

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

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIOSTATINA, GDF-11 E IRISINA NO SORO E NO
LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

RENATA TERNUS PEDÓ

Porto Alegre

2021

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

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIOSTATINA, GDF-11 E IRISINA NO SORO E NO
LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

RENATA TERNUS PEDÓ

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção de título de Mestre em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós- Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Pedó, Renata Ternus
AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE MIOSTATINA, GDF-11 E
IRISINA NO SORO E NO LÍQUIDO SINOVIAL DE PACIENTES COM
ARTRITE REUMATOIDE / Renata Ternus Pedó. -- 2021.
69 f.
Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, , Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Artrite reumatoide. 2. Miocinas. 3. Miostatina.
4. Irisina. 5. GDF11. I. Xavier, Ricardo Machado,
orient. II. Título.

RESUMO

Base teórica. A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, caracterizada por sinovite crônica que leva a destruição da cartilagem e do osso. Os fibroblastos sinoviais (FLS) na AR possuem um papel central na inflamação sinovial e na degradação da articulação. Um mecanismo adicional pelo qual os FLS podem contribuir para a degradação articular na AR é por meio da expressão de miocinas, como a miostatina. Miocinas são citocinas e fatores de crescimento derivadas do músculo esquelético e que têm como funções não apenas a regulação autócrina do metabolismo do tecido muscular, mas também atividades parácrinas. A miostatina é caracterizada por inibir a síntese proteica e aumentar a degradação de proteínas no tecido muscular e por aumentar a osteoclastogênese no tecido ósseo. Outras miocinas que também apresentam atividade nos tecidos musculares e ósseos são o fator de crescimento e diferenciação 11 (GDF11) e a irisina. Em relação ao GDF11, os dados mostram resultados opostos em relação às suas funções nestes tecidos, não havendo um consenso na literatura. A irisina apresenta ações opostas a da miostatina, tanto no tecido muscular quanto no ósseo. Dados sobre níveis séricos e principalmente sinoviais destas miocinas em pacientes com AR ainda são escassos na literatura.

Objetivo. Avaliar e comparar os níveis de miostatina, GDF11 e irisina no líquido sinovial e no soro de pacientes com AR usando como controle um grupo de pacientes com osteoartrite (OA).

Métodos. Foram realizadas coletas de líquido sinovial e sangue em 11 pacientes com AR e 5 pacientes com OA. A atividade da doença foi avaliada pelo *Clinical Disease Activity Index* (CDAI). Os medicamentos utilizados pelos pacientes com AR, o tempo de duração da doença e a presença de doença erosiva foram consultados nos prontuários. As análises dos níveis de miostatina, GDF11 e irisina no líquido sinovial e no soro foram realizadas pelo método de ELISA.

Resultados. A média de idade dos pacientes com AR foi de 65 anos e a média do tempo de duração da doença foi de 16 anos. A média do CDAI foi de 12,8, sendo que 27,3% dos pacientes foram classificados com atividade baixa da doença e 72,7% com atividade moderada da doença. No momento das coletas 18,2% dos pacientes estavam usando medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) biológicos e 72,7% estavam usando metotrexato. A presença de doença erosiva foi encontrada em 27,3% dos pacientes. A média de idade do grupo OA foi de 66 anos. Os níveis séricos de GDF11 foram mais altos no pacientes com AR do que no grupo OA (347,50 (31,30- 1818,00) *versus* 31,30 (31,30- 31,30); $p=0,052$). Os níveis de miostatina e irisina no líquido sinovial e no soro, bem como os níveis de GDF11 no líquido

sinovial não foram diferentes significativamente entre os grupos. Nos pacientes com AR os níveis de miostatina e de GDF11 no líquido sinovial foram significativamente mais baixos do que no soro (31,30 (31,30-181,80) *versus* 817,20 (334,30- 994,70); $p= 0,007$); (31,30 (31,30-88,13) *versus* 347,50 (31,30- 1818,00); $p=0,018$), respectivamente. O tempo de duração da doença nos pacientes com AR foi negativamente associado com os níveis de miostatina no líquido sinovial ($r=-0,684$, $p=0,02$). O CDAI e a presença de doença erosiva não foram associados com os níveis de miostatina, GDF11 e irisina no líquido sinovial e no soro.

Conclusão. Nós encontramos níveis séricos de GDF11 mais altos no grupo AR comparado ao grupo OA. Nos pacientes com AR os níveis de miostatina e GDF11 no líquido sinovial foram mais baixos do que no soro. Nossos resultados contribuem para o conhecimento sobre a participação das miocinas na patogênese da AR. Além disso, os níveis séricos mais elevados de GDF11 encontrados no grupo com AR podem estar relacionados a uma tentativa compensatória contra o estado inflamatório da doença.

Palavras chave. Artrite reumatoide, músculo, osso, miocinas, miostatina, irisina, GDF11.

ABSTRACT

Background. Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune systemic disease, characterized by chronic synovitis that leads to cartilage and bone destruction. Synovial fibroblasts (FLS) in RA play a central role in synovial inflammation and joint degradation. An additional mechanism by which FLS can contribute to joint degradation in RA is through the expression of myokines, such as myostatin. Myokines are cytokines and growth factors derived from skeletal muscle and whose functions are not only the autocrine regulation of muscle tissue metabolism, but also paracrine activities. Myostatin is characterized by inhibiting protein synthesis and increasing protein degradation in muscle tissue, and by increasing osteoclastogenesis in bone tissue. Other myokines that also have activity in bone and muscle tissues are growth and differentiation factor 11 (GDF11) and irisin. In relation to GDF11, published data have shown contradictory results regarding its functions in these tissues. Irisin has opposite actions to myostatin, both in muscle and bone tissue. Data on serum and mainly synovial levels of these myokines in RA patients are still scarce in the literature.

Objective. To assess and compare synovial and serum levels of myostatin, GDF11 and irisin in patients with RA using a group of patients with osteoarthritis (OA) as control.

Methods. Synovial fluid and blood were collected from 11 RA patients and 5 OA patients. Disease activity was assessed by Clinical Disease Activity Index (CDAI). Drugs used by RA patients, disease duration and presence of erosive disease were consulted in medical records. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to evaluate myostatin, GDF11 and irisin synovial fluid and serum levels.

Results. RA patients presented mean age of 65 years and mean disease duration of 16 years. Mean clinical disease activity was 12.8, 27.3% of the patients were classified in low disease activity and 72.7% in moderate disease activity. Biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs) were being used by 18.2% of the patients and 72.7% of the patients were using methotrexate at the time of samples collections. Presence of erosive disease was found in 27.3% of patients. Mean age of patients with OA was 66 years. GDF11 serum levels were higher in RA patients (347.50 (31.30- 1818.00)) than in OA group (31.30 (31.30- 31.30)); $p=0.052$). Myostatin and irisin synovial fluid and serum levels, as well as GDF11 synovial fluid levels, did not differ between RA patients and OA group. In RA patients, myostatin synovial fluid levels (31.30 (31.30-181.80)) were lower than in serum (817.20 (334.30- 994.70)); $p= 0.007$) and GDF11 synovial fluid levels (31.30 (31.30- 88.13)) were also lower than in serum (347.50 (31.30- 1818.00)); $p=0.018$). Disease duration was negatively correlated with myostatin synovial fluid levels ($r=-0.684$, $p=0.02$). CDAI and presence of erosive disease were not associated with

myostatin, GDF11 and irisin levels in synovial fluid and in serum

Conclusion. We found higher GDF11 serum levels in RA group compared to OA group. In RA patients myostatin and GDF11 synovial fluid levels were lower than in serum. Our results contribute to the knowledge about myokines participation in RA pathogenesis. Additionally, the higher GDF11 serum levels found in RA group could be related to a compensatory attempt against the disease inflammatory state.

Key Words. Rheumatoid arthritis, muscle, bone, myokines, myostatin, GDF11, irisin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	14
Figura 2: Alterações articulares na artrite reumatoide.....	16
Figura 3: Biossíntese e processamento proteolítico do GDF11 e miostatina.....	26
Figura 4: Marco conceitual da artrite reumatoide e miocinas.....	32
Figura 5: Comparação dos níveis das miocinas entre os grupos.....	50
Figura 6: Níveis das miocinas no líquido sinovial e no soro dos pacientes com AR e do grupo controle.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de classificação para AR segundo ACR 2010.....	18
Tabela 2: Características da população em estudo.....	49
Tabela 3: Associações entre os parâmetros clínicos e os níveis de miocinas.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-CCP	Anti-Peptídeo Citrulinado Cíclico
AR	Artrite Reumatoide
CDAI	<i>Clinical Disease Activity Index</i>
DAS-28	<i>Disease Activity Score-28</i>
FLS	Fibroblastos Sinoviais
FNDC5	Fibronectina tipo III contendo o domínio 5
FR	Fator Reumatoide
GDF8	Fator de Crescimento e Diferenciação 8
GDF11	Fator de Crescimento e Diferenciação 11
HLA-DRB1	Antígeno leucocitário humano
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleucina-1 β
MEC	Matriz Extracelular
MLS	Macrófagos Sinoviais
MMCDs	Medicamentos Modificadores do Curso da Doença
MMPs	Metaloproteinases
OA	Osteoartrite
PCR	Proteína C Reativa
PGC1- α	Coativador 1 α do Receptor γ Ativado por Proliferador de Peroxissoma
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear $\kappa\beta$
SDAI	<i>Simplified Disease Activity Index</i>
TLR	Receptores do Tipo Toll
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UCP1	Proteína Desacopladora 1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VSG	Velocidade de Sedimentação Globular

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	14
2.2 Artrite reumatoide	14
2.2.1 Diagnóstico e tratamento da AR.....	17
2.3 Fibroblastos sinoviais.....	22
2.4 Interação músculo-osso	22
2.5 Miocinas	23
2.5.1 Miostatina	24
2.5.2 Fator de crescimento e diferenciação 11 (GDF-11).....	26
2.5.3 Irisina	28
3. MARCOCONCEITUAL.....	32
4. JUSTIFICATIVA.....	33
5. OBJETIVOS.....	34
5.1 Objetivo primário	34
5.2 Objetivos secundários	34
6.REFERÊNCIASBIBLIOGRÁFICAS.....	35
7.ARTIGO.....	44
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	61
10. ANEXOS.....	62
10.1 ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AR.....	62
10.2 ANEXO 2- TERMODE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO OA.....	65
11. STROBE Statement.....	68

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória, sistêmica e de etiologia desconhecida. Ela é caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva, que leva a destruição da cartilagem e do osso (1,2). Os fibroblastos sinoviais (FLS) na AR possuem um papel central na inflamação sinovial e na degradação articular. Na articulação artrítica estas células mudam seu perfil, passando a apresentar resistência a apoptose, aumento da proliferação e migração, bem como o aumento da capacidade de invasão (3). Esse dano articular causa deformidade e contribui para a incapacidade funcional e diminuição da qualidade de vida em pacientes com AR (4).

O tecido muscular, que também é afetado na AR levando os pacientes a perda muscular, é o principal produtor e alvo primário das miocinas (5,6). Como as miocinas são citocinas e fatores de crescimento derivados do músculo esquelético e liberados na circulação, elas têm como funções não apenas a regulação autócrina do metabolismo do tecido muscular, mas também atividades parácrinas (7,8). A miostatina é uma miocina caracterizada por inibir a síntese de proteínas e aumentar a degradação de proteínas no tecido muscular, e por aumentar a osteoclastogênese no tecido ósseo (9–11). A expressão da miostatina foi relatada em tecidos sinoviais de pacientes com AR e camundongos artríticos, especificamente nos FLS. Além disso, a estimulação dos FLS com citocinas inflamatórias resultou na regulação positiva da miostatina, o que sugere que os FLS sejam uma fonte de miocinas (11). Em contraste com os achados na articulação artrítica, a avaliação da miostatina sérica demonstrou que pacientes com AR em remissão apresentam níveis mais baixos em comparação com indivíduos controle (12).

Outras miocinas que também apresentam atividade no tecido ósseo e muscular são fator de crescimento e diferenciação 11 (GDF11) e a irisina. Dados publicados sobre o GDF11 têm mostrado resultados contraditórios em relação às suas funções nestes tecidos. Foi relatado que o GDF11 induz a diferenciação de osteoblastos, enquanto outro estudo mostrou que ele inibe a diferenciação de osteoblastos e estimula a osteoclastogênese (13,14). No músculo, um estudo mostrou que sua administração melhora o desempenho e reparo do músculo esquelético, enquanto outro demonstrou que sua administração inibiu a diferenciação de mioblastos e a regeneração muscular (15,16). Em relação à irisina, ela possui ações opostas à miostatina. A irisina aumenta a massa óssea, reduz o número de osteoclastos e aumenta a expressão de genes

osteoblásticos, além de promover a diferenciação e proliferação de osteoblastos (17,18). No músculo, ela estimula genes relacionados ao crescimento muscular e induz a hipertrofia do músculo esquelético(19,20). Embora a expressão de irisina não tenha sido especificamente estudada na articulação da AR, o tratamento com GDF11 recombinante foi capaz de reduzir a gravidade da degradação articular em um modelo animal de artrite (21). Além disso, os níveis séricos de irisina foram investigados em pacientes com AR e correlacionados inversamente com a atividade e a duração da doença, bem como com as manifestações extra-articulares e a rigidez matinal (22,23). Quanto ao GDF11, sua concentração circulante em pacientes com AR ainda não foi avaliada.

Devido às funções recentemente identificadas das miocinas no tecido sinovial, além de sua conhecida influência nos tecidos muscular e ósseo, todos afetados pela AR, é importante o estudo desses marcadores tanto em nível articular quanto circulante. Esse conhecimento pode contribuir para o entendimento da patogênese e para a busca de biomarcadores que possam melhorar o diagnóstico e o manejo dos pacientes. Além disso, novos dados sobre miocinas na AR podem contribuir para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar e comparar os níveis sinoviais e séricos de miostatina, GDF11 e irisina em pacientes com AR, utilizando um grupo de pacientes com osteoartrite (OA) como controle.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada nos mediadores secretados pelo tecido muscular e suas ações nos tecidos sinovial e ósseo na artrite reumatoide. A estratégia de busca envolveu as bases de dados do PubMed, Scielo e Embase. Foram realizadas buscas a partir dos termos “rheumatoid arthritis”, “muscle”, “synovial tissue”, “bone”, “myokines”, “myostatin”, “GDF11”, “irisin”.

