

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DOS FATORES DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO (GDF) 8, 11 E 15 NA  
PERDA MUSCULAR EM MODELO DE ARTRITE EXPERIMENTAL**

Bárbara Jonson Bartikoski

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PAPEL DOS FATORES DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO (GDF) 8, 11 E 15  
NA PERDA MUSCULAR EM MODELO DE ARTRITE EXPERIMENTAL**

Bárbara Jonson Bartikoski

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

CIP - Catalogação na Publicação

Bartikoski, Bárbara  
PAPEL DOS FATORES DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO  
(GDF) 8, 11 E 15 NA PERDA MUSCULAR EM MODELO DE  
ARTRITE EXPERIMENTAL / Bárbara Bartikoski. -- 2022.  
97 f.  
Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2022.

1. Perda muscular . 2. artrite reumatoide. 3.  
GDF-8. 4. GDF-11. 5. GDF-15. I. Machado Xavier,  
Ricardo, orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço de todo o coração a minha família que sempre me motivou a ir em busca dos meus sonhos e a ser a pessoa que sou hoje. Essa conquista dedico a vocês! Gostaria de agradecer ao meu namorado, amigo e confidente Thales por ser a pessoa incrível que me acompanhou em todos os passos até aqui e com quem pude dividir minhas dúvidas e indecisões; te amo muito!

Agradeço a meus amigos pelo apoio dividido, pelo ombro estendido tantas vezes e pela enorme felicidade que a presença de vocês causa no meu dia a dia. Agradeço aos meus amigos e colegas do LABDAI, pela oportunidade de crescermos juntos tanto como pessoas como quanto pesquisadores e pelo esforço conjunto feito para esse trabalho ter sido realizado. Obrigado. Agradeço a minha colega de laboratório Mirian Farinon que me forneceu o apoio técnico para desempenhar as técnicas empregas nesse trabalho, com paciência e comprometimento: Agradeço de coração os ensinamentos até aqui.

Agradeço à minha coorientadora Jordana, que abraçou a ideia desse projeto desde o primeiro dia do trabalho de conclusão do curso e que me ensinou quase tudo que sei hoje sobre pesquisa. Mais do que isso, me conduziu de maneira brilhante na execução desse trabalho: meu eterno obrigado. Agradeço ao meu orientador Prof. Xavier, por me dar a oportunidade fazer parte de um grupo de pesquisa unido que motiva o crescimento como um só, além de fornecer engajamento e compromisso diário com o trabalho aqui apresentado: Obrigado.

## RESUMO

**Introdução:** A artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória autoimune, a qual acomete primordialmente as articulações sinoviais periféricas. Além disso, os pacientes com AR também apresentam manifestações extra-articulares, como a perda de massa muscular. Os componentes da superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) apresentam função importante na modulação da massa muscular como os fatores de crescimento e diferenciação (GDFs). Os fatores de crescimento e diferenciação 8 e 11 (GDF-8, GDF-11) já foram reportados como reguladores negativos da massa muscular por diversos mecanismos, como por exemplo, a indução de GDF-15, levando à alteração do apetite e da homeostase energética.

**Objetivo:** Avaliar os níveis séricos e musculares da expressão gênica e proteica de GDF-8, GDF-11 e GDF-15 durante o desenvolvimento da artrite induzida por colágeno (CIA) e sua associação com o declínio físico.

**Métodos:** Camundongos DBA1/J, machos, com 8-12 semanas de idade, foram randomizados em 5 grupos experimentais: animais saudáveis (BL n=6); animais controle avaliados nos dias 25 e 50 (CO 25 = 8, CO 50 = 8); animais com artrite induzida por colágeno avaliados nos dias 25 e 50 (CIA 25 = 8; CIA 50 = 8). Durante todo o período experimental do modelo de CIA foram avaliados 3 vezes por semana: escore clínico, edema das patas e peso corporal. Força de preensão, nocicepção, tempo de fadiga e velocidade de marcha foram avaliados nos 5 grupos experimentais nos dias 0, 18, 25, 50 de experimentação. O músculo TA foi usado para medir a área da seção transversal da miofibrila (CSA) e o músculo GA foi utilizado para avaliar a expressão gênica de GDF-8, GDF-11 e GDF-15 via reação de polimerase reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR). A expressão da proteica de GDF-8, GDF-11 no soro e no músculo GA foi realizada por meio de Enzima-Ligado de imunoabsorção (ELISA). Os testes estatísticos utilizados foram: ANOVA de duas vias seguido por teste de Bonferroni, ANOVA de uma via seguido por teste de Bonferroni, teste de equação de estimativa generalizada (GEE) seguido de Bonferroni, teste U de Mann Whitney, teste de Kruskal Wallis seguido por teste de Dunn, teste de modelo linear misto (LMM). Os resultados foram considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

**Resultados:** O desenvolvimento da AR nos grupos CIA inicial e CIA estabelecido foi confirmado por valores significativamente altos de escore clínico, nocicepção, edema da pata e escore histológico

quando comparado com os respectivos controles ( $p < 0,0001$ ;  $p = 0,001$ ;  $p = 0,001$ , respectivamente). Houve diminuição de força de preensão no grupo CIA 25 e CIA 50, em comparação com os controles CO 25 e CO 50 ( $p = 0,0021$ ,  $p = 0,007$ , respectivamente). O tempo de fadiga foi menor em CIA 25 e CIA 50 comparado aos controles ( $p = 0,002$ ,  $p = 0,006$ , respectivamente). A velocidade de marcha apresentou diminuição em CIA 25 comparado ao CO 25 ( $p = 0,001$ ) e em CIA 50 comparado ao CO 50 ( $p = 0,000$ ). O peso dos músculos GA e TA apresentaram diminuição apenas no modelo CIA 50 (-34,77% e -42,74% respectivamente); após normalização pelo peso corporal, apenas o músculo GA apresentou redução significativa no grupo CIA estabelecido quando comparado ao CO 50 (-34,5 %). A área da miofibrila do músculo TA apresentou redução de 14,04% no grupo CIA 50 em comparação com o CO 50 ( $p = 0,026$ ). Não houve alterações em relação ao peso corporal. O nível de mRNA de GDF-15 não diferiu entre os grupos. A análise de GDF-11 revelou aumento dos níveis de mRNA no músculo GA do grupo CIA 25 em comparação com o CO 25 e com grupo BL ( $p = 0,004$ ;  $p = 0,0087$ , respectivamente); em CIA 50, houve uma tendência de aumento dos níveis de mRNA de GDF-11 em relação ao CO 50 ( $p = 0,07$ ). No músculo GA, a expressão proteica de GDF-11 apresentou diferenças entre o grupo CIA 25 e CO 25 ( $p = 0,002$ ) e nos grupos CIA 50 e CO 50 ( $p = 0,017$ ), porém, a expressão proteica de GDF-11 no soro dos animais não apresentou diferenças entre os grupos analisados. A expressão gênica de GDF-8 apresentou diminuição no músculo GA do grupo CIA 50 em comparação ao CO 50 e apresentou diferenças entre dos grupos CIA 25 e CIA 50 ( $p = 0,010$ ;  $p = 0,0369$ , respectivamente); O músculo GA teve uma expressão proteica diminuída de GDF-8 entre os grupos CIA 25 e CIA 50 ( $p = 0,001$ ) e, no soro os níveis proteicos de GDF-8 apresentaram diminuição em CIA 50 em comparação com o CO 50 ( $p = 0,037$ ). A baixa força muscular foi associada a maiores níveis de proteína GDF-11 no músculo GA ( $r = -0,64$ ;  $p = 0,01$ ) e diminuição da velocidade de marcha ( $r = -0,534$ ;  $p = 0,04$ ). Níveis séricos mais elevados de GDF-8 foram associados a maior força muscular ( $r = 0,74$ ;  $p = 0,02$ ) e aumento da velocidade de caminhada ( $r = 0,64$ ;  $p = 0,01$ ).

**Conclusões:** No presente estudo, foi observado o declínio da função física em estágios iniciais da artrite experimental antes de se identificar atrofia muscular, e o aumento de GDF-11 no músculo está associado à piora da função, enquanto que há diminuição de GDF-8 no soro de animais CIA 50 e aumento dos

níveis proteicos de GDF-8 no músculo de animais CIA ao longo do tempo, o que pode significar um papel mais sistêmico do GDF-8 no modelo da CIA. Tomando nossos resultados em conjunto, sugere-se que a família TGF- $\beta$ , especialmente GDF-8 e 11, podem estar envolvidos na perda de massa, força e função do músculo esquelético em modelo experimental de AR.

Palavras-chave: Perda muscular, artrite reumatoide, GDF-8, GDF-11, GDF-15.

## ABSTRACT

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease, which primarily affects peripheral synovial joints. In addition, patients with RA also have extra-articular manifestations, such as loss of muscle mass. The components of the transforming growth factor beta superfamily (TGF- $\beta$ ) play an important role in muscle mass regulation as growth and differentiation factors (GDFs). Growth and differentiation factors (GDF) 8 and 11 have already been reported as negative regulators of muscle mass by several mechanisms, such as the induction of GDF-15, leading to changes in appetite and energy homeostasis.

**Objective:** To evaluate serum and muscle levels of gene and protein expression of GDF-8, GDF-11 and GDF-15 during the development of collagen-induced arthritis (CIA) and its association with physical decline.

**Methods:** Male DBA1/J mice, 8-12 weeks old, were randomized into 5 experimental groups: healthy baseline animals (BL=6); control animals evaluated at days 25 and 50 (CO25=8, CO50=8) and collagen-induced arthritis mice evaluated at day 25 and 50 (CIA 25=8; CIA 50=8). During the entire experimental period of the CIA model, the following tests were performed 3 times a week: clinical score, paw edema and body weight. Grip strength, nociception, fatigue time and walking speed were taken in the 5 experimental groups on days 0, 18, 25, 50 of experimentation. The TA muscle was used to measure the cross-sectional area of the myofiber (CSA) and GA muscle was used to assess the gene expression of GDF-8, GDF-11 and GDF-15 via real-time quantitative reverse polymerase reaction (qRT-PCR). Protein expression of GDF-8, GDF-11 in serum and GA muscle was performed via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The statistical tests used were two-way ANOVA followed by Bonferroni test, one-way ANOVA followed by Bonferroni test, generalized estimating equation (GEE) test followed by Bonferroni, Mann Whitney U test, Kruskal Wallis test followed by Dunn's test and mixed linear model test (LMM). Significance was reached when  $p < 0.05$ .

**Results:** The development of RA in the CIA 25 and CIA 50 groups was confirmed by increased values of clinical score, nociception, paw edema and histological score when compared to controls ( $p < 0.0001$ ;



$p = 0.001$ ;  $p = 0.001$ , respectively). Decreased grip strength was observed in the CIA 25 and CIA 50 groups when compared to CO 25 and CO 50 ( $p = 0.0021$ ,  $p = 0.007$ , respectively). Fatigue time was shorter at CIA 25 and CIA 50 compared to the controls ( $p = 0.002$ ,  $p = 0.006$ , respectively). Walking speed was reduced at CIA 25 compared to CO 25 ( $p = 0.001$ ) and at CIA 50 compared to CO 50 ( $p = 0.000$ ). The weight of the GA and TA muscles decreased only in the CIA 50 model (-34.77% and -42.74% respectively); after normalization by body weight, only the GA muscle maintained the reduction in the CIA 50 group when compared to the CO 50 (-34.5%). The TA CSA presented a reduction of 14.04% in the CIA 50 group compared to the CO 50 group ( $p = 0.026$ ). There were no changes regarding body weight or mRNA levels of GDF-15 between groups. Analysis of GDF-11 revealed increased mRNA levels in the muscle of the CIA 25 group compared to the CO 25 and BL group ( $p = 0.004$ ;  $p = 0.0087$ , respectively); at CIA 50, there was a trend towards increased levels of GDF-11 mRNA in relation to CO 50 ( $p = 0.07$ ). Protein expression of GDF-11 in animal serum did not differ between groups; however, in GA muscle, protein expression of GDF-11 presented differences between the CIA 25 and CIA 50 compared with the respective controls ( $p = 0.002$ ;  $p = 0.017$ , respectively). The gene expression of GDF-8 showed a decrease in the muscle of the CIA 50 group compared to the CO 50 and differences between the CIA 25 and CIA 50 groups ( $p = 0.010$ ;  $p = 0.0369$ , respectively); The GA muscle had a decreased expression of the GDF-8 protein between the CIA 25 and CIA 50 groups ( $p = 0.001$ ), while serum levels of GDF-8 were decreased in CIA 50 compared with CO 50 ( $p = 0.037$ ). Low muscle strength was associated with higher levels of GDF-11 protein in the GA muscle ( $r = -0.64$ ;  $p = 0.01$ ) and decreased walking speed ( $r = -0.534$ ;  $p = 0.04$ ). Higher serum GDF-8 levels were associated with greater muscle strength.

**Conclusion:** In the present study, a decline in physical function in early stages of experimental arthritis was observed before muscle wasting was identified, and an increase in muscle GDF-11 is associated with worsening of function, while there is a decrease in serum GDF-8 of CIA animals and increased protein levels of GDF-8 in muscle of CIA animals over time, which may imply a more systemic role of GDF-8 in the CIA model. Taking our results together, it is suggested that the TGF- $\beta$

family, especially GDF-8 and 11, may be involved in the loss of skeletal muscle mass, strength and function in an experimental model of RA.

