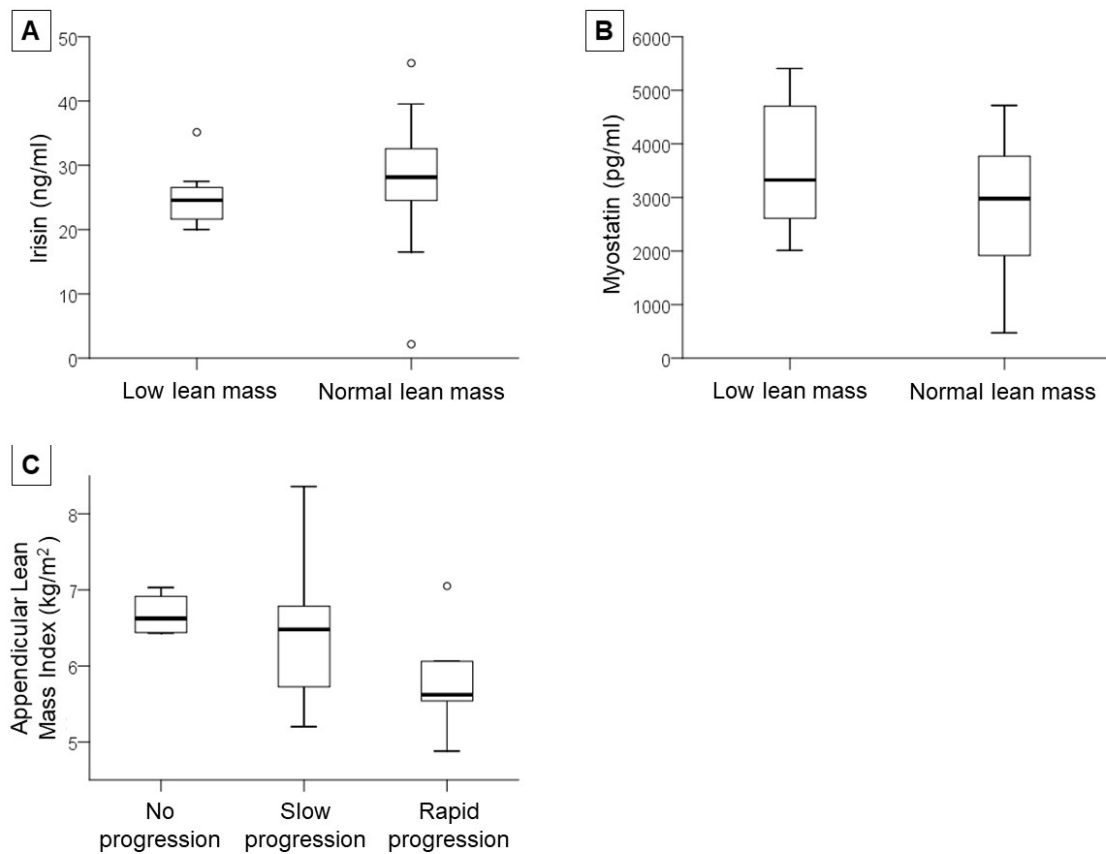


Figure 2. Irisin (A) and myostatin (B) serum levels of RA patients with low lean mass and normal lean mass. Appendicular lean mass index of RA patients with no progression, slow progression, and rapid progression (C). Data were analyzed by Mann-Whitney U test or Kruskal-Wallis test and are represented by median (interquartile range). No statistical difference was observed among groups.

Physical function. No correlation was found among irisin and myostatin serum levels and CRT, handgrip strength and HAQ. Irisin serum levels were positively correlated with TUG ($r= 0.339$, $p= 0.032$) (Figure 3B), while myostatin showed no correlation.

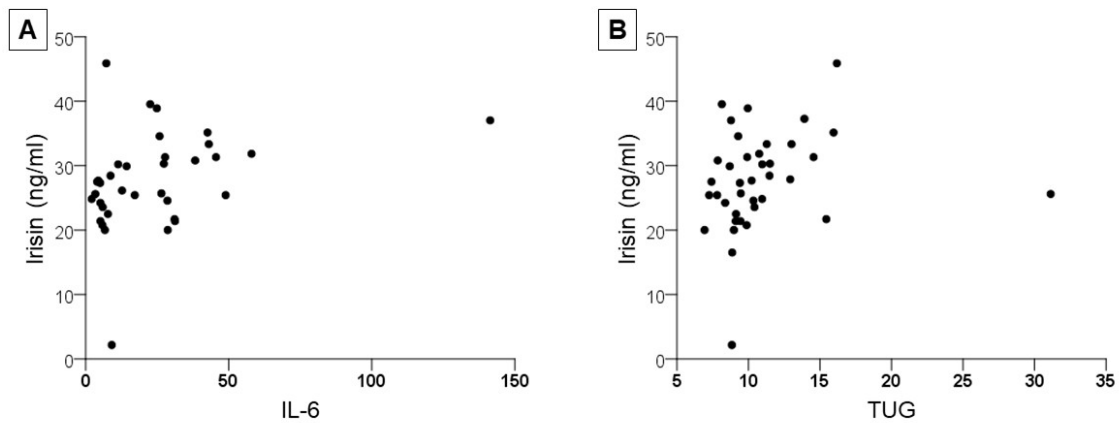


Figure 3. Correlation of irisin serum levels with IL-6 circulating levels (A) and TUG (D) in RA patients. Data were analyzed by Spearman’s correlation coefficient.

Discussion

The myokines irisin and myostatin participate in bone and skeletal muscle homeostasis and may be representative of the clinical status of these tissues. We found that serum levels of myostatin were diminished in RA patients but were not related to one-year radiographic progression and to lean mass amount, as well as irisin. The use of bDMARD resulted in significantly higher irisin and tendency to lower myostatin serum concentrations in RA patients, while irisin was positively correlated with circulating IL-6 and mobility evaluated by timed up and go (TUG) test.

RA patients in our study were mostly slow progressors over one year. Although lower irisin and higher myostatin levels were expected in patients with greater mean SHS or rapid radiographic progression, it was not noticed in our study. Literature reports that irisin exerts anabolic action in bone, which is mediated primarily through the stimulation of bone formation (23). *In vivo* administration of irisin increases cortical bone mass and strength, blunts the osteoblast differentiation inhibitor sclerostin, and modulates the Osteoprotegerin/RANKL to a physiological level, inhibiting osteoclasts formation and activity (7, 24). On the other hand, myostatin blockade is known to increase bone formation and, specifically in RA and in experimental arthritis, it is highly expressed in synovial tissue and directly stimulates osteoclast differentiation promoting bone resorption (8, 25). In osteoclasts precursors, myostatin and RANKL binding lead to enhanced expression of several osteoclast-specific target genes, including *Nfatc1*, favoring osteoclastogenesis (8). In our study, the absence of greater progression of joint erosion in one year may have influenced the power to detect correlations with the myokines. As

serum myostatin was lower in RA patients than in control individuals, with no consequent impact in bone erosion evaluated by SHS, the hypothesis that the joint and the circulating myostatin contents are distinct is also reasonable. Another study has identified lower myostatin serum levels in RA patients compared to controls, as well (26). Although not significantly different, serum irisin levels tended to be lower in RA patients in our study, similarly to a previous report, in which RA patients presented lower irisin levels than control subjects (27).

Associations between disease activity and irisin or myostatin serum levels were not identified in this study. In RA, negative correlation has been described between DAS28-ESR and serum irisin (27, 28). In osteoarthritis (OA), otherwise, the serum and synovial concentrations of myostatin and irisin were equivalent and associated with higher and lower disease severity, respectively (29, 30).