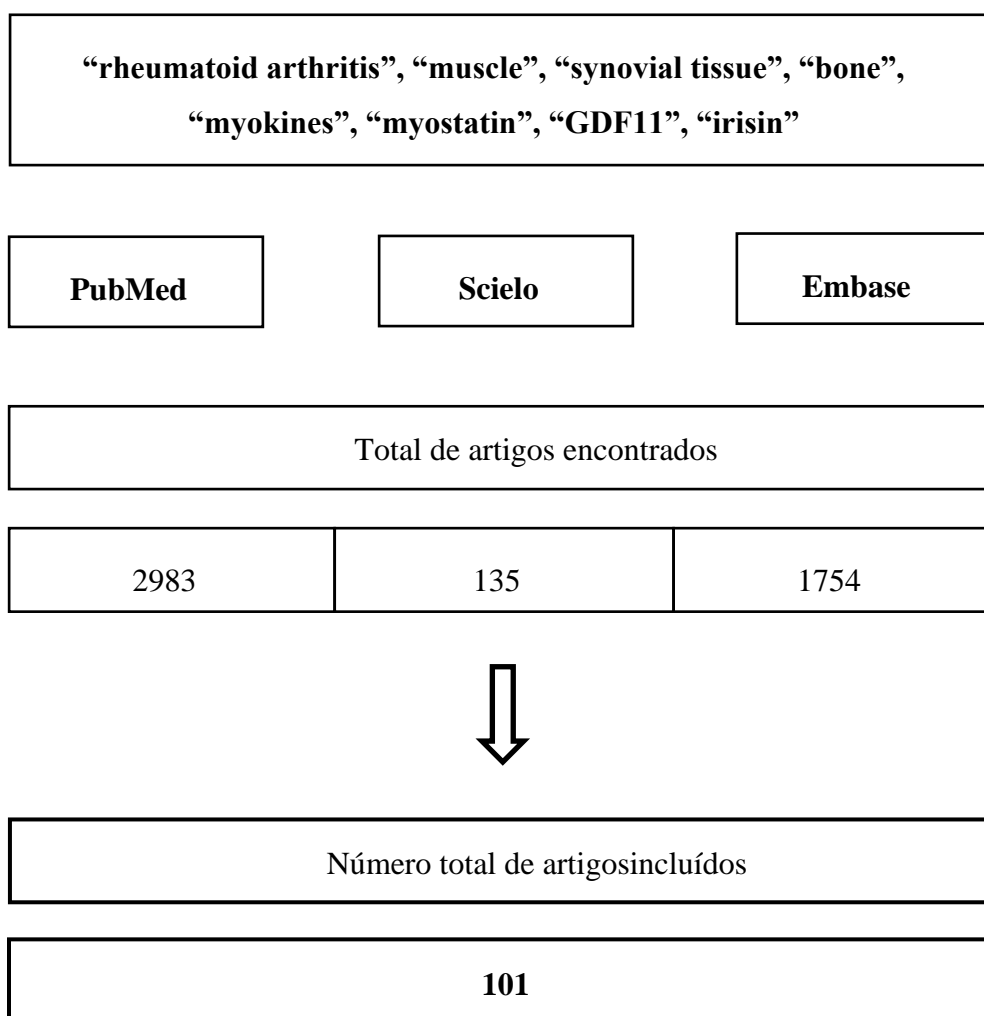


Figura 1- Estratégias para localizar e selecionar as informações

2.2 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide(AR) é uma doença autoimune, inflamatória, sistêmica e de etiologia pouco desconhecida. Ela é caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva, acometendo preferencialmente as articulações periféricas(24). Os sintomas clínicos da doença incluem edema, rigidez nas articulações e conseqüentemente redução dos movimentos(24).Apesar de envolver principalmente as articulações, a AR causa manifestações extra-articulares como nódulos reumatoides, fraqueza muscular, doenças de pele, manifestações oculares e vasculite, além de poder acometer rins, coração e sistema nervoso central e periférico (25)(26). Essas manifestações agravam a doença, levando a um aumento da incapacidade funcional, diminuição da qualidade de vida e aumento da mortalidade (4). A prevalência da AR é de 0,46% no Brasil e de 1% no mundo, sendo sua incidência mais comum em indivíduos entre os 40 e 70 anos de idade, com uma ocorrência maior em mulheres(27)(28).

Apesar da etiologia da AR não ser completamente descrita, sabe-se que fatores ambientais, genéticos e epigenéticos estão envolvidos com a suscetibilidade e a severidade da doença (2). Alguns fatores ambientais associados à AR são exposição à sílica, tabagismo, deficiência de vitamina D, obesidade e alterações na microbiota (28)(2). Quanto aos fatores genéticos, sabe-se que 50% do risco de desenvolver AR é atribuído a eles. Atualmente, mais de 30 regiões gênicas associadas ao desenvolvimento da doença já foram identificadas, como os alelos do antígeno leucocitário humano (HLA)-DRB1, que contém um motivo comum, denominado de epítopo compartilhado e o gene PTPN22 (29). As alterações epigenéticas envolvem a metilação de DNA, modificações de histonas e RNAs não codificantes. Essas alterações além de contribuírem para a etiologia da AR, estão envolvidas nos mecanismos de desenvolvimento da doença e atuam como biomarcadores da progressão e atividade da doença (30).

Diversos mecanismos estão envolvidos na patogênese da AR. Um evento inicial para o desenvolvimento da doença são as modificações pós-traducionais, como a citrulinização de proteínas, a qual origina novos epítopos. Estes são reconhecidos pelo sistema imune adaptativo e apresentados pelas células apresentadoras de antígenos às células T que, por sua vez, estimulam as células B a produzirem uma variedade de anticorpos (2). Os anticorpos formados reconhecem auto-proteínas (proteínas do próprio indivíduo) sendo, portanto, denominados autoanticorpos. Os principais autoanticorpos presentes na AR são o fator reumatoide (FR), o qual reage contra a porção Fc da

imunoglobulina G formando complexos imunes, e os anticorpos anti-peptídeos citrulinadoscíclicos (Anti-CCP) que possuem como alvo as proteínas/peptídeos que sofrem citrulinação (31)(2). A presença destes autoanticorpos circulantes pode ser detectada anos antes do aparecimento dos sinais clínicos da doença. Além disso, a presença do FR e do Anti-CCP está associada com um pior prognóstico da AR (32).

A resposta autoimune gerada leva inicialmente a um processo inflamatório na membrana sinovial. Esta inflamação é caracterizada, primeiramente, pelo infiltrado e acúmulo de leucócitos, principalmente neutrófilos, os quais são atraídos por moléculas de adesão e quimiocinas expressas na sinóvia (33). Posteriormente, ocorre intensa proliferação de células T (principalmente $CD4^+$) e B, plasmócitos, mastócitos e células dendríticas. Além disso, os macrófagos sinoviais (MLS) e fibroblastos sinoviais (FLS), que são uma importante fonte de citocinas e proteases, aumentam sua proliferação, levando à hiperplasia da membrana sinovial (34). Esta hiperplasia sinovial, juntamente com o infiltrado das células inflamatórias e a estimulação da angiogênese, leva à formação de um tecido invasivo denominado *pannus*, o qual invade as estruturas adjacentes, gerando danos à cartilagem e ao osso, destruindo progressivamente a articulação (33) (Figura 2).

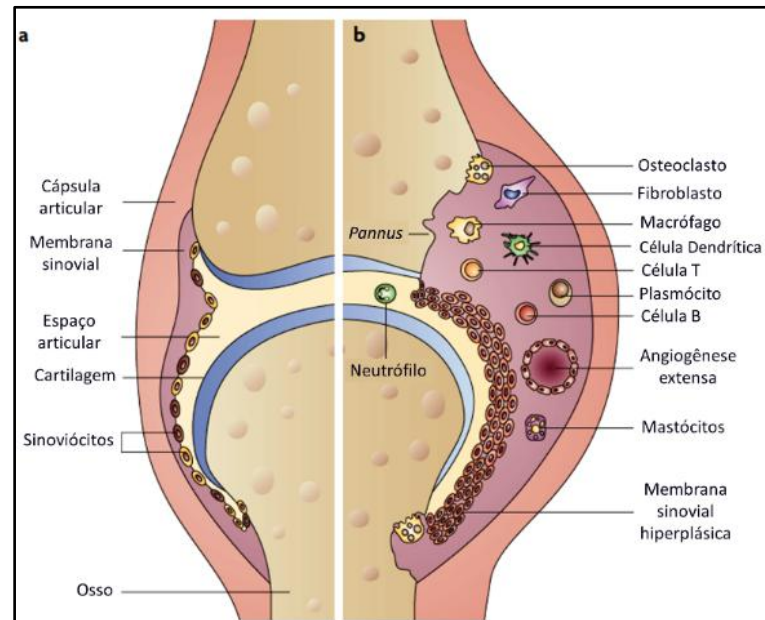


Figura 2: Alterações articulares na artrite reumatoide.

a) Articulação saudável; b) Articulação doente (Adaptado de Smolen and Steiner, 2003).

A patologia da AR também envolve a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores por diferentes tipos celulares. Os neutrófilos sintetizam prostaglandinas, proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além

de secretarem fator de necrose tumoral (TNF) e metaloproteinases (MMPs) (35). Os macrófagos produzem TNF- α , interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, IL-8, MMPs, quimiocinas e, também, realizam fagocitose e apresentação de antígenos. As células B produzem IL-6, TNF- α e são precursores de plasmócitos secretores de autoanticorpos, além de processarem e apresentarem antígenos, promovendo a ativação das células T. Estas, por sua vez, sintetizam interferon- γ (IFN- γ), TNF e IL-17 (35).

Embora ocorra a participação de várias citocinas na patogênese da AR, o TNF- α , a IL-6 e a IL-1 são mediadores cruciais na migração de células e no estabelecimento da inflamação (35). O TNF- α desempenha um papel fundamental através da ativação da expressão de citocinas e quimiocinas, supressão de células T regulatórias, indução da angiogênese e da dor (36). A IL-6 promove a ativação local de leucócitos e a produção de autoanticorpos. Já a IL-1, além de promover a ativação de leucócitos, também promove a ativação de células endoteliais, condrócitos e osteoclastos (36)(33).

Adicionalmente à inflamação sinovial, ocorre o dano à cartilagem e ao osso subcondral (subjacente à cartilagem articular). A hiperplasia sinovial é a principal causa do dano à cartilagem, uma vez que os MLS e FLS são ativados por TNF- α , IL-1 e IL-6, conseqüentemente, passam a sintetizar substâncias nocivas à cartilagem, como as MMPs (35). Citocinas também ativam os condrócitos, levando à liberação direta de MMPs na cartilagem. Somado a isto, o potencial de regeneração do tecido cartilaginoso fica limitado, devido às citocinas e espécies reativas de nitrogênio presentes neste ambiente, que promovem a apoptose dos condrócitos (35)(33).

O dano ao tecido ósseo ocorre devido a diferenciação de osteoclastos em células maduras e ativas capazes de reabsorver a matriz óssea. Esse processo é desencadeado pela ligação do ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) aos precursores de osteoclastos (37). Na sinóvia da AR, células T e FLS participam ativamente da produção de RANKL, favorecendo a diferenciação dos precursores em osteoclastos maduros. A diferenciação e a ativação dos osteoclastos também é estimulada, em menor proporção, por citocinas como TNF α , IL-1, IL-6 e IL-17 (37). Os osteoclastos, então ativados, produzem proteases que degradam a matriz óssea mineralizada e realizam a reabsorção óssea (38).

2.2.1 Diagnóstico e tratamento da AR

O diagnóstico da AR é um processo individualizado, baseado em critérios de

classificação que incluem manifestações clínicas e testes sorológicos (2). Atualmente, os critérios de classificação mais utilizados são os propostos pelo Colégio Americano de Reumatologia (*American College of Rheumatology - ACR*) e pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (*European League Against Rheumatism - EULAR*) em 2010 (2). Estes critérios avaliam o envolvimento e distribuição das articulações acometidas, a duração dos sintomas, a sorologia (FR e Anti-CCP) e marcadores de fase aguda (níveis da proteína C reativa [PCR] e velocidade de sedimentação globular [VSG]), atribuindo uma pontuação para cada critério (39).

Tabela 1. Critérios de classificação para AR segundo ACR 2010.

1. Envolvimento articular (0-5)
<ul style="list-style-type: none">• 1 articulação média a grande (0)• 2-10 articulações médias a grande (1)• 1-3 articulações pequenas (não contando articulações grandes) (2)• 4-10 articulações pequenas (não contando articulações grandes) (3)• > 10 articulações (pelo menos uma articulação pequena) (5)
2. Sorologia (0-3)
<ul style="list-style-type: none">• Fator reumatoide (FR) e anticorpos anti-proteínas/peptídeos citrulinados (Anti-CCP) negativo (0)• RF e Anti-CCP fracamente positivos (2)• RF e Anti-CCP fortemente positivos (3)
3. Reagentes de fase aguda (0-1)
<ul style="list-style-type: none">• Proteína C reativa e velocidade de sedimentação globular(0)• Proteína C reativa e/ou velocidade de sedimentação globular(1)
4. Duração dos sintomas (0-1)
<ul style="list-style-type: none">• < 6 semanas (0)• 6 semanas ou mais (1)

Ponto de corte para artrite reumatoide: 6 ou mais

Aletaha et al., 2010.

