

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

**AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA ALIMENTAR EM MODELO DE POLIARTRITE  
INDUZIDA POR COLÁGENO**

EDUARDA CORREA FREITAS

Porto Alegre

2014

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

**AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA ALIMENTAR EM MODELO DE POLIARTRITE  
INDUZIDA POR COLÁGENO**

EDUARDA CORREA FREITAS

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

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

Porto Alegre

2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Letícia da Silva Souza

Profa. Dra. Lidiane Isabel Fillipin

Prof. Dr. Odirlei André Monticielo

Profa. Dra. Zilda Elisabeth de Albuquerque Santos

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em especial, à minha família, por nunca me deixarem desistir de meus sonhos, por sua presença constante e por seu amor incondicional.

Ao Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier, meu orientador, por ter me aceito e orientado neste trabalho, por sua compreensão e exemplo científico.

À Dra. Priscila Schmidt Lora, minha “co-orientadora” e amiga, por ter sempre acreditado em mim, por dividir comigo seu conhecimento e por seu carinho infindável.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Doenças Autoimunes e Infeciosas, pelo apoio.

Ao meu namorado, Elton, por sua presença em minha vida, por sempre acreditar em mim, por suas palavras de incentivo e pelo seu carinho e amor.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela ajuda no manejo dos animais.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Ao Serviço de Reumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

À Fundação de Incentivo a Pesquisa (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho.

“O único lugar onde o sucesso vem antes  
do trabalho é no dicionário.”

Albert Einstein

## RESUMO

**Introdução:** Artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica associada a alterações no metabolismo proteico e energético. **Objetivos:** Investigar a preferência alimentar durante o desenvolvimento da inflamação crônica em ratas com artrite induzida por colágeno. **Métodos:** Ratas Wistar fêmeas foram alocadas em dois grupos: controle (CO, n=10) e artrite induzida por colágeno (CIA; n=11) e expostas simultaneamente a quatro diferentes dietas (padrão, hipercalórica, hiperlipídica e hiperproteica). Durante o período experimental foi observado dados clínicos da doença, consumo alimentar, peso corporal e parâmetros bioquímicos, bem como, peso muscular esquelético ao final do experimento. Os testes estatísticos realizados foram ANOVA de duas vias e test-t e nível de significância estabelecido para estes testes foi de 95%. **Resultados:** Os animais com artrite induzida demonstram redução voluntária da ingestão total de alimento, redução do peso corporal e redução da relação sarcossomática quando comparados aos animais controles. Ainda, o grupo artrite aumentou o relativo consumo de dieta hiperproteica, diminuiu as concentrações séricas de creatinina, triglicérides e glicose. **Conclusão:** Condições inflamatórias crônicas como a artrite reumatoide causam alterações no metabolismo energético e proteico e estas alterações fisiológicas podem induzir a uma mudança na escolha alimentar.

## PALAVRAS-CHAVE

Artrite experimental, seleção de dietas, dieta hiperproteica, inflamação crônica, comportamento alimentar.

## ABSTRACT

**Background:** Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease associated with changes in energy and protein metabolism. **Objective:** To investigate food preferences during the development of chronic inflammation in rats with collagen-induced arthritis (CIA). **Methods:** Female Wistar rats were separated into two groups, control (CO, n=10) and CIA (n=11), and were simultaneously exposed to four different diets (standard, hypercaloric, hyperlipidic and hyperproteic). During the experimental period was observed clinical evidence of disease, food intake, body weight and biochemical parameters, as well as skeletal muscle weight at the end of the experiment. Statistical tests were two-away ANOVA and t-test and significance level for these tests was 95%. **Results:** CIA animals demonstrate voluntary reduction in total food intake, reduced body weight and reduced relative muscle weight compared to CO animals. In addition, CIA animals increased relative consumption of high protein diet, decreased serum concentrations creatinine, triglycerides and glucose. **Conclusion:** Chronic inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis cause changes in protein and energy metabolism, and these physiological alterations may induce a change in food choice.

## KEYWORDS

CIA rats, diet selection, high protein diet, chronic inflammation, eating behavior.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Artrite reumatoide
BCM	Body cell mass
TEE	Total daily energy expenditure
EEPA	Energy expenditure of physical activity
TNF-alfa	Tumor necrosis fator – alfa
IL-1 beta	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
DCNT	Doença crônica não transmissível
PIA	Artrite induzida por pristane
AIA	Artrite induzida por adjuvante
CIA	Artrite induzida por colágeno
MHC classe II	Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
PCR	Proteína C reativa
IMC	Índice de massa corporal
SNC	Sistema nervoso central
PUFAs	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
IL-10	Interleucina - 10
IG	Índice glicêmico
CG	Carga glicêmica
NF-kB	Fator nuclear kappa B
DII	Diabetes Mellitus tipo II
ROS	Espécies reativas de oxigênio



## INDICE

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 ESTRATÉGIAS PARA A LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES .....	14
2.2 ARTRITE REUMATOIDE.....	14
2.3 MODELOS ANIMAIS DE ARTRITE .....	15
2.4 ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA AR .....	18
2.5 DIETAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	21
3 MARCO TEÓRICO.....	26
4 JUSTIFICATIVA.....	27
5 OBJETIVOS .....	28
5.1 OBJETIVO PRINCIPAL.....	28
5.2 OBJETIVO SECUNDÁRIOS.....	28
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO.....	29
7 ARTIGO EM INGLÊS .....	39
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
9 PESPECTIVAS FUTURAS.....	60
10 ANEXOS .....	61
10.1 Metodologia estendida.....	61
10.1.1 Modelo de poliartrite indizada por colágeno.....	61
10.1.2 Avaliação do escore clínico da artrite.....	61
10.1.3 Avaliação da preferência alimentar .....	61

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica, poliarticular, simétrica e crônica, caracterizada por inflamação da sinóvia, produção de autoanticorpos e pela destruição da cartilagem e do osso (1). É uma doença reumática de alta prevalência e alta morbidade, assim esforços para elucidar sua patogênese, diagnóstico e tratamento são necessários.