Keywords: Muscle wasting, rheumatoid arthritis, GDF-8, GDF-11, GDF-15.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Critérios de classificação para AR segundo ACR 2010 (Aletaha et al., 2010)

## **LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1.** Estratégias de busca.

**Figura 2.** Alterações articulares na artrite reumatoide.

**Figura 3.** Fluxograma de tratamento medicamentoso para a AR da Sociedade Brasileira de Reumatologia no Brasil.

**Figura 4.** Sinalização GDF-8 e GDF-8.

**Figura 5.** Esquema do papel dos fatores de crescimento e diferenciação na AR.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Artrite reumatoide
(HLA)-DRB1	Antígeno leucocitário humano DRB1
ACPA	Anticorpo contra proteínas citrulinadas
RF	Fator-reumatoide
Th1	T helper 1
Th17	T helper 17
MMP	Metaloproteinases
RANKL	Receptor ativador do fator nuclear kB
FLS	Fibroblastos sinoviais
IL-1	Interleucina 1
IL-17	Interleucina 17
PCR	Proteína C reativa
GDF	Fator de crescimento e diferenciação
IL-6	Interleucina 6
TNF-ALPHA	Fator de necrose tumoral alfa
MLS	Macrófagossinoviais
ACR	American College of Rheumatology;
EULAR	Liga Europeia Contra Reumatismo
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
DMCDs	Drogas modificadoras do curso da doença

MTX	Metotrexato
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
GDF-15	Fator de crescimento e diferenciação 15
GDF-11	Fator de crescimento e diferenciação 11
GDF-8	Fator de crescimento e diferenciação 8
TGF- $\beta$	Fator de crescimento e diferenciação beta
MyHC	Miosina de cadeia pesada
ActRIIB/IIA	Receptores activina tipo IIB e tipo IIA
CIA	Artrite induzida por colágeno
MHC	Major histocompatibility complex
CD28	Cluster de diferenciação 28
CD40	Cluster de diferenciação 40
PTPN22	A proteína tirosina fosfatase, não receptora do tipo 22
APC	Células apresentadoras de antígenos
Treg	T reguladoras
ACPAs	Anti-proteínas citrulinadas
DAS-28	Disease activity score-28
VSG	Velocidade de sedimentação globular
SDAI	Simple Disease Activity Index
CDAI	Clinical Disease Activity Index
IFD	Articulações interfalangeanas distais

MTF	Metatarsofalangeana
CMTC	Carpometacarpiana
UI	Unidade Internacional
LSN	Limite superior normal
ADA	Adalimumabe
CERT	Certolizumabe
ETN	Etanercepte
GOL	Golimumabe
IFX	Infliximabe
JAK	Janus kinase
GC	Glicocorticoide
CS	Células satélite
NAG-1	Gene 1 ativado por AINE
MIC-1	Citocina inibitória de macrófago 1

## SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	18
2.0	REVISÃO DA LITERATURA .....	19
2.1	Estratégias para localizar e selecionar informações .....	19
2.2	Artrite reumatoide .....	20
2.3	Prevalência da AR e etiologia .....	21
2.4	Fisiopatologia da artrite reumatoide.....	23
2.5	Diagnóstico e monitoramento da artrite reumatoide.....	24
2.6	Tratamento .....	27
2.7	Envolvimento muscular na artrite reumatoide .....	29
2.8	Fatores de crescimento e diferenciação.....	31
2.9	Fator de crescimento e diferenciação 8 (Growth differentiation factor 8- GDF-8) .....	33
2.10	Fator de crescimento e diferenciação 11 (Growth differentiation factor 11 - GDF-11) ...	35
2.11	Fator de crescimento e diferenciação 15 (Growth differentiation factor 15 - GDF-15) ...	36
3	MARCO CONCEITUAL.....	38
4	JUSTIFICATIVA .....	39
5	OBJETIVOS.....	40
5.1	Objetivo geral.....	40
5.2	Objetivos específicos .....	40
6	REFERENCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	41
7	ARTIGO CIENTÍFICO .....	61
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	92
9	PERSPECTIVAS .....	94



<b>10.</b>	<b>ANEXO 1 – ARRIVE guidelines .....</b>	<b>95</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXO 2 – CARTA DE APROVAÇÃO CEUA .....</b>	<b>95</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, crônica, inflamatória, sistêmica e progressiva. O acometimento simétrico das pequenas articulações, a produção de autoanticorpos e a destruição cartilaginosa e óssea são características principais da doença que resultam em incapacidade funcional aos pacientes (1). Além do acometimento articular, estudos demonstram que a AR é uma doença com características extra articulares importantes como nódulos reumatoides, vasculite e diminuição de massa muscular (2,3). A perda de massa magra em pacientes com AR ocorre mesmo com o tratamento intensivo para o controle da doença, uma vez que estes possuem aproximadamente 10% menos massa magra quando comparados a indivíduos saudáveis (4,5). Além disso, pacientes com AR do sexo feminino apresentam espessura muscular diminuída em 23,3% além de menor ângulo de penação (ângulo da fibra muscular em relação a linha de ação do músculo) atingindo 14,1% menos do que mulheres saudáveis (6). Como consequência, a baixa massa magra está relacionada à redução da atividade física, com o aumento da fadiga e com a perda de força, o que pode levar a um quadro de perda da capacidade funcional e da qualidade de vida dos pacientes (7).

Uma série de fatores estão associados com a perda muscular na AR, como exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, uso de glicocorticoides e sedentarismo (8). Ademais, estudos tem demonstrado o papel das miocinas, citocinas e fatores de crescimento derivados do músculo esquelético, e seu envolvimento da perda muscular (9–11). A superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) compreende um grande número de proteínas secretadas, entre elas os fatores de crescimento e diferenciação 8, 11 e 15 (GDF-8, GDF-11 e GDF-15), as quais realizam a transdução de sinal pelos receptores activina tipo IIB e tipo IIA (ActRIIB/IIA) e, sequencialmente, ativam fatores de transcrição Smad 2 e 3 - proteínas reguladoras negativas do crescimento muscular podendo induzir um quadro de atrofia intensa (12–14). O GDF-8 (comumente chamado miostatina) é um regulador negativo do crescimento muscular esquelético, principalmente por meio da diminuição da miogênese (15). Na AR o papel do GDF-8 é controverso, uma vez que, em modelos animais, já foi reportado ausência de alteração na expressão proteica de GDF-

8 no músculo, enquanto outro estudo demonstrou diminuição na expressão proteica de GDF-8 tanto no músculo quanto no soro de animais artríticos (16,17). O GDF-11 também atua potencialmente na regulação negativo crescimento muscular pelo seu estreito parentesco com o GDF-8 (18). Alguns estudos avaliaram a sua expressão e influência sobre a musculatura esquelética durante o processo de envelhecimento, no qual os níveis sanguíneos de GDF-11 diminuem, e que a administração de GDF-11 é capaz de promover a reversão do declínio muscular esquelético relacionado à idade, bem como a reversão da hipertrofia cardíaca (19–21). Na artrite inflamatória experimental, o tratamento com GDF-11 foi capaz de inibir a reação inflamatória *in vitro* além de retardar o desenvolvimento do modelo de CIA (17). Além dos efeitos sobre o músculo, há evidências de que o GDF-11 também é capaz de induzir a perda de apetite através de um mecanismo indireto, no qual as altas concentrações musculares de GDF-11 provocam uma elevação plasmática de GDF-15 (22, 23, 24). Por sua vez, o GDF-15, é capaz de ativar, diretamente, neurônios hipotalâmicos e, dessa maneira, levar à perda de apetite e, eventualmente, à anorexia (25). Em condições fisiológicas, o GDF-15 é produzido em níveis baixos, mas fatores como lesão ou malignidade podem induzir aumento na sua expressão (23). No entanto, o conhecimento das miocinas na AR é escasso e as vias de sinalização envolvidas no processo não são totalmente elucidados na doença.

Assim, este estudo teve como objetivos: (I) abordar o papel dos fatores de crescimento e diferenciação 8, 11 e 15 na perda muscular decorrente da AR em modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) e (II) se os fatores de crescimento e diferenciação participam do declínio da função física dos animais já em momento inicial da doença. Portanto, a presente dissertação segue a disposição de: uma revisão da literatura (para apresentação do referencial teórico que deu base ao trabalho) e um artigo original no qual responde às perguntas de pesquisa

## **2.0 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações**

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados aos mediadores secretados a partir do tecido muscular, desta forma esse trabalho visa selecionar e sintetizar as informações encontradas nas bases de dados Pubmed; Scielo; LILACS, sobre os temas: artrite reumatoide, fatores de crescimento e diferenciação e perda muscular. Para tal fim, as buscas foram feitas combinando os termos (MeSH):

“rheumatoid arthritis”, “growth differentiation factors”, “muscle wasting”, “GDF-11”, “GDF-8”, “animal model”, “sarcopenia”, “muscle loss”, “myostatin”.

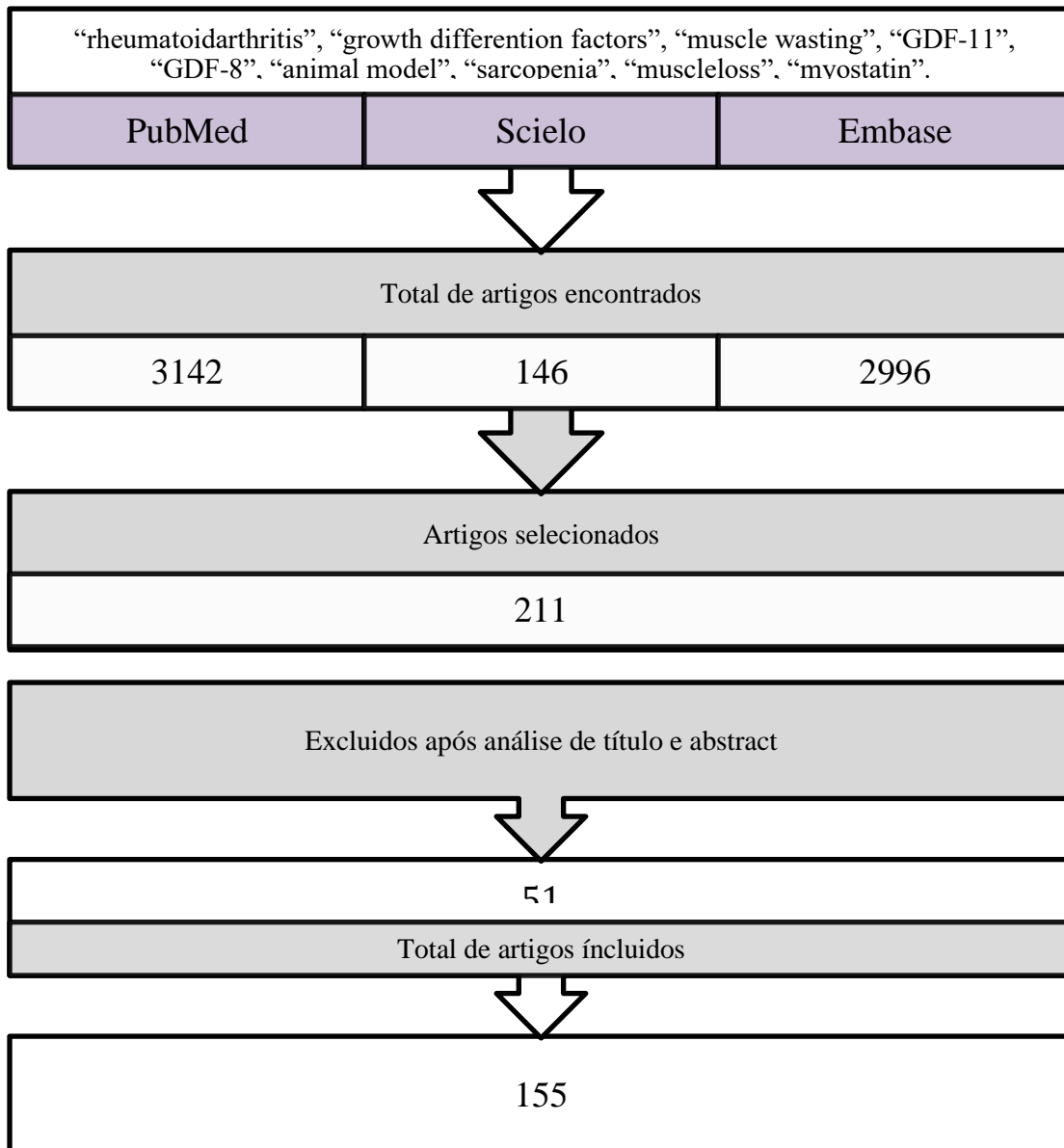


Figura 1. Estratégias de busca.

## 2.2 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, inflamatória crônica e progressiva com o acometimento simétrico das pequenas e grandes articulações e o maior envolvimento de mãos e pés (26). A AR possui características marcantes como a produção de autoanticorpos, sinovite crônica, destruição cartilaginosa e óssea, o que pode resultar em incapacidade funcional aos pacientes (1). Algumas das manifestações clínicas mais comuns relatadas pelos pacientes com AR são a presença

constante da dor, rigidez matinal, edema nas articulações, fraqueza e a incapacidade nas tarefas diárias (27). Devido as manifestações articulares, o perfil inflamatório sistêmico e as manifestações clínicas da doença, pacientes com AR sofrem sérias limitações funcionais, resultando em má qualidade de vida e grande impacto no cenário socioeconômico devido à perda de força de trabalho (27,28). Além do acometimento articular, o caráter sistêmico e inflamatório da AR pode resultar em manifestações extra articulares, como vasculite, nódulos reumatoides, problemas cardiovasculares e impacto muscular, os quais são responsáveis por comorbidades complexas (27,29). Entretanto, a etiologia da AR não está totalmente esclarecida, porém sabe-se que há grande influência genética e ambiental na promoção na doença (2,28).