Depois do diagnóstico o paciente precisa ser monitorado constantemente.No entanto, como a AR apresenta uma patogênese bastante complexa, ainda não foi encontrado um biomarcador confiável para monitorar a sua gravidade, a qual vai além de testes inespecíficos de resposta inflamatória. Diante disso, até o momento, a atividade clínica da doença é o melhor biomarcador que pode ser usado para monitorar a gravidade da AR (2). Com esta finalidade, são empregados na prática clínica diferentes

escores e critérios que categorizam o paciente em estratos de atividade. Entre os escores, o mais validado é o *Disease Activity Score-28* (DAS-28) que utiliza 28 articulações acometidas pela AR, avaliando quais destas estão edemaciadas e dolorosas, um marcador inflamatório que pode ser o PCR ou o VSG e a avaliação global da saúde ou da atividade da doença feita pelo paciente (40). Ao final da avaliação, esse índice utiliza uma fórmula complexa que gera valores de corte específicos usados para classificar a atividade da doença. A classificação da atividade da AR é descrita como: remissão da doença, atividade leve, moderada e alta. Outros escores também utilizados são o *Simplified Disease Activity Index* (SDAI) e o *Clinical Disease Activity Index* (CDAI), os quais são mais simples de calcular comparados ao DAS-28(40). O SDAI apresenta como resultado a soma simples do número de juntas dolorosas (28 articulações), do número de juntas edemaciadas (28 articulações), da avaliação da atividade da doença feita pelo paciente numa escala analógica visual de 0 a 10 cm, da avaliação da atividade da doença feita pelo médico (0 a 10 cm) e da PCR (mg/dL) (41). O CDAI é ainda mais simples, pois seu cálculo não leva em consideração a PCR no somatório, utiliza apenas as quatro primeiras medidas (42).

O tratamento da doença atualmente envolve uma abordagem baseada em metas (*treat-to-target*), através do monitoramento rigoroso da atividade da doença e na mudança do manejo, caso a meta de tratamento não seja atingida (43). O principal objetivo do tratamento não é a cura, mas a remissão ou pelo menos uma baixa taxa de atividade da doença, com a finalidade de restaurar a função física na doença precoce e maximizar a função física na doença estabelecida, bem como a eliminar a inflamação articular ativa (2).

A base do tratamento da AR são os medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD). Estes medicamentos são divididos em diferentes classes, sendo elas: a classe dos sintéticos convencionais (como metotrexato e leflunomida), a dos sintéticos alvo-específicos (tofacitinibe) e a dos biológicos (como os inibidores de TNF e bloqueadores do receptor de IL-6) (44). Embora seus diversos mecanismos de ação não sejam completamente conhecidos, seus efeitos são a redução do edema e da dor nas articulações, diminuição dos marcadores de fase aguda (PCR e VSG), limitação dos danos progressivos nas articulações e melhora da função. O tempo de início da ação dos MMCDs é lento, assim até que seu efeito farmacológico se inicie, são utilizados glicocorticoides por períodos curtos de tempo (2). Dentro da classe dos biológicos, os inibidores de TNF foram os primeiros MMCD biológicos licenciados para uso (45).

Segundo a última versão do consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da AR, o tratamento com MMCD deve ser iniciado logo após o diagnóstico e ajustado conforme for necessário. Na primeira linha de tratamento estão os sintéticos convencionais, tendo como primeira escolha o metotrexato, o qual pode ser prescrito em monoterapia ou combinado a outro da mesma classe. Como segunda linha de tratamento são indicados os MMCD biológicos ou os sintéticos alvo-específicos. Os biológicos utilizados nesta linha são os inibidores de TNF, modulador de coestimulação de linfócito T e bloqueador do receptor de IL-6, combinados com sintéticos convencionais (preferencialmente o metotrexato). O sintético alvo-específico tofacitinibe é prescrito preferencialmente com o metotrexato. A terceira linha de tratamento é iniciada após a falha do primeiro MMCD biológico ou sintético alvo-específico. Nesta linha são indicadas as mesmas classes da segunda, tendo como diferencial a classe de biológico anti-CD20 (rituximabe). É indicado que se faça a troca por um outro medicamento da mesma classe utilizada na segunda linha de tratamento, mas que tenha um mecanismo de ação diferente (44).

Os medicamentos empregados no tratamento da AR são utilizados de maneira combinada, de acordo com o estado do paciente e o estágio da doença. No entanto, apesar dos avanços e das diversas classes disponíveis para o tratamento, a presença dos efeitos adversos e a necessidade do uso de diversos fármacos ao mesmo tempo, em alguns casos, leva muitos pacientes a desistirem ou não seguirem o tratamento corretamente. Além disso, as opções atuais falham muitas vezes, o que leva a reativação da doença e muitos fármacos possuem custos elevados, como os agentes biológicos. Portanto, se faz necessária a busca por novas terapias, com o intuito de solucionar os problemas relacionados ao tratamento e, assim, melhorar a qualidade de vida dos pacientes (2,45). Ainda, é importante ampliar o entendimento da fisiopatologia da AR, identificando as demais moléculas mediadoras do dano articular, bem como de biomarcadores de atividade da doença, a fim de facilitar um diagnóstico mais precoce, além do conhecimento de novos alvos terapêuticos.

2.3 Fibroblastos sinoviais

A membrana sinovial saudável é um tecido que reveste internamente as articulações e é composta por uma camada fina de células, normalmente dividida em dois compartimentos denominados camada íntima e camada sub-íntima. A íntima possui de 1 a 3 camadas de células e é composta por dois tipos celulares em proporções

relativamente iguais: MLS e FLS. A sub-íntima é composta de tecido conjuntivo frouxo, irregular, com poucos FLS, MLS e células adiposas(46). Na AR, no entanto, a membrana sinovial sofre modificações se tornando hiperplásica. A camada íntima pode atingir de 10 a 15 camadas de células e a sub-íntima também sofre expansão com um infiltrado de células inflamatórias (células dendríticas, mastócitos, células T e B) e aumento da deposição de matriz extracelular (MEC). Além disso, na camada sub-íntima ocorre a neoangiogênese, em resposta ao aumento da demanda metabólica do tecido inflamado e hipóxico (47).

Apesar de diversos tipos celulares estarem envolvidos nas modificações que ocorrem na membrana sinovial, os FLS se destacam por possuírem um importante papel tanto no indivíduo saudável quanto na patogenia da AR (46). Nas articulações saudáveis, eles controlam a composição do líquido sinovial, produzindo lubrificina e ácido hialurônico que auxiliam na lubrificação articular. Eles também são responsáveis pelo remodelamento da MEC, através da secreção de vários dos seus componentes, como colágenos, fibronectina e laminina, além de secretarem enzimas que degradam a matriz, como as MMPs, e seus inibidores (46). Contudo, na AR o comportamento dos FLS se modifica pois, após sua ativação, estas células adquirem um fenótipo agressivo e medeiam a inflamação e a destruição articular (46).

Os FLS de pacientes com AR possuem uma habilidade aumentada de secretar uma variedade de citocinas, como IL-6 e IL-18, quimiocinas como CCL-2, e fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), quando comparados aos FLS de pessoas saudáveis (48). A ativação dos FLS se deve ao contato célula-célula e a ativação dos receptores do tipo Toll (TLR), os quais fazem parte do sistema imune inato. Destes receptores, os mais expressos nos FLS são o TLR2, TLR3 e TLR4, os quais contribuem para a angiogênese, secreção de MMPs, regulação positiva de moléculas de adesão, hiperplasia sinovial, infiltração de células inflamatórias, inflamação crônica, além de promoverem a proliferação e maturação de osteoclastos, o que leva a reabsorção óssea (49).

Os FLS também apresentam expressão aumentada de moléculas de adesão, como caderinas e integrinas, as quais auxiliam na fixação da sinóvia hiperplásica à superfície da cartilagem. Com esse processo, é estabelecida uma rede parácrina/autócrina que perpetua a inflamação, recruta novas células inflamatórias para a articulação e contribui para a degradação da MEC (46). Em adição à produção e secreção de fatores inflamatórios, a capacidade proliferativa dos FLS aumenta, por

conta de um desequilíbrio entre proliferação e apoptose (48).

Além disso, os FLS apresentam características semelhantes a um tumor, como o aumento da migração, redução da inibição por contato, expressão de proto-oncogenes e a capacidade de invadir os tecidos adjacentes (48). O fenótipo de invasão se deve à capacidade dos FLS de produzirem componentes de degradação da MEC, como colagenases, MMPs e catepsinas, que orientam o equilíbrio entre as proteases e seus inibidores para a destruição tecidual. Essa invasividade é também estimulada por citocinas como IL-1 e TNF, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que têm sua produção favorecida pela hipóxia local(48,50). Somado ao potencial invasivo, responsável pelo dano à cartilagem, os FLS também podem migrar de uma articulação para a outra, propagando a doença (51). Ainda, são capazes de secretar RANKL que promove a diferenciação de osteoclastos, os quais geram a erosão óssea, aumentando o dano articular (48).

Por serem considerados um dos principais contribuintes para a inflamação e destruição articular, os FLS constituem um importante alvo para novas abordagens terapêuticas na AR. Uma característica dos FLS que propicia seu estudo, é que eles podem ser isolados do tecido sinovial e cultivados *in vitro*(46). No cultivo *in vitro*, seu fenótipo agressivo e invasivo é mantido, inclusive apresentando correlação do grau de capacidade de invasão *in vitro* com o dano articular *in vivo*. Estudos já demonstraram que seu fenótipo *in vitro* está associado com a taxa de destruição articular de pacientes com AR (52), bem como com o dano histológico da articulação em ratos (53).

Recentemente, verificou-se que a miostatina (miocina derivada do músculo esquelético) está presente na sinóvia de pacientes com AR. A exposição dos FLS artríticos às citocinas inflamatórias promoveu a expressão de miostatina na membrana sinovial, a qual, por sua vez, aumentou a diferenciação de osteoclastos induzida por RANKL (11)(54). Desta maneira, os FLS possuem um mecanismo adicional que contribui para a doença, a produção de miocinas que levam ao aumento da reabsorção óssea (11). Além da miostatina, outras miocinas como o fator de crescimento e diferenciação 11 (GDF-11) e a irisina, já foram estudadas como tendo papel na homeostase óssea(13,14,17,55–57). No entanto, não se sabe, se os FLS participam da secreção dessas miocinas no ambiente articular, ou se eles secretam algum mediador que interfere na atividade dessas miocinas na articulação.

2.4 Interação músculo-osso

O músculo esquelético e o osso estão intimamente conectados, eles possuem uma origem comum, compartilham o mesmo sistema integrado que fornece forma e função física e exibem mudanças significativas ao longo da vida (58). Ambos atuam como órgãos secretórios e se comunicam através de fatores musculares, como as miocinas, e fatores ósseos, como a osteocalcina e o TGF- β , sendo que alguns desses fatores têm efeitos positivos e outros negativos no tecido oposto (59). Este conceito de que as células musculares e ósseas se comunicam em níveis bioquímicos e moleculares, além das interações mecânicas e, ao mesmo tempo, de maneira complementar a elas, tem gerado uma nova compreensão de como ossos e músculos atuam de maneira conjunta, tanto na saúde, quanto em situações patológicas (60).

A interação mecânica entre osso e músculo é bem compreendida. O osso ajusta a sua massa e arquitetura conforme as mudanças na carga mecânica e as contrações do músculo esquelético aplicam carga ao osso(61). Nesta perspectiva, à medida que a função muscular diminui, resulta em diminuição da carga sobre o esqueleto, o que leva a uma diminuição da massa óssea. No entanto, não é possível explicar totalmente a perda de massa óssea com base na presença de perda de massa muscular, apenas pela perspectiva mecânica, o que demonstra a participação da interação molecular entre estes tecidos (61).

O músculo é uma fonte de miocinas e estas podem tanto estimular a formação óssea quanto contribuir para a perda da massa óssea. O tecido ósseo, por sua vez, também secreta fatores que possuem efeito no músculo (62). Na AR, já foi demonstrado que um destes mediadores moleculares, a miostatina, originalmente secretada pelo músculo, pode ser expressa diretamente nas articulações afetadas, contribuindo, assim, com a degradação articular (11). Neste contexto, conhecer mais a respeito de como ocorre a comunicação entre estes tecidos e sobre os fatores secretados por eles, é crucial para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas para inibir a perda de massa muscular e óssea na AR.

2.5 Miocinas

O termo miocina foi utilizado pela primeira vez no ano de 2003 e se refere a um conjunto de citocinas ou peptídeos sintetizados, expressos e liberados pelas fibras musculares (63)(7). Elas possuem como funções a regulação autócrina do metabolismo no tecido muscular e a regulação parácrina/endócrina de outros tecidos e órgãos, como o tecido adiposo, tecido ósseo, fígado e cérebro (8).

2.5.1 Miostatina

A miostatina ou fator de crescimento e diferenciação 8 (GDF8) é uma miocina que pertence à superfamília do TGF- β e foi descoberta em um estudo que buscava descrever novos membros da superfamília do TGF- β a partir do DNA genômico de camundongos. Ela foi considerada um regulador negativo do crescimento muscular esquelético, inicialmente, através da inibição da miogênese (64). De maneira fisiológica, a sua expressão está restrita principalmente ao músculo esquelético e, em níveis baixos, nos tecidos adiposo e cardíaco (64)(65). No entanto, foi demonstrado recentemente que sua expressão também é alta nos FLS de pacientes com AR(11).

A miostatina é sintetizada como uma proteína precursora de 376 aminoácidos que para se tornar ativa passa por duas clivagens proteolíticas. Sua forma precursora é clivada primeiro em miostatina latente por enzimas da família furina e, após, em miostatina madura por enzimas como metaloproteinases, trombospondinas e integrinas(66)(67). Ela pode ser detectada na circulação, predominantemente na forma latente, e no músculo esquelético está presente extracelularmente na forma precursora (68)(69).