Skeletal muscle is admittedly the largest myokines secretor to the blood stream, and changes in their levels may reflect disorders in muscle tissue, mostly (31-34). The RA patients with low lean mass were few and presented no significant difference in irisin and myostatin levels compared to patients with normal lean mass. As an additional factor contributing to myokines levels in RA is the use of bDMARDs by patients. We identified significant higher serum irisin levels in patients treated with bDMARDs, while serum myostatin levels tended to be decreased in patients treated with bDMARDs. It has been demonstrated that the administration of TNF- α to mice significantly reduced irisin gene and protein expression in skeletal muscle. Also, the treatment of myotubes with TNF- α and IL-1 β down-regulated irisin mRNA (35). The RA systemic increase in pro-inflammatory cytokines possibly diminishes irisin secretion, as the patients present a tendency of lower irisin serum levels than controls in this study. Otherwise, the treatment with bDMARDs is likely to minimize the irisin reduction in RA patients. A positive feedback among pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β) and myostatin have been shown in FLS isolated from RA patients (8, 36, 37). Additionally, in culture of muscle cells, TNF- α promoted increase of myostatin expression through the NF- κ B- pathway (38). In the previous study reporting low myostatin levels in RA population, the authors argued that most of patients were using bDMARDs and possibly the immune modulation positively affected muscle mass, thereby decreasing myostatin (26). IL-6 and irisin serum levels were positively correlated in our RA patients, which is plausible since prior data demonstrated that treatment of myoblasts and adipocytes with irisin increases IL-6 expression. These studies also showed that IL-6 increase mediated by irisin have favorable consequences, such as skeletal muscle hypertrophy and commitment of adipocyte precursors towards a beige phenotype (10, 39).

Finally, the evaluation of physical function performed in our RA patients demonstrated that irisin is positively associated with TUG. The TUG test assesses gait speed and lower extremity mobility and function, and higher values represent worse physical function. *In vitro* studies showed that treatment of muscle cells with recombinant irisin increases the gene expression of myosin heavy chain type 2X, which is a fast type muscle fiber isoform (10, 24). Additionally, increased susceptibility to fatigue is a functional consequence of the transition of the fiber type from slow to fast, following increased type 2 fiber content (40). This way, muscle fatigue could be a possible link between higher levels of irisin and higher values of TUG, representing reduced physical performance. However, the association between irisin and TUG is not completely clear, since our sample consists of elderly women and it has been reported that aging leads to conversion of fast type 2 muscle fibers into slow type 1 fibers, reducing muscle power required for daily activities (41). Also, negative correlation has been detected between irisin serum levels and sarcopenia, demanding more investigation about this matter (32, 42).

The number of patients included is one of the limitations of this study, as well as the low proportion of RA patients with greater radiographic progression and low lean mass.

In conclusion, most of the RA patients evaluated in this study did not show high radiographic progression or low lean mass, which may have limited the power of the study to identify an association with myokines serum levels. The reduced serum myostatin in RA patients, compared to controls, agrees with previous study, and we additionally showed that bDMARD treatment influences the myokines serum levels. Irisin was positively correlated with IL-6 circulating levels, however the association with mobility decline evaluated by TUG was surprising.

Funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundo de incentivo à pesquisa e eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Fipe-Hcpa).

Acknowledgements: Joshua Baker and Poli Mara Spritzer.

References

1. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18001.
2. Scott DL, Pugner K, Kaarela K, Doyle DV, Woolf A, Holmes J, et al. The links between joint damage and disability in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2000;39(2):122-32.
3. van der Heijde D. How to read radiographs according to the Sharp/van der Heijde method. *J Rheumatol*. 2000;27(1):261-3.
4. van den Broek M, Dirven L, de Vries-Bouwstra JK, Dehpoor AJ, Goekoop-Ruiterman YP, Gerards AH, et al. Rapid radiological progression in the first year of early rheumatoid arthritis is predictive of disability and joint damage progression during 8 years of follow-up. *Ann Rheum Dis*. 2012;71(9):1530-3.
5. Vermeer M, Kuper HH, Moens HJ, Drossaers-Bakker KW, van der Bijl AE, van Riel PL, et al. Sustained beneficial effects of a protocolized treat-to-target strategy in very early rheumatoid arthritis: three-year results of the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring remission induction cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65(8):1219-26.
6. Laurent MR, Dubois V, Claessens F, Verschuere SM, Vanderschuere D, Gielen E, et al. Muscle-bone interactions: From experimental models to the clinic? A critical update. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;432:14-36.
7. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Pignataro P, Buccoliero C, Liu P, et al. The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(39):12157-62.
8. Dankbar B, Fennen M, Brunert D, Hayer S, Frank S, Wehmeyer C, et al. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice. *Nat Med*. 2015;21(9):1085-90.
9. Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Sassi AH, et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014;71(22):4361-71.
10. Reza MM, Subramaniyam N, Sim CM, Ge X, Sathiakumar D, McFarlane C, et al. Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy. *Nat Commun*. 2017;8(1):1104.
11. Colaianni G, Sanesi L, Storlino G, Brunetti G, Colucci S, Grano M. Irisin and Bone: From Preclinical Studies to the Evaluation of Its Circulating Levels in Different Populations of Human Subjects. *Cells*. 2019;8(5).
12. Baker JF, Von Feldt J, Mostoufi-Moab S, Noaiseh G, Taratuta E, Kim W, et al. Deficits in Muscle Mass, Muscle Density, and Modified Associations With Fat in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care & Research*. 2014;66(11):1612-8.
13. Baker JF, Mostoufi-Moab S, Long J, Taratuta E, Leonard MB, Zemel B. Low Muscle Density is Associated with Deteriorations in Muscle Strength and Physical Functioning in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2019.
14. Santo RC, Silva JM, Lora PS, Moro ALD, Freitas EC, Bartikoski BJ, et al. Cachexia in patients with rheumatoid arthritis: a cohort study. *Clin Rheumatol*. 2020.
15. Baker JF, Long J, Mostoufi-Moab S, Denburg M, Jorgenson E, Sharma P, et al. Muscle Deficits in Rheumatoid Arthritis Contribute to Inferior Cortical Bone Structure and Trabecular Bone Mineral Density. *J Rheumatol*. 2017;44(12):1777-85.
16. van der Heijde D, Landewé R. Should radiographic progression still be used as outcome in RA? *Clin Immunol*. 2018;186:79-81.
17. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569-81.

18. Weber D, Long J, Leonard MB, Zemel B, Baker JF. Development of Novel Methods to Define Deficits in Appendicular Lean Mass Relative to Fat Mass. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164385.
19. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR. Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum*. 1980;23(2):137-45.
20. Guralnik JM, Ferrucci L, Simonsick EM, Salive ME, Wallace RB. Lower-extremity function in persons over the age of 70 years as a predictor of subsequent disability. *N Engl J Med*. 1995;332(9):556-61.
21. Podsiadlo D, Richardson S. The timed "Up & Go": a test of basic functional mobility for frail elderly persons. *J Am Geriatr Soc*. 1991;39(2):142-8.
22. Inoue E, Yamanaka H, Hara M, Tomatsu T, Kamatani N. Comparison of Disease Activity Score (DAS)28- erythrocyte sedimentation rate and DAS28- C-reactive protein threshold values. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(3):407-9.
23. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Oranger A, Mori G, Brunetti G, et al. Irisin enhances osteoblast differentiation in vitro. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:902186.
24. Colaianni G, Mongelli T, Cuscito C, Pignataro P, Lippo L, Spiro G, et al. Irisin prevents and restores bone loss and muscle atrophy in hind-limb suspended mice. *Sci Rep*. 2017;7(1):2811.
25. Bialek P, Parkington J, Li X, Gavin D, Wallace C, Zhang J, et al. A myostatin and activin decoy receptor enhances bone formation in mice. *Bone*. 2014;60:162-71.
26. Kersch-Schindl K, Ebenbichler G, Foeger-Samwald U, Leiss H, Gesslbauer C, Herceg M, et al. Rheumatoid arthritis in remission: Decreased myostatin and increased serum levels of periostin. *Wiener Klinische Wochenschrift*. 2019;131(1-2):1-7.
27. Gamal RM, Mohamed ME, Hammam N, El Fetoh NA, Rashed AM, Furst DE. Preliminary study of the association of serum irisin levels with poor sleep quality in rheumatoid arthritis patients. *Sleep Med*. 2020;67:71-6.
28. Lavrova DP, Zavodovsky BV, Akhverdyan YR, Polyakova YV, Sivordova LE, Zborovskaya IA, et al. [Irisin as a new marker for the early diagnosis of low-traumatic fractures in rheumatoid arthritis.]. *Klin Lab Diagn*. 2018;63(11):702-6.
29. Zhao C, Shao Y, Lin C, Zeng C, Fang H, Pan J, et al. Myostatin serum concentrations are correlated with the severity of knee osteoarthritis. *J Clin Lab Anal*. 2017;31(5).
30. Mao Y, Xu W, Xie Z, Dong Q. Association of Irisin and CRP Levels with the Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2016;20(2):86-9.
31. Chang JS, Kim TH, Nguyen TT, Park KS, Kim N, Kong ID. Circulating irisin levels as a predictive biomarker for sarcopenia: A cross-sectional community-based study. *Geriatr Gerontol Int*. 2017;17(11):2266-73.
32. Park HS, Kim HC, Zhang D, Yeom H, Lim SK. The novel myokine irisin: clinical implications and potential role as a biomarker for sarcopenia in postmenopausal women. *Endocrine*. 2019;64(2):341-8.
33. Peng LN, Lee WJ, Liu LK, Lin MH, Chen LK. Healthy community-living older men differ from women in associations between myostatin levels and skeletal muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018;9(4):635-42.
34. Chew J, Tay L, Lim JP, Leung BP, Yeo A, Yew S, et al. Serum Myostatin and IGF-1 as Gender-Specific Biomarkers of Frailty and Low Muscle Mass in Community-Dwelling Older Adults. *J Nutr Health Aging*. 2019;23(10):979-86.
35. Matsuo Y, Gleitsmann K, Mangner N, Werner S, Fischer T, Bowen TS, et al. Fibronectin type III domain containing 5 expression in skeletal muscle in chronic heart failure-relevance of inflammatory cytokines. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2015;6(1):62-72.
36. Su CM, Hu SL, Sun Y, Zhao J, Dai CQ, Wang LH, et al. Myostatin induces tumor necrosis factor-alpha expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the PI3K-Akt signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology*. 2019;234(6):9793-801.