### **2.3 Prevalência da AR e etiologia**

A prevalência da AR tem pequenas variações de acordo com o continente e com a média etária da população residente, uma vez que a incidência da doença aumenta com a idade, atingindo um pico entre os 40 e 50 anos da vida (30). Na Europa, a prevalência da AR é de 0,5-1,0%, enquanto nos Estados Unidos, um levantamento apontou para uma prevalência relativamente menor entre 0,53 e 0,55% (28,31). A prevalência no Brasil é de 0,46% com seu pico de incidência por volta dos 50 anos (28). A população feminina é afetada três vezes mais do que homens e pode estar relacionada a diferentes hormônios sexuais, aos seus efeitos no sistema imunológico e, possivelmente, à epigenética e à microbiota (30,31).

Apesar da etiologia da AR não ser completamente descrita, sabe-se que ela resulta de uma complexa interação entre mutações genéticas, fatores ambientais e quebra da tolerância imunológica. A hereditariedade da doença é atualmente estimada em 40-65% na AR soropositiva (presença de anticorpos contra autoantígenos selecionados) e em aproximadamente 20% na doença soronegativa (32). O componente genético da AR é, frequentemente, associado aos genes do complexo de histocompatibilidade principal (major histocompatibility complex – MHC), também designado antígeno leucocitário humano (human leukocyte antigen – HLA) (33,34). Além disso, existe forte associação entre os alelos do antígeno leucocitário humano (HLA)-DRB, particularmente HLA-DRB1, e a susceptibilidade dos indivíduos para o risco de desenvolvimento

de AR, uma vez que codifica as moléculas do MHC de classe II que podem acomodar uma ampla gama de ligantes peptídicos (2,34). Sabe-se que a maioria dos alelos HLA-DRB1 associados à AR compartilham sequências semelhantes de aminoácidos na posição 70-74 da cadeia  $\beta$ , denominada epítipo compartilhado. O epítipo compartilhado encontra-se no sulco de ligação ao peptídeo e influencia na apresentação de antígenos próprios; em adição, o epítipo compartilhado é altamente prevalente entre os pacientes que apresentam anticorpos contra peptídeos cíclicos citrulinados (ACPA) (35). Outros loci genéticos que provavelmente contribuem com efeitos funcionais menores, de maneira isolada ou acumulativa, estão nas vias co-estimulatórias (por exemplo, CD28, CD40), na sinalização de citocinas, no limiar de ativação de receptores linfocitários (por exemplo, A proteína tirosina fosfatase, não receptora do tipo 22-PTPN22) e na ativação da imunidade inata (36–38).

Os fatores ambientais associados à etiologia da AR incluem tabagismo, dieta, obesidade, microbiota, infecções como fatores desencadeadores da doença em indivíduos geneticamente suscetíveis (31). O tabagismo é o fator externo mais popular relacionado à AR, uma vez que, o receptor que medeia a atividade dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (componentes da fumaça do cigarro) é capaz de aumentar a diferenciação de células T auxiliares 17 (Th17), exacerbando a doença (39,40). Estudos apontam que a disbiose intestinal pode contribuir negativamente para a patogênese da AR demonstrando o papel chave da microbiota na doença. Nesse contexto sabe-se que a microbiota dos pacientes difere da população geral e que os medicamentos antirreumáticos podem exercer efeitos sobre sua regulação (41). Guerrero e colaboradores sugeriram uma associação entre desequilíbrio da microbiota intestinal e AR devida a diferentes mecanismos relacionados ao sistema imunológico do hospedeiro, incluindo: (i) ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs); (ii) capacidade do intestino de constituir uma fonte de peptídeos citrulinados; (iii) mimetismo antigênico; (iv) impacto na permeabilidade da mucosa intestinal; (v) e modulação do sistema imunológico do hospedeiro com desequilíbrio da homeostase entre as células Th17 e T reguladoras (Treg) (42). Outro fator importante, os agentes infecciosos, como *Porphyromonasgingivalis*, *Proteusmirabilis*, *Escherichia coli* e *Epstein-Barr*

vírus podem contribuir para o desenvolvimento da doença por meio de mimetismo molecular (43).

Por fim, o baixo nível socioeconômico e escolar pode ser possíveis gatilhos para o início da doença.

## **2.4 Fisiopatologia da artrite reumatoide**

A AR é causada principalmente por processos imunológicos que levam à inflamação da sinóvia.

A inflamação da sinóvia expande-se e invade as regiões marginais da articulação, causando erosão da cartilagem e do osso subcondral (2). A fisiopatologia é considerada heterogênea, por envolver alteração de sistemas celulares, moleculares e epigenéticos, e possui consequências comuns como a quebra da auto tolerância e o estabelecimento da autoimunidade. A presença de autoanticorpos (soropositividade) está associada a danos articulares mais graves e a alta mortalidades dos pacientes com AR (2,44–46). Uma importante classe de autoanticorpos são os anti-proteínas citrulinadas (ACPAs). Os ACPAs são recorrentes em 50-70% dos indivíduos com AR e, são direcionados a proteínas próprias modificadas, nos quais resíduos de arginina são substituídos por citrulina através do processo de citrulinação (36). O fator reumatoide, primeiro auto-anticorpo descrito na AR, é direcionado contra a porção Fc das imunoglobulinas e tem a capacidade de ativar o sistema complemento repetidamente (36,47,48). O FR está presente em 50-80% dos indivíduos com AR e, embora ainda importante, apresenta menor especificidade para AR em comparação com o ACPA.

A composição celular da inflamação articular na AR possui um repertório de células muito vasto, uma vez que inclui muitos tipos celulares envolvidos. Células de primeira fase de resposta como monócitos, células dendríticas, mastócitos e células linfoides possuem uma participação importante na infiltração celular nas articulações como também células de resposta específica como células Th1 e Th17, células B, plasmoblastos e plasmócitos. Estas células podem contribuir para o desenvolvimento de uma resposta autoimune robusta contra os componentes articulares (2). Também, o perfil de resposta de linfócitos T efetores sofre um desequilíbrio para o tipo Th1, o que culmina para uma resposta pró-inflamatória, caracterizada por aumento do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) (49). O ambiente inflamatório e constante modulação destas citocinas na articulação resultam em um fenótipo mais agressivo de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS), o quais se tornam mais resistentes à apoptose e com maior capacidade de secretar metaloproteinases de

matriz (MMPs), moléculas de adesão e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kB (RANKL), promovendo a degradação da cartilagem articular e dano ao osso subcondral (37,50). Além do dano aos tecidos alvo e periféricos a articulação, os sinoviócitos semelhantes a macrófagos (MLS) e FLS que são uma importante fonte de citocinas e proteases, aumentam sua proliferação, levando à hiperplasia da membrana sinovial (27). 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 mais danos à cartilagem e ao osso, destruindo progressivamente a articulação e expandindo o dano a outros tecidos (27). Como consequência, os pacientes relatam alto nível de incapacidade para realizar as tarefas rotineiras e, dessa forma, há uma diminuição da qualidade de vida dos pacientes com AR (2).

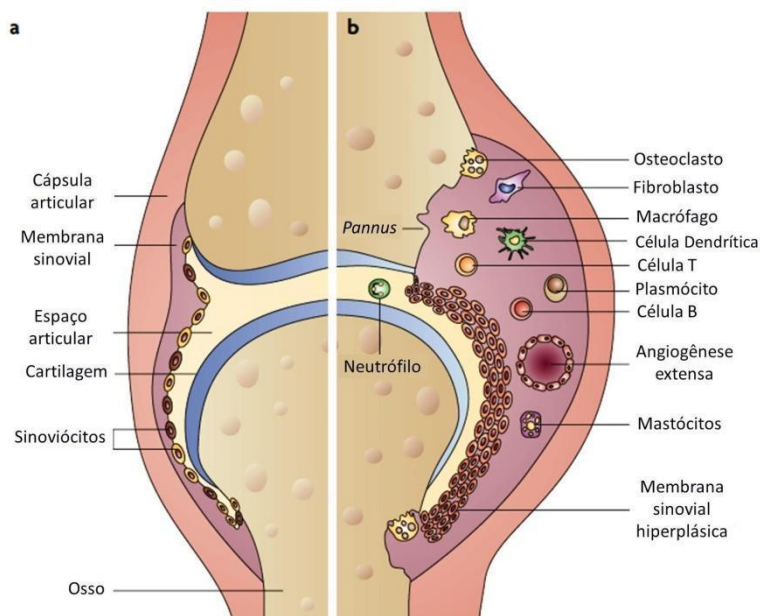


Figura 2: Alterações articulares na artrite reumatoide. a) Articulação saudável; b) Articulação doente (Adaptado de Smolenand Steiner, 2003).

## 2.5 Diagnóstico e monitoramento da artrite reumatoide

O diagnóstico da AR é usualmente baseado em critérios de classificação (tabela 1) estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (American College of Rheumatology – ACR) e a última



modificação foi realizada por Aletaha e colaboradores (Tabela 1) (51). Para o monitoramento da atividade da doença foi proposto em 1990 um índice de medida de atividade da AR chamado Escore de Atividade da Doença (41,52). Para a avaliação da atividade da doença é utilizado o escore de atividade de doença-28 (disease activity score-28 – DAS-28), o qual consiste na contagem de 28 articulações edemaciadas e dolorosas, além de um marcador inflamatório, que pode ser a velocidade de sedimentação globular (VSG) ou a proteína C-reativa (PCR) pela quantificação no sangue total e soro do paciente, respectivamente. O resultado do DAS-28 gera pontos de corte específicos usados para classificar a doença como em 1) remissão, 2) estado de atividade baixo, 3) moderado, 4) alto (52). Como o cálculo do DAS28 é complexo e requer um instrumento tecnológico para seu cálculo, foram propostos índices mais simples como o índice de atividade da doença simplificada (Simple Disease Activity Index – SDAI) e o índice clínico de atividade da doença (Clinical Disease Activity Index – CDAI) (53,54).

Tabela 1. Critérios de classificação para AR segundo ACR 2010 (Aletaha et al., 2010).

1. Envolvimento articular (0-5)

- 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)

- Fator reumatoide (FR) e Anticorpo contra antígenos citrulinados (ACPA) negativo (0)
- FR e ACPA fracamente positivos (2)
- FR e ACPA fortemente positivos (3)

3. Reagentes de fase aguda (0-1)

- Proteína C reativa e taxa de sedimentação eritrocitária normal (0)
- Proteína C reativa e/ou taxa de sedimentação eritrocitária anormal (1)

#### 4. Duração dos sintomas (0-1)

- < 6 semanas (0)
- 6 semanas ou mais (1)

---

Ponto de corte para artrite reumatoide: 6 ou mais

---

Tabela 1. Critérios de classificação para AR segundo ACR 2010 (Aletaha et al., 2010). O envolvimento articular se refere a qualquer articulação edemaciada ou dolorosa ao exame físico e pode ser confirmado por evidências de sinovite detectada por métodos de imagem. As articulações interfalangeanas distais (IFDs), primeira carpometacarpiana (CMTC) e primeira metatarsofalangeana (MTF) são excluídos da avaliação. As diferentes categorias de acometimento articular são definidas de acordo com a localização e o número de articulações envolvidas (padrão ou distribuição do acometimento articular). A pontuação ou colocação na categoria mais alta possível é baseada no padrão de envolvimento articular. São consideradas grandes articulações: ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos. São consideradas pequenas articulações: punhos, CMTC, IFP, interfalangeana do primeiro quirodáctilo e articulações MTF. Nesta categoria, pelo menos uma das articulações envolvidas deve ser uma pequena articulação; as outras articulações podem incluir qualquer combinação de grandes e pequenas articulações, bem como outras não especificamente mencionadas em outros lugares (por exemplo, temporomandibular, acromioclavicular e esternoclavicular). Resultado negativo refere-se a valores (Unidade Internacional-UI) menores ou iguais ao limite superior normal (LSN) para o método de imagem e laboratorial. Título positivo baixo corresponde aos valores (UI) maiores que o LSN, mas menores ou iguais a três vezes o LSN para o método de imagem e laboratorial. Título positivo alto: valores maiores que 3 vezes o LSN para o método de imagem e laboratorial. Quando o FR estiver disponível como positivo ou negativo, um resultado positivo deve ser marcado como “positivo em título baixo”. FR = fator reumatoide; AACP = anticorpos antiproteína/ peptídeo citrulinados; LSN = limite superior do normal; VHS = velocidade de hemossedimentação; PCR = proteína C-reativa.