A forma madura da miostatina se liga a um dos dois receptores de ativina quinase do tipo II (ActRIIB em maior grau que ao ActRIIA) que recruta, fosforila e, assim, ativa os receptores de ativina quinase I (ALK4 e ALK5), os quais levam a fosforilação e ativação dos fatores de transcrição Smad2 e Smad3. Estas Smads fosforiladas se conjugam com a Smad4, formando o complexo Smad2/3/4, o qual se transloca para o núcleo. O acúmulo desses fatores no núcleo resulta na regulação dos genes responsivos a miostatina (70,71). No músculo, quando a sinalização é induzida por ActRIIB, ocorre a inibição da síntese de proteínas e o aumento das vias de degradação de proteínas, levando a atrofia muscular (9).

Em camundongos nocaute para o gene da miostatina, a massa muscular aumenta aproximadamente duas vezes em comparação a de camundongos normais (64). Ainda, a inativação pós-natal do gene da miostatina leva ao aumento da massa muscular pela hipertrofia e hiperplasia (72). Em um modelo de artrite em coelhos, foi observado uma redução significativa na expressão proteica da miostatina no músculo, na membrana sinovial e no soro (73).

Estudos recentes demonstram que a miostatina também participa da regulação do tecido ósseo (10). A homeostase óssea ocorre pelo equilíbrio entre a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. No entanto, na AR essa

homeostase é interrompida pela formação descoordenada de osteoclastos (74). Nesse contexto ocorre a participação da miostatina, a qual regula a diferenciação de osteoclastos através de mecanismos que dependem da interação do RANKL e seu receptor RANK (10). O RANKL é produzido por osteoblastos, linfócitos T e pelos FLS de pacientes com AR (37).

Em pacientes com AR, em remissão, foi observada uma diminuição nos níveis séricos de miostatina quando comparada com pacientes controles saudáveis. Esta diminuição pode estar relacionada com o efeito anti-inflamatório da terapia com MMCDs, uma vez que, a diminuição do ambiente inflamatório pode diminuir a expressão da miostatina (12). Outro estudo avaliou a concentração de miostatina no soro e líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (OA) de joelho. As análises revelaram que as concentrações de miostatina no soro dos pacientes foram mais elevadas do que as do grupo controle. Ainda, as concentrações no soro e no líquido sinovial foram correlacionadas significativamente com a severidade da OA de joelho (75). Nas membranas sinoviais de pacientes com AR foi encontrado uma maior expressão de miostatina em comparação com pacientes com OA. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que o bloqueio da miostatina, realizado por tratamento com um inibidor, atenuou a formação de osteoclastos induzida por RANKL e reduziu a destruição das articulações em um modelo experimental de AR (11). Ainda, mediadores inflamatórios, como o TNF, aumentaram a expressão da miostatina em FLS da AR, sugerindo que a inflamação sinovial pode desencadear a regulação da miostatina (11).

Em uma análise do líquido sinovial de pacientes com AR, em comparação com pacientes com OA, os níveis de miostatina e IL-1 β (citocina pró-inflamatória importante na AR) estavam superexpressos e correlacionados positivamente. Em análises *in vitro* com linhagem de FLS artríticos, observou-se que a miostatina regula a expressão de IL-1 β , via inibição de miR-21-5p (um regulador negativo de IL-1 β), indicando que a miostatina promove diretamente a inflamação nos FLS pelo aumento da expressão de IL-1 β (76). Adicionalmente, outro estudo também investigou a participação da miostatina na inflamação sinovial da AR e demonstrou uma correlação positiva da miostatina e do TNF- α no tecido sinovial. Os resultados de análises *in vitro*, mostraram que a miostatina diretamente induz a expressão do TNF- α pela via de sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)-Akt (77).

2.5.2 Fator de crescimento e diferenciação 11 (GDF11)

O GDF11 é um outro membro da família do TGF- β que foi identificado há duas décadas (78). Ele apresenta um estreito parentesco com o GDF8, uma vez que possuem 90% de identidade conformacional nas suas formas maduras (79). O GDF11 é expresso em tecidos embrionários, como membros e sistema nervoso, e em tecidos adultos, como medula espinhal, tecido olfativo, músculo esquelético, cérebro e coração, porém os níveis de expressão variam entre os tecidos. A sua expressão é alta no córtex cerebral e baixa no músculo esquelético, por exemplo (80).

O GDF11 é sintetizado como uma proteína precursora e passa pelas mesmas clivagens da miostatina para se tornar ativo (Figura 2). Quando ativo, também se liga aos receptores de activina quinase do tipo II (ActRIIB e ActRIIA), os quais irão ativar os receptores de activina quinase I (ALK4 e ALK5) que levarão à fosforilação dos fatores de transcrição Smads2 e 3 (70). No entanto, apesar da alta similaridade entre a miostatina e o GDF11 quanto a estrutura e sinalização, algumas diferenças já foram relatadas. Há evidências de que o GDF11 pode sinalizar usando também o receptor tipo I ALK7 e que ele é um ligante mais potente para a ativação da Smad2/3 (79,81).

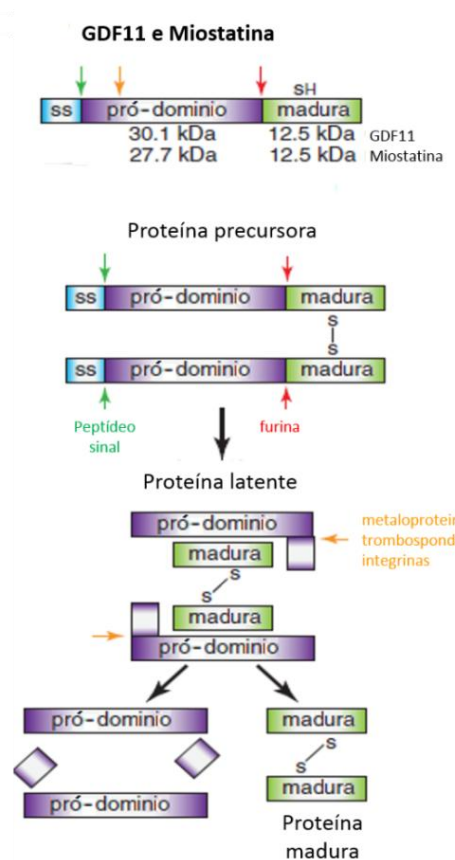


Figura 3: Biossíntese e processamento proteolítico do GDF11 e miostatina (Adaptado de Walker, 2016).

O GDF11 foi identificado como um fator circulante que diminui com a idade e que é capaz de reverter várias patologias associadas ao envelhecimento (82,83). Estudos experimentais reportaram que a sua administração reduz a hipertrofia cardíaca associada à idade, melhora o desempenho e reparo do músculo esquelético, além de aumentar a neurogênese (15,82,84). No entanto, na literatura, outros estudos apresentam resultados contrários quanto a ação do GDF11 no tecido muscular e aos seus níveis em relação à idade.

Um estudo que analisou os níveis séricos de GDF11 em camundongos e humanos mostrou que os níveis séricos de GDF11 aumentam com a idade. Além disso, sua administração em camundongos saudáveis inibiu a diferenciação de mioblastos e a regeneração muscular (16). Outro estudo também demonstrou que o GDF11 regula o crescimento do músculo esquelético de camundongos pela inibição da diferenciação dos mioblastos. Adicionalmente, mioblastos da linhagem celular C2C12 foram inibidos pelo tratamento com GDF11 recombinante (85). Ainda, um estudo demonstrou que os níveis circulantes de GDF11 não são alterados com o envelhecimento em mulheres e homens saudáveis, mas, ao contrário disso, os níveis de miostatina são menores em homens idosos em comparação com homens mais jovens (86).

Além da participação do GDF11 no envelhecimento e no tecido muscular, diversos estudos têm buscado determinar o papel do GDF11 no metabolismo ósseo. Em um estudo foram encontrados níveis diminuídos de GDF11 no soro de camundongos idosos e com osteoporose, bem como a diminuição da expressão dessa miocina na medula óssea. Ainda, baseado em estudos *in vitro*, foi observado que o GDF11 atuou na osteogênese induzindo a diferenciação de osteoblastos (13). Outro estudo também demonstrou a participação desta miocina na osteogênese. Em camundongos nocaute para o GDF11, a massa óssea estava reduzida devido ao comprometimento da maturação de osteoblastos e ao aumento da osteoclastogênese (55).

Contraditoriamente, outros estudos mostram uma participação negativa do GDF11, como um fator de risco para a perda óssea. Em mulheres chinesas na pós-menopausa, foram analisados os níveis séricos de GDF11 e estes foram associados negativamente com a densidade mineral óssea (87). *In vitro*, o GDF11 inibiu a diferenciação osteoblástica das células-tronco mesenquimais da medula óssea e *in vivo*, a injeção intraperitoneal de GDF11 em camundongos inibiu a formação óssea e acelerou a perda óssea relacionada à idade(56). Similarmente, outro estudo também demonstrou que o GDF11 inibiu, *in vitro*, a diferenciação de osteoblastos, além de estimular a

osteoclastogênese induzida por RANKL. Ainda, *in vivo*, a administração de GDF11 causou perda óssea e prejudicou a regeneração óssea em camundongos adultos jovens e idosos (14).

Quanto a AR, em relação a inflamação, foi observado que o GDF11 antagoniza a inflamação induzida por TNF- α e protege contra o desenvolvimento de artrite inflamatória em modelos de artrite em camundongos. O tratamento de macrófagos *in vitro* com TNF- α e GDF11 recombinante, demonstrou que o GDF11 foi capaz de reduzir os níveis de citocinas que tiveram seus níveis aumentados após o estímulo com o TNF- α , como IL-1 β e IL-6. Além disso, o GDF11 também antagonizou a indução mediada pelo TNF- α da via de sinalização do NF- κ B, a qual é ativada em várias condições inflamatórias, como na artrite (21).

2.5.3 Irisina

A irisina é uma miocina que foi descrita por Boström et al. em 2012. Ela é produzida pelo músculo esquelético em resposta ao exercício físico, através de um mecanismo dependente do coativador-1 α do receptor γ ativado por proliferador de peroxisoma (PGC1- α), um coativador transcricional que medeia muitos dos eventos moleculares induzidos pelo exercício(88). O PGC1- α , nas fibras musculares, regula a expressão da proteína transmembrana fibronectina tipo III contendo o domínio 5 (FNDC5), o qual codifica uma proteína de membrana. Esta proteína é processada proteoliticamente para formar a irisina, um polipeptídeo de 112 aminoácidos, que é, então, secretado na circulação sanguínea (88)(89).

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 (UCP1). Esse processo de diferenciação desencadeia a termogênese, aumentando o gasto total de energia corporal e melhorando a homeostase da glicose (88). Posteriormente, verificou-se que outros tecidos também são alvos da irisina. Existe uma regulação autócrina da irisina no músculo esquelético como um fator pró-miogênico, bem como uma ação anabólica da irisina sobre o tecido ósseo (90).

O fato de a irisina ser predominantemente expressa no músculo esquelético e liberada durante o exercício físico, levantou a hipótese de que ela poderia influenciar o metabolismo das células musculares. Essa relação com exercício físico foi demonstrada pela avaliação dos níveis circulantes de irisina em indivíduos submetidos a treinamento

aeróbico. Estes indivíduos apresentaram níveis de irisina mais elevados do que indivíduos sedentários (91). Na literatura, diversos estudos já demonstraram a relação da irisina com o tecido muscular. Utilizando culturas primárias de músculo esquelético humano, foi demonstrado que a expressão de mRNA de FNDC5 e os níveis de irisina estão aumentados durante o processo de diferenciação de miócitos. Ainda, o tratamento com irisina causou um aumento na expressão de quinases fosforiladas reguladas por sinal extracelular (p-Erk), as quais estão envolvidas na via de síntese proteica (19). Em outro estudo, o tratamento com irisina da linhagem de células musculares C2C12, foi capaz de induzir a expressão de vários genes pró-miogênicos e de resposta ao exercício nestas células. Neste mesmo estudo, os aumentos na expressão de IL-6, bem como na ativação de alvos subsequentes da cascata de sinalização, ao longo do tempo de diferenciação dos miotubos, foram reportados em consequência do tratamento com irisina, indicando que os efeitos dessa miocina sobre a diferenciação miogênica estão associados com a sinalização de IL-6. Adicionalmente, o tratamento de camundongos com irisina, após denervação, recuperou a perda de massa muscular esquelética, melhorando a ativação das células satélites e reduzindo a degradação de proteínas (20).

A irisina também regula genes que estão envolvidos na resposta imune. Em uma análise transcriptômica foi observado que a ativação de Erk pela irisina regulou positivamente quimiocinas como CCL2, CCL7 e CCL8 em células C2C12. Ainda, foi demonstrado que a CCL7 promove a proliferação de células C2C12, visto que o nocaute de CCL7, é capaz de inibir a proliferação de células C2C12 induzida por irisina (92). Com a finalidade de determinar se a irisina exerce efeitos miogênicos durante condições atroficas causadas por glicocorticoide, células C2C12 foram tratadas com dexametasona. O tratamento reduziu o tamanho dos miotubos e aumentou a atividade do proteossomo, no entanto, a irisina atenuou estes efeitos causados pela dexametasona (93). Ainda, um estudo analisou os níveis de irisina circulantes e demonstrou que estes níveis em indivíduos sarcopênicos e pré-sarcopênicos foram significativamente menores 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(94,95).

Evidências demonstram que a irisina é um mediador molecular crucial na conectividade músculo-osso(96). Com o objetivo de observar essa interação e a ação da irisina sobre o tecido ósseo, osteoblastos *in vitro* foram expostos a um meio condicionado coletado de mioblastos de camundongos após exercício físico, ou seja, um

meio com expressão aumentada de irisina. Esse meio induziu a diferenciação dos osteoblastos em maior extensão comparado aos osteoblastos expostos a meio condicionado coletado de camundongos em repouso (58).