37. Hu S-L, Chang A-C, Huang C-C, Tsai C-H, Lin C-C, Tang C-H. Myostatin Promotes interleukin-1 beta expression in rheumatoid arthritis synovial Fibroblasts through inhibition of mir-21-5p. *Frontiers in Immunology*. 2017;8.
38. Zhang L, Rajan V, Lin E, Hu Z, Han HQ, Zhou X, et al. Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease. *FASEB J*. 2011;25(5):1653-63.
39. Kristóf E, Klusóczki Á, Veress R, Shaw A, Combi ZS, Varga K, et al. Interleukin-6 released from differentiating human beige adipocytes improves browning. *Exp Cell Res*. 2019;377(1-2):47-55.
40. Hennebry A, Berry C, Siriatt V, O'Callaghan P, Chau L, Watson T, et al. Myostatin regulates fiber-type composition of skeletal muscle by regulating MEF2 and MyoD gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;296(3):C525-34.
41. von Haehling S, Morley JE, Anker SD. From muscle wasting to sarcopenia and myopenia: update 2012. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2012;3(4):213-7.
42. Planella-Farrugia C, Comas F, Sabater-Masdeu M, Moreno M, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, et al. Circulating Irisin and Myostatin as Markers of Muscle Strength and Physical Condition in Elderly Subjects. *Front Physiol*. 2019;10:871.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos pacientes com AR avaliados neste estudo não apresentou alta progressão radiográfica ou baixa massa magra, podendo impactar no poder do estudo de encontrar possíveis associações entre esses parâmetros e os níveis séricos de miocinas. Adicionalmente, existe a hipótese haver diferenças nas concentrações circulantes e articulares de miocinas nos pacientes com AR. A miostatina sérica apresentou redução em pacientes com AR, em comparação com os controles, o que está de acordo com um estudo anteriormente publicado. Também foi demonstrado nesse estudo que o uso de MMCD biológicos parece influenciar no aumento dos níveis séricos da irisina e na diminuição dos níveis séricos de miostatina. Por fim, a irisina correlacionou-se positivamente com a IL-6, o que é plausível, de acordo com estudos anteriores nos quais a irisina atua regulando positivamente a expressão de IL-6 em células musculares e adipócitos, no entanto, a associação entre irisina e menor mobilidade, avaliada pelo teste TUG, não ficou muito clara.

Em adição ao estudo da avaliação dos níveis séricos de miocinas e sua associação com a progressão radiográfica em uma população de pacientes com AR do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, a avaliação dos níveis séricos de miocinas e sua relação com parâmetros de composição corporal, de maneira mais ampla, é importante. Visto que estudos em populações de outros países já reportaram anormalidades significativas, como alterações na massa muscular e na massa de gordura nos pacientes com AR, bem como déficits na força muscular e na funcionalidade, a possibilidade de inclusão de pacientes de outro importante hospital universitário no Brasil, nesse caso o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, permite melhor descrição da população brasileira. Assim, foi realizada, adicionalmente, a análise de composição corporal de pacientes com AR atendidos em dois estados brasileiros, além da mensuração de irisina e miostatina séricas.

9 PERSPECTIVAS

A coorte de paciente incluída neste estudo faz parte de um estudo longitudinal com avaliações em tempo basal, em um ano e em cinco anos. Por conta disso, tem-se a intenção de coletar dados dos pacientes novamente na visita dos cinco anos. Dessa maneira, informações adicionais a respeito da erosão óssea e da massa magra em relação aos níveis basais de irisina e de miostatina poderiam ser agregadas, elucidando melhor o seu papel na AR.

Adicionalmente, a avaliação dos níveis de miocinas no líquido sinovial coletado de pacientes com AR com indicação para artrocentese poderia ser informativa, no sentido de esclarecer se há diferenças entre as concentrações de miocinas circulantes e articulares.

9.1 Artigo 2

O artigo seguinte será submetido na revista *“Advances in Rheumatology”*.

Association of irisin and myostatin serum levels with body composition and disability in a cohort of Brazilian female patients with established rheumatoid arthritis: a cross-sectional study

Jordana Miranda de Souza Silva^{1, 2}; Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo^{1, 2}; Bárbara Jonson Bartikoski^{1, 2}; Nayara Felicidade Tomaz Braz³; Érica Leandro Marciano Vieira^{3, 4}; Eduarda Correa Freitas¹; Ana Cristina Simões e Silva^{3, 4}; Adriana Maria Kakehasi⁴; Ricardo Machado Xavier^{1, 2}

¹Laboratório de Doenças Autoimunes, Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

² Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

³Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

⁴Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil

Abstract

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory disease characterized by abnormal body composition. We aimed to evaluate body composition alterations rate and associated irisin and myostatin serum levels in patients with RA.

Methods: One-hundred twenty-one female RA patients were enrolled in the study. Disease activity and treatment were investigated. Body mass index was determined, and patients were categorized as underweight, normal, overweight, obese, and severely obese. Body composition was evaluated using dual X-ray absorptiometry (DXA) to assess the presence of high fat mass, low muscle quantity and low lean mass. Disability was assessed by Health Assessment Questionnaire-Disability Index (HAQ-DI), and irisin and myostatin serum levels were assessed by ELISA.

Results: Sixty-eight percent of the patients were classified as overweight or obese, while 82% presented high fat mass. Low muscle quantity or low lean mass were found in around 30% of the patients, and greater fat and muscle mass were present in obese patients, compared to non-obese. Lean mass adjusted by fat mass was reduced by the use of glucocorticoids and was positively correlated with myostatin serum levels.

Conclusions: The rate of obesity and adiposity was high in the RA population studied, while about one-third of the patients presented low muscle mass. The use of glucocorticoids was correlated with a decrease in lean mass adjusted by fat mass, reinforcing the catabolic effects of this drug on skeletal muscle. Lower lean mass was correlated with lower myostatin serum levels, although myostatin is recognizably a negative regulator of muscle mass, requiring further examination.