Em pacientes com AR alterações significativas no metabolismo energético e proteico têm sido elucidadas. Rall e Roubenoff demonstraram que pacientes com AR têm menor composição de massa celular (*body cell mass*; BCM), e essa é considerada um fator preditor de morte e morbidade (2–4).

A redução na massa celular inclui alterações no gasto energético como redução no gasto energético diário total (*total daily energy expenditure*, TEE), aumento no gasto energético em repouso e baixo gasto energético em atividade física (*energy expenditure of physical activity*, EEPA) (5). O metabolismo de proteínas na AR também sofre alterações, representadas pelo aumento no *turnover* proteico, o que somado as demais alterações metabólicas caracteriza o hipermetabolismo (6). Este evento está relacionado com o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, especialmente fator de necrose tumoral – alfa (*tumor necrosis factor*, TNF-alfa), interleucina-1 beta (*interleukin 1-beta*, IL-1 beta) e interleucina – 6 (*interleukin 6*, IL-6), que desempenham um importante papel na patogênese da AR (7).

Mudanças significativas no metabolismo dos indivíduos (8–11), como por exemplo, as que acontecem nos pacientes com AR, podem alterar a escolha alimentar (12). Esta escolha é influenciada por fatores internos e externos. Dentre os fatores externos influenciam os hábitos culturais e a aparência dos alimentos (13). Enquanto que o metabolismo celular (14) e o controle neural (15) são responsáveis pela maior parte das escolhas relacionadas aos fatores internos.

Nossa hipótese é que o hipermetabolismo observado em pacientes com AR pode alterar o comportamento alimentar. Desta forma, nosso objetivo foi investigar a consumo alimentar durante a inflamação crônica do modelo experimental de artrite, expondo estes animais a quatro diferentes dietas (padrão, hipercalórica, hiperlipídica e hiperproteíca).

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 ESTRATÉGIAS PARA A LOCALIZAR E SELECIONAR AS INFORMAÇÕES**

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed e Scielo. O período da pesquisa foi de 1978 a 2014. Foram realizadas buscas através da lista de termos e suas combinações: “cachexia”, “muscle”, “muscle loss”, “muscle wasting”, “muscle mass”, “rheumatoid arthritis”, “collagen induced arthritis”, “experimental arthritis”, “arthritis”, “diet”, “high protein diet”, “diet selection”, “metabolism”, “metabolic change”, “CIA rats” e “inflammation”.

### **2.2 ARTRITE REUMATOIDE**

AR é uma doença auto-imune, crônica, sistêmica e poliarticular que afeta em torno de 1% da população adulta mundial e acomete duas vezes mais as mulheres do que o sexo masculino (16,17). A AR é caracterizada por uma poliartrite simétrica que leva a deformidade e perda de função das articulações em virtude da destruição da cartilagem e da erosão óssea. Dentre as principais manifestações sistêmicas encontradas nesta patologia podemos citar a rigidez matinal (18), a fadiga (19) e a perda de peso (5). Sua incidência é de 5-50 casos novos por 100.000 habitantes anualmente e tende a aumentar com a idade, atingindo seu pico em torno dos 40 anos de vida (20). No Brasil, um estudo de 2004 mostrou uma prevalência de 0,46% (21), similar a população mundial (17).

Essa doença, classificada como doença crônica não transmissível (DCNT), representa um importante problema em termos de saúde pública com sérias consequências socioeconômicas (20). É uma frequente causa de incapacidade funcional e está associada com um aumento de morbidade e mortalidade (1,22,23).

Por se tratar de uma doença bastante heterogênea, a investigação clínica da AR necessita de associações de manifestações clínicas, radiológicas e laboratoriais (24).

Apesar da patogênese da AR não ser completamente descrita sabe-se que fatores ambientais e genéticos estão envolvidos com a susceptibilidade e severidade da doença (25). Um aspecto importante no desenvolvimento da AR são as alterações que acontecem nas articulações dos pacientes, dentre elas a sinovite. Esse processo caracteriza-se fundamentalmente pela hiperplasia dos fibroblastos sinoviais que ativa o processo inflamatório e desencadeia o acúmulo dos leucócitos polimorfonucleares, a proliferação dos linfócitos T e B e neoangiogênese levando a formação de um tecido proliferativo e localmente invasivo conhecido como *pannus*. Este cresce rapidamente, invadindo a cartilagem, ativando condrócitos e liberando enzimas proteolíticas como as metaloproteinases, que degradam a cartilagem e o osso, resultando em destruição articular (26,27). A ativação e o recrutamento de tais células são influenciados por citocinas e mediadores inflamatórios (28).

Dentre as diversas citocinas e quimicinas associadas à patologia da AR, o TNF-alfa ocupa lugar de destaque no processo erosivo articular, através da ativação dos osteoclastos (29). A produção exacerbada de TNF-alfa e das demais citocinas pró-inflamatórias, IL-1 beta e IL-6 estão relacionadas com as manifestações extra-articulares que também fazem parte da patogênese da AR (7).

### **2.3 MODELOS ANIMAIS DE ARTRITE**

O uso de modelos animais de artrite tem provado ser uma importante ferramenta no estudo dos mecanismos envolvidos na patologia, etiologia da doença,

e na busca por novas terapias (30). Estes modelos mimetizam inúmeras disfunções patológicas, imunológicas e genéticas encontrados na AR (31,32).

Artrite inflamatória aguda e crônica semelhante a AR é comumente induzida em camundongos e ratos (33), também menos frequentemente em coelhos (34) e macacos (35). Diversos modelos de indução de artrite são relatados na literatura, dentre os mais utilizados estão a artrite induzida por pristane (*pristane-induced arthritis*, PIA) (36), artrite induzida por adjuvante (AIA) (37) e, um de grande destaque na literatura mundial, o modelo de artrite induzida por colágeno (*collagen-induced arthritis*, CIA) (38).