Em um estudo *in vivo*, foram administradas doses baixas de irisina recombinante em camundongos machos jovens. O tratamento causou ações anabólicas na massa óssea e na densidade mineral do tecido cortical, ainda foram observadas diminuição de osteoclastos, aumento na expressão de genes osteoblásticos e uma diminuição da expressão de genes inibitórios osteoblásticos (17). A partir destes resultados, buscou-se avaliar os potenciais efeitos do tratamento com irisina em modelos animais de perda óssea. Em modelo murino de perda óssea por denervação, a redução da densidade mineral óssea trabecular foi prevenida pela irisina (97). Na osteoporose induzida pelo desuso em camundongos, através da suspensão dos animais pelos membros posteriores, houve diminuição da diferenciação de osteoblastos, porém o tratamento com irisina recombinante foi capaz de prevenir essa redução na diferenciação (98).

Diversos estudos têm buscado avaliar os níveis circulantes de irisina em diferentes situações. A análise dos níveis de irisina no soro e no líquido sinovial de pacientes com OA severa de joelho, revelou que estes pacientes possuem uma diminuição acentuada dos níveis de irisina tanto no soro quanto no líquido sinovial. Além disso, os níveis de irisina foram correlacionados com a severidade radiográfica da OA (99). Quando analisados, em condições de osteoporose, em indivíduos de meia-idade e idosos, bem como em mulheres na pós-menopausa, também foram reportados diminuição nos níveis da irisina sérica (100,101). Em um estudo com o objetivo de avaliar a relação entre o nível sérico de irisina e a presença de fraturas ósseas com baixo nível de trauma em pacientes com AR, foi observado um nível reduzido de irisina em 37% dos casos. Este grupo apresentou maior grau de atividade da doença pelo DAS28, de manifestações extra articulares e duração da doença de 5 a 10 anos. Também foi relatada uma relação confiável entre o nível de irisina sérica e a presença de fratura óssea na anamnese (22). Outro estudo em AR avaliou a associação dos níveis séricos de irisina com a qualidade do sono e atividade da doença nos pacientes. Os níveis de irisina estavam diminuídos em pacientes com AR com má qualidade do sono quando comparados com pacientes com melhor qualidade do sono e pacientes controle, indicando uma possível associação da diminuição da irisina sérica com o comprometimento do sono em pacientes com AR. Ainda, estes níveis foram inversamente correlacionados com a duração da doença e atividade da doença (avaliada

pelo DAS-28) (23).

3.MARCOCONCEITUAL

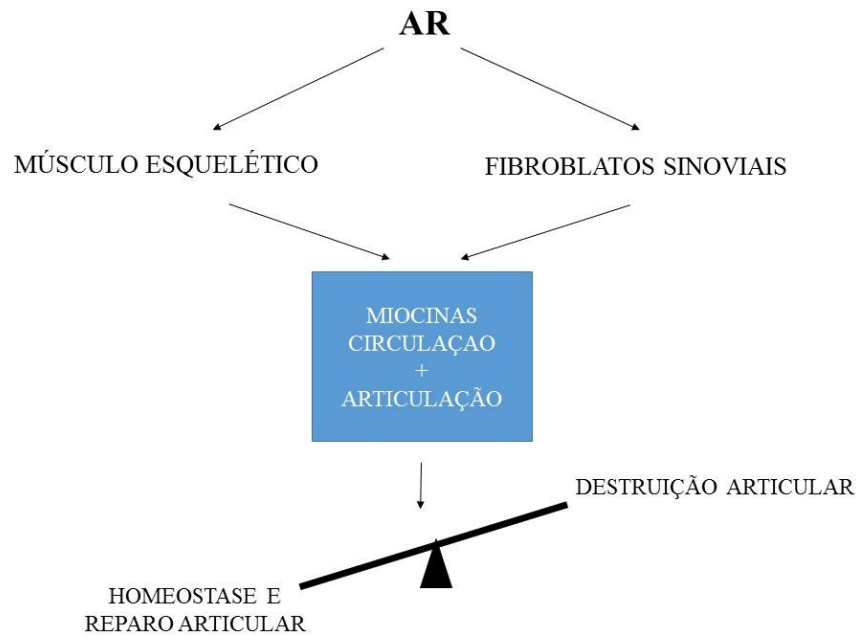


Figura 4. Marco conceitual artrite reumatoide e miocinas.

4. JUSTIFICATIVA

A literatura demonstra que as miocinas apresentam funções em diferentes tecidos, incluindo tecido ósseo e músculo esquelético. Adicionalmente, foi reportado que a miostatina é expressa por FLS na articulação de pacientes com AR, impulsionando a degradação óssea da doença. No entanto, um estudo na literatura em pacientes com AR, no estado de remissão, demonstrou uma diminuição nos níveis séricos de miostatina quando comparada com pacientes controle saudáveis. Enquanto outro estudo demonstrou níveis séricos mais elevados de miostatina em pacientes com AR com atividade da doença principalmente moderada a grave em comparação com um grupo de controle.

Em relação ao GDF11 e à irisina, apesar de ambos apresentarem também ações nos tecidos ósseo e muscular, existem poucos dados na literatura em relação aos níveis sinoviais e séricos dessas miocinas na AR comparadas a um grupo controle. Pelo nosso conhecimento, a expressão da irisina nunca foi avaliada especificamente na articulação e a do GDF11 não foi avaliada no soro. Sendo assim, a análise destas miocinas no líquido sinovial e no soro de pacientes com AR poderá auxiliar no entendimento do comportamento destes marcadores a nível articular e sistêmico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Avaliar os níveis séricos e no líquido sinovial de GDF-11, miostatina e irisina de pacientes com AR utilizando como controle um grupo de pacientes com OA.

5.2 Objetivos secundários

- Comparar os níveis articulares e sistêmicos das miocinas dos pacientes com AR com os do grupo controle;
- Avaliar a atividade da doença pelo CDAI;
- Identificar as medicações utilizadas, o tempo de duração da doença e a presença de doença erosiva nos prontuários dos pacientes com AR;
- Correlacionar as características clínicas dos pacientes com AR com os níveis das miocinas articulares e sistêmicos.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016 Oct 22;388(10055):2023–38.
2. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim*. 2018 Feb 8;4:18001.
3. Pap T, Dankbar B, Wehmeyer C, Korb-Pap A, Sherwood J. Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: Role and mechanisms. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2020.
4. Radner H, Smolen JS, Aletaha D. Comorbidity affects all domains of physical function and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. 2010.
5. Huffman KM, Jessee R, Andonian B, Davis BN, Narowski R, Huebner JL, et al. Molecular alterations in skeletal muscle in rheumatoid arthritis are related to disease activity, physical inactivity, and disability. *Arthritis Res Ther*. 2017 Dec 23;19(1):12.
6. Lee JH, Jun HS. Role of myokines in regulating skeletal muscle mass and function. Vol. 10, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2019. p. 42.
7. Pedersen BK, Åkerström TCA, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. Vol. 103, *Journal of Applied Physiology*. American Physiological Society; 2007. p. 1093–8.
8. Carson BP. The potential role of contraction-induced myokines in the regulation of metabolic function for the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 May 2;8(MAY).
9. Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2009 Jun;296(6).
10. Fennen M, Pap T, Dankbar B. Smad-dependent mechanisms of inflammatory bone destruction. Vol. 18, *Arthritis Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2016.
11. 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 Sep 8;21(9):1085–90.
12. Kersch-Schindl K, Ebenbichler G, Föeget-Samwald U, Leiss H, Gesslbauer C, Herceg

- M, et al. Rheumatoid arthritis in remission: Decreased myostatin and increased serum levels of periostin. *Wien Klin Wochenschr.* 2019 Jan 1;131(1–2):1.
13. Zhang Y, Shao J, Wang Z, Yang T, Liu S, Liu Y, et al. Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPARgamma. *Gene.* 2015 Feb 25;557(2):209–14.
 14. Liu W, Zhou L, Zhou C, Zhang S, Jing J, Xie L, et al. GDF11 decreases bone mass by stimulating osteoclastogenesis and inhibiting osteoblast differentiation. *Nat Commun.* 2016;7.
 15. Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, Miller CM, Loffredo FS, Wojtkiewicz GR, et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science (80-).* 2014;344(6184):630–4.
 16. Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, et al. GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration HHS Public Access. *Cell Metab.* 2015;22(1):164–74.
 17. 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 Sep 29;112(39):12157–62.
 18. Qiao XY, Nie Y, Ma YX, Chen Y, Cheng R, Yinrg WY, et al. Irisin promotes osteoblast proliferation and differentiation via activating the MAP kinase signaling pathways. *Sci Rep.* 2016;6.
 19. 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.* 2014 Dec 11;38(12):1538–44.
 20. Reza MM, Subramaniam 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 Dec 1;8(1):1–17.
 21. Li W, Wang W, Liu L, Qu R, Chen X, Qiu C, et al. GDF11 antagonizes TNF- α -induced inflammation and protects against the development of inflammatory arthritis in mice. *FASEB J.* 2019 Mar 8;33(3):3317–29.
 22. Lavrova DP, Zavadovsky B V., Akhverdyan YR, Polyakova Y V., Sivordova LE, Zborovskaya IA, et al. Irisin as a new marker of early diagnostics of low-traumatic

- fractures in rheumatoid arthritis. *Klin Lab Diagnostika*. 2018;63(11):702–6.
23. 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 Mar 1;67:71–6.
 24. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TWJ. Rheumatoid arthritis. *Lancet (London, England)* . 2010 Sep 25;376(9746):1094–108.
 25. Khurana R, Berney SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005 Oct 1;12(3):153–65.
 26. Dougados M. Comorbidities in rheumatoid arthritis. Vol. 28, *Current Opinion in Rheumatology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 282–8.
 27. Senna ER, De Barros ALP, Silva EO, Costa IF, Pereira LVB, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004 Mar;31(3):594–7.
 28. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2010;35(1):10–4.
 29. Barton A, Worthington J. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: An emerging picture. *Arthritis Rheum*. 2009 Oct 15;61(10):1441–6.
 30. Karami J, Aslani S, Tahmasebi MN, Mousavi MJ, Sharafat Vaziri A, Jamshidi A, et al. Epigenetics in rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes as an emerging paradigm in the pathogenesis of the disease. *Immunol Cell Biol*. 2020 Mar 26;98(3):171–86.
 31. Holers M. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. 2013.
 32. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum* . 2004 Feb 1;50(2):380–6.
 33. McInnes IB. SG. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med*. 2011; 365(23):2205–19.
 34. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. Vol. 46, *Immunity*. Cell Press; 2017. p. 183–96.
 35. Choy E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of

- rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2012;51(suppl 5):v3–11.
36. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun 1;7(6):429–42.
 37. Jung SM, Kim KW, Yang C-W, Park S-H, Ju JH. Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. *J Immunol Res*. 2014 Sep 10;2014:263625.
 38. Schett G, Gravallesse E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. *Nat Rev Rheumatol*. 2012 Nov;8(11):656–64.
 39. Neogi T, Aletaha D, Silman AJ, Naden RL, Felson DT, Aggarwal R, et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report. *Arthritis Rheum*. 2010 Sep;62(9):2582–91.
 40. Maria M, Medeiros C, Maria B, Barreto De Oliveira G, Medeiros De Cerqueira JV, Telles De Souza Quixadá B E R, et al. Correlação dos índices de atividade da artrite reumatoide (Disease Activity Score 28 medidos com VHS, PCR, Simplified Disease Activity Index e Clinical Disease Activity Index) e concordância dos estados de atividade da doença com vários pontos de corte. 2015.
 41. Smolen JS, Breedveld FC, Schiff MH, Kalden JR, Emery P, Eberl G, et al. A simplified disease activity index for rheumatoid arthritis for use in clinical practice. *Rheumatology*. 2003;42:244–57.
 42. Aletaha D, Nell VPK, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther*. 2005;7(4):R796.
 43. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(1):3–15.
 44. da Mota LMH, 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 May 24;58(1):1–17.
 45. O’Shea JJ, Laurence A, McInnes IB. Back to the future: oral targeted therapy for RA and other autoimmune diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Mar;9(3):173–82.

46. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev.* 2010 Jan;233(1):233–55.
47. Turner JD, Filer A. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis. 2015.
48. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol.* 2013 Jan;9(1):24–33.
49. Ganesan R, Rasool M. Fibroblast-like synoviocytes-dependent effector molecules as a critical mediator for rheumatoid arthritis: Current status and future directions. *Int Rev Immunol.* 2017;36(1):20–30.
50. Müller-Ladner U, Ospelt C, Gay S, Distler O, Pap T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(6):223.
51. Lefèvre S, Knedla A, Tennie C, Kampmann A, Wunrau C, Dinser R, et al. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat Med.* 2009 Dec;15(12):1414–20.
52. Tolboom TCA, van der Helm-Van Mil AHM, Nelissen RGHH, Breedveld FC, Toes REM, Huizinga TWJ. Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005 Jul 1;52(7):1999–2002.
53. Laragione T, Brenner M, Mello A, Symons M, Gulko PS. The arthritis severity locus *Cia5d* is a novel genetic regulator of the invasive properties of synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2008 Aug;58(8):2296–306.
54. Kaji H. Effects of myokines on bone. *Bonekey Rep.* 2016 Jul 20;5.
55. 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 Mar 3;117(9):4910–20.
56. Lu Q, Tu ML, Li CJ, Zhang L, Jiang TJ, Liu T, et al. GDF11 Inhibits Bone Formation by Activating Smad2/3 in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Calcif Tissue Int.* 2016 Nov 1;99(5):500–9.
58. Colaianni G, Cuscito C, Mongelli T, Oranger A, Mori G, Brunetti G, et al. Irisin enhances osteoblast differentiation in vitro. *Int J Endocrinol.* 2014.
59. Bonewald L. Use it or lose it to age: A review of bone and muscle communication. *Bone.*