## 2.6 Tratamento

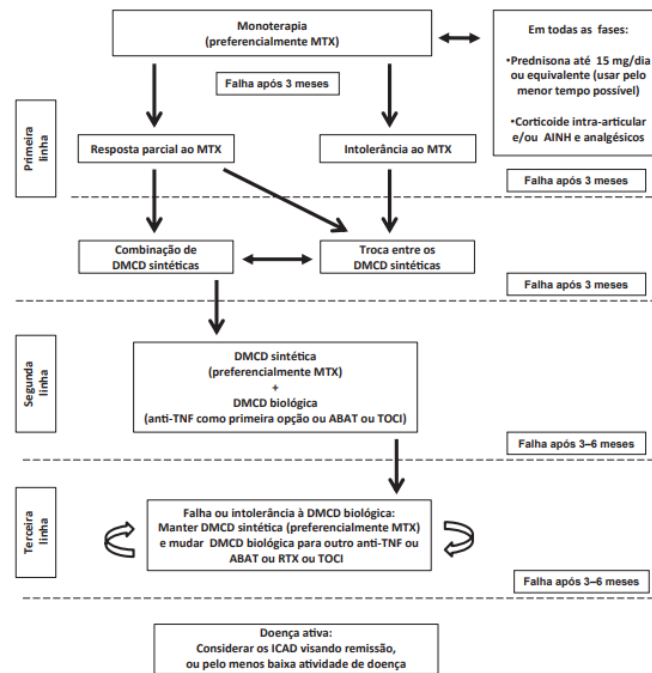
Há uma ampla gama de agentes terapêuticos para o tratamento da AR: anti-inflamatórios não hormonais (AINES), corticoides, medicamentos modificadores do curso da doença (DMCD) sintéticos convencionais, DMCD biológicos, DMCD sintéticos alvo-específicos e drogas imunossupressoras são as classes de medicamentos aprovados para o manejo da doença (55). Após o diagnóstico da doença, busca-se alcançar a remissão da AR ou atingir um grau baixo de sua atividade, que é avaliada por índices pré-estabelecidos que levam em consideração variáveis clínicas e laboratoriais relativas ao paciente (56).

As drogas DMCD correspondem ao metotrexato, hidroxicloroquina, leflunomida e sulfassalazina. O fármaco de primeira escolha para o tratamento da AR é um MMCD chamado metotrexato, o qual deve ser prescrito, preferencialmente, em monoterapia no início do tratamento (55). O metotrexato corresponde a um agente imunomodulador que atua na inibição da síntese de ácidos nucleicos, timidinato e proteínas.

Os efeitos anti-inflamatórios do metotrexato na AR são associados a capacidade do fármaco de modular o metabolismo da adenosina e ter uma ação nas vias de sinalização de citocinas pro inflamatórias como o TNF (57). Quando o paciente apresenta contraindicação para o metotrexato, a sulfassalazina e a leflunomida podem ser utilizadas como primeira escolha, visto que apresentam efeitos imunomodulatórios, como a inibição da produção de prostaglandinas, de funções neutrofílicas e linfocitárias e de quimiotaxia, e ação antiproliferativa sobre a síntese de pirimidina (55,58,59). Os antimaláricos também são empregados no tratamento da AR, como difosfato de cloroquina e sulfato de hidroxicloroquina, porém são indicados para pacientes que apresentem formas leves da doença e com baixo potencial erosivo (60). O mecanismo de ação dos antimaláricos na AR não é totalmente elucidado, mas se especula que a atividade anti-inflamatória destes fármacos ocorre por sua capacidade de interferir na função de enzimas lisossômicas, quimiotaxia, fagocitose de polimorfonucleares, produção de prostaglandinas (61). O uso de corticoides por via oral também é muito utilizado no manejo da AR e possuem um efeito similar as DMCD e melhoram a resposta clínica na fase inicial, enquanto os AINES são úteis para diminuir o processo inflamatório e a dor, principalmente no início da doença, e geralmente

são prescritos em associação aos DMCD (56). Os fármacos imunossupressores ciclofosfamida e azatioprina podem ser utilizadas em pacientes com manifestações extra articulares graves como vasculite e/ou envolvimento pulmonar (62–64). Os pacientes que não alcançam resposta após a utilização de dois esquemas de DMCD sintéticos convencionais devem ser avaliados para o uso de DMCD biológicos e sintéticos alvo-específicos. Recomenda-se preferencialmente o uso de um DMCD biológico ou alternar entre um DMCD sintético alvo-específico combinado, em ambos os casos, com um DMCD sintético convencional (51). Os DMCD biológicos são direcionados a alvos extracelulares, como citocinas solúveis individuais, receptores de citocinas ou outros receptores de superfície celular (65). Nesse contexto, os inibidores de TNF foram os primeiros a serem desenvolvidos, uma vez que a citocina pro inflamatória TNF exerce ação citotóxica sobre diferentes tipos de linfócitos, estimulando a apoptose (66). Atualmente, existem cinco diferentes agentes biológicos anti-TNF no mercado: o adalimumabe (ADA), um anticorpo monoclonal 100% humano; o certolizumabe (CERT), um fragmento Fab de um anticorpo anti-TNF humanizado, com alta afinidade ao TNF, conjugado com duas moléculas de polietilenoglicol (5%-10% de proteína animal); o etanercepte (ETN), proteína de fusão composta pelo receptor solúvel do TNF mais a região Fc da IgG; o golimumabe (GOL), outro anticorpo monoclonal humano; e o infliximabe (IFX), um anticorpo monoclonal quimérico (67). Na presença de contraindicações ou em situações clínicas individualizadas, a terapia biológica pode ser iniciada com outros DMCD biológicos, como moduladores da co-estimulação da célula T (abatacepte) e anticorpos contra o receptor da IL-6 (tocilizumabe)(68–70). Recentemente, foram aprovados os inibidores de Janus quinases (Janus kinase – JAK), como o tofacitinibe e o upadacitinibe, denominados DMCD alvo-específicos para terapia na AR (71). A ação dessa nova classe de drogas ocorre a nível intracelular, com a inibição da fosforilação e da ativação de JAK específicas, levando à diminuição da produção de citocinas e à modulação da resposta imune. Como escolha dentro da nova classe há o DMCD biológico depletor de células B denominado rituximabe, o qual é aprovado para o tratamento da AR após a falha com o inibidor de TNF e tem sido usado como tratamento de terceira linha nessa estratégia terapêutica (55). Há algumas diferenças entre os DMCD alvo-específicos quanto ao mecanismo de ação, pois eles irão bloquear proteínas JAK específicas, como o tofacitinibe é um inibidor preferencial da JAK1/JAK3,

o upacitinibe, que possui seletividade para JAK1 sobre JAK2 e o baricitinibe que bloqueia os subtipos JAK1 e JAK2 (72).



**Figura 3.** Fluxograma de tratamento medicamentoso para a AR da Sociedade Brasileira de Reumatologia no Brasil, proposto pela Comissão de AR da SBR. DMCD, drogas modificadoras do curso da doença; MTX, metotrexato; anti-TNF, medicações antifator de necrose tumoral; ABAT, abatacepte; RTX, rituximabe; TOCI, tocilizumabe; ICAD, índices compostos de atividade da doença.

Um outro aspecto importante no tratamento da AR, é o manejo das comorbidades associadas, como doenças cardíacas, renais e depressão, pois elas refletem tanto o processo da doença como o seu tratamento (30). Apesar dos avanços no tratamento da AR e das diversas classes de medicamentos disponíveis, os tratamentos farmacológicos, por vezes, não são capazes de atenuar danos extrarticulares como déficits musculoesqueléticos, os quais resultam em declínio da função física e da qualidade de vida dos pacientes.

## 2.7 Envolvimento muscular na artrite reumatoide

O acometimento articular decorrente da doença causa forte impacto nos tecidos extra articulares e pode ocasionar mudanças adversas na composição corporal - especificamente, redução do músculo esquelético (73). Alguns estudos relatam que a intensidade da sinovite e a alta atividade da doença culminam no aparecimento de danos nos tecidos periféricos à articulação (3). Mesmo após o paciente atingir um controle sobre a atividade da doença, a perda muscular ainda é recorrente e uma causa importante do aumento da morbidade e da mortalidade (4,74).

Pacientes com AR podem atingir 10% menos massa magra apendicular quando comparados com indivíduos saudáveis além de menor densidade muscular, um índice que mensura a quantidade de gordura intramuscular, em comparação com a amostra considerada saudável (4,5,75). Blum e colaboradores demonstraram que pacientes com AR do sexo feminino apresentam espessura muscular diminuída (23,3% menor) quando comparados com mulheres saudáveis. Também, apresentam menor ângulo de penação (14,1% menos), ângulo da fibra muscular em relação a linha de ação do músculo, do que mulheres saudáveis (6). Em músculos de grande porte, como o quadríceps, há consideráveis diferenças em relação ao comprimento do fascículo e isometria muscular (6). A perda de massa magra culmina para a piora da função física resultando em aumento de fadiga, fraqueza muscular e episódios de quedas para os pacientes com AR já na doença inicial (76). Além disso, demonstrou-se que indivíduos com AR apresentam déficits mais pronunciados na área e na densidade muscular quando há baixa massa gorda, e que o aumento da destruição articular está associado a maiores déficits musculares (77). Remediar a perda da função física e musculoesquelética nos pacientes em conjunto com a necessidade de manter a atividade baixa da doença têm sido um desafio para a equipe médica como também a necessidade de buscar o melhor entendimento sobre a associação entre a AR e a incapacidade física (78).

A atrofia generalizada de fibras musculares, pode ser uma das causas que geram a perda de função física nos pacientes, uma vez que pode culminar em perda muscular acentuada afetando de 10% até 67% dos pacientes (7,79–82). Também, alguns fatores como o caráter inflamatório da doença são fortemente associados com a perda muscular na AR e o quadro de piora da função física, como a

exposição prolongada a citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, o impacto hormonal, sedentarismo, ingestão inadequada de proteínas e o tratamento com glicocorticoides – todos resultando em redução de síntese e aumento de degradação de proteínas musculares (66,83,84). Em estudos envolvendo pacientes com AR, os níveis de citocinas pró-inflamatórias foram duas vezes maiores no tecido muscular quando comparado aos níveis sistêmicos encontrados, dessa forma sugeriu-se que o músculo é um potencial produtor local de citocinas e estas têm uma influência negativa no crescimento de fibras musculares (74). A intensidade da inflamação e severidade da doença já foram descritas como fatores que promovem a perda muscular na AR (85). A AR em alta atividade resulta em aumento dos mediadores inflamatórios e dessa forma, no aumento da inflamação sistêmica, o que se torna um importante contribuinte para a disfunção do músculo esquelético além de estudos já apontarem que citocinas pró-inflamatórias como o TNF e a IL-1 provavelmente atuam como mediadores centrais da perda de massa muscular na AR (86); além disso, estudos em murinos mostraram que o bloqueio do TNF pode ativar vias envolvidas no ganho de músculo esquelético, sugerindo que o TNF funciona como um importante contribuinte da perda muscular. Por outro lado, o TNF pode não ser o único mediador, visto que a inibição concomitante de IL-1 e TNF é mais eficaz na redução do declínio muscular (87). Há evidências crescentes de que a inflamação crônica pode produzir uma modificação sistêmica profunda do microambiente celular que pode afetar a sobrevivência, reparo e manutenção das células musculares e ativação de células precursoras (88). O ambiente inflamatório e a influência da atividade da doença corroboram para o quadro de perda muscular decorrente da AR, porém há poucas informações a respeito do estado de ativação e inibição de células regeneradoras de fibras. Nesse contexto, as células satélites, células precursoras das fibras musculares podem ter seu papel alterado por consequência da inflamação crônica e, dessa forma, estabelecer o quadro de perda de massa muscular observado em pacientes com AR.

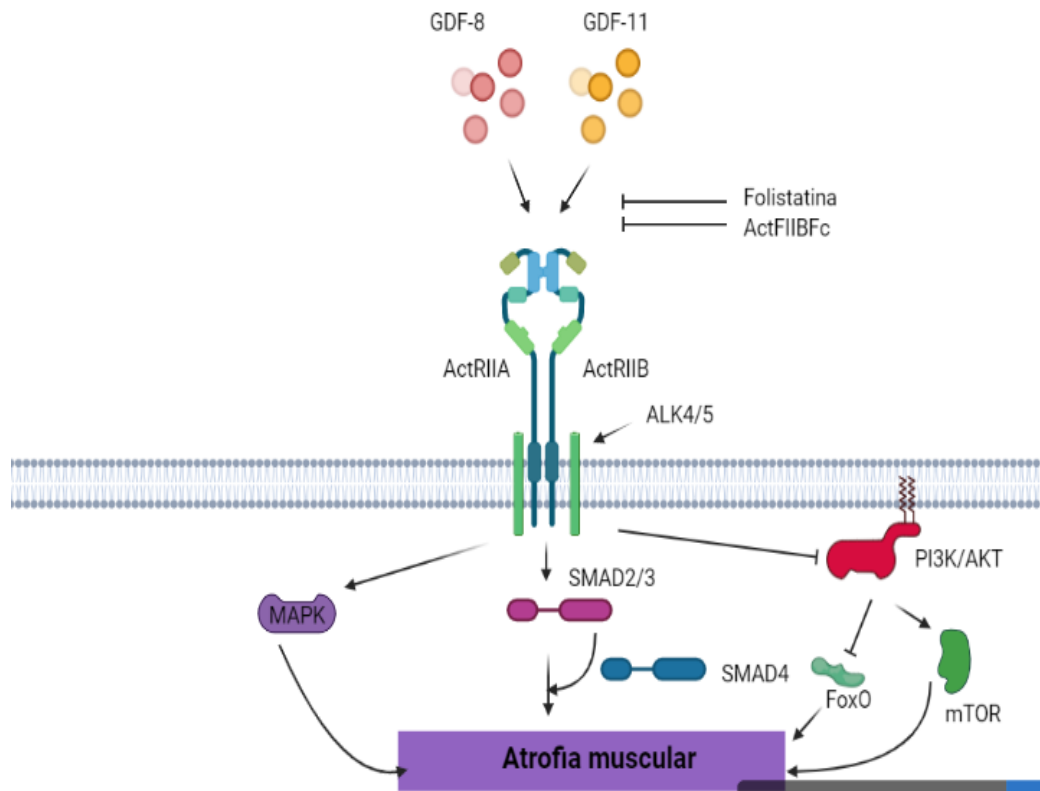
## **2.8 Fatores de crescimento e diferenciação**

A superfamília do TGF- $\beta$  compreende um grande número de proteínas secretadas, entre elas os fatores de crescimento e diferenciação 8 e 11 (GDF-8, GDF-11). Os GDFs regulam vários processos biológicos fundamentais como o desenvolvimento embrionário e a regulação pós-natal de órgãos (120).