O modelo de CIA foi primeiramente descrito em ratos (39) e subsequentemente mostrou ser induzível em camundongos DBA1/J e C57B/L6 (40). O uso das diferentes espécies neste modelo experimental pode levar a diferenças na incidência da doença, nos mecanismos inflamatórios envolvidos, bem como nas manifestações clínicas, celulares e moleculares (41,42).

O modelo de CIA em ratos compartilha muitas semelhanças com a AR (43). Dentre estas similaridades podemos destacar a alta suscetibilidade em fêmeas, o envolvimento articular simétrico, articulações periféricas afetadas, hiperplasia sinovial, infiltrado celular inflamatório e produção de fator reumatoide (30). A incidência de artrite deste modelo, assim como na AR, esta ligada a expressão de genes do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC classe II) (44)

Brevemente, no modelo de CIA, o desenvolvimento da doença ocorre pela quebra da tolerância à proteína do colágeno heterólogo, principal proteína da

cartilagem. Caracterizado por acentuada destruição cartilaginosa associada à deposição de imunocomplexos na superfície articular, reabsorção óssea e proliferação periosteal, juntamente com sinovite e inflamação periarticular (45).

O sistema imunológico está intimamente envolvido no desenvolvimento e na manutenção da inflamação no modelo de CIA. Sendo essencial a participação de linfócitos T e B para gerar uma resposta imune completa. Ratos sem timo (*nude*), que carecem de linfócitos T, demonstram resistência à indução da doença (46). Essas células desempenham uma atividade importante na indução da doença, mas um papel secundário na fase crônica. Ao contrário, linfócitos B, mais especificamente os anticorpos anti-colágeno produzidos por estas células, parecem ser os principais agentes envolvidos na fase crônica.

Anticorpos específicos contra o colágeno, produzidos por linfócitos B ativados, ligam-se ao colágeno presente nas articulações, resultando na formação de um imunocomplexo, na ativação do sistema complemento e na ativação da resposta inflamatória local. Em modelo animal de CIA, células polimorfonucleares, mais especificamente neutrófilos, são abundantes no tecido sinovial, enquanto que em pacientes com AR predominam células mononucleares, macrófagos, como a maior população de células fagocitárias (47). Como consequência deste infiltrado celular há a produção de citocinas e mediadores inflamatórios resultando na destruição óssea e cartilaginosa (42).

Dentre as principais citocinas presentes no modelo de CIA em ratos podemos mencionar TNF-alfa e IL-1 beta. Um estudo da cinética destas citocinas, através da análise de imunohistoquímica da sinóvia, demonstrou que estas citocinas estão

presentes em maior quantidade uma semana antes do infiltrado leucocitário, sendo produzidas por fibroblastos sinoviais e células do endotélio venoso (48).

Aproximadamente 10 a 13 dias após a indução, aparecem os primeiros sinais da doença, caracterizado por patas anteriores e posteriores edemaciadas. Neste momento os macrófagos são os principais produtores das citocinas inflamatórias (48). O edema pode persistir por algumas semanas, cerca de 20 dias, e diminui gradualmente (45), resultando em artrite crônica com consequências graves, como a deformação das estruturas ósseas (49).

## **2.4 ALTERAÇÕES METABÓLICAS NA AR**

O risco cardiovascular aumentado entre os pacientes com AR assim como o conjunto de alterações que representa a caquexia reumatoide são aspectos que evidenciam modificações no metabolismo energético nestes pacientes (50,51). Essas alterações estão relacionadas à presença de citocinas pró-inflamatórias em especial IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa (52) e podem ou não apresentar correlação com a redução da atividade da doença pelo uso das terapias convencionais (53).

Esse conjunto de manifestações sistêmicas está relacionado especialmente a ação dos mediadores inflamatórios. Esse processo envolve aspectos bioquímicos como modificações no metabolismo de proteínas (catabolismo proteico aumentado) (54), lipídios (aumento de massa gorda) (55) e carboidratos (aumento do consumo energético e redução na ação da insulina) (4,56), levando a redução das atividades do cotidiano (fadiga). O conjunto destas alterações é chamado de caquexia.



Caquexia é uma síndrome metabólica complexa associada à doença inflamatória crônica e caracterizada por perda de peso e perda de massa magra, com ou sem alteração de massa gorda (57). O quadro de caquexia é uma das mais evidentes condições clínicas que demonstram ligação entre o metabolismo e a inflamação (14). É clara a participação do TNF-alfa no desenvolvimento desta síndrome. Assim como estão relacionadas com o seu desenvolvimento a IL-6 e a proteína C reativa (PCR) (58–60).

Atualmente o diagnóstico mais citados pela literatura para definir caquexia (61), estabelece que o paciente deve apresentar: perda de peso (superior a 5% nos últimos 12 meses), como critério preliminar, seguido por mais três dos cinco critérios: índice de massa corporal (IMC) inferior a 20 kg/m<sup>2</sup>, diminuição da força muscular, diminuição do apetite (anorexia), fadiga, e alteração de parâmetros bioquímicos e imunológicos, tais como elevação de IL-6, elevação de PCR, redução de hemoglobina e redução de albumina sérica.

Entretanto, esses critérios parecem ser mais fidedignos para determinação da síndrome nos pacientes oncológicos do que em outras doenças, como nos pacientes reumáticos (50). Bokhorst e colaboradores (50) demonstraram que pacientes com AR não apresentam os critérios diagnósticos estabelecidos por Evans (57) para definição da síndrome. Contudo é sabido que os pacientes artríticos demonstram importantes alterações sistêmicas. Assim foi designado o termo caquexia reumatoide, que respeita a individualidade do quadro sindrômico desta doença.