Background

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic systemic inflammatory disease primarily characterized by synovial joint degradation (1). About 20-40% of RA patients present extra-articular manifestations, which have been linked to higher morbidity and mortality in RA (2). Adverse changes to body composition, including obesity, excess adiposity, and low muscle mass, occur in proportion of RA patients, even with the expansion of treatment options.

Patients with RA have high risk for development of sarcopenia and low muscle mass. Sarcopenia, defined as the presence of low muscle strength, mass and function, following aging

or chronic disease, has been reported in 28-37% of RA patient population (3-7). The presence of low muscle mass, occurring even in early RA, reaches 49% of patients, with increased incidence with aging (6, 8, 9). Moreover, RA patients present the association of low lean mass with stable or increased total fat mass, a condition referred to as rheumatoid cachexia, what frequently leads to underestimations of sarcopenia in patients who might have the same weight and body mass index (BMI) compared to the normal population (10, 11). Similar to general population, obesity and excess adiposity are associated with greater and worsening disability among RA patients (12-14). Also, adiposity was found to decrease the odds of achieving disease remission, and to be related with elevated CRP values among obese women with RA (15, 16). Otherwise, both BMI and weight loss are predictors of cause-specific mortality in RA. Indeed, the loss approximately 3kg/m² per year was associated with a significantly increased risk of death, with the greatest risk occurring in patients who have gone from obesity to underweight (<20kg/m²) (17).

Several blood indicators have been proposed as biomarkers for body composition changes and muscle dysfunction (18, 19). In this sense, the myokines, described as group of cytokines and growth factors produced and released by skeletal muscle, are of increasing interest in RA (20). The myokine irisin has anabolic roles in muscle and bone, enhancing muscle protein synthesis and bone mass and strength (21, 22). It was firstly described as a molecule able to shift adipocytes from white to brown phenotype (23). With opposite roles, myostatin is known as suppressor of skeletal muscle growth, upregulating proteolysis pathways and inhibiting muscle protein synthesis and regeneration (24). Myostatin also acts as an inhibitor of bone mass and remodeling and its deletion is associated with diminished adipose tissue (25-27).

Despite the knowledge about myokines role in different tissues and body composition changes, there is a gap in our knowledge regarding the association between these biomarkers in RA patients. So, in this study our aims were to verify the occurrence of body composition alterations and to evaluate the associations of the myokines levels (myostatin and irisin) with body composition and physical function in a population of RA patients.

Methods

Patients. This is a cross-sectional, observational study conducted in two University Hospitals in Brazil, Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Hospital das Clínicas de Belo Horizonte. One hundred forty-one female patients with RA, aged 40–70 years, according to America College of Rheumatology/European League Against Rheumatism 2010 criteria, were enrolled in the study

(28). The exclusion criteria included dysphagia, illicit drug use, alcohol abuse, severe heart failure (New York Heart Association [NYHA] class III or IV), severe chronic obstructive pulmonary disease, abnormal hepatic function, uncontrolled diabetes, thyroid dysfunction (hypo or hyperthyroidism), severe kidney disease, and any other diffuse connective tissue disease. Patients with malignant disease, deformities in the lower limbs, and any surgical history in the previous year were also excluded. The protocol was approved by hospitals' Ethics Committee (study 2018-0223) and informed consent was obtained from all participants.

Medication use was assessed in the medical record. Disease activity was evaluated by the disease activity score for 28 joints-C reactive protein (DAS28-CRP) and classified as remission (<2.3), low (2.3-2.7), moderate (>2.7-4.1) and high (>4.1) (29).

Myokines and inflammatory markers. Fasting blood samples were collected, and serum was stored at -80°C for subsequent measurements. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to evaluate irisin (Phoenix Pharmaceuticals) and myostatin (R&D Systems) serum levels according to manufacturer's instructions. Clinical laboratory assays [Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) and CRP] were performed using standard methods in Hospital Clinical Pathology Department.

Body composition. Body mass index (BMI) of RA patients was calculated as weight divided by height squared, expressed in kg/m^2 , and BMI categories were defined as underweight (<20 kg/m^2), normal-weight (20–<25 kg/m^2), overweight (25–<30 kg/m^2), obese (>30 kg/m^2) and severely obese (≥ 30 kg/m^2) (30). Additionally, subjects underwent total body dual-emission x-ray absorptiometry (DXA) scanning (Delphi Systems, Hologic, Inc., Bedford, MA) to measure appendicular lean mass and total fat mass. Body composition estimates were adjusted for height² to generate appendicular lean mass index (ALMI, kg/m^2) and fat mass index (FMI, kg/m^2). Subsequently, fat-adjusted ALMI (ALMI_{FMI}) Z-Scores were generated, based on residuals obtained from the regression of ALMI Z-Score on FMI Z-Score within age, sex, and race categories. Thus, "low fat-adjusted lean for age" was defined as ALMI_{FMI} Z-score ≤ -1 (31).

Physical function. Disability was assessed by the Health Assessment Questionnaire-Disability Index (HAQ-DI), which ranges from 0.0 to 3.0, with higher values representing worse functional status (32).

Statistical analysis. Data distribution was preliminarily checked for normality with the Kolmogorov-Smirnov test. The differences in FMI, ALMI and ALMI_{FMI} between obese and non-obese patients, and the differences in BMI between patients using or non-using bDMARDs and glucocorticoids were evaluated by Mann-Whitney U test. The differences in FMI, ALMI and

ALMI_{FMI} between patients using or non-using bDMARDs and glucocorticoids were evaluated by Student's t test. To correlate BMI with DAS28-CRP and HAQ, Spearman's correlation coefficients were used. To correlate FMI, ALMI and ALMI_{FMI} with DAS28-CRP and HAQ Pearson's correlation coefficients were used. The correlation of irisin and myostatin serum levels and BMI, FMI, ALMI, ALMI_{FMI}, and HAQ were determined based on Spearman's correlation coefficients. The differences in irisin and myostatin serum levels among BMI groups were evaluated by Kruskal-Wallis test, while the differences between FMI, ALMI and ALMI_{FMI} groups were evaluated by Mann-Whitney U test. P-values ≤ 0.05 were considered statistically significant for differences and correlations. The Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 20.0 was used to analyze the data.

Results

The characteristics of the study population are summarized in Table 1. Briefly, a total of 121 eligible RA patients completed study procedures and were included in the analysis. RA participants had a mean age of 53.5 years, mean disease duration of 11.2 years and moderate disease activity on average. Approximately 25% of patients were being treated with biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs).

Table 1. Characteristics of the study population.

	RA patients n=121
Age (years), mean \pm SD	53.5 \pm 8.7
Disease duration (years), mean \pm SD	13.9 \pm 9.6
bDMARDs, n (%)	29 (24.8)
Glucocorticoids, n (%)	98 (81)
DAS28-CRP, mean \pm SD	3.8 \pm 1.3
Remission, n (%)	18 (15.2)
Low, n (%)	12 (10.2)

Moderate, n (%)	39 (33.1)
High, n (%)	49 (41.5)
CRP (mg/dl), mean \pm SD	12.7 \pm 11.2
ESR (mm/h), mean \pm SD	30.1 \pm 19.1
Irisin (ng/ml), mean \pm SD	25.5 \pm 8.2
Myostatin (pg/ml), mean \pm SD	3019.1 \pm 1280.5
BMI in kg/m ² , mean \pm SD	27.4 \pm 4.9
FMI in kg/m ² , mean \pm SD	11.3 \pm 3.2
ALMI in kg/m ² , mean \pm SD	6 \pm 0.8
ALMI _{FMI} Z-score, mean \pm SD	-0.4 \pm 1.2
HAQ score, mean \pm SD	0.9 \pm 0.7

SD, standard deviation; RF, rheumatoid factor; ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; bDMARDs, biological disease-modifying antirheumatic drugs; DAS28-PCR, disease activity score 28-C reactive protein; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate; BMI, body mass index; ALMI, appendicular lean mass index; FMI, fat mass index; ALMI_{FMI} Z-score, appendicular lean mass index adjusted by fat mass index Z-score; HAQ, health assessment questionnaire.