O GDF-8 e o GDF-11 realizam a transdução de sinal pelos receptores activina tipo IIB e tipo IIA (ActRIIB/IIA) e, sequencialmente, ativam fatores de transcrição Smad 2 e 3 (figura 3) (12)(13)(14). Alguns estudos descrevem a sinalização via Smads 2 e 3 como um regulador negativo do crescimento muscular podendo induzir um quadro de atrofia intensa (12)(13)(14). Em vista disso, ligantes TGF- $\beta$  podem desempenhar um papel relevante na homeostase entre a degradação e a síntese proteica e contribuir para a fisiologia muscular. Já foi reportado que os níveis supra fisiológicos de GDF-11 e GDF-8 podem induzir atrofia do músculo estriado (121). Em adição, altos níveis de GDF-11 induzem níveis comparáveis de atrofia miotubular em células C2C12 através da ativação de p-SMAD2 / 3 além de causar atrofia do músculo esquelético e cardíaco, induzindo um fenótipo caquético em camundongos saudáveis (122). O GDF-15, um fator de crescimento e diferenciação participante da família TGF- $\beta$  tem apresentado grande importância na perda de massa corporal decorrente de doenças crônicas; GDF15 é um hormônio induzido pelo estresse que é liberado por muitos tecidos, incluindo músculo liso vascular, células cardíacas e endoteliais, macrófagos e adipócitos em resposta a diversas condições pró-inflamatórias, como obesidade, resistência à insulina, insuficiência cardíaca e câncer (123, 122). Altos níveis circulantes de GDF-15 e subsequente perda de peso foram associados ao estágio e extensão da progressão da doença e a todas as causas de mortalidade em doenças crônicas em que os pacientes apresentam caquexia como comorbidade. Curiosamente, a perda de peso foi revertida pela administração de anticorpos monoclonais contra o GDF15 no músculo esquelético em vários modelos animais caquéticos (25, 124, 125).

Juntas, as proteínas TGF- $\beta$  e seus componentes sinalizadores exercem controle fisiológico sobre a proliferação, diferenciação, apoptose, adesão e deposição de matriz extracelular, controlando assim a embriogênese, organogênese e homeostase do tecido adulto. Além disso, há evidências crescentes de que as proteínas TGF- $\beta$  agem em conjunto para regular o crescimento e o remodelamento do músculo esquelético (12, 14, 120).





**Figura 4.** Sinalização GDF-8 e GDF-11. Abreviaturas: GDF-8: Fator de crescimento e diferenciação 8; GDF-11: Fator de crescimento e diferenciação 11; ActRIIB/IIA: receptores activina tipo IIB e tipo IIA; ALK: linfoma anaplásico quinase; PI3K: fosfatidil-inositol 3-quinase; AKT: proteína quinase B; mTOR: alvo da rapamicina em mamíferos; FoxO: forkhead box O; MAPK proteína cinase 7 ativada por mitôgênio.

## 2.9 Fator de crescimento e diferenciação 8 (Growth differentiation factor 8- GDF-8)

O GDF-8 (também conhecido como miostatina) é um regulador negativo do crescimento muscular esquelético, principalmente por meio da diminuição da miogênese (15). O GDF-8 é expresso principalmente no músculo esquelético e atua como um inibidor autócrino/parácrino do crescimento do músculo. Ele é comumente chamado de miocina por sua secreção muscular ter capacidade de influenciar no caráter sistêmico do indivíduo (17). Inicialmente, é sintetizado como uma proteína precursora de 52 kDa, a qual sofre processamento proteolítico originando um peptídeo maduro de, aproximadamente, 26 kDa para ser liberado na circulação sanguínea (126). Os seus efeitos no músculo são conhecidos e sabe-se que a deleção do gene do GDF-8, ou a inibição da sua função, leva à hipertrofia e hiperplasia muscular em mamíferos (127). Estudos com animais nocaute, ou com mutação no gene do GDF-8,

demonstraram aumento da massa muscular pelos processos de hipertrofia e hiperplasia (128). Como tratamento, em modelos animais de atrofia por imobilização e em condições de microgravidade, o bloqueio da ação do GDF-8 é capaz de atenuar a atrofia muscular e a perda de capacidade funcional, embora em modelo de denervação a atrofia não tenha sido diminuída (129, 130, 131). Os mecanismos pelos quais o GDF-8 aumenta a proteólise do músculo esquelético ocorrem pelo menos em parte, pelo aumento da expressão de MuRF-1 e atrogina-1 a fim de e aumentar a degradação proteica no músculo esquelético (132). No entanto, a inibição de GDF-8 evitou a perda muscular induzida por GCs, revertendo o aumento da proteólise em camundongos, enquanto a síntese proteica suprimida não foi alterada (56). É concebível, portanto, que ao contrário da proteólise, o papel do GDF-8 na síntese de proteínas pode variar dependendo das condições fisiopatológicas (133). Na inflamação crônica, o GDF-8 pode ter níveis aumentados em sua expressão e induzir um quadro de sarcopenia via seus efeitos catabólicos (134). Na AR, foi reportado que não há alteração na expressão proteica de GDF-8 no músculo em modelos experimentais (16). Por outro lado, um estudo demonstrou que a expressão proteica de GDF-8 está diminuída tanto no músculo quanto no soro de animais artríticos (135). Em estado de remissão, foi observada uma diminuição da expressão de GDF-8, possivelmente por conta do efeito positivo da terapia anti-inflamatória em mediadores que influenciam a miogênese (136). Nas membranas sinoviais de pacientes, mais especificamente nos FLS, o GDF-8 pode estar estimulando a produção de IL-1 $\beta$ , via inibição de miR-21-5p, um regulador negativo da produção de IL-1 $\beta$ , como também é capaz de induzir TNF (137). Também, o GDF-8 pode ter um papel importante no processo de regeneração muscular pela regulação negativa desse processo através da inibição de myoD, um marcador de proliferação das células satélites (CS) (15). O tratamento com GDF-8 leva à falha da diferenciação de mioblastos em miotubos por conta da interação entre Smad3 e o promotor de myoD e por conta da poliubiquitinação e degradação de MyoD pelo proteossomo (15, 133, 138). Entretanto, o efeito sobre a regeneração parece envolver a ativação de CS e não o seu conteúdo, uma vez que a inibição de GDF-8 por nocaute não promove alteração no conteúdo de CS durante a idade adulta e não torna esses animais resistentes à sarcopenia (139). *In vivo*, também se observou aumento na expressão proteica de enzimas do sistema ubiquitina-proteossomo como consequência do tratamento com GDF-8

levando a maior degradação proteica, enquanto a hipertrofia muscular causada pelo nocaute gênico ou pela neutralização do gene do GDF-8 foi relacionada ao aumento na expressão proteica de MyoD e à diminuição da ativação do proteossomo (97, 138). Já em modelo murino de sepse, a deficiência proteica de GDF-8 preveniu a atrofia além de aumentar os níveis de MuRF-1, atrogina-1 e induzir a fosforilação de STAT3 (140).

## **2.10 Fator de crescimento e diferenciação 11 (Growth differentiation factor 11 - GDF-11)**

O GDF-11 apresenta um estreito parentesco com o GDF-8, uma vez que possuem cerca de 90% de identidade conformacional. Por conta disso, sugere-se que o GDF-11 também pode ser capaz de regular negativamente o crescimento da massa muscular além de desempenhar um papel importante na regulação da regeneração do cérebro, músculo esquelético e coração durante o envelhecimento, embora os resultados sejam, por vezes, contraditórios (18, 141). Embora a sinalização de GDF-8 e de GDF-11 ocorra pelo mesmo receptor, demonstrou-se que o GDF-11 é um ligante mais potente para a ativação da via ActRII/Alk/Smad 2/3 do que o GDF-8, uma hipótese que foi confirmada, posteriormente, pela análise da estrutura proteica (18, 142, 143). Com relação à ação do GDF-11, alguns estudos avaliaram a sua expressão e influência sobre a musculatura esquelética ao longo do envelhecimento. Inicialmente, demonstrou-se em camundongos que os níveis sanguíneos de GDF-11 diminuem com o envelhecimento, e que a administração de GDF-11 é capaz de promover a reversão do declínio muscular esquelético relacionado à idade, bem como a reversão da hipertrofia cardíaca (20, 21, 19). Por outro lado, também foi reportado que os níveis séricos de GDF-11 aumentam com a idade em camundongos e humanos saudáveis e que a administração de GDF-11 em camundongos provoca diminuição da regeneração muscular (142). Por fim, um estudo demonstrou que em homens saudáveis os níveis circulantes de GDF-11 não diminuem com o envelhecimento, mas, ao invés disso, os níveis de GDF-8 são menores em homens idosos em comparação com homens mais jovens (144). Em modelo de AR foi observado que o GDF-11 antagoniza a inflamação induzida por TNF e protege contra o desenvolvimento de artrite inflamatória em camundongos (145).

## **2.11 Fator de crescimento e diferenciação 15 (Growth differentiation factor 15 - GDF-15)**

O GDF-15, anteriormente conhecido como gene 1 ativado por AINE (NAG-1) e citocina inibitória de macrófago 1 (MIC-1), é um fator de crescimento e diferenciação membro da família TGF $\beta$  (122). Este fator é uma citocina de resposta ao estresse expressa em cardiomiócitos, adipócitos, células endoteliais, macrófagos e células musculares lisas em condições normais e patológicas. Estudos demonstraram que ele está associado à caquexia do câncer, doenças cardiovasculares e uma série de doenças de caráter inflamatório (19). O GDF-15, não possui um receptor notadamente conhecido, mas sabe-se que ele atua como um antagonista para integrina  $\beta$ 2, sendo esta essencial para a migração de leucócitos para o local da inflamação levando à continuação do processo inflamatório (123). Ele também tem um papel importante na ativação do sistema nervoso central pela ativação direta de neurônios hipotalâmicos e, dessa maneira, pode induzir à perda de apetite e, eventualmente, à anorexia (122, 146). Em condições fisiológicas, o GDF-15 é produzido em níveis baixos, mas aumenta sob condições inflamatórias e sob dano tecidual a fim de proteger os tecidos contra lesão induzida por inflamação, promovendo uma adaptação metabólica sendo considerado uma miocina induzida por estresse (23, 147). Já foi demonstrado que elevações de GDF-15 fornece um papel cardioprotetor em estados de inflamação em modelos de sepse (148, 149). Alguns estudos apontam uma relação próxima entre GDF-11 e GDF-15, na qual o GDF-11 é capaz de induzir a perda de apetite através de um mecanismo indireto, no qual as altas concentrações musculares de GDF-11 podem provocar uma elevação plasmática de GDF-15 (23, 24). O GDF-15 também possui uma relação sinérgica com o GDF-8, no qual se observou que a secreção de MIC-1 / GDF-15 pode exacerbar a perda muscular e a disfunção imunológica em camundongos, porém não há efeitos deletérios devido ao aumento dos níveis de GDF-15 quando é utilizado modelos nocautes para o gene GDF-8 (150, 151). Níveis alterados de GDF-15 no músculo liso podem induzir um quadro de atrofia como também inibir a ativação macrofágica local (152).

Em pacientes com AR, alguns estudos relataram níveis séricos elevados de GDF-15 e a associação positiva entre GDF-15 sérico e atividade de doença (153). Brown et al. demonstraram uma associação de níveis sistêmicos de GDF-15 com a atividade da doença e erosão da cartilagem com diminuição dos

índices após o tratamento medicamentoso, o qual sugeriu um papel importante do GDF-15 no desenvolvimento da AR (154). Adicionalmente, Tanrıku et al. reportaram níveis altos de GDF-15 em pacientes com alta atividade da doença em comparação com pacientes em remissão além de associar implicações da doença aos níveis proteicos encontrados (155). Entretanto, não há relatos sobre a influência do GDF-15 sobre a perda de massa muscular decorrente da AR.

### 3 MARCO CONCEITUAL

Estudos demonstram que alguns fatores de crescimento e diferenciação apresentam efeitos sobre o metabolismo e catabolismo muscular em diversas condições fisiológica e patológicas. Visto que a AR é uma doença na qual os pacientes apresentam perda de massa muscular e sabe-se que a perda de massa muscular contribui para incapacidade física destes pacientes, é válida a investigação a respeito dos níveis de GDF-8, 11 e 15 no músculo de animais induzidos com artrite e em células precursoras musculares.