- 2019;120:212–8.
60. Brotto M, Bonewald L. Bone and muscle: Interactions beyond mechanical. Vol. 80, *Bone*. 2015. p. 109–14.
 61. Brotto M, Johnson ML. Endocrine crosstalk between muscle and bone. Vol. 12, *Current Osteoporosis Reports*. 2014. p. 135–41.
 62. Bettis T, Kim BJ, Hamrick MW. Impact of muscle atrophy on bone metabolism and bone strength: implications for muscle-bone crosstalk with aging and disuse. Vol. 29, *Osteoporosis International*. Springer London; 2018. p. 1713–20.
 63. Pedersen BK, Steensberg A, Fischer C, Keller C, Keller P, Plomgaard P, et al. Searching for the exercise factor: Is IL-6 a candidate? In: *Journal of Muscle Research and Cell Motility*. *J Muscle Res Cell Motil*; 2003. p. 113–9.
 64. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*. 1997 May 1;387(6628):83–90.
 65. Rodgers BD, Interlichia JP, Garikipati DK, Mamidi R, Chandra M, Nelson OL, et al. Myostatin represses physiological hypertrophy of the heart and excitation-contraction coupling. *J Physiol*. 2009 Oct;587(20):4873–86.
 66. Lee S-J. REGULATION OF MUSCLE MASS BY MYOSTATIN. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004 Nov 8;20(1):61–86.
 67. Huang Z, Chen X, Chen D. Myostatin: A novel insight into its role in metabolism, signal pathways, and expression regulation. Vol. 23, *Cellular Signalling*. Pergamon; 2011. p. 1441–6.
 68. Zimmers TA, Davies M V., Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* (80-). 2002 May 24;296(5572):1486–8.
 69. Anderson SB, Goldberg AL, Whitman M. Identification of a Novel Pool of Extracellular Pro-myostatin in Skeletal Muscle *. 2008.
 70. Fan X, Gaur U, Sun L, Yang D, Yang M. The Growth Differentiation Factor 11 (GDF11) and Myostatin (MSTN) in tissue specific aging. Vol. 164, *Mechanisms of Ageing and Development*. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 108–12.
 71. Walker RG, Poggioli T, Katsimpardi L, Buchanan SM, Oh J, Wattus S, et al. *Biochemistry and Biology of GDF11 and Myostatin: Similarities, Differences, and*

- Questions for Future Investigation. Vol. 118, Circulation Research. Lippincott Williams and Wilkins; 2016. p. 1125–42.
72. Grobet L, Pirottin D, Farnir F, Poncelet D, Royo LJ, Brouwers B, et al. Modulating skeletal muscle mass by postnatal, muscle-specific inactivation of the myostatin gene. *Genesis*. 2003 Apr 1;35(4):227–38.
 73. Little RD, Prieto-Potin I, Pérez-Baos S, Villalvilla A, Gratal P, Cicuttini F, et al. Compensatory anabolic signaling in the sarcopenia of experimental chronic arthritis. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
 74. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. Vol. 473, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Academic Press; 2008. p. 201–9.
 75. 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. 2016.
 76. Hu SL, Chang AC, Huang CC, Tsai CH, Lin CC, Tang CH. Myostatin promotes interleukin-1 β expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through inhibition of miR-21-5p. *Front Immunol*. 2017 Dec 8;8(DEC).
 77. Su C, Hu S, Sun Y, Zhao J, Dai C, Wang L, et al. Myostatin induces tumor necrosis factor- α expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the PI3K–Akt signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2019 Jun 30;234(6):9793–801.
 78. Nakashima M, Toyono T, Akamine A, Joyner A. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGF β superfamily during mouse embryogenesis. *Mech Dev*. 1999 Feb 1;80(2):185–9.
 79. Walker RG, Czepnik M, Goebel EJ, McCoy JC, Vujic A, Cho M, et al. Structural basis for potency differences between GDF8 and GDF11. *BMC Biol*. 2017 Mar 3;15(1).
 80. Zhang Y, Wei Y, Liu D, Liu F, Li X, Pan L, et al. Role of growth differentiation factor 11 in development, physiology and disease. Vol. 8, *Oncotarget*. Impact Journals LLC; 2017. p. 81604–16.
 81. Andersson O, Reissmann E, Ibáñez CF. Growth differentiation factor 11 signals through the transforming growth factor- β receptor ALK5 to regionalize the anterior-posterior axis. *EMBO Rep*. 2006;7(8):831–7.
 82. Loffredo FS, Steinhauser ML, Jay SM, Gannon J, Pancoast JR, Yalamanchi P, et al. Growth Differentiation Factor 11 is a Circulating Factor that Reverses Age-Related

- Cardiac Hypertrophy. *Cell*. 2013;153(4):828–39.
83. 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 HHS Public Access. *Circ Res*. 2016;118(1):29–37..
 84. Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle#. *Science*. 2014;344(6184):649–52.
 85. Jeanplong F, Falconer SJ, Thomas M, Matthews KG, Oldham JM, Watson T, et al. Growth and differentiation factor-11 is developmentally regulated in skeletal muscle and inhibits myoblast differentiation. *Open J Mol Integr Physiol*. 2012;2:127–38.
 86. Schafer MJ, Atkinson EJ, Vanderboom PM, Kotajarvi B, White TA, Moore MM, et al. Quantification of GDF11 and myostatin in human aging and cardiovascular disease HHS Public Access. *Cell Metab*. 2016;23(6):1207–15.
 87. Chen Y, Guo Q, Zhang M, Song S, Quan T, Zhao T, et al. Relationship of serum GDF11 levels with bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal Chinese women. *Bone Res*. 2016;4.
 88. 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 Jan 26;481(7382):463–8.
 89. Aydin S. Three new players in energy regulation: Preptin, adropin and irisin [Internet]. Vol. 56, *Peptides*. Elsevier Inc.; 2014. p. 94–110.
 90. Colaianni G, Mongelli T, Colucci S, Cinti S, Grano M. Crosstalk Between Muscle and Bone Via the Muscle-Myokine Irisin. Vol. 14, *Current Osteoporosis Reports*. Current Medicine Group LLC 1; 2016. p. 132–7.
 91. Jedrychowski MP, Wrann CD, Paulo JA, Gerber KK, Szpyt J, Robinson MM, et al. Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. *Cell Metab*. 2015;22(4):734–40.
 92. 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).
 93. Chang JS, Kong ID. Irisin prevents dexamethasone-induced atrophy in C2C12 myotubes. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2020;472(4):495–502.

94. Chang JS, Kim TH, Nguyen TT, Park K-S, Kim N, Kong ID. Circulating irisin levels as a predictive biomarker for sarcopenia: A cross-sectional community-based study. *Geriatr Gerontol Int.* 2017 Nov 1.
95. 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 May 15;64(2):341–8.
96. 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.
97. 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 Jul 1;103(1):24–34.
98. 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):1259.
99. 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.
100. Zhou K, Qiao X, Cai Y, Li A, Shan D. Lower circulating irisin in middle-aged and older adults with osteoporosis. *Menopause.* 2019 Nov 1;26(11):1302–10.
101. 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.

7. ARTIGO

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

GDF11, myostatin and irisin synovial fluid and serum levels in RA patients

Renata Ternus Pedó^{1,2}; Jordana Miranda de Souza Silva^{1,2}; Mirian Farinon^{1,2}; Suelen Pizzolatto Dalmolin¹; Manuela dos Santos¹; Barbara Jonson Bartikoski^{1,2}; Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo^{1,2}; Vanessa Hax³; Ricardo Machado Xavier^{1,2}.

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

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

³Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

Key indexing terms: Rheumatoid arthritis, myostatin, GDF-11, irisin.

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).

Conflict of interest:the authors declare no conflict of interest.

Degree information for all authors:

Renata Ternus Pedó, Graduated.

Jordana Miranda de Souza Silva, PhD.

Mirian Farinon, MD.

Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo, PhD.

Bárbara Jonson Bartikoski,

Vanessa Hax, MD.

Ricardo Machado Xavier, PhD.

Corresponding author:

Renata Ternus Pedó

Laboratório de Doenças Autoimunes, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Ramiro Barcelos Street, 2350, Santa Cecília – Porto Alegre, Brazil

renata.tpedo@gmail.com

Phone: +55 51 33598837

Abstract

Objective. To assess and compare synovial fluid and serum levels of myostatin, GDF11 and irisin in patients with rheumatoid arthritis (RA) using a group of patients with osteoarthritis (OA) as control.

Methods. Synovial fluid and blood were collected from 11 RA patients and 5 OA patients. Disease activity was assessed by Clinical Disease Activity Index (CDAI). Drugs used by RA patients, disease duration and presence of erosive disease were consulted in medical records. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to evaluate myostatin, GDF11 and irisin synovial fluid and serum levels.

Results. RA patients presented mean age of 65 years and mean disease duration of 16 years. Mean clinical disease activity was 12.8, 27.3% of the patients were classified in low disease activity and 72.7% in moderate disease activity. Biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs) were being used by 18.2% of patients and 72.7% of the patients were using methotrexate at the time of samples collection. Presence of erosive disease was found in 27.3% of patients. Mean age of patients with OA was 66 years. GDF11 serum levels were higher in RA patients (347.50 (31.30- 1818.00) than in OA group (31.30 (31.30- 31.30); $p=0.052$). Myostatin and irisin synovial fluid and serum levels, as well as GDF11 synovial fluid levels, did not differ between RA patients and OA group. In RA patients, myostatin synovial fluid levels (31.30 (31.30-181.80) were lower than in serum (817.20 (334.30- 994.70); $p= 0.007$) and GDF11 synovial fluid levels (31.30 (31.30- 88.13) were also lower than in serum (347.50 (31.30- 1818.00); $p=0.018$). Disease duration was negatively correlated with myostatin synovial fluid levels ($r=-0.684$, $p=0.02$). CDAI and

presence of erosive disease were not associated with myostatin, GDF11 and irisin levels in synovial fluid and in serum.

Conclusion. We found higher GDF11 serum levels in RA group compared to OA group, almost reaching a significant difference. In RA patients, myostatin and GDF11 synovial fluid levels were lower than in serum. Our results contribute to the knowledge about the participation of myokines in RA pathogenesis. Additionally, the higher GDF11 serum levels found in RA group could be related to a compensatory attempt against the disease inflammatory state.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a highly prevalent systemic autoimmune disease, characterized by chronic synovitis that leads to cartilage and bone destruction (1)(2). Fibroblast-like synoviocytes (FLS) have a central role in RA chronic synovitis and joint damage. In the arthritic joint environment, these cells are altered and present a tumor-like behavior such as resistance to apoptosis, increased proliferation and migration, as well as invasion capacity (3). This joint damage causes deformity and contributes to functional disability and decreased quality of life in RA patients (4).

Muscle tissue, which is also affected in RA leading patients to muscle loss, is the main producer and primary target of myokines (5)(6). As myokines are skeletal muscle-derived cytokines and growth factors released into the circulation, they have as functions not only the autocrine regulation of muscle tissue metabolism, but also paracrine activities (7,8). Myostatin is a myokine characterized by inhibiting protein synthesis and increasing protein degradation in muscle tissue, and by increasing osteoclastogenesis in bone tissue (9–11). The expression of myostatin has been reported in synovial tissues of RA patients and arthritic mice, specifically in the FLS. Additionally, FLS stimulation with inflammatory cytokines resulted in upregulation of myostatin, which suggests that FLS are a potential source of myokines (10). In contrast to the findings in the arthritic joint, the assessment of serum myostatin demonstrated that RA patients in remission have lower levels in comparison with control individuals (12).

Others myokines that have also demonstrated activity on bone and muscle tissues are growth differentiation factor 11 (GDF11) and irisin. Published data in relation to GDF11 have shown contradictory results regarding its functions in these tissues. It has been reported that GDF11 induces osteoblast differentiation, while another study have shown that GDF11 inhibits osteoblast differentiation and stimulates osteoclastogenesis(13,14). In muscle, a study has shown that its administration improves skeletal muscle performance and repair, while another demonstrated that its administration inhibited myoblast differentiation and muscle regeneration (15,16). Regarding irisin, it has opposite actions to myostatin. Irisin increases bone mass, reduces the number of osteoclasts and increases the expression of osteoblastic genes, in addition to promoting the differentiation and proliferation of osteoblasts (17,18). In muscle, irisin stimulates muscle growth-related genes and induces skeletal muscle hypertrophy(19,20). Although irisin expression has not been specifically studied in RA joint, the treatment with recombinant GDF11 was able to reduce the severity of joint degradation in an arthritis animal model (21). Additionally, irisin serum levels in RA patients were found to be inversely correlated with disease activity and duration, presence of extra-articular manifestations and morning stiffness (22,23). As for GDF11, its circulating concentration in RA patients has not yet been evaluated.

Due to the recently identified functions of myokines on synovial tissue, besides their known influence on muscle and bone tissues, all affected by RA, it is important to study these markers both at articular and circulating levels. This knowledge may contribute to the understanding of pathogenesis and to the search for biomarkers that can improve the diagnosis and management of patients. Additionally, novel data about myokines in RA may contribute to the development of new therapeutic interventions. Thus, this study aimed to assess and to compare synovial and serum levels of myostatin, GDF11 and irisin in patients with RA using a group of patients with osteoarthritis (OA) as control.

Materials and Methods

Study design and patients: This cross-sectional study was performed at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA/BRAZIL). Patients diagnosed with RA according to the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria

(ACR/EULAR) (24), with active disease and indication of knee arthrocentesis by the attending rheumatologist were included in the study. Patients with knee OA and indication of knee arthrocentesis were included as controls for the evaluation of myokines. Patients with positive infection serology tests (HIV, HBV, HCV, syphilis, tuberculosis) and indication of arthrocentesis on other joints were excluded. RA patients' disease activity was also evaluated at the time of samples collection. Drugs use, disease duration and presence of erosive disease were determined in the medical records. This study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethics Committee and registered under number 18-0667. All subjects signed an informed consent form.

Collection procedures: Synovial fluid was obtained by arthrocentesis of the affected knee joints and performed by a rheumatologist. In brief, local anesthetic was applied in the joint area, a needle with an attached syringe was inserted into the joint and joint fluid was aspirated into the syringe. After the sample was centrifuged and stored in aliquots at -80°C until use. Venous blood collections were performed in patients without previous fasting. After collection, samples were centrifuged and serum was stored at -80°C for subsequent measurements.