Body composition measures in RA population

The patients categorized in underweight, normal-weight, overweight, obese, and severely obese were 5%, 27.3%, 37.2%, 22.3%, and 8.3 % respectively. High fat mass was detected in 81.8% of the patients, defined as the FMI above 8.3 kg/m² (33). Low muscle quantity was identified in 28.9% of patients, considering an ALMI below 5.5 kg/m², and 29.8% of the patients had ALMI_{FMI} Z-score \leq -1 (3, 31) (Figure 1).

FMI was positively correlated with ALMI in RA patients ($r=0.549$; $p=0.001$). Obese patients (BMI ≥ 30 kg/m²) presented significantly greater FMI and ALMI than non-obese patients (BMI < 30 kg/m²) (Table 2).

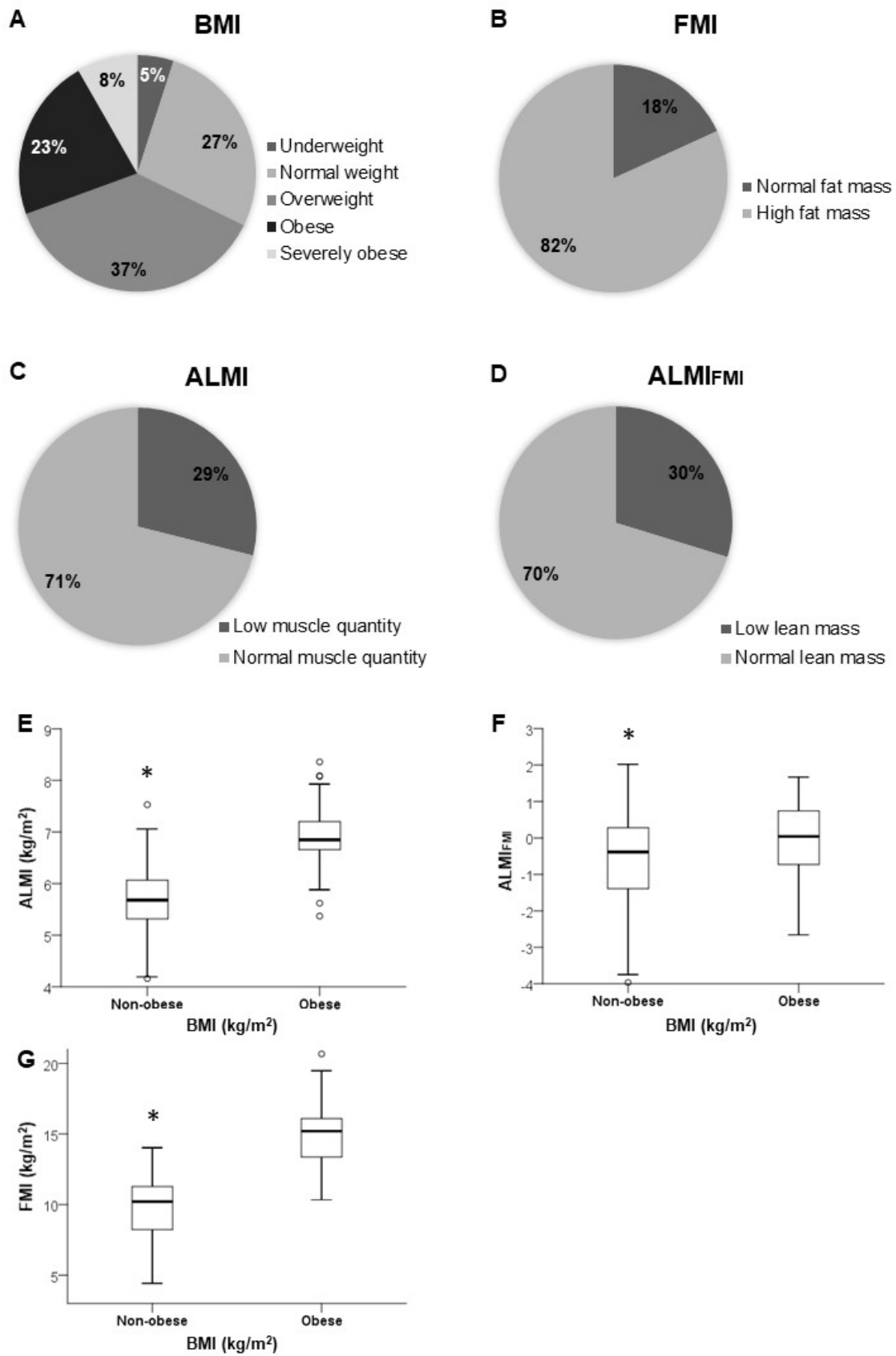


Figure 1. Frequency of BMI (A), FMI (B), ALMI (C) and ALMI_{FMI} (D) alterations in the RA population studied. ALMI (E), ALMI_{FMI} (F) and FMI (G) measures between obese and non-obese RA patients.

Data were analyzed by Mann-Whitney U test and graphics express mean and standard deviation. * $p \leq 0.05$ RA non-obese patients vs RA obese patients.

Body composition measures and disease activity and treatment

Disease activity score was not correlated with BMI ($r = -0.010$; $p = 0.915$), FMI ($r = -0.039$; $p = 0.677$), ALMI ($r = 0.037$; $p = 0.694$), and $ALMI_{FMI}$ ($r = 0.008$; $p = 0.935$). Body composition measures were not different between patients treated or not with bDMARDs, while patients treated with glucocorticoids presented significantly lower $ALMI_{FMI}$ values than non-treated patients (Table 2).

Table 2. Body composition and RA treatment

	BMI (kg/m ²)	FMI (kg/m ²)	ALMI (kg/m ²)	$ALMI_{FMI}$ Z-score
Glucocorticoids				
Yes	26.6 (24-30.4)	11.3 (3.1)	5.9 (0.8)	-0.5 (1.2)*
No	27.4 (24.9-30.5)	11.3 (3.7)	6.3 (0.8)	0.1 (1.2)
bDMARDs				
Yes	27.4 (24.1-30.2)	10.9 (3)	6 (0.6)	-0.2 (1.1)
No	26.3 (23.9-30.4)	11.4 (3.4)	6 (0.9)	-0.4 (1.3)

Data were analyzed by Mann-Whitney U test or Student t test and are represented by mean (standard deviation) or median (interquartile range). * $p \leq 0.05$ RA patients treated with glucocorticoids vs RA patients non-treated with glucocorticoids. BMI, body mass index; ALMI, appendicular lean mass index; FMI, fat mass index; $ALMI_{FMI}$ Z-score, appendicular lean mass index adjusted by fat mass index Z-score; bDMARDs, biological disease-modifying antirheumatic drugs.

Body composition and disability

No significant correlations were found between HAQ scores and BMI ($r = 0.163$; $p = 0.074$), FMI ($r = 0.169$; $p = 0.063$), ALMI ($r = 0.092$; $p = 0.317$), and $ALMI_{FMI}$ ($r = 0.007$; $p = 0.936$). Disability levels tended to be greater in obese individuals, as well as in patients with greater FMI, and lower ALMI and $ALMI_{FMI}$ (Table 3).

Table 3. Body composition and disability

	HAQ-DI
BMI (kg/m²)	
Non-obese	0.81 (0.25-1.38)
Obese	1.13 (0.50-1.87)
FMI (kg/m²)	
Normal fat mass	0.81 (0.25-1.63)
High fat mass	1 (0.38-1.63)
ALMI (kg/m²)	
Low muscle quantity	1 (0.38-1.63)
Normal muscle quantity	0.81 (0.25-1.63)
ALMI_{FMI} Z-score	
Low lean mass	1 (0.38 (1.44)
Normal lean mass	0.88 (0.25-1.75)

Data were analyzed by Mann-Whitney U test and are represented by median (interquartile range). No significant differences were found. BMI, body mass index; ALMI, appendicular lean mass index; FMI, fat mass index; ALMI_{FMI} Z-score, appendicular lean mass index adjusted by fat mass index Z-score.