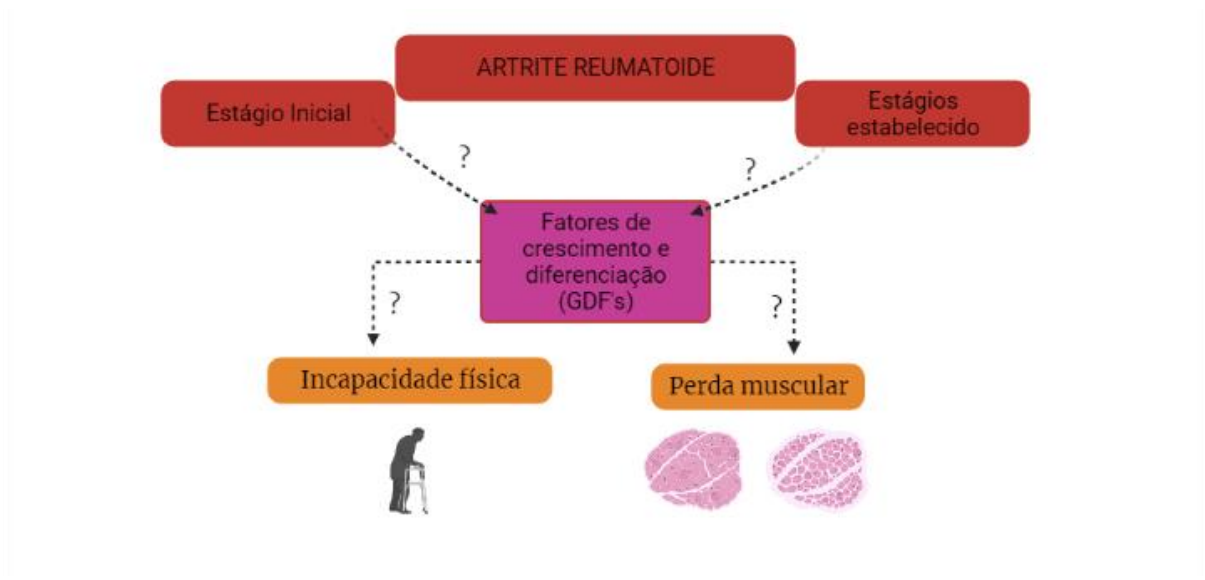


Figura 5. Esquema do papel dos fatores de crescimento e diferenciação na AR.

#### **4 JUSTIFICATIVA**

A literatura demonstra que as moléculas membros da superfamília do TGF- $\beta$  apresentam funções em diferentes tecidos, incluindo músculo esquelético. Sabe-se que a perda muscular é prevalente e que afeta profundamente a funcionalidade e a qualidade de vida dos pacientes com AR. Estudos recentes têm ressaltado a importância da família TGF- $\beta$  no acometimento muscular decorrente do envelhecimento. Devido à escassez de informações sobre o tema na AR, a investigação de possíveis mediadores envolvidos na perda muscular poderá auxiliar no esclarecimento da fisiopatogenia da doença e dessa comorbidade, bem como na busca por potenciais novos alvos terapêuticos. Portanto, a avaliação da expressão e níveis de GDFs no modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) é uma boa estratégia para o entendimento dos mecanismos envolvidos na perda muscular da artrite.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Avaliar os níveis séricos e musculares de GDF-8, GDF-11 e GDF-15 ao longo do desenvolvimento da artrite induzida por colágeno (CIA).

### **5.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o peso corporal e muscular;
- Avaliar o escore clínico da doença;
- Avaliar o edema dos membros pélvicos;
- Avaliar a força muscular;
- Avaliar a fadiga e velocidade de marcha;
- Avaliar a área transversal da miofibra no musculo tibial anterior;
- Avaliar a expressão gênica de GDF-11, GDF-8 e GDF-15 no musculo gastrocnêmico;
- Avaliar expressão proteica de GDF-11, GDF-8 e GDF-15 no musculo gastrocnêmico;



## 6 REFERENCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Khurana R, Berney SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*. 2005;12(3):153–65.
2. JS S, D A, A B, GR B, P E, GS F, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018 Feb 8 [cited 2021 Aug 13];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29417936/>
3. Nyhäll-Wählin BM, Petersson IF, Nilsson JÅ, Jacobsson LTH, Turesson C, Ahlmén M, et al. High disease activity disability burden and smoking predict severe extra-articular manifestations in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2009;48(4):416–20.
4. Lemmey AB, Wilkinson TJ, Clayton RJ, Sheikh F, Whale J, Jones HSJ, et al. Tight control of disease activity fails to improve body composition or physical function in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2018 Jul 5];55(10):1736–45. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/kew243>
5. D R, C G-V, C D-T, JMN S. Assessment of nutritional status by dual X-Ray absorptiometry in women with rheumatoid arthritis: A case-control study. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Aug 13];98(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30732168/>
6. Blum D, Rodrigues R, Geremia JM, Brenol CV, Vaz MA, Xavier RM. Quadriceps muscle properties in rheumatoid arthritis: insights about muscle morphology, activation and functional capacity. *Adv Rheumatol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2021 Sep 13];60(1). Available from: <http://www.scielo.br/j/adr/a/kQc7sqnzXpTr6v5gzLbDqdc/?lang=en>
7. van Bokhorst-de van der Schueren MAE, Konijn NPC, Bultink IEM, Lems WF, Earthman CP, van Tuyl LHD. Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis. *Clin Nutr* [Internet]. 2012 Dec [cited 2019 Oct 8];31(6):1008–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695407>
8. R R. Molecular basis of inflammation: relationships between catabolic cytokines, hormones, energy balance, and muscle. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* [Internet]. 2008 Nov [cited 2021 Sep 13];32(6):630–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18974242/>

9. Dankbar B, Fennen M, Brunert D, Hayer S, Frank S, Wehmeyer C, et al. Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice. *Nat Med*. 2015;21(9):1085+.
10. G C, C C, T M, A O, G M, G B, et al. Irisin enhances osteoblast differentiation in vitro. *Int J Endocrinol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Sep 13];2014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24723951/>
11. Qiao X, Nie Y, Ma Y, Chen Y, Cheng R, Yin W, et al. Irisin promotes osteoblast proliferation and differentiation via activating the MAP kinase signaling pathways. *Sci Reports* 2016 61 [Internet]. 2016 Jan 7 [cited 2021 Sep 13];6(1):1–12. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep18732>
12. Massagué J. TGF $\beta$  signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 Oct [cited 2018 Jul 5];13(10):616–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992590>
13. Anthor H, Otto A, Vulin A, Rochat A, Dumonceaux J, Garcia L, et al. Muscle hypertrophy driven by myostatin blockade does not require stem/precursor-cell activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 May 5 [cited 2018 Jul 5];106(18):7479–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19383783>
14. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2018 Jul 5];19(23):2783–810. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322555>
15. Sharma M, Langley B, Bass J, Kambadur R. Myostatin in muscle growth and repair. *Exerc Sport Sci Rev* [Internet]. 2001 Oct [cited 2018 Jul 5];29(4):155–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688787>
16. de Oliveira Nunes Teixeira V, Filippin LI, Viacava PR, de Oliveira PG, Xavier RM. Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Exp Biol Med* [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2018 Jul 5];238(12):1421–30. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370213505961>

17. Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass [Internet]. Vol. 49, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. Taylor & Francis; 2014 [cited 2020 Jun 24]. p. 59–68. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10409238.2013.857291>
18. Nakashima M, Toyono T, Akamine A, Joyner A. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. *Mech Dev* [Internet]. 1999 Feb [cited 2018 Jul 5];80(2):185–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10072786>
19. Hinken AC, Powers JM, Luo G, Holt JA, Billin AN, Russell AJ. Lack of evidence for GDF11 as a rejuvenator of aged skeletal muscle satellite cells. *Aging Cell*. 2016 Jun 1;15(3):582–4.
20. Poggioli T, Vujic A, Yang P, Macias-Trevino C, Uygur A, Loffredo FS, et al. Circulating Growth Differentiation Factor 11/8 Levels Decline With AgeNovelty and Significance. *Circ Res* [Internet]. 2016 Jan 8 [cited 2018 Jul 5];118(1):29–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26489925>
21. 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* [Internet]. 2014 May 9 [cited 2018 Jul 5];344(6184):649–52. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1251152>
22. Emmerson PJ, Wang F, Du Y, Liu Q, Pickard RT, Gonciarz MD, et al. The metabolic effects of GDF15 are mediated by the orphan receptor GFRAL. *Nat Med* [Internet]. 2017 Aug 28 [cited 2018 Jul 5];23(10):1215–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm.4393>
23. Jones JE, Cadena SM, Gong C, Wang X, Chen Z, Wang SX, et al. Supraphysiologic Administration of GDF11 Induces Cachexia in Part by Upregulating GDF15. *Cell Rep* [Internet]. 2018 Mar 20 [cited 2018 Jul 5];22(12):3375. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29562191>
24. Mullican SE, Lin-Schmidt X, Chin C-N, Chavez JA, Furman JL, Armstrong AA, et al. GFRAL is the receptor for GDF15 and the ligand promotes weight loss in mice and nonhuman primates. *Nat*

Med [Internet]. 2017 Oct [cited 2019 Nov 17];23(10):1150–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28846097>

25. Breit SN, Johnen H, Cook AD, Tsai VWW, Mohammad MG, Kuffner T, et al. The TGF- $\beta$  superfamily cytokine, MIC-1/GDF15: A pleiotropic cytokine with roles in inflammation, cancer and metabolism. *Growth Factors* [Internet]. 2011 Oct [cited 2021 Jun 8];29(5):187–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21831009/>

26. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2018 Feb 8 [cited 2021 Jan 13];4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29417936/>

27. Firestein GS, McInnes IB. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Immunity* [Internet]. 2017 Feb 21 [cited 2017 Aug 15];46(2):183–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.006>

28. 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* [Internet]. 2004 Mar [cited 2019 Feb 1];31(3):594–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14994410>

29. Cutolo M, Kitas GD, van Riel PLCM. Burden of disease in treated rheumatoid arthritis patients: Going beyond the joint. *Semin Arthritis Rheum* [Internet]. 2014 Feb [cited 2019 Feb 4];43(4):479–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080116>

30. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *Lancet* [Internet]. 2010 Sep [cited 2017 Aug 15];376(9746):1094–108. Available from: [http://ac.els-cdn.com/S0140673610608264/1-s2.0-S0140673610608264-main.pdf?\\_tid=13b3db3c-81f2-11e7-b493-00000aab0f6c&acdnat=1502826417\\_c19b5b79ef4502cfe215dc935913f40c](http://ac.els-cdn.com/S0140673610608264/1-s2.0-S0140673610608264-main.pdf?_tid=13b3db3c-81f2-11e7-b493-00000aab0f6c&acdnat=1502826417_c19b5b79ef4502cfe215dc935913f40c)

31. Tobón GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* [Internet]. 2010 Aug [cited 2019 Oct 8];35(1):10–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080387>

32. Silman AJ, Pearson JE. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis [Internet]. Vol. 4, Arthritis research. BioMed Central; 2002 [cited 2021 Jun 7]. p. S265–72. Available from: <https://arthritis-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/ar578>
33. Kurkó J, Besenyei T, Laki J, Glant TT, Mikecz K, Szekanecz Z. Genetics of rheumatoid arthritis - A comprehensive review [Internet]. Vol. 45, Clinical Reviews in Allergy and Immunology. NIH Public Access; 2013 [cited 2021 Jun 7]. p. 170–9. Available from: </pmc/articles/PMC3655138/>
34. Brenner M, Meng H-C, Yarlett NC, Joe B, Griffiths MM, Remmers EF, et al. The Non-MHC Quantitative Trait Locus Cia5 Contains Three Major Arthritis Genes That Differentially Regulate Disease Severity, Pannus Formation, and Joint Damage in Collagen- and Pristane-Induced Arthritis . J Immunol [Internet]. 2005 Jun 15 [cited 2020 Jun 25];174(12):7894–903. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15944295/>
35. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1987;30(11):1205–13.
36. Zhao X, Okeke NL, Sharpe O, Batliwalla FM, Lee AT, Ho PP, et al. Circulating immune complexes contain citrullinated fibrinogen in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2008 Aug 18;10(4).
37. Lenz TL, Deutsch AJ, Han B, Hu X, Okada Y, Eyre S, et al. Widespread non-additive and interaction effects within HLA loci modulate the risk of autoimmune diseases. Nat Genet. 2015 Aug 27;47(9):1085–90.
38. Viatte S, Plant D, Han B, Fu B, Yarwood A, Thomson W, et al. Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response. JAMA [Internet]. 2015 Apr 28 [cited 2019 Nov 17];313(16):1645–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25919528>
39. Takeno M, Kitagawa S, Yamanaka J, Teramoto M, Tomita H, Shirai N, et al. 5-Hydroxy-2-methylpyridine isolated from cigarette smoke condensate aggravates collagen-induced arthritis in Mice.