Assessment of disease activity: Disease activity was assessed by Clinical Disease Activity Index (CDAI)(25). CDAI is measured by assessing 28-tender-joint count (range 0–28), 28-swollen-joint count (range 0–28) and patient and physician global assessment on VAS (0–10 cm) Scale. Remission is considered when $\text{CDAI} < 2.8$, low disease activity when $\text{CDAI} 2.8 - 10.0$, moderate disease activity when $\text{CDAI} > 10.0 - 22.0$ and high disease activity when $\text{CDAI} > 22.0$ (26).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to evaluate myostatin (DY788-05; R&D Systems), GDF11 (DY1958-05; R&D Systems) and irisin (EK-067-29; Phoenix Pharmaceuticals) synovial fluid and serum levels according to manufacturer's instructions. The absorbance of each well was measured at 450nm and 540nm in a SpectraMax M3 spectrophotometer. Myokines synovial fluid and serum concentrations were calculated at MyAssays Software.

Statistical analysis: The Kolmogorov–Smirnov method was used to test for normality. Results are expressed as mean \pm standard deviation, median and interquartile range (25-

75%) or number as percent of total (%) as appropriate. Spearman's correlation coefficients were used to analyze correlation between clinical parameters and myokines synovial fluid and serum levels. The Mann-Whitney U test was used to compare the difference of myokines synovial fluid and serum levels between patients and controls. 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

Clinical and demographic characteristics. Clinical and demographic data of the patient and control groups are shown in Table 1. RA patients included in the study presented mean age of 65 years and mean disease duration of 16 years. Mean clinical disease activity was 12.8, 18.2% of the patients were using biological disease-modifying antirheumatic drugs (bDMARDs) and 72.7% of the patients were using methotrexate at the time of samples collection. Presence of erosive disease was found in 27.3% of patients. Mean age of OA patients was 66 years (Table 1).

Table 1. Clinical and demographic features of study population

Characteristics	RA (n=11)	OA (n=5)
Age in years (mean \pm SD)	65.3 \pm 9.26	66.6 \pm 5.22
Women, n (%)	10 (90.9)	3 (60)
Disease duration in years (mean \pm SD)	16 \pm 12.41	
CDAI (mean \pm SD)	12.8 \pm 5.68	
Low activity, n (%)	3 (27.3)	
Moderate activity, n (%)	8 (72.7)	
MTX use, n (%)	8 (72.7)	
Erosive disease, n (%)	3 (27.3)	
bDMARD use, n (%)	2 (18.2)	
Synovial fluid		
Myostatin (pg/ml) (median (IQR))	31.30 (31.30-181.80)	232.10 (106.15- 855.50)
GDF11 (pg/ml) (median (IQR))	31.30 (31.30- 88.13)	31.30 (31.30- 31.30)
Irisin (ng/ml) (median (IQR))	9.51 (8.89- 16.68)	5.58 (5.33- 8.32)
Serum		

Myostatin (pg/ml) (median (IQR))	817.20 (334.30- 994.70)	761.70 (440.55- 1312.05)
GDF11 (pg/ml) (median (IQR))	347.50 (31.30- 1818.00)	31.30 (31.30- 31.30)
Irisin (ng/ml) (median (IQR))	14.05 (12.47- 14.96)	11.17 (9.16- 14.69)

RA, rheumatoid arthritis; OA, osteoarthritis; SD, standard deviation; CDAI, clinical disease activity index; MTX, methotrexate; bDMARDs, biological disease-modifying antirheumatic drugs; IQR, interquartile range.

Disease activity and myokines. Mean disease activity was 12.8, 27.3% of the patients were classified in low disease activity and 72.7% in moderate disease activity. CDAI was not associated with myostatin, GDF11 and irisin in synovial fluid ($r=0.22$, $p=0.51$; $r=-0.16$, $p=0.64$; $r=-0.31$, $p=0.35$) and in serum ($r=-0.08$, $p=0.805$; $r=-0.002$, $p=0.99$; $r=0.21$, $p=0.53$) (Table 2).

Myokines synovial fluid and serum levels. GDF11 serum levels were higher in RA patients than in OA group (347.50 (31.30- 1818.00) vs 31.30 (31.30- 31.30); $p=0.052$). Myostatin and irisin in synovial fluid and serum levels, as well as GDF11 synovial fluid levels, did not differ between RA patients and OA group (Figure 1). In RA patients myostatin synovial fluid levels were lower than in serum (31.30 (31.30-181.80) vs 817.20 (334.30- 994.70); $p=0.007$) and GDF11 synovial fluid levels were also lower than in serum (31.30 (31.30- 88.13) vs 347.50 (31.30- 1818.00); $p=0.018$) (Figure 2A).

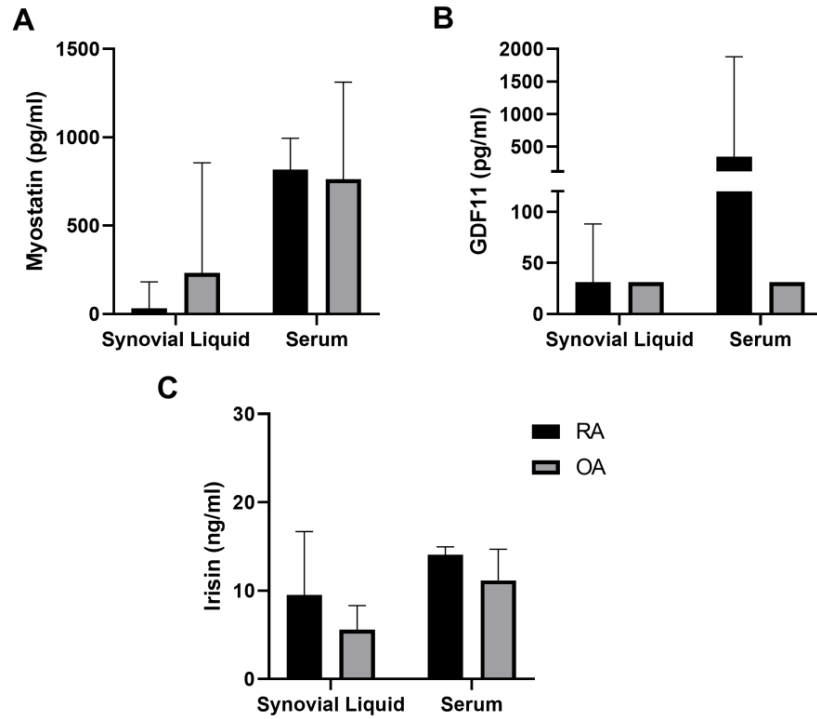


Figure 1. Myostatin (A), GDF11 (B) and irisin (C) synovial fluid and serum levels of RA patients and OA group. Data were analyzed by Mann-Whitney U test and are represented by median (interquartile range).

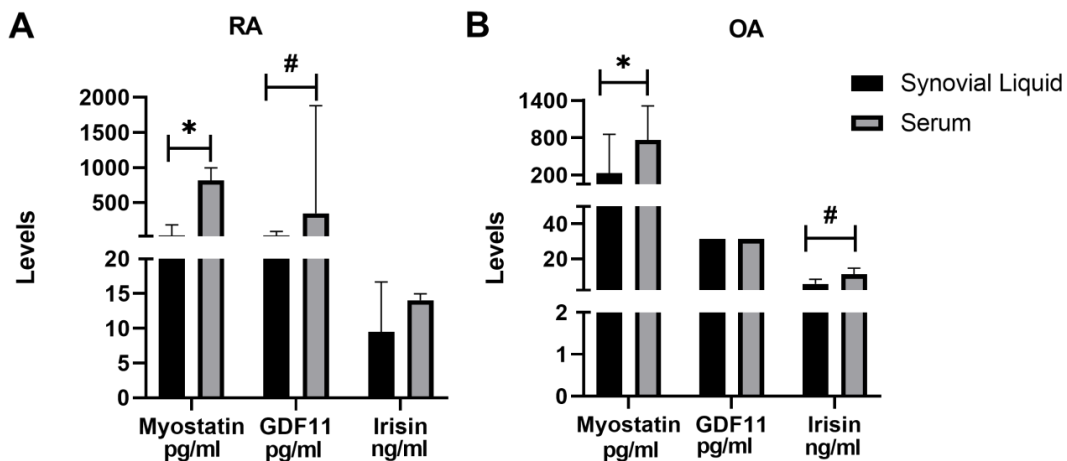


Figure 2.A) Myostatin, GDF11 and irisin synovial fluid and serum levels in RA patients. Data were analyzed by Mann-Whitney U test and are represented by median (interquartile range). * $p=0.007$ myostatin synovial fluid vs myostatin serum. # $p=0.018$ GDF11 synovial

fluid vs GDF11 serum. B) Myostatin, GDF11 and irisin synovial fluid and serum levels in OA group. Data were analyzed by Mann-Whitney U test and are represented by median (interquartile range). *p=0.043 myostatin synovial fluid vs myostatin serum. #p=0.043 irisin synovial fluid vs irisin serum.

Correlated parameters. In RA patients, disease duration was negatively correlated with myostatin synovial fluid levels ($r=-0.684$, $p=0.02$). The use of bDMARDs, MTX and the presence of erosive disease did not correlate with myokines synovial and serum levels (Table 2).

Table 2. Associations between clinical parameters and myokines levels

	GDF11 (pg/ml)				Myostatin (pg/ml)				Irisin (ng/ml)			
	SF		Serum		SF		Serum		SF		Serum	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
CDAI	-0.16	0.64	-0.00	0.99	0.22	0.51	-0.08	0.80	0.31	0.35	0.21	0.53
Disease duration	0.81	0.81	-0.07	0.82	-0.68	0.02*	-0.15	0.67	0.15	0.66	-0.02	0.96
bDMARDs	0.33	0.32	-0.04	0.91	0.86	0.80	0.15	0.66	-0.52	0.09	0.22	0.51
MTX	-0.82	0.81	0.03	0.92	0.15	0.66	0.29	0.38	-0.42	0.19	0.25	0.44
Erosive disease	0.00	1.00	0.53	0.95	0.00	1.00	-0.16	0.63	0.38	0.24	0.13	0.70

Spearman's correlation coefficients of the study variables. * $p \leq 0.05$. SF, synovial fluid; CDAI, clinical disease activity index; bDMARDs, biological disease-modifying antirheumatic drugs; MTX, methotrexate.

Discussion

In RA, the joint homeostasis is likely affected by myokines, which are released from skeletal muscle to bloodstream or locally produced by arthritic FLS, and have the ability to impact bone remodeling. Following the evaluation of myostatin, GDF11 and irisin in synovial fluid and serum of RA patients, having as control a group of OA patients, we found higher GDF11 serum levels in RA patients. Also, the synovial fluid levels of myostatin and GDF11 in RA patients, and the synovial fluid levels of myostatin and irisin in OA patients were lower than in serum.

Our results demonstrated higher GDF11 serum levels in RA group compared to OA group, almost reaching a significant difference ($p=0.052$), while synovial fluid levels were similar between groups. Additionally, RA patients had lower GDF11 synovial fluid levels, compared to serum levels. In an animal model of arthritis, a reduction in synovitis, pannus, and erosion was observed after GDF11 treatment(21). Also, the administration of GDF11 demonstrated anti-inflammatory activity in animal models of psoriasis and colitis, and antagonized TNF- α function, suppressed IL-1 β secretion and NLRP3 inflammasome activation *in vitro*(27,28). Considering these previous studies, the increased GDF11 levels in our RA patients could be related to a compensatory attempt against the disease inflammatory state. Although we did not find association between GDF11 levels and disease activity, it is important to mention that our RA patients had little disease activity variability (27.3% low disease activity and 72.7% moderate disease activity), which possibly hindered the correlations with myokines levels. Furthermore, the increased levels in serum but not in synovial fluid suggest the role of muscle secreted GDF11 in RA. Otherwise, despite the beneficial effects on bone erosion found in animal arthritis, other studies have reported that GDF11 leads to bone loss in young and adult mice, and inhibits osteoblast differentiation *in vitro*(13,14). Thus, further studies to evaluate GDF11 expression in synovial tissue, as well as FLS participation in GDF11 production and signaling, are extremely relevant to better understand this myokine role in RA joint destruction. Our study was pioneer in the evaluation of serum GDF11 in RA patients and further analysis, with greater sample size, would enable to reinforce the levels alterations in the disease. Mainly, because previous results reporting GDF11 circulating levels, in conditions such as aging and bone loss, showed discrepancies(13,16,29,30).

In our study, the evaluation of myostatin serum levels did not differ between RA and OA patients. Previously, lower myostatin serum levels were found in RA patients in remission, compared to a control group of healthy individuals age and gender matched, while another study demonstrated higher myostatin serum levels in a sample of RA patients with mostly moderate-severe disease activity compared to a control group matched by sex, age and body mass index(12,31). Unlike the cited studies, our control group was composed by OA patients, which also presented myostatin serum levels significantly higher than healthy individuals in previous report(32). Possibly, as rheumatic diseases, both RA and OA have

altered serum levels of myostatin, which differs from the normal population. However, to enable the analysis of myokines levels in the synovial fluid as well, OA represents an ideal control group for RA. Myostatin expression in synovial tissues of RA patients were described to be higher than in OA patients(10,33). Similarly, myostatin levels in synovial fluid were also higher in RA compared OA(34), although we did not find different levels between groups in our study. However, we evaluated synovial fluid samples collected during the arthrocentesis, differing from the arthroplasty used by Hu et al, which is usually indicated for RA patients with more severe disease. Otherwise, in our RA patients, the levels of myostatin in synovial fluid were significantly lower than in serum. In our OA group, myostatin synovial fluid levels were also lower than in serum, which may be considered closer to the physiological condition. As far as we know, this was the first study to simultaneously evaluate myostatin synovial fluid and serum levels in RA.