Irisin and myostatin serum levels and body composition

Irisin serum levels were not correlated with BMI, FMI, ALMI or ALMI_{FMI} measures. Myostatin serum levels were positively correlated with ALMI_{FMI} ($r=0.190$; $p=0.037$), and not correlated with BMI, FMI and ALMI measures (Table 4). Irisin and myostatin serum levels were not significantly different between obese and non-obese RA patients, or between patients with high and normal fat mass. Regarding lean mass classification, serum irisin and myostatin did not differ between RA patients with low or normal muscle mass (Figure 2).

Table 4. Association of irisin and myostatin serum levels and body composition

	Irisin (ng/ml)		Myostatin (pg/ml)	
	r	p	r	p
BMI (kg/m ²)	0.114	0.211	0.095	0.303
FMI (kg/m ²)	0.113	0.215	0.042	0.649
ALMI (kg/m ²)	0.105	0.250	0.156	0.088
ALMI _{FMI} (units)	0.131	0.153	0.190	0.037*

Spearman's correlation coefficients of the study variables. *p≤0.05. BMI, body mass index; FMI, fat mass index; ALMI, appendicular mass index; ALMI_{FMI}, appendicular lean mass index adjusted by fat mass.

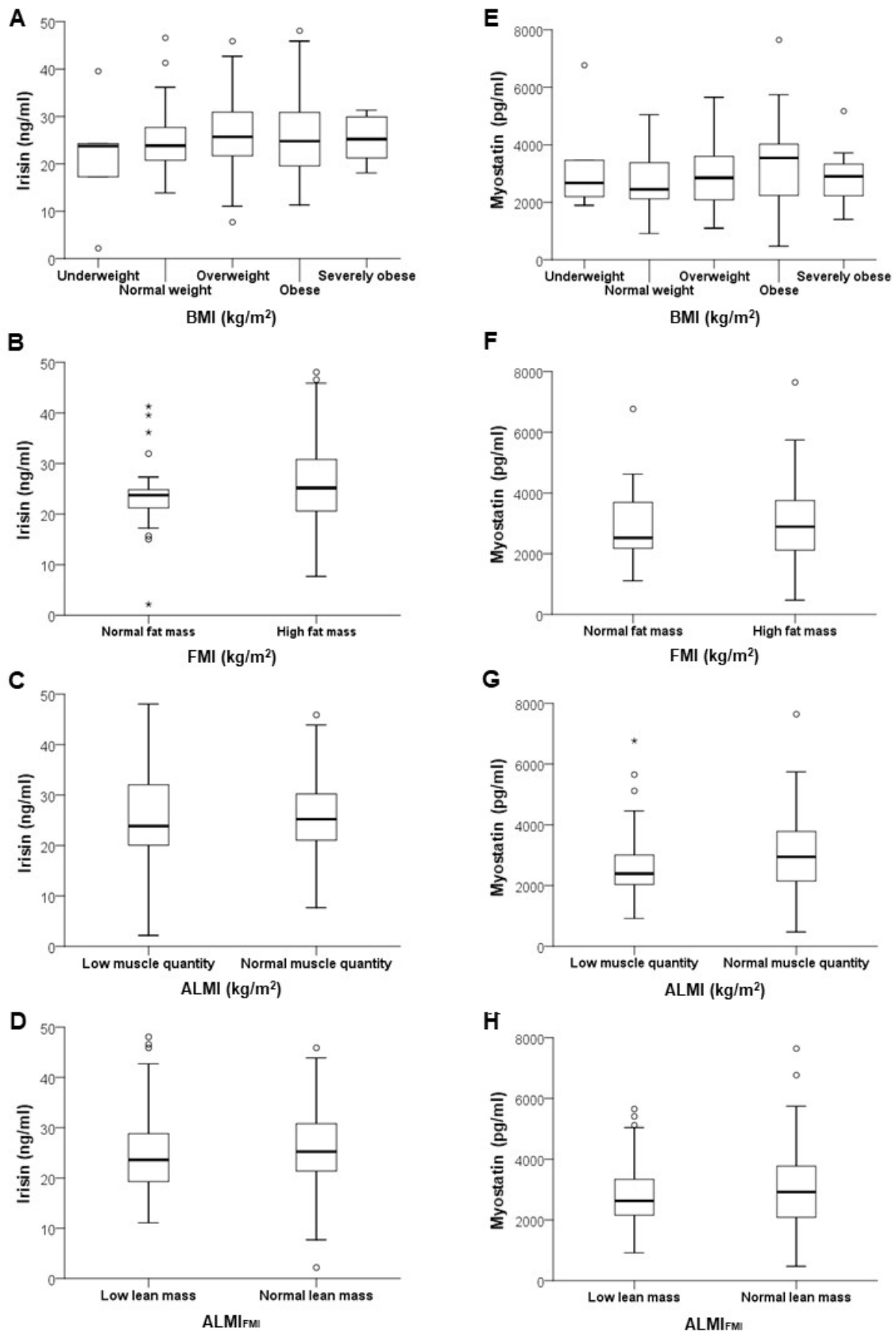


Figure 3. Irisin serum levels in RA patients according to BMI (A), FMI (B), ALMI (C) and ALMI_{FMI} (D) categories. Myostatin serum levels in RA patients according to BMI (E), FMI (F), ALMI (G) and ALMI_{FMI} (H) categories. Data were analyzed by Kruskal-Wallis or Mann-Whitney U test and

graphics express mean and standard deviation. No significant difference was found among groups.

Irisin and myostatin serum levels and disability

Most RA patients in this study presented low or moderate disability. Irisin and myostatin serum levels were not associated with HAQ scores ($r=0.099$; $p=0.279$ and $r=-0.028$; $p=0.762$) and were not different among HAQ categories.

Discussion

In this study, most of the patients enrolled were overweight or obese, and presented high fat mass. Around 30% of the patients exhibited low muscle quantity or low lean mass, whose BMI was significantly lower compared with patients with normal muscle quantity or lean mass. The use of glucocorticoids was positively correlated with $ALMI_{FMI}$ Z score, while the use of bDMARDs, disease activity, and disability were not associated with body composition parameters. Irisin and myostatin serum levels were not different in patients with or without body composition changes, however, myostatin serum levels were associated with greater low lean mass occurrence. Disability index was also not correlated with myokines serum levels.

Our patients presented a mean BMI value of 27.4 kg/m^2 , and 67.8% were classified as overweight or obese. Other studies also report a prevalence of $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ above 60% in RA patients (12, 15). For a given value of BMI, body fat may differ, and considering that RA patients have higher percentages of body fat, a $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ as a cut-off value for obesity was proposed in a study with female patients with RA (34). Indeed, high fat mass ($FMI > 8.3 \text{ kg/m}^2$) was found in 81.8% of our patients. Although most of our patients were overweight, 5% of the patients were classified as underweight ($< 20 \text{ kg/m}^2$), which is associated with adverse outcomes in RA (35-37). RA patients with obesity and excess adiposity have shown greater disability, and in our study worsening HAQ was observed in patients with obesity or high fat mass, although not significantly (12, 38). A longitudinal study and a meta-analysis reported that obese RA patients have higher disease activity scores and lower chance of achieving and sustain disease remission, but our cross-sectional study did not find association between BMI and DAS28-CRP scores (16, 38).

As previously shown, under normal circumstances, individuals with greater fat mass are expected to present greater muscle mass (31). In fact, our RA patients showed positive

correlation between ALMI and FMI, with the obese RA patients demonstrating simultaneously greater ALMI and FMI than non-obese patients. Literature also shows that the positive association between ALMI and FMI usually does not translate into proportional gains in strength, once RA patients with obesity and excess adiposity have greater disability, suggesting reduced muscle quality (12, 38, 39). In this sense, methodologies that assess appendicular lean mass relative to fat mass could better estimate relationships between muscle mass and physical function. ALMI adjusted for FMI allows for the quantification of deficits in subjects compared with a reference group of similar age, sex, race and FMI, generating an $ALMI_{FMI}$ Z-score (31). In our RA population, the average $ALMI_{FMI}$ was -0.41 and about 30% of the patients presented low lean mass ($ALMI_{FMI} \leq -1$). In United States population, mean $ALMI_{FMI}$ was -0.58, and 14.4% patients presented lean mass, which is slightly different than ours, although our sample size were considerably smaller (31). $ALMI_{FMI}$ Z-score was found to be inversely correlated with HAQ scores, and in our population we observed a tendency to increased disability coupled with reduced lean mass (40).