A caquexia reumatoide está associada a um pior prognóstico nos pacientes com AR (55). Estudos demonstraram que pacientes com AR têm menor composição

de massa celular que envolve o músculo e outros órgãos (4). Nesse contexto, a perda de massa muscular varia entre 13 a 15%, um terço da perda de massa muscular que levaria a morte do indivíduo (62,63).

A redução da musculatura esquelética está associada a prejuízos de função e a gravidade da doença (63,64). Nesse contexto, a perda de massa muscular esquelética está inserida em grupo de alterações sistêmicas que acontece na doença da AR.

Os mecanismos de sinalização intracelular relacionados à perda muscular na inflamação crônica são proteases lisossomais, proteases ativadas por cálcio e o sistema ubiquitina proteossomo (65,66). Essas cascatas de sinalização intracelular podem levar a apoptose, ao aumento da degradação proteica ou ainda à diminuição da ativação das células satélites responsáveis pela regeneração muscular (63).

Além do componente sarcopênico o processo inflamatório também pode alterar a ingestão alimentar. Em um indivíduo saudável, a ingestão alimentar é regulada por sinalização neural e humoral derivadas dos nervos sensoriais gastrointestinais e pelo controle central do apetite. Na AR, a produção das citocinas e outras moléculas neuroativas irá alterar a regulação hipotalâmica do apetite devido à sensibilização dos nervos intestinais aferentes (sensoriais) e por a inibição em nível do sistema nervoso central (SNC) (67).

Sabe-se que, nas doenças inflamatórias crônicas, em função da atividade da doença, pode ocorrer diminuição na absorção de nutrientes e/ou utilização alterada destes nutrientes pelo organismo, o aumento das necessidades calóricas ou de nutrientes específicos, cuja magnitude ainda não foi determinada, mas que são

importantes para suprir os efeitos do hipermetabolismo característico destas patologias (68,69).

Chaud e colaboradores, avaliando um grupo de pacientes com artrite idiopática juvenil, demonstram uma redução da quantidade de calorias recomendadas e aumento da ingestão de proteínas (70). Porém o aumento no consumo de proteínas não foi associado a uma necessidade da doença, devido este consumo ser naturalmente aumentado nesta faixa etária de idade.

Alterações nos padrões alimentares de artrite foram demonstradas, não somente por dados clínicos, como também em modelo experimental de artrite induzida por adjuvante. Castellero e colaboradores demonstram que os animais com artrite induzida por adjuvante comiam menos que animais controles saudáveis, mas também apresentavam uma maior perda de peso quando comparados a controles quando esses comiam a mesma quantidade de ração (controles pareados de alimentação). Por fim, tanto diminuição no consumo alimentar quanto a perda de peso nos animais estava positivamente correlacionado com uma maior concentração de TNF-alfa (71–73).

## **2.5 DIETAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO**

As alterações metabólicas causadas pela inflamação têm estimulado pesquisas sobre a influência da nutrição e de hábitos alimentares neste processo. Fatores dietéticos são importantes reguladores da função imune (74), desta forma a manipulação da dieta pode modificar os sintomas da inflamação, influenciando assim nos sintomas da AR (75).

Dietas ricas em lipídios tem influência no processo inflamatório. Lipídios são estruturas formadas por ácidos graxos e colesterol com importantes funções no organismo (síntese de hormônios, vitaminas e mediadores do sistema imune). Os ácidos graxos são divididos em três diferentes tipos: os ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids* - PUFAs).

Os PUFAs, podem ser classificados como ômega 3 e ômega 6 de acordo com a posição proximal da ligação dupla (76). Ainda, compõem uma parte importante da membrana celular e dos tecidos, atuando nos processos metabólicos e desempenhando um papel na regulação da resposta inflamatória (77).

Uma típica dieta ocidental, em geral, consome mais gorduras do tipo ômega 6 do que ômega 3, assim o desequilíbrio na ingestão destes ácidos graxos está relacionada a uma produção exacerbada de ácido araquidônico intensificando o processo inflamatório (76). Por conseguinte dietas ricas em ômega 3, especialmente oriundas de óleo de peixe, podem reduzir a inflamação sistêmica (78,79).

Kremer e colaboradores observaram uma redução de 54% nos níveis de IL-1 beta após suplementarem a alimentação de 17 pacientes com AR com óleo de peixe e azeite de oliva, fontes de ômega 3 (80). Entretanto, Cunha e colaboradores ofertou uma dieta rica em ômega 6 e observou elevação nos níveis TNF-alfa e adiponectina e redução nos níveis de interleucina - 10 (IL-10) no tecido adiposo (81).

Lee e colaboradores demonstraram que a mudança de uma dieta rica em lipídios para uma dieta rica em carboidratos foi capaz de diminuir o peso corporal e o tecido adiposo, bem como os níveis de leptina, resistina e IL-6 (82). Além disso,

McDougall e colaboradores ofertaram uma dieta com baixo teor de gordura para 24 pacientes com AR por 4 semanas e comprovaram que a manipulação da dieta foi capaz de reduzir dor e edema articular, porém não mostrou alteração na rigidez matinal e nos níveis PCR (83).

Assim como os lipídios, os carboidratos também desempenham um papel importante no processo inflamatório. Os carboidratos são a principal fonte de energia na dieta e pode ser avaliados de acordo com índice glicêmico (IG) e os valores de carga glicêmica (CG). Apesar do IG e da CG serem frequentemente confundidos estas medidas têm denominações diferentes. O IG é denominado a velocidade que a glicose chega a corrente sanguínea, enquanto que a CG é um indicador de qualidade e quantidade de carboidrato do alimento consumido na dieta (84).

Desta forma, estudos sugerem que o consumo de alimentos de baixo IG ou baixa CG atenua o processo inflamatório crônico de baixa intensidade (85,86). Segundo Liu e colaboradores existe uma correlação positiva entre a concentração de PCR e CG dos alimentos ingeridos em mulheres saudáveis de meia idade (85).