Considering their isin evaluation, synovial fluid and serum levels were not different between RA and OA group. Studies reported lower irisin serum levels in RA patients compared to healthy individuals, in addition to a negative correlation of serum irisin with disease activity (22,23). However, the recruitment of healthy individuals as the control group, and the use DAS28-ESR instead of CDAI to evaluate the disease activity of RA patients, are some aspects that differ from our study and may be related to the distinct findings (22,23). A significant difference was found in the OA group, where the levels of irisin in synovial fluid were lower than in serum. Although this significant difference was not found in our RA group, the synovial fluid median was lower than in serum. In OA, previous report showed that irisin serum levels were significantly lower than control individuals, and irisin levels, both in synovial fluid and in serum, were negative correlated with disease severity (35). Despite the apparent inverse relationship of irisin with the activity and severity of rheumatic diseases, this was not detected in our study, and may be related to our sample size, as well as the little disease activity variation between the RA patients, since that most of our patients had moderate disease activity.

Regarding the clinical parameters analyzed in this study, association between disease activity and myokines concentrations was not found. An observational study identified that myostatin serum levels were associated with moderate or severe disease evaluated by DAS28 in RA patients. Of these patients, 96% were using synthetic DMARDs(31).

Otherwise, when in remission, RA patients have lower myostatin serum levels than healthy individuals. Most of these patients used DMARDs(12). We evaluated disease activity by CDAI, and at the time of samples collection, eight of the RA patients were using methotrexate and two were using bDMARDs. As 72.7% of our patients presented moderate activity, we speculate that it prevented the reach of associations between disease activity and myokines levels in RA. Additionally, no association was found between the use of bDMARDs, MTX and the presence of erosive disease with myokines synovial and serum levels. Due to the fact that myostatin has already been associated with joint damage in an animal model(10), we assessed whether this association was also present in our patients sample, but this did not occur. However, it is necessary to take into account that our sample size was small and that only three patients had erosive disease. Finally, perhaps, the use of a radiological score would be better. Also, we found a negative correlation between disease duration and myostatin synovial fluid levels. To our knowledge, the only literature study which assesses myostatin synovial fluid concentration does not relate it to the disease duration and one study which evaluates myostatin serum levels and compared it to the disease duration found positive correlation between them (31,34).

This study has some limitations. The number of patients included is small, which may have interfered in the comparisons between groups, as well as in the correlations with clinical features. Another limitation is the lack of *in vitro* evaluation of myokines expression and activity directly in the FLS, which can be isolated from the patient's synovial fluid. Additionally, the disease activity evaluation by DAS28 would include the inflammation parameter in this assessment.

In summary, we found higher GDF11 serum levels in RA group compared to OA group, almost reaching a significant difference. In RA patients, myostatin and GDF11 synovial fluid levels were lower than in serum and in OA group myostatin and irisin synovial fluid levels were lower than in serum. Our results contribute to the knowledge about myokines participation in RA pathogenesis and the higher GDF11 serum levels found in RA group could be related to a compensatory attempt against the disease inflammatory state. However, future research about this relation, as well as on the myokines participation in synovium and FLS are needed.

Referências

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016 Oct 22;388(10055):2023–38.
2. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim*. 2018 Feb 8;4:18001.
3. Pap T, Dankbar B, Wehmeyer C, Korb-Pap A, Sherwood J. Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: Role and mechanisms. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. Elsevier Ltd; 2020.
4. Radner H, Smolen JS, Aletaha D. Comorbidity affects all domains of physical function and quality of life in patients with rheumatoid arthritis. 2010.
5. Huffman KM, Jessee R, Andonian B, Davis BN, Narowski R, Huebner JL, et al. Molecular alterations in skeletal muscle in rheumatoid arthritis are related to disease activity, physical inactivity, and disability. *Arthritis Res Ther*. 2017 Dec 23;19(1):12.
6. Lee JH, Jun HS. Role of myokines in regulating skeletal muscle mass and function. Vol. 10, *Frontiers in Physiology*. Frontiers Media S.A.; 2019. p. 42.
7. Pedersen BK, Åkerström TCA, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. Vol. 103, *Journal of Applied Physiology*. American Physiological Society; 2007. p. 1093–8.
8. Carson BP. The potential role of contraction-induced myokines in the regulation of metabolic function for the prevention and treatment of type 2 diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 May 2;8(MAY).
9. Sartori R, Milan G, Patron M, Mammucari C, Blaauw B, Abraham R, et al. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2009 Jun;296(6).
10. 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 Sep 8;21(9):1085–90.

11. Fennen M, Pap T, Dankbar B. Smad-dependent mechanisms of inflammatory bone destruction. Vol. 18, *Arthritis Research and Therapy*. BioMed Central Ltd.; 2016.
12. Kerschán-Schindl K, Ebenbichler G, Föeger-Samwald U, Leiss H, Gesslbauer C, Herceg M, et al. Rheumatoid arthritis in remission: Decreased myostatin and increased serum levels of periostin. *Wien Klin Wochenschr*. 2019 Jan 1;131(1–2):1.
13. Zhang Y, Shao J, Wang Z, Yang T, Liu S, Liu Y, et al. Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPARgamma. *Gene*. 2015 Feb 25;557(2):209–14.
14. Liu W, Zhou L, Zhou C, Zhang S, Jing J, Xie L, et al. GDF11 decreases bone mass by stimulating osteoclastogenesis and inhibiting osteoblast differentiation. *Nat Commun*. 2016;7.
15. Sinha M, Jang YC, Oh J, Khong D, Wu EY, Manohar R, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle#. *Science*. 2014;344(6184):649–52.
16. Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, et al. GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration HHS Public Access. *Cell Metab*. 2015;22(1):164–74.
17. 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 Sep 29;112(39):12157–62.
18. Qiao XY, Nie Y, Ma YX, Chen Y, Cheng R, Yinrg WY, et al. Irisin promotes osteoblast proliferation and differentiation via activating the MAP kinase signaling pathways. *Sci Rep*. 2016;6.
19. 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*. 2014 Dec 11;38(12):1538–44.
20. 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 Dec 1;8(1):1–17.
21. Li W, Wang W, Liu L, Qu R, Chen X, Qiu C, et al. GDF11 antagonizes TNF- α -induced inflammation and protects against the development of inflammatory arthritis in mice. *FASEB J.* 2019 Mar 8;33(3):3317–29.
 22. Lavrova DP, Zavodovsky B V., Akhverdyan YR, Polyakova Y V., Sivordova LE, Zborovskaya IA, et al. Irisin as a new marker of early diagnostics of low-traumatic fractures in rheumatoid arthritis. *Klin Lab Diagnostika.* 2018;63(11):702–6.
 23. 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 Mar 1;67:71–6.
 24. Neogi T, Aletaha D, Silman AJ, Naden RL, Felson DT, Aggarwal R, et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2582–91.
 25. Aletaha D, Nell VPK, Stamm T, Uffmann M, Pflugbeil S, Machold K, et al. Acute phase reactants add little to composite disease activity indices for rheumatoid arthritis: validation of a clinical activity score. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(4):R796.
 26. Maria M, Medeiros C, Maria B, Barreto De Oliveira G, Medeiros De Cerqueira JV, Telles De Souza Quixadá B E R, et al. Correlação dos índices de atividade da artrite reumatoide (Disease Activity Score 28 medidos com VHS, PCR, Simplified Disease Activity Index e Clinical Disease Activity Index) e concordância dos estados de atividade da doença com vários pontos de corte nu. 2015.
 27. Wang W, Qu R, Wang X, Zhang M, Zhang Y, Chen C, et al. GDF11 Antagonizes Psoriasis-like Skin Inflammation via Suppression of NF- κ B Signaling Pathway. *Inflammation.* 2019 Feb 15;42(1):319–30.
 28. Wang L, Wang Y, Wang Z, Qi Y, Zong B, Liu M, et al. Growth differentiation factor 11 ameliorates experimental colitis by inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2018 Dec 1;315(6):G909–20.

29. 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 HHS Public Access. *Circ Res*. 2016;118(1):29–37.
30. Lu Q, Tu ML, Li CJ, Zhang L, Jiang TJ, Liu T, et al. GDF11 Inhibits Bone Formation by Activating Smad2/3 in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Calcif Tissue Int*. 2016 Nov 1;99(5):500–9.
31. Murillo-Saich JD, Vazquez-Villegas ML, Ramirez-Villafaña M, Saldaña-Cruz AM, Aceves-Aceves JA, Gonzalez-Lopez L, et al. Association of myostatin, a cytokine released by muscle, with inflammation in rheumatoid arthritis. *Medicine (Baltimore)*. 2021 Jan 22;100(3):e24186.
32. 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. 2016.
33. Su C, Hu S, Sun Y, Zhao J, Dai C, Wang L, et al. Myostatin induces tumor necrosis factor- α expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the PI3K–Akt signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2019 Jun 30 [;234(6):9793–801.
34. Hu SL, Chang AC, Huang CC, Tsai CH, Lin CC, Tang CH. Myostatin promotes interleukin-1 β expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through inhibition of miR-21-5p. *Front Immunol*. 2017 Dec 8;8(DEC).
35. 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.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os níveis séricos de GDF11 mais elevados que foram encontrados nos pacientes com AR comparado ao grupo OA, podem estar demonstrando uma participação desta miocina na patogênese da AR, no entanto este achado precisa ser mais investigado. No grupo AR, os níveis de GDF11 e miostatina foram mais baixos no líquido sinovial comparado aos níveis séricos e isso se repetiu no grupo OA, onde os níveis de miostatina e irisina também foram mais baixos no líquido sinovial comparado aos níveis séricos. Estes níveis menores encontrados no líquido sinovial podem estar relacionados ao fato de a maioria dos pacientes com AR terem apresentado atividade da doença moderada.

Adicionalmente, a atividade da doença moderada apresentada pelos pacientes, possivelmente pode ter impactado na possibilidade deste estudo de encontrar associações entre este parâmetro e os níveis articulares e séricos de miocinas. Ainda, o escore utilizado para avaliar a atividade da doença pode não ter sido o mais adequado, uma vez que o índice CDAI não leva em consideração parâmetros inflamatórios. Por fim, a avaliação de um número maior de pacientes pode trazer mais dados em relação a participação das miocinas na AR.

9. PERSPECTIVAS

Este estudo se encontra em andamento e tem como perspectivas a coleta de um número maior de amostras e a avaliação do escore radiológico nos pacientes com AR, a fim de mensurar o dano articular e poder compará-los com os níveis articulares e circulantes de miocinas. Ainda, pretende-se realizar estudos *in vitro* com a finalidade de avaliar a ação das miocinas diretamente nos FLS.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO 1- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Avaliação dos níveis de miostatina, GDF-11 e irisina no soro e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar, no líquido sinovial e no sangue, os níveis de proteínas 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) 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:

- Avaliação da atividade da doença, onde o reumatologista irá analisar quantas juntas dolorosas e inchadas você apresenta;
- Coleta do líquido sinovial será realizada quando houver derrame articular, com indicação clínica de punção. O líquido sinovial será armazenado para as análises das proteínas e para cultura de células. Este material seria descartado após o procedimento;
- Coleta de 10 ml de sangue (equivalente a um tubo) para as análises das proteínas. Esta coleta será realizada no Centro de Pronto Diagnóstico Ambulatorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para onde você será levado, de cadeira de rodas. O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa e você poderá ser chamado para autorizar o uso do material, de acordo com as resoluções de pesquisa vigentes.

Autorizo que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Não autorizo que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Além disso, faremos consulta ao prontuário do participante para coletar dados clínicos e características da doença. Por isso, solicitamos a sua autorização para realizar este acesso.

Durante a coleta da amostra de sangue, você poderá ter um pequeno desconforto da

picada, e, posteriormente manchas roxas e dor no local da coleta. Há também 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.

Você não terá benefícios diretos ao participar da pesquisa. A análise das suas amostras de líquido sinovial e de sangue contribuirá para o melhor entendimento da artrite reumatoide no presente estudo, possibilitando o 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 a pesquisadora Renata Pedó, pelo telefone (51) 3359-8837 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sala 2227, de segunda a sexta, das 8h às 17h.

Este 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: _____

10.2 ANEXO 2- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Titulo do Projeto: Avaliação dos níveis de miostatina, GDF-11 e irisina no soro e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatoide

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar, no líquido sinovial e no sangue, os níveis de proteínas 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) a participar deste estudo porque possui o diagnóstico de osteoartrite 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:

- Coleta do líquido sinovial será realizada quando houver derrame articular, com indicação clínica de punção. O líquido sinovial será armazenado para as análises das proteínas e para cultura de células. Este material seria descartado após o procedimento;
- Coleta de 10 ml de sangue (equivalente a um tubo) para as análises das proteínas. Esta coleta será realizada no Centro de Pronto Diagnóstico Ambulatorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para onde você será levado, de cadeira de rodas. O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa e você poderá ser chamado para autorizar o uso do material, de acordo com as resoluções de pesquisa vigentes.

Autorizo que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Não autorizo que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Além disso, faremos consulta ao prontuário do participante para coletar dados clínicos e características da doença. Por isso, solicitamos a sua autorização para realizar este acesso.

Durante a coleta da amostra de sangue, você poderá ter um pequeno desconforto da picada, e, posteriormente manchas roxas e dor no local da coleta. Há também 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.

Você não terá benefícios diretos ao participar da pesquisa. A análise das suas amostras de líquido sinovial e de sangue contribuirá para o melhor entendimento da artrite reumatoide no presente estudo, possibilitando o 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 a pesquisadora Renata Pedó, pelo telefone (51) 3359-8837 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sala 2227, de segunda a 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: _____

11. STROBE Statement- Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

	Item No	Recommendation	Page No
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	43
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	44-45
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	45-46
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	46
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	46-47
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	46-47
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	46-47
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	46-47
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	47
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	-
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	-
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	47
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	47
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	47-48
		(c) Explain how missing data were addressed	Without missing
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	-
		(e) Describe any sensitivity analyses	-
Results			
Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	48
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	-
		(c) Consider use of a flow diagram	-
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	48-49
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	Without missing
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	49-51
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted	48

		estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	-
		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	-
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	-
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	51
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	54
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	51-54
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	54
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	43

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.