Considering low muscle mass as an ALMI below 6 kg/m^2 , it was present in 28.9% of our population (3). In the Japanese population, 49% of patients with RA have demonstrated low muscle mass, which was a high incidence, considering the rate of low muscle mass for Japanese elderly women is about 34% (6, 41). Low muscle mass was also reported in RA patients in United States compared to control individuals (9). Regarding the presence of low lean mass, associated with normal or greater total fat mass, our group previously published 13.3% or 33.3% as the prevalence of rheumatoid cachexia in a cohort of Brazilian RA patients, depending on the diagnostic criteria used, while the overall prevalence of rheumatoid cachexia was reported to be between 15-32%, according to a systematic review and meta-analysis (42, 43).

The use of glucocorticoids significantly reduced the lean mass adjusted by fat mass of our patients. In agreement, studies reported that average glucocorticoids dose $\geq 3.25 \text{ mg/day}$ over a 1-year period was an independent risk factor for sarcopenia development, in addition to the higher frequency of sarcopenia in patients using glucocorticoids than in those not using, and the significant association with lower muscle density (6, 7, 44). It may be related to the well-known catabolic effects of glucocorticoids on skeletal muscle, both as an endocrine hormone released in response to stress and as a drug to treat inflammation (45). The treatment with bDMARDs, however, had no effect on body composition measures in our RA patients. In contrast, negative correlation has been found between the overall use of bDMARDs and sarcopenia (6). Additionally, specific evaluation of cytokine inhibition showed that TNF and IL-6 receptor blockade promotes body weight gain in RA patients, whereas IL-6 inhibition leads

increased in lean mass and unaltered fat mass, and long-term TNF inhibition increases fat mass and preserves muscle mass (46-52).

The commonness of altered body composition in RA demands the development of biomarkers to facilitate diagnosis, support the investigation of changes over time, and improve decisions for clinical and therapeutic purposes. As irisin and myostatin are important myokines, with crucial function in several tissues involved in RA pathogenesis, such as muscle, bone and fat, the evaluation of their circulating levels in RA could be informative (21-27). Serum irisin levels have been linked to sarcopenia in elderly people, while in obesity some controversial data have been reported (18, 53, 54). Our results indicate that irisin serum levels do not distinguish body composition changes in RA. Although not associated with obesity and fat mass index, myostatin was positively correlated with ALMI_{FMI} Z-score in our patients, which suggests that when lean mass adjusted by fat mass decreases, the releasing of myostatin into the bloodstream is also reduced. As myostatin is a negative regulator of muscle mass, it was expected that its levels were inversely correlated with low lean mass. However, it has been speculated that the age-related loss of muscle may be coupled with diminished levels of myostatin, together with increasing of myostatin natural inhibitors, such as follistatin-related gene (FLRG) protein and growth and serum protein-1 (GASP-1) (55). It suggests that serum myostatin and muscle mass are able to be positively correlated, in certain conditions. The autoimmune inflammatory nature of RA, combined with different therapy strategies may possibly affect myokines production and release, as well as myokines physiologic inhibitors expression, suggesting more deeply investigation.

Conclusions

The rate of obesity and adiposity was high, while the rate of low muscle mass in the RA population studied was around 30%. Lean mass adjusted by fat mass was reduced by the use of glucocorticoids, in agreement with previous reports of the catabolic effects of this drug on skeletal muscle, and was positively correlated with myostatin serum levels, which represents an unexpected finding requiring further examination.

Funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundo de incentivo à pesquisa e eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Fipe-Hcpa).

References

1. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4:18001.
2. Giles JT. Extra-articular Manifestations and Comorbidity in Rheumatoid Arthritis: Potential Impact of Pre-Rheumatoid Arthritis Prevention. *Clin Ther*. 2019;41(7):1246-55.
3. Cruz-Jentoft AJ, Bahat G, Bauer J, Boirie Y, Bruyère O, Cederholm T, et al. Sarcopenia: revised European consensus on definition and diagnosis. *Age Ageing*. 2019.
4. Mochizuki T, Yano K, Ikari K, Okazaki K. Sarcopenia-associated factors in Japanese patients with rheumatoid arthritis: A cross-sectional study. *Geriatr Gerontol Int*. 2019;19(9):907-12.
5. Tada M, Yamada Y, Mandai K, Hidaka N. Matrix metalloprotease 3 is associated with sarcopenia in rheumatoid arthritis - results from the CHIKARA study. *Int J Rheum Dis*. 2018;21(11):1962-9.
6. Torii M, Hashimoto M, Hanai A, Fujii T, Furu M, Ito H, et al. Prevalence and factors associated with sarcopenia in patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2019;29(4):589-95.
7. Yamada Y, Tada M, Mandai K, Hidaka N, Inui K, Nakamura H. Glucocorticoid use is an independent risk factor for developing sarcopenia in patients with rheumatoid arthritis: from the CHIKARA study. *Clin Rheumatol*. 2020;39(6):1757-64.
8. Müller R, Kull M, Pölluste K, Valner A, Lember M, Kallikorm R. Factors Associated With Low Lean Mass in Early Rheumatoid Arthritis: A Cross- Sectional Study. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(11).
9. Baker JF, Von Feldt J, Mostoufi-Moab S, Noaiseh G, Taratuta E, Kim W, et al. Deficits in Muscle Mass, Muscle Density, and Modified Associations With Fat in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care & Research*. 2014;66(11):1612-8.
10. Summers GD, Deighton CM, Rennie MJ, Booth AH. Rheumatoid cachexia: a clinical perspective. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47(8):1124-31.
11. Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: a complication of rheumatoid arthritis moves into the 21st century. *Arthritis Research & Therapy*. 2009;11(2).
12. Baker JF, England BR, Mikuls TR, Sayles H, Cannon GW, Sauer BC, et al. Obesity, Weight Loss, and Progression of Disability in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2018;70(12):1740-7.
13. De Stefano F, Zambon S, Giacometti L, Sergi G, Corti MC, Manzato E, et al. Obesity, Muscular Strength, Muscle Composition and Physical Performance in an Elderly Population. *J Nutr Health Aging*. 2015;19(7):785-91.
14. Wolfe F, Michaud K. Effect of body mass index on mortality and clinical status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2012;64(10):1471-9.
15. George MD, Giles JT, Katz PP, England BR, Mikuls TR, Michaud K, et al. Impact of Obesity and Adiposity on Inflammatory Markers in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017;69(12):1789-98.
16. Liu Y, Hazlewood GS, Kaplan GG, Eksteen B, Barnabe C. Impact of Obesity on Remission and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2017;69(2):157-65.
17. Baker JF, Billig E, Michaud K, Ibrahim S, Caplan L, Cannon GW, et al. Weight Loss, the Obesity Paradox, and the Risk of Death in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*. 2015;67(7):1711-7.
18. Chang JS, Kim TH, Nguyen TT, Park KS, Kim N, Kong ID. Circulating irisin levels as a predictive biomarker for sarcopenia: A cross-sectional community-based study. *Geriatr Gerontol Int*. 2017;17(11):2266-73.