Ainda, dietas ricas em carboidratos, especialmente em glicose, foram associadas ao aumento da síntese de superóxido por leucócitos, bem como aumento da sinalização do fator nuclear kappa B (NF-Kb) (87). Além disso, o consumo de glicose via oral ou intravenosa por pessoas saudáveis e pacientes com diabetes mellitus tipo II (DII), aumentou a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e elevou os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa e IL-6, importantes citocinas presentes na patogênese da AR (88,89).

Dieta vegana pode ser útil como uma terapia de nutrição médica no tratamento das condições de síndrome metabólica, incluindo a obesidade, a diabetes e risco cardiovascular (90,91) e pode conferir proteção contra doenças inflamatórias, tais como AR. Embora o consumo de dietas ricas em alimentos de baixo IG pareça ser eficaz na redução do processo inflamatório e dietas com altos níveis de CG esta associada a um processo inflamatório intenso, o papel dos carboidratos na inflamação ainda precisa ser mais elucidado.

Uma das alterações sistêmicas bem descritas na caquexia reumatoide é a perda muscular. Dietas ricas em proteínas ou suplementações com aminoácidos podem ser uma alternativa para diminuir a degradação proteica. Gomes-Marcondes e Cruz demonstraram que uma dieta rica em leucina teve um efeito protetivo no processo catabolismo do músculo gastrocnêmico fetais de ratas grávidas portadoras de tumor Walker (92). Leucina, um aminoácido essencial, tem sido bastante utilizada como fonte proteica, pois estimula a síntese de proteína (93).

Como possíveis tratamentos alternativos para caquexia reumatoide, Maddison e colaboradores suplementaram a dieta de pacientes com AR durante 12 semanas com Beta-Hidroxi-Beta-Metilbutirato, glutamina e arginina. Apesar da suplementação ter sido bem tolerada entre os pacientes, a mesma não foi eficaz em reverter a caquexia em relação aos controles (94).

Embora estudos recentes não tenham demonstrado melhora na perda muscular, Mosoni e colaboradores manipularam a dieta de animais idosos para uma dieta hiperproteica e identificaram um retardo na perda muscular decorrente da

idade em ratos velhos. Assim, o aumento na ingestão proteica pode retardar a perda muscular (95).

Em pacientes em condições críticas como os pacientes internados nos centros de terapia intensiva é bem estabelecido que o aumento do consumo de proteínas e outras manipulações na dieta podem imunomodular o indivíduo e reduzir, por exemplo, infecções. Nesse contexto, o uso de certos aminoácidos como arginina, glutamina além de outros componentes como fibras e antioxidantes já foram propostos como terapias nutricionais de sucesso (96,97).

Apesar dos diversos trabalhos realizados demonstrarem que manipulação de dieta ou fatores dietéticos pode modificar o processo inflamatório, ainda não existe um consenso sobre qual seria a melhor estratégia terapêutica para reduzir esse processo. Sendo assim novos estudos são necessários para elucidar o papel dos macro e micronutrientes na inflamação.

### **3 MARCO TEÓRICO**

A base teórica relatada acima demonstra que o processo de inflamação crônica, encontrado na AR, é complexo e está diretamente relacionado a alterações no metabolismo. Ainda, essas alterações provocam caquexia (síndrome complexa que envolve o componente sarcopênico de demais alterações sistêmicas da inflamação crônica). Não obstante, modificações na dieta podem modular o processo inflamatório. Por fim, as alterações sistêmicas que compõem a caquexia reumatoide podem estar relacionadas a uma necessidade modificada de macronutrientes (proteína, carboidrato ou lipídio).



#### **4 JUSTIFICATIVA**

O uso de dietas como terapia alternativa para doenças autoimunes inflamatórias crônicas tem aumentado nos últimos anos. O consumo dietético em pacientes pode ser alterado não somente por variáveis biológicas como idade, sexo, mutações, metabolismo, tempo de doença, evolução da doença, mas também pela terapia medicamentosa. Contudo ainda são falhos os estudos que observam as mudanças na escolha alimentar nos processos de inflamação crônica. Ainda, a utilização de modelos animais para esses estudos é facilitada por trabalhar com animais isogênicos (sem variabilidade genética) expostos as mesmas condições ambientais e ainda sem manipulação medicamentosa. Assim, estudos que avaliem a influência das alterações fisiológicas decorrentes do processo inflamatório sobre a escolha alimentar podem auxiliar e elucidar novos mecanismos de manipulação dietética para os pacientes e como consequência reduzir a mortalidade e morbidade destes.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

- Avaliar a preferência alimentar dos animais com artrite induzida por colágeno do tipo II (CIA).

### **5.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

- Avaliar a ingesta alimentar no desenvolvimento da doença;
- Avaliar o peso corporal dos animais no desenvolvimento da doença;
- Avaliar o consumo alimentar de cada macronutriente (proteína, lipídio e carboidrato) no desenvolvimento da doença;
- Avaliar as alterações bioquímicas sorológicas no desenvolvimento da doença;
- Avaliar a relação sarcossomática nos animais;