- Biol Pharm Bull [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 7];41(6):877–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29863076/>
40. Talbot J, Peres RS, Pinto LG, Oliveira RDR, Lima KA, Donate PB, et al. Smoking-induced aggravation of experimental arthritis is dependent of aryl hydrocarbon receptor activation in Th17 cells. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2018 Jun 8 [cited 2021 Jun 7];20(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1609-9>
41. Honda K, Littman DR. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2012 [cited 2019 Nov 17];30:759–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22224764>
42. Guerreiro CS, Calado Â, Sousa J, Fonseca JE. Diet, microbiota, and gut permeability-the unknown triad in rheumatoid arthritis. *Front Med* [Internet]. 2018 [cited 2021 Jun 7];5(DEC):349. Available from: </pmc/articles/PMC6302746/>
43. Ebringer A, Wilson C. HLA molecules, bacteria and autoimmunity. *J Med Microbiol* [Internet]. 2000 Apr [cited 2019 Nov 17];49(4):305–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10755623>
44. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. *Arthritis Res Ther*. 2015 Aug 26;17(1).
45. Gonzalez A, Icen M, Kremers HM, Crowson CS, Davis JM, Therneau TM, et al. Mortality trends in rheumatoid arthritis: The role of rheumatoid factor. *J Rheumatol*. 2008 Jun;35(6):1009–14.
46. van Gaalen FA, van Aken J, Huizinga TWJ, Schreuder GMT, Breedveld FC, Zanelli E, et al. Association between HLA class II genes and autoantibodies to cyclic citrullinated peptides (CCPs) influences the severity of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2004 Jul [cited 2019 Nov 17];50(7):2113–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15248208>
47. Anquetil F, Clavel C, Offer G, Serre G, Sebbag M. IgM and IgA Rheumatoid Factors Purified from Rheumatoid Arthritis Sera Boost the Fc Receptor– and Complement-Dependent Effector

Functions of the Disease-Specific Anti-Citrullinated Protein Autoantibodies. *J Immunol.* 2015 Apr 15;194(8):3664–74.

48. Sabharwal UK, Vaughan JH, Fong S, Bennett PH, Carson DA, Curd JG. Activation of the classical pathway of complement by rheumatoid factors. Assessment by radioimmunoassay for C4. *Arthritis Rheum* [Internet]. 1982 Feb [cited 2019 Nov 17];25(2):161–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7066047>

49. de Sire R, Rizzatti G, Ingravalle F, Pizzoferrato M, Petito V, Lopetuso L, et al. Skeletal muscle-gut axis: emerging mechanisms of sarcopenia for intestinal and extra intestinal diseases. *Minerva Gastroenterol Dietol.* 2018;64(4):351–62.

50. Barra L, Pope J, Bessette L, Haraoui B, Bykerk V. Lack of seroconversion of rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptide in patients with early inflammatory arthritis: a systematic literature review. *Rheumatology (Oxford)* [Internet]. 2011 Feb [cited 2019 Nov 17];50(2):311–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621983>

51. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Ann Rheum Dis.* 2017;76(6):960–77.

52. Fransen J, van Riel PLCM. The Disease Activity Score and the EULAR Response Criteria. Vol. 35, *Rheumatic Disease Clinics of North America.* 2009. p. 745–57.

53. Tsuji S, Higashiyama M, Tomita T, Matsui M, Tsuboi H, Hashimoto J. Predictors of minimal disease activity in patients treated with adalimumab for 52 weeks in clinical practice. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2015;74:871. Available from: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L72153358&from=export>

54. Fujiwara M, Kita Y. Reexamination of the assessment criteria for rheumatoid arthritis disease activity based on comparison of the Disease Activity Score 28 with other simpler assessment methods. *Mod Rheumatol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2021 Apr 20];23(2):260–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22546955/>

55. 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* [Internet]. 2018 Jul 29 [cited 2021 Jun 7];58(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s42358-018-0005-0>
56. Knevel R, Schoels M, Huizinga TWJ, Aletaha D, Burmester GR, Combe B, et al. Current evidence for a strategic approach to the management of rheumatoid arthritis with disease-modifying antirheumatic drugs: A systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2021 Jun 7];69(6):987–94. Available from: <https://ard.bmj.com/content/69/6/987>
57. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis - PubMed [Internet]. [cited 2021 Jun 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17922664/>
58. Behrens F, Koehm M, Burkhardt H. Update 2011: Leflunomide in rheumatoid arthritis - Strengths and weaknesses [Internet]. Vol. 23, *Current Opinion in Rheumatology*. *Curr Opin Rheumatol*; 2011 [cited 2021 Jun 7]. p. 282–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21427581/>
59. Plosker GL, Croom KF. Sulfasalazine: A review of its use in the management of rheumatoid arthritis [Internet]. Vol. 65, *Drugs*. *Drugs*; 2005 [cited 2021 Jun 7]. p. 1825–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16114981/>
60. SciELO - Brasil - Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatoide [Internet]. [cited 2021 Jun 7]. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbr/a/cGx8cNWtnB7ztKDkSNKMWMJ/?lang=pt>
61. Suarez-Almazor ME, Belseck E, Shea B, Wells G, Tugwell P. Cyclophosphamide for rheumatoid arthritis. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2000 Oct 23 [cited 2021 Jun 7];(2):CD001157. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10796419>
62. 2012 Brazilian Society of Rheumatology Consensus for the treatment of rheumatoid arthritis - PubMed [Internet]. [cited 2021 Jun 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22460407/>



63. Bauerová K, Mihalová D, Drábíková K, Jančinová V, Kucharská J, Paulovičová E, et al. Effects of glucomannan isolated from *Candida Utilis* on adjuvant arthritis in Lewis Rats. *Curr Top Nutraceutical Res* [Internet]. 2012;10(1):13–30. Available from: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L370436422&from=export>
64. Suarez-Almazor ME, Spooner C, Belseck E. Azathioprine for rheumatoid arthritis. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2000 Oct 23 [cited 2021 Jun 7];(2):CD001461. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10796441>
65. The mechanism of action of tofacitinib - an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis - PubMed [Internet]. [cited 2021 Jun 7]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26966791/>
66. Tracey KJ, Morgello S, Koplin B, Fahey TJ, Fox J, Aledo A, et al. Metabolic effects of cachectin/tumor necrosis factor are modified by site of production. Cachectin/tumor necrosis factor-secreting tumor in skeletal muscle induces chronic cachexia, while implantation in brain induces predominately acute anorexia. *J Clin Invest*. 1990;86(6):2014–24.
67. Graham LD, Graham L. Treat to target by specific cytokine interdiction: Multiple biomarker disease activity test deconstructed. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2019;71:4224–7. Available from: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L633059446&from=export>
68. Shetty A, Hanson R, Korsten P, Shawagfeh M, Arami S, Volkov S, et al. Tocilizumab in the treatment of rheumatoid arthritis and beyond [Internet]. Vol. 8, *Drug Design, Development and Therapy*. DOVE Medical Press Ltd.; 2014 [cited 2021 Jun 7]. p. 349–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24729685/>
69. Garcia-Montoya L, Villota-Eraso C, Yusof MYM, Vital EM, Emery P. Lessons for rituximab therapy in patients with rheumatoid arthritis [Internet]. Vol. 2, *The Lancet Rheumatology*. Lancet Publishing Group; 2020 [cited 2021 Jun 7]. p. e497–509. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S2665991320300333/fulltext>
70. Blair HA, Deeks ED. Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2021 Jun 7];77(11):1221–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28608166/>

71. Taylor PC. Clinical efficacy of launched JAK inhibitors in rheumatoid arthritis. *Rheumatol (United Kingdom)* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Jun 7];58(Suppl 1):i17–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30806707/>
72. MC G, J K, O Z, C L, M K, L X, et al. Baricitinib in Patients with Refractory Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 [cited 2021 Sep 24];374(13):60–1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27028914/>
73. Summers GD, Deighton CM, Rennie MJ, Booth AH. Rheumatoid cachexia: a clinical perspective. *Rheumatology* [Internet]. 2008 Apr 29 [cited 2017 Aug 9];47(8):1124–31. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/ken146>
74. 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* [Internet]. 2017 Jan 23 [cited 2019 Nov 17];19(1):12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28114971>
75. Baker JF, Long J, Mostoufi-Moab S, Denburg M, Jorgenson E, Sharma P, et al. Muscle Deficits in Rheumatoid Arthritis Contribute to Inferior Cortical Bone Structure and Trabecular Bone Mineral Density. *J Rheumatol*. 2017 Dec;44(12):1777–85.
76. Young A, Koduri G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* [Internet]. 2007 Oct [cited 2019 Oct 8];21(5):907–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17870035>
77. Baker JF, Von Feldt J, Mostoufi-Moab S, Noaiseh G, Taratuta E, Kim W, et al. Deficits in muscle mass, muscle density, and modified associations with fat in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* [Internet]. 2014 Nov [cited 2018 Jul 5];66(11):1612–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24664868>
78. Lundberg IE, Nader GA. Molecular effects of exercise in patients with inflammatory rheumatic disease. *Nat Clin Pract Rheumatol* [Internet]. 2008 Nov [cited 2019 Oct 8];4(11):597–604. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18839010>

79. Gomez-Vaquero C, Nolla JM, Fiter J, Ramon JM, Concustell R, Valverde J, et al. Nutritional status in patients with rheumatoid arthritis. *Jt BONE SPINE*. 2001;68(5):403–9.
80. Fleming A, Corbett M, Crown JM. Prognostic value of early features in rheumatoid disease. *Br Med J*. 1976 May 22;1(6020):1243–5.
81. Munro R, Capell H. Prevalence of low body mass in rheumatoid arthritis: association with the acute phase response. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 1997 May 1;56(5):326–9. Available from: <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.56.5.326>
82. Roubenoff R, Roubenoff RA, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, Dawson-Hughes B, et al. Rheumatoid cachexia: Cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest*. 1994;93(6):2379–86.
83. Sakuma K, Yamaguchi A. Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2012 Jun [cited 2019 Nov 17];3(2):77–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22476916>
84. Turesson C, O’Fallon WM, Crowson CS, Gabriel SE, Matteson EL. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2002;29(1):62–7.
85. Fukuda W, Omoto A, Oku S, Tanaka T, Tsubouchi Y, Kohno M, et al. Contribution of rheumatoid arthritis disease activity and disability to rheumatoid cachexia. *Mod Rheumatol* [Internet]. 2010 Oct [cited 2019 Nov 17];20(5):439–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508962>
86. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2004;287(4):C834–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15355854>
87. Roubenoff R, Dellaripa P, Nadeau MR, Abad LW, Muldoon BA, Selhub J, et al. Abnormal homocysteine metabolism in rheumatoid arthritis. *ARTHRITIS Rheum*. 1997;40(4):718–22.
88. Franceschi C, Collignon A, Isnardon D, Benkoel L, Vérine A, Silvy F, et al. A Novel Tumor-Associated Pancreatic Glycoprotein Is Internalized by Human Dendritic Cells and Induces Their

- Maturation. *J Immunol* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2021 Jun 7];186(7):4067–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21346236/>
89. Reznik M. Régénération expérimentale de la fibre musculaire squelettique adulte. *Ann d'anatomie Pathol.* 1973 Jan;18(1):91–108.
90. Moss F, Leblond CP. Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J Cell Biol* [Internet]. 1970 Feb 1 [cited 2021 Jun 7];44(2):459–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5411085/>
91. Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Jan 7];5(3):1027–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26140708/>
92. Said RS, Mustafa AG, Asfour HA, Shaqoura EI. Myogenic satellite cells: Biological milieu and possible clinical applications. Vol. 20, *Pakistan Journal of Biological Sciences*. Asian Network for Scientific Information; 2017. p. 1–11.
93. Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* [Internet]. 2000 Sep 15 [cited 2021 Jun 7];102(6):777–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11030621/>
94. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* 2013 Jan 1;93(1):23–67.
95. Cornelison DDW, Olwin BB, Rudnicki MA, Wold BJ. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol* [Internet]. 2000 Aug 15 [cited 2021 Jun 7];224(2):122–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10926754/>
96. Cornelison DDW, Wold BJ. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* [Internet]. 1997 Nov 15 [cited 2021 Jun 7];191(2):270–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9398440/>
97. Otto A, Collins-Hooper H, Patel K. The origin, molecular regulation and therapeutic potential of myogenic stem cell populations. Vol. 215, *Journal of Anatomy*. 2009. p. 477–97.

98. Smith CK, Janney MJ, Allen RE. Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells. *J Cell Physiol* [Internet]. 1994 [cited 2021 Jun 7];159(2):379–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8163577/>
99. Yablonka-Reuveni Z, Rivera AJ. Temporal expression of regulatory and structural muscle proteins during myogenesis of satellite cells on isolated adult rat fibers. *Dev Biol* [Internet]. 1994 Aug [cited 2021 Jun 7];164(2):588–603. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7913900/>
100. Olguin HC, Olwin BB. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: A potential mechanism for self-renewal. *Dev Biol* [Internet]. 2004 Nov 15 [cited 2021 Jun 7];275(2):375–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15501225/>
101. Olguin HC, Yang Z, Tapscott SJ, Olwin BB. Reciprocal inhibition between Pax7 and muscle regulatory factors modulates myogenic cell fate determination. *J Cell Biol* [Internet]. 2007 Jun 4 [cited 2021 Jun 7];177(5):769–79. Available from: [/pmc/articles/PMC2064278/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/177504278/)
102. Jejurikar SS, Kuzon WM. Satellite cell depletion in degenerative skeletal muscle [Internet]. Vol. 8, Apoptosis. *Apoptosis*; 2003 [cited 2021 Jun 7]. p. 573–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14574063/>
103. Shrivastava AK, Singh H V., Raizada A, Singh SK, Pandey A, Singh N, et al. Inflammatory markers in patients with rheumatoid arthritis. *Allergol Immunopathol (Madr)* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 Jun 7];43(1):81–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24656623/>
104. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly [Internet]. Vol. 39, *Experimental Gerontology*. Elsevier Inc.; 2004 [cited 2021 Jun 7]. p. 687–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15130663/>
105. Renault V, Thornell LE, Eriksson PO, Butler-Browne G, Mouly V. Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 7];1(2):132–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12882343/>
106. Kurosaka M, Machida S. Interleukin-6-induced satellite cell proliferation is regulated by induction of the JAK2/STAT3 signalling pathway through cyclin D1 targeting. *Cell Prolif* [Internet].