19. Ratkevicius A, Joyson A, Selmer I, Dhanani T, Grierson C, Tommasi AM, et al. Serum concentrations of myostatin and myostatin-interacting proteins do not differ between young and sarcopenic elderly men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2011;66(6):620-6.
20. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *J Muscle Res Cell Motil*. 2003;24(2-3):113-9.
21. Reza MM, Subramaniyam N, Sim CM, Ge X, Sathiakumar D, McFarlane C, et al. Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy. *Nat Commun*. 2017;8(1):1104.
22. Colaianni G, Sanesi L, Storlino G, Brunetti G, Colucci S, Grano M. Irisin and Bone: From Preclinical Studies to the Evaluation of Its Circulating Levels in Different Populations of Human Subjects. *Cells*. 2019;8(5).
23. Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
24. McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(23):12457-61.
25. Dankbar B, Fennen M, Brunert D, Hayer S, Frank S, Wehmeyer C, et al. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice. *Nat Med*. 2015;21(9):1085-90.
26. Yuan XL, Meng HY, Wang YC, Peng J, Guo QY, Wang AY, et al. Bone-cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(8):1077-89.
27. Allen DL, Hittel DS, McPherron AC. Expression and function of myostatin in obesity, diabetes, and exercise adaptation. *Med Sci Sports Exerc*. 2011;43(10):1828-35.
28. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569-81.
29. Castrejón I, Ortiz AM, Toledano E, Castañeda S, García-Vadillo A, Patiño E, et al. Estimated cutoff points for the 28-joint disease activity score based on C-reactive protein in a longitudinal register of early arthritis. *J Rheumatol*. 2010;37(7):1439-43.
30. James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M. The worldwide obesity epidemic. *Obes Res*. 2001;9 Suppl 4:228S-33S.
31. Weber D, Long J, Leonard MB, Zemel B, Baker JF. Development of Novel Methods to Define Deficits in Appendicular Lean Mass Relative to Fat Mass. *PLoS One*. 2016;11(10):e0164385.
32. Fries JF, Spitz P, Kraines RG, Holman HR. Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis Rheum*. 1980;23(2):137-45.
33. Schutz Y, Kyle UU, Pichard C. Fat-free mass index and fat mass index percentiles in Caucasians aged 18-98 y. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002;26(7):953-60.
34. Guimarães MFBR, Pinto MRDC, Raid RGSC, Andrade MVM, Kakehasi AM. Which is the best cutoff of body mass index to identify obesity in female patients with rheumatoid arthritis? A study using dual energy X-ray absorptiometry body composition. *Rev Bras Reumatol Engl Ed*. 2017;57(4):279-85.
35. Baker JF, Billig E, Michaud K, Ibrahim S, Caplan L, Cannon GW, et al. Weight Loss, the Obesity Paradox, and the Risk of Death in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(7):1711-7.
36. England BR, Baker JF, Sayles H, Michaud K, Caplan L, Davis LA, et al. Body Mass Index, Weight Loss, and Cause-Specific Mortality in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2018;70(1):11-8.
37. Baker JF, Cannon GW, Ibrahim S, Haroldsen C, Caplan L, Mikuls TR. Predictors of longterm changes in body mass index in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2015;42(6):920-7.

38. Ajeganova S, Andersson ML, Hafström I, Group BS. Association of obesity with worse disease severity in rheumatoid arthritis as well as with comorbidities: a long-term followup from disease onset. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2013;65(1):78-87.
39. Cooper R, Hardy R, Bann D, Aihie Sayer A, Ward KA, Adams JE, et al. Body mass index from age 15 years onwards and muscle mass, strength, and quality in early old age: findings from the MRC National Survey of Health and Development. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69(10):1253-9.
40. Baker JF, Giles JT, Weber D, Leonard MB, Zemel BS, Long J, et al. Assessment of muscle mass relative to fat mass and associations with physical functioning in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2017;56(6):981-8.
41. Yamada M, Kimura Y, Ishiyama D, Nishio N, Abe Y, Kakehi T, et al. Differential Characteristics of Skeletal Muscle in Community-Dwelling Older Adults. *J Am Med Dir Assoc*. 2017;18(9):807.e9-.e16.
42. Santo RCE, Fernandes KZ, Lora PS, Filippin LI, Xavier RM. Prevalence of rheumatoid cachexia in rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2018.
43. Santo RC, Silva JM, Lora PS, Moro ALD, Freitas EC, Bartikoski BJ, et al. Cachexia in patients with rheumatoid arthritis: a cohort study. *Clin Rheumatol*. 2020.
44. Kramer HR, Fontaine KR, Bathon JM, Giles JT. Muscle density in rheumatoid arthritis: Associations with disease features and functional outcomes. *Arthritis and Rheumatism*. 2012;64(8):2438-50.
45. Bodine SC, Furlow JD. Glucocorticoids and Skeletal Muscle. *Adv Exp Med Biol*. 2015;872:145-76.
46. Younis S, Rosner I, Rimar D, Boulman N, Rozenbaum M, Odeh M, et al. Weight change during pharmacological blockade of interleukin-6 or tumor necrosis factor- α in patients with inflammatory rheumatic disorders: a 16-week comparative study. *Cytokine*. 2013;61(2):353-5.
47. Brown RA, Spina D, Butt S, Summers GD. Long-term effects of anti-tumour necrosis factor therapy on weight in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2012;31(3):455-61.
48. Marcora SM, Chester KR, Mittal G, Lemmey AB, Maddison PJ. Randomized phase 2 trial of anti-tumor necrosis factor therapy for cachexia in patients with early rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr*. 2006;84(6):1463-72.
49. Tournadre A, Pereira B, Dutheil F, Giraud C, Courteix D, Sapin V, et al. Changes in body composition and metabolic profile during interleukin 6 inhibition in rheumatoid arthritis. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017;8(4):639-46.
50. Metsios GS, Stavropoulos-Kalinoglou A, Douglas KM, Koutedakis Y, Nevill AM, Panoulas VF, et al. Blockade of tumour necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: effects on components of rheumatoid cachexia. *Rheumatology (Oxford)*. 2007;46(12):1824-7.
51. Serelis J, Kontogianni MD, Katsiogiannis S, Bletsas M, Tektonidou MG, Skopouli FN. Effect of anti-TNF treatment on body composition and serum adiponectin levels of women with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2008;27(6):795-7.
52. Engvall IL, Tengstrand B, Brismar K, Hafström I. Infliximab therapy increases body fat mass in early rheumatoid arthritis independently of changes in disease activity and levels of leptin and adiponectin: a randomised study over 21 months. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(5):R197.
53. Sahin-Efe A, Upadhyay J, Ko BJ, Dincer F, Park KH, Migdal A, et al. Irisin and leptin concentrations in relation to obesity, and developing type 2 diabetes: A cross sectional and a prospective case-control study nested in the Normative Aging Study. *Metabolism*. 2018;79:24-32.
54. Hwang YC, Jeon WS, Park CY, Youn BS. The ratio of skeletal muscle mass to visceral fat area is a main determinant linking circulating irisin to metabolic phenotype. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15:9.

55. Bergen HR, Farr JN, Vanderboom PM, Atkinson EJ, White TA, Singh RJ, et al. Myostatin as a mediator of sarcopenia versus homeostatic regulator of muscle mass: insights using a new mass spectrometry-based assay. *Skelet Muscle*. 2015;5:21.

10 ANEXOS

10.1 ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Estudo da associação entre miostatina e irisina e erosão articular em pacientes com artrite reumatoide

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa porque já participou da pesquisa “Aplicação e comparação dos critérios estabelecidos para diagnóstico de caquexia reumatoide”. O objetivo dessa nova pesquisa é avaliar as características ósseas em radiografia de mãos e pés e avaliar os níveis de proteínas no sangue associadas com desgaste das articulações (juntas). Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Você está sendo convidado a participar deste estudo porque possui o diagnóstico de artrite reumatoide e realiza tratamento no ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: será avaliado o sangue que foi coletado para a pesquisa que você já participa e as radiografias que você fez no Serviço de Reumatologia. Não é necessário realizar novos exames por conta desta pesquisa, pois nós utilizaremos o material armazenado e radiografias já realizados. Além disso, serão utilizados os resultados da pesquisa que você já faz parte.

Não são previstos desconfortos associados a essa pesquisa. Há o possível risco de quebra de confidencialidade dos dados, no entanto, os pesquisadores se comprometem a utilizar códigos e não o nome dos participantes para minimizar este risco.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são o aumento do conhecimento sobre a artrite reumatoide e, a partir disso, o possível aprimoramento do tratamento da doença no futuro.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier no Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no telefone (51) 3359-8340, com o pesquisador Jordana Souza, pelo telefone (51) 3359-8837 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 3359-7640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____