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* . 2003 May;423(6937):356–61.
2. Tierney R, Pierson N. Magnitude of body-cell-mass depletion death from wasting in A1DS13 and the timing. 1989;444–7.
3. Dewys WD, Begg C, Lavin PT, Band PR, Bennett JM, Bertino JR, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med* . 1980 Oct ;69(4):491–7.
4. Rall L, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology* . 2004 ;43(10):1219–23.
5. Roubenoff R, Roubenoff R a, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, Dawson-Hughes B, et al. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest* . 1994 Jun;93(6):2379–86.
6. Rall LC, Rosen CJ, Dolnikowski G, Hartman WJ, Lundgren N, Abad LW, et al. Protein metabolism in rheumatoid arthritis and aging. Effects of muscle strength training and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum*. 1996 Jul;39(7):1115–24.
7. Mcinnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):429–42.
8. Baudrand R, Lian CG, Lian BQ, Ricchiuti V, Yao TM, Li J, et al. Long-term dietary sodium restriction increases adiponectin expression and ameliorates the proinflammatory adipokine profile in obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 Jan ;24(1):34–41.
9. Greene MW, Burrington CM, Lynch DT, Davenport SK, Johnson AK, Horsman MJ, et al. Lipid metabolism, oxidative stress and cell death are regulated by PKC delta in a dietary model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2014 Jan;9(1):e85848.
10. Thind K, Jensen MD, Hegarty E, Chen AP, Lim H, Martinez-Santesteban F, et al. Mapping metabolic changes associated with early Radiation Induced Lung Injury post conformal radiotherapy using hyperpolarized <sup>13</sup>C-pyruvate Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging. *Radiother Oncol* . 2014 Feb;110(2):317–22.
11. Yamashita A, Zhao Y, Matsuura Y, Yamasaki K, Moriguchi-Goto S, Sugita C, et al. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. *PLoS One*. 2014 Jan;9(1):e86426.
12. Grimsley DL. Effects of experience with salty food on salt selection in adrenalectomized rats. *Integr Physiol Behav Sci* ;29(1):17–24.
13. Furst T, Connors M, Bisogni C a, Sobal J, Falk LW. Food choice: a conceptual model of the process. *Appetite* . 1996 Jun;26(3):247–65.

14. Fitzpatrick M, Young SP. Metabolomics--a novel window into inflammatory disease. *Swiss Med Wkly* . 2013 Jan;143:w13743.
15. Broberger C, McCormick D a. Excitatory effects of thyrotropin-releasing hormone in the thalamus. *J Neurosci* . 2005 Feb 16 ;25(7):1664–73.
16. Turesson C, Jacobsson L, Bergstro U. Extra-articular rheumatoid arthritis: prevalence and mortality. 1999:668–74.
17. McInnes IB and SG. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis.
18. Luyster FS, Chasens ER, Wasko MCM, Dunbar-Jacob J. Sleep quality and functional disability in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Sleep Med* . 2011 Feb 15;7(1):49–55.
19. Nikolaus S, Bode C, Taal E, van de Laar MAFJ. Fatigue and factors related to fatigue in rheumatoid arthritis: a systematic review. *Arthritis Care Res (Hoboken)* . 2013 Jul;65(7):1128–46.
20. Alamanos Y, Drosos AA. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2005 Mar ;4(3):130–6.
21. Senna ER, De Barros ALP, Silva EO, Costa IF, Pereira LVB, Ciconelli RM, et al. Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach. *J Rheumatol*. 2004 Mar ;31(3):594–7.
22. Pincus T, Brooks RH, Callahan LF. Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures. *Ann Intern Med* . 1994 Jan 1;120(1):26–34.
23. Young a, Koduri G, Batley M, Kulinskaya E, Gough a, Norton S, et al. Mortality in rheumatoid arthritis. Increased in the early course of disease, in ischaemic heart disease and in pulmonary fibrosis. *Rheumatology (Oxford)* . 2007 Feb;46(2):350–7.
24. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* . 1988 Mar;31(3):315–24.
25. Gulko PS. Contribution of genetic studies in rodent models of autoimmune arthritis to understanding and treatment of rheumatoid arthritis. *Genes Immun*. 2007 Oct;8(7):523–31.
26. Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol Rev*. 2010 Jan ;233(1):233–55.
27. Bottini N, Firestein GS. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Jan;9(1):24–33.
28. Goldring SR. Pathogenesis of bone erosions in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*. 2002 Jul ;14(4):406–10.

29. Miossec P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* . 2004 May;16(3):218–22.
30. Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? *Arthritis Rheum* . 2010 Aug ;62(8):2192–205.
31. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervoordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis*. 2011 Aug;70(8):1357–62.
32. Staines NA, Wooley PH. Collagen arthritis - what can it teach us? *Br J Rheumatol* . 1994 Sep;33(9):798–807.
33. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*. 2007 Jan;2(5):1269–75.
34. Hembry RM, Bagga MR, Murphy G. Rabbit Models of Arthritis : Immunolocalization of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor. 1993;143(2):628–42.
35. Horai N, Nagaoka T, Higuchi I, Kasai H, Yoshioka T, Umekita Y, et al. Muscle wasting associated with pathologic change is a risk factor for the exacerbation of joint swelling in collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys. *BMC Musculoskelet Disord* . 2013 Jul 9 ;14(1):205.
36. Vingsbo C, Sahlstrand P, Brun JG, Jonsson R, Saxne T, Holmdahl R. Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes. *Am J Pathol* . 1996 Nov;149(5):1675–83.
37. Knight B, Katz DR, Isenberg D a, Ibrahim M a, Le Page S, Hutchings P, et al. Induction of adjuvant arthritis in mice. *Clin Exp Immunol*. 1992 Dec;90(3):459–65.
38. Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, Myers LK, Brand DD. Collagen-induced arthritis. *Curr Protoc Immunol*. 2010 Apr;Chapter 15:Unit 15.5.1–25.
39. Trentham BYDE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. 1978;146:10–1.
40. Brand DD, Latham K a, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* . 2007 Jan ;2(5):1269–75.
41. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervoordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis* . 2011 Aug;70(8):1357–62.
42. Kannan K, Ortmann R a, Kimpel D. Animal models of rheumatoid arthritis and their relevance to human disease. *Pathophysiology*. 2005 Oct;12(3):167–81.
43. Trentham DE. Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1982 Aug;25(8):911–6.

44. Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol.* 2003 Aug ;25(1):3–18.
45. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY. Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol.* 2009 Aug;39(8):2040–4.
46. Klareskog L, Holmdahl R, Larsson E, Wigzell H. Role of T lymphocytes in collagen II induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol.* 1983 Jan;51(1):117–25.
47. Tak PP, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, Meijers KA, Brand R, et al. Analysis of the synovial cell infiltrate in early rheumatoid synovial tissue in relation to local disease activity. *Arthritis Rheum.* 1997 Feb;40(2):217–25.
48. Palmblad K, Erlandsson-harris H, Tracey KJ, Andersson U. Dynamics of Early Synovial Cytokine Expression in Rodent Collagen-Induced Arthritis. 2001;158(2):491–500.
49. Durie FH, Fava RA, Noelle RJ. Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1994 Oct;73(1):11–8.
50. Van Bokhorst-de van der Schueren M a E, 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. Elsevier Ltd;* 2012 Dec;31(6):1008–10.
51. Kerekes G, Nurmohamed MT, González-Gay M a, Seres I, Paragh G, Kardos Z, et al. Rheumatoid arthritis and metabolic syndrome. *Nat Rev Rheumatol. Nature Publishing Group;* 2014 Nov;10(11):691–6.
52. Lin W, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1175–83.
53. Ogdie A, Yu Y, Haynes K, Love TJ, Maliha S, Jiang Y, et al. Risk of major cardiovascular events in patients with psoriatic arthritis, psoriasis and rheumatoid arthritis: a population-based cohort study. *Ann Rheum Dis.* 2014 Oct 28;
54. Rall LC, Rosen CJ, Dolnikowski G, Hartman WJ, Lundgren N, Abad LW, et al. Protein metabolism in rheumatoid arthritis and aging. Effects of muscle strength training and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1996 Jul;39(7):1115–24.
55. Walsmith J, Roubenoff R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *Int J Cardiol.* 2002;85(1):89–99.
56. Etxeberria U, de la Garza AL, Martínez JA, Milagro FI. Diet-induced hyperinsulinemia differentially affects glucose and protein metabolism: a high-throughput metabolomic approach in rats. *J Physiol Biochem .* 2013 Sep;69(3):613–23.
57. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 2008 Dec;27(6):793–9.

58. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervoordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis*. 2011 Aug;70(8):1357–62.
59. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Oct;287(4):C834–43.
60. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*. 2004 Jun;50(6):1761–9.
61. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*. 2008 Dec;27(6):793–9.
62. Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: a complication of rheumatoid arthritis moves into the 21st century. *Arthritis Res Ther*. 2009 Jan;11(2):108.
63. Teixeira V de ON, Filippin LI, Xavier RM. Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia. *Rev Bras Reumatol*. 2012 Apr;52(2):252–9.
64. Rocha OM da, Batista A de AP, Maestá N, Burini RC, Laurindo IMM. Sarcopenia da caquexia reumatoide: conceituação, mecanismos, consequências clínicas e tratamentos possíveis. *Rev Bras Reumatol*. 2009 Jun ;49(3):288–301.
65. Zoico E, Roubenoff R. The Role of Cytokines in Regulating Protein Metabolism and Muscle Function. 2002;60(2):39–51.
66. Lee T-P, Chiang B-L. Sex differences in spontaneous versus induced animal models of autoimmunity. *Autoimmun Rev*. 2012 May;11(6-7):A422–9.
67. Page CE, Smale S, Carty SM, Amos N, Lauder SN, Goodfellow RM, et al. Interferon- $\gamma$  inhibits interleukin-1 $\beta$ -induced matrix metalloproteinase production by synovial fibroblasts and protects articular cartilage in early arthritis. *Arthritis Res*. 2010;
68. Alarcón-riquelme ME. Diseases. *Analysis*. 2005;55–67.
69. Woo P, Ansell BM, White PH, for Rheumatology BS. Paediatric rheumatology update. Oxford University Press; 1990.
70. Chaud DMA, Hil rio MOE, Yanaguibashi G, Amancio OMS. [Dietetic and anthropometric assessment in juvenile rheumatoid arthritis patients]. *Rev Assoc Med Bras*;49(2):181–4.
71. Rall LC, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology (Oxford)*. 2004 Oct;43(10):1219–23.
72. Plata-Salamán CR, Oomura Y, Kai Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res*. 1988 May 10;448(1):106–14.

73. Castellero E, Martín AI, López-Menduiña M, Villanúa MA, López-Calderón A. Eicosapentaenoic acid attenuates arthritis-induced muscle wasting acting on atrogenin-1 and on myogenic regulatory factors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009 Nov;297(5):R1322–31.
74. Gershwin ME, Borchers AT, Keen CL. Phenotypic and functional considerations in the evaluation of immunity in nutritionally compromised hosts. *J Infect Dis*. 2000 Sep;182 Suppl S108–14.
75. Mooney R a, Sampson ER, Lerea J, Rosier RN, Zuscik MJ. High-fat diet accelerates progression of osteoarthritis after meniscal/ligamentous injury. *Arthritis Res Ther*. BioMed Central Ltd; 2011 Jan;13(6):R198.
76. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*. 1991 Sep;54(3):438–63.
77. Almeida VV De. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6 : importância e ocorrência em alimentos. 2006;19(6):761–70.
78. Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C. Fatty acids from fish : the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. 2010;68(5):280–9.
79. Kremer JM. n-3 fatty acid supplements in rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr*. 2000 Jan;71(1 Suppl):349S–51S.
80. Kremer JM, Lawrence DA, Jubiz W, DiGiacomo R, Rynes R, Bartholomew LE, et al. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. Clinical and immunologic effects. *Arthritis Rheum*. 1990 Jun ;33(6):810–20.
81. Cunha CA, Lira FS, Rosa Neto JC, Pimentel GD, Souza GIH, da Silva CMG, et al. Green tea extract supplementation induces the lipolytic pathway, attenuates obesity, and reduces low-grade inflammation in mice fed a high-fat diet. *Mediators Inflamm*. 2013 Jan;2013:635470.
82. Lee IS, Shin G, Choue R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. *Endocr J*. 2010 Jan;57(1):39–50.
83. McDougall J, Bruce B, Spiller G, Westerdahl J, McDougall M. Effects of a very low-fat, vegan diet in subjects with rheumatoid arthritis. *J Altern Complement Med*. 2002 Feb;8(1):71–5.
84. Lee H, Lee IS, Choue R. Obesity, inflammation and diet. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2013 Sep;16(3):143–52.
85. Liu S, Manson JE, Buring JE, Stampfer MJ, Willett WC, Ridker PM. Relation between a diet with a high glycemic load and plasma concentrations of high-sensitivity C-reactive protein in middle-aged women. *Am J Clin Nutr*. 2002 Mar;75(3):492–8.