- 2013 Aug [cited 2021 Jun 7];46(4):365–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23869758/>
107. Haddad F, Zaldivar F, Cooper DM, Adams GR. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol* [Internet]. 2005 Mar [cited 2021 Jun 7];98(3):911–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15542570/>
108. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an endocrine organ: Focus on muscle-derived interleukin-6 [Internet]. Vol. 88, *Physiological Reviews*. *Physiol Rev*; 2008 [cited 2021 Jun 7]. p. 1379–406. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18923185/>
109. Lightfoot AP, Sakellariou GK, Nye GA, McArdle F, Jackson MJ, Griffiths RD, et al. SS-31 attenuates TNF- $\alpha$  induced cytokine release from C2C12 myotubes. *Redox Biol* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2021 Jun 7];6:253–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26291279/>
110. Palacios D, Mozzetta C, Consalvi S, Caretti G, Saccone V, Proserpio V, et al. TNF/p38 $\alpha$ /polycomb signaling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2010 Oct 8 [cited 2021 Jun 7];7(4):455–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20887952/>
111. Collins RA, Grounds MD. The role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in skeletal muscle regeneration: Studies in TNF- $\alpha$ (-/-) and TNF- $\alpha$ (-/-)/LT- $\alpha$ (-/-) mice. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2001 [cited 2021 Jun 7];49(8):989–1001. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11457927/>
112. De Bleecker JL, Meire VI, Declercq W, Van Aken EH. Immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha and its receptors in inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 1999 Jun 1 [cited 2021 Jun 7];9(4):239–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10399751/>
113. Kuru S, Inukai A, Kato T, Liang Y, Kimura S, Sobue G. Expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2021 Jun 7];105(3):217–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12557007/>

114. Warren GL, Hulderman T, Jensen N, McKinstry M, Mishra M, Luster MI, et al. Physiological role of tumor necrosis factor alpha in traumatic muscle injury. *FASEB J* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 7];16(12):1630–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12207010/>
115. Zádor E, Mendler L, Takács V, De Bleecker J, Wuytack F. Regenerating soleus and extensor digitorum longus muscles of the rat show elevated levels of TNF- $\alpha$  and its receptors, TNFR-60 and TNFR-80. *Muscle and Nerve* [Internet]. 2001 [cited 2021 Jun 7];24(8):1058–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11439381/>
116. Guttridge DC, Mayo MW, Madrid L V., Wang CY, Baldwin J. NF- $\kappa$ B-induced loss of MyoD messenger RNA: Possible role in muscle decay and cachexia. *Science* (80- ) [Internet]. 2000 Sep 29 [cited 2021 Jun 7];289(5488):2363–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11009425/>
117. LANGEN RCJ, SCHOLS AMWJ, KELDERS MCJM, WOUTERS EFM, JANSSEN-HEININGER YMW. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor- $\kappa$ B. *FASEB J* [Internet]. 2001 May [cited 2021 Jun 7];15(7):1169–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11344085/>
118. Te Pas MFW, De Jong PR, Verburg FJ. Glucocorticoid inhibition of C2C12 proliferation rate and differentiation capacity in relation to mRNA levels of the MRF gene family. *Mol Biol Rep* [Internet]. 2000 [cited 2021 Jun 7];27(2):87–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11092555/>
119. Hanaoka B, Nagareddy PR, Campbell M, Crofford LJ, Peterson CA, Rider LG, et al. Impaired satellite cell activation and myofiber transition during skeletal muscle regeneration in patients with polymyositis and dermatomyositis. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2016;68:344–5. Available from: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L613887109&from=export>
120. Sartori R, Gregorevic P, Sandri M. TGF $\beta$  and BMP signaling in skeletal muscle: Potential significance for muscle-related disease. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2014;25(9):464–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.002>

121. Hammers DW, Merscham-Banda M, Hsiao JY, Engst S, Hartman JJ, Sweeney HL. Supraphysiological levels of GDF 11 induce striated muscle atrophy . *EMBO Mol Med* [Internet]. 2017 Apr [cited 2021 Jun 8];9(4):531–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28270449/>
122. Johnen H, Lin S, Kuffner T, Brown DA, Wang V, Tsai W, et al. Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1. *Nat Med* Vol [Internet]. 2007 [cited 2018 Jul 5];13. Available from: <http://www.nature.com/naturemedicine>
123. Zarbock A, Kempf T, Wollert KC, Vestweber D. Leukocyte integrin activation and deactivation: Novel mechanisms of balancing inflammation [Internet]. Vol. 90, *Journal of Molecular Medicine*. Springer; 2012 [cited 2021 Jun 8]. p. 353–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-011-0835-2>
124. Lerner L, Tao J, Liu Q, Nicoletti R, Feng B, Krieger B, et al. MAP3K11/GDF15 axis is a critical driver of cancer cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 Jun 8];7(4):467–82. Available from: </pmc/articles/PMC4863827/>
125. Tsai VWW, Husaini Y, Manandhar R, Lee-Ng KKM, Zhang HP, Harriott K, et al. Anorexia/cachexia of chronic diseases: A role for the TGF- $\beta$  family cytokine MIC-1/GDF15 [Internet]. Vol. 3, *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. Wiley Online Library; 2012 [cited 2021 Jun 8]. p. 239–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22936174/>
126. Rodriguez J, Vernus B, Chelh I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj Sassi A, et al. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2014 Nov [cited 2019 Oct 8];71(22):4361–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25080109>
127. 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* [Internet]. 2017 Dec 3 [cited 2018 Jul 5];15(1):19. Available from: <http://bmcbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12915-017-0350-1>
128. 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* [Internet]. 2003 Apr [cited 2018 Jul 5];35(4):227–38. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/gene.10188>



129. Murphy KT, Cobani V, Ryall JG, Ibebunjo C, Lynch GS. Acute antibody-directed myostatin inhibition attenuates disuse muscle atrophy and weakness in mice. *J Appl Physiol* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2021 Jun 8];110(4):1065–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21270350/>
130. Smith RC, Cramer MS, Mitchell PJ, Lucchesi J, Ortega AM, Livingston EW, et al. Inhibition of myostatin prevents microgravity-induced loss of skeletal muscle mass and strength. *PLoS One* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2021 Jun 8];15(4):e0230818. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230818>
131. MacDonald EM, Andres-Mateos E, Mejias R, Simmers JL, Mi R, Park JS, et al. Denervation atrophy is independent from Akt and mTOR activation and is not rescued by myostatin inhibition. *DMM Dis Model Mech*. 2014 Apr 1;7(4):471–81.
132. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [Internet]. Vol. 7, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2007 [cited 2021 Jun 8]. p. 429–42. Available from: [www.nature.com/reviews/immunol](http://www.nature.com/reviews/immunol)
133. Lokireddy S, Mouly V, Butler-Browne G, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R, et al. Myostatin promotes the wasting of human myoblast cultures through promoting ubiquitin-proteasome pathway-mediated loss of sarcomeric proteins. *Am J Physiol - Cell Physiol* [Internet]. 2011 [cited 2021 Jun 8];301(6):1316–24. Available from: [www.ajpcell.org](http://www.ajpcell.org)
134. Camporez JPG, Petersen MC, Abudukadier A, Moreira G V., Jurczak MJ, Friedman G, et al. Anti-myostatin antibody increases muscle mass and strength and improves insulin sensitivity in old mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 Feb 23 [cited 2021 Jun 8];113(8):2212–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26858428/>
135. Little RD, Prieto-Potin I, Perez-Baos S, Villalvilla A, Gratal P, Herrero-Beaumont G, et al. Muscle alterations in an experimental model of chronic arthritis. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. 2016;24:S345. Available from: <https://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&id=L72246554&from=export>
136. Kerschman-Schindl K, Ebenbichler G, Föegeter-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 [Internet]. 2019 Jan [cited 2019 Oct 8];131(1–2):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30171335>

137. Su C-M, Hu S-L, Sun Y, Zhao J, Dai C, Wang L, et al. Myostatin induces tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the PI3K-Akt signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2019 Jun;234(6):9793–801.

138. McFarlane C, Plummer E, Thomas M, Hennebry A, Ashby M, Ling N, et al. Myostatin induces cachexia by activating the ubiquitin proteolytic system through an NF- $\kappa$ B-independent, FoxO1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* [Internet]. 2006 Nov [cited 2021 Jun 8];209(2):501–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16883577/>

139. Wang Q, McPherron AC. Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation. *J Physiol* [Internet]. 2012 May [cited 2021 Jun 8];590(9):2151–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22393251/>

140. Kobayashi M, Kasamatsu S, Shinozaki S, Yasuhara S, Kaneki M. Myostatin deficiency not only prevents muscle wasting but also improves survival in septic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Jun 8];320(1):E150–9. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/ajpendo.00161.2020>

141. Lu Q, Tu M-L, Li C-J, Zhang L, Jiang T-J, Liu T, et al. GDF11 Inhibits Bone Formation by Activating Smad2/3 in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Calcif Tissue Int* [Internet]. 2016 Nov 9 [cited 2018 Jul 5];99(5):500–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27395058>

142. Egerman MA, Cadena SM, Gilbert JA, Meyer A, Nelson HN, Swalley SE, et al. GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration. *Cell Metab* [Internet]. 2015 Jul 7 [cited 2018 Jul 5];22(1):164–74. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413115002223>

143. Trendelenburg AU, Meyer A, Rohner D, Boyle J, Hatakeyama S, Glass DJ. Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size. *Am J Physiol Physiol* [Internet]. 2009 Jun [cited 2018 Jul 5];296(6):C1258–70. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00105.2009>

144. 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. *Cell Metab* [Internet]. 2016 Jun 14 [cited 2018 Jul 5];23(6):1207–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27304512>
145. Li W, Wang W, Liu L, Qu R, Chen X, Qiu C, et al. GDF11 antagonizes TNF- $\alpha$ -induced inflammation and protects against the development of inflammatory arthritis in mice. *FASEB J*. 2019 Mar;33(3):3317–29.
146. Bonaterra GA, Zügel S, Thogersen J, Walter SA, Haberkorn U, Strelau J, et al. Growth differentiation factor-15 deficiency inhibits atherosclerosis progression by regulating interleukin-6-dependent inflammatory response to vascular injury. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2012 Dec [cited 2019 Oct 8];1(6):e002550. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316317>
147. Chung HK, Ryu D, Kim KS, Chang JY, Kim YK, Yi HS, et al. Growth differentiation factor 15 is a myomitokine governing systemic energy homeostasis. *J Cell Biol* [Internet]. 2017 [cited 2021 Jun 8];216(1):149–65. Available from: [/pmc/articles/PMC5223607/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5223607/)
148. Abulizi P, Loganathan N, Zhao D, Mele T, Zhang Y, Zwiép T, et al. Growth Differentiation Factor-15 Deficiency Augments Inflammatory Response and Exacerbates Septic Heart and Renal Injury Induced by Lipopolysaccharide. *Sci Rep* [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 8];7(1):1037. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28432312>
149. Kempf T, Eden M, Strelau J, Naguib M, Willenbockel C, Tongers J, et al. The transforming growth factor-beta superfamily member growth-differentiation factor-15 protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* [Internet]. 2006 Feb 17 [cited 2019 Oct 8];98(3):351–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397141>
150. Ost M, Igual Gil C, Coleman V, Keipert S, Efstathiou S, Vidic V, et al. Muscle-derived GDF15 drives diurnal anorexia and systemic metabolic remodeling during mitochondrial stress. *EMBO Rep* [Internet]. 2020 Mar 4 [cited 2021 Jun 8];21(3):e48804. Available from: <https://www.embopress.org/doi/full/10.15252/embr.201948804>

151. Patel MS, Lee J, Baz M, Wells CE, Bloch S, Lewis A, et al. Growth differentiation factor-15 is associated with muscle mass in chronic obstructive pulmonary disease and promotes muscle wasting in vivo. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 Jun 8];7(4):436–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27239406/>
152. Garfield BE, Crosby A, Shao D, Yang P, Read C, Sawiak S, et al. Growth/differentiation factor 15 causes TGF $\beta$ -activated kinase 1-dependent muscle atrophy in pulmonary arterial hypertension. *Thorax* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Jun 8];74(2):164–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30554141/>
153. Esalatmanesh K, Fayyazi H, Esalatmanesh R, Khabbazi A. The association between serum levels of growth differentiation factor-15 and rheumatoid arthritis activity. *Int J Clin Pract* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Jun 8];74(9). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32478946/>
154. Brown DA, Moore J, Johnen H, Smeets TJ, Bauskin AR, Kuffner T, et al. Serum macrophage inhibitory cytokine 1 in rheumatoid arthritis: A potential marker of erosive joint destruction. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2007 Mar [cited 2021 Jun 8];56(3):753–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17328047/>
155. Tanrikulu O, Sariyildiz MA, Batmaz I, Yazmalar L, Polat N, Kaplan I, et al. Serum GDF-15 level in rheumatoid arthritis: Relationship with disease activity and subclinical atherosclerosis. *Acta Reumatol Port* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2021 Jun 8];2017(1):66–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27679935/>