86. Qi L, Rimm E, Liu S, Rifai N, Hu FB. Dietary glycemic index, glycemic load, cereal fiber, and plasma adiponectin concentration in diabetic men. *Diabetes Care*. 2005 May;28(5):1022–8.
87. Mohanty P, Hamouda W, Garg R, Aljada A, Ghanim H, Dandona P. Glucose challenge stimulates reactive oxygen species (ROS) generation by leucocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Aug;85(8):2970–3.
88. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, et al. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care*. 2002 Aug;25(8):1439–43.
89. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation*. 2002 Oct 15;106(16):2067–72.
90. Le LT, Sabaté J. Beyond meatless, the health effects of vegan diets: findings from the Adventist cohorts. *Nutrients*. 2014 Jun ;6(6):2131–47.
91. Tonstad S, Stewart K, Oda K, Batech M, Herring RP, Fraser GE. Vegetarian diets and incidence of diabetes in the Adventist Health Study-2. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013 May;23(4):292–9.
92. Cruz B, Gomes-Marcondes MCC. Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by Walker-256 tumour. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Jan;12:2.
93. Pereira MG, Silva MT, Carlassara EOC, Gonçalves D a, Abrahamsohn P a, Kettelhut IC, et al. Leucine supplementation accelerates connective tissue repair of injured tibialis anterior muscle. *Nutrients*. 2014 Jan;6(10):3981–4001.
94. Marcora S, Lemmey A, Maddison P. Dietary treatment of rheumatoid cachexia with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, glutamine and arginine: a randomised controlled trial. *Clin Nutr*. 2005 Jun;24(3):442–54.
95. Mosoni L, Gatineau E, Gatellier P, Migné C, Savary-Auzeloux I, Rémond D, et al. High Whey Protein Intake Delayed the Loss of Lean Body Mass in Healthy Old Rats, whereas Protein Type and Polyphenol/Antioxidant Supplementation Had No Effects. *PLoS One*. 2014 Jan;9(9):e109098.
96. Caparrós T, Lopez J, Grau T. Early enteral nutrition in critically ill patients with a high-protein diet enriched with arginine, fiber, and antioxidants compared with a standard high-protein diet. The effect on nosocomial infections and outcome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*.;25(6):299–308; discussion 308–9.
97. Van Zanten ARH, Sztark F, Kaisers UX, Zielmann S, Felbinger TW, Sablotzki AR, et al. High-protein enteral nutrition enriched with immune-modulating nutrients vs standard high-protein enteral nutrition and nosocomial infections in the ICU: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014 Aug 6;312(5):514–24.
98. Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, Myers LK, Brand DD. Collagen-induced arthritis. *Curr Protoc Immunol*. 2010 Apr;Chapter 15:Unit 15.5.1–25.

99. 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*. 2005 Jun 15;174(12):7894–903.
100. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*. 2008 Dec;27(6):793–9.
101. Laviano A, Gleason JR, Meguid MM, Yang ZJ, Cangiano C, Rossi Fanelli F. Effects of intra-VMN mianserin and IL-1ra on meal number in anorectic tumor-bearing rats. *J Investig Med*. 2000 Jan;48(1):40–8.
102. Kent S, Bret-Dibat JL, Kelley KW, Dantzer R. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. *Neurosci Biobehav Rev*. 1996 Jan;20(1):171–5.
103. Bluthé RM, Dantzer R, Kelley KW. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Res*. 1992 Feb 28;573(2):318–20.
104. De Oliveira Nunes Teixeira V, Filippin LI, Viacava PR, de Oliveira PG, Xavier RM. Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013 Dec 1;238(12):1421–30.
105. Gómez-SanMiguel AB, Martín AI, Nieto-Bona MP, Fernández-Galaz C, López-Menduiña M, Villanúa MÁ, et al. Systemic  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone administration decreases arthritis-induced anorexia and muscle wasting. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 May 15;304(10):R877–86.
106. Ozawa J, Kurose T, Kawamata S, Yamaoka K. Morphological changes in hind limb muscles elicited by adjuvant-induced arthritis of the rat knee. *Scand J Med Sci Sports*. 2010 Feb;20(1):e72–9.
107. Hartog A, Hulsman J, Garssen J. Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis. *BMC Musculoskelet Disord*. 2009 Jan;10:59.
108. Okiura T, Nagatomo F, Gu N, Taguchi Y, Morimatsu F, Ishihara A. Bone density of the femur and fiber cross-sectional area and oxidative enzyme activity of the tibialis anterior muscle in type II collagen-induced arthritic mice. *J Physiol Sci*. 2008 Aug;58(4):221–7.
109. Castellero E, Martín AI, López-Menduiña M, Granado M, Villanúa MA, López-Calderón A. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Oct 15;309(1-2):8–16.
110. Castellero E, Nieto-Bona MP, Fernández-Galaz C, Martín AI, López-Menduiña M, Granado M, et al. Fenofibrate, a PPAR $\alpha$  agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 May;300(5):E790–9.

111. Filippin LI, Teixeira VN, Viacava PR, Lora PS, Xavier LL, Xavier RM. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013 Feb 7;
112. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide*;21(3-4):157–63.
113. Wang Z, Chen Z, Yang S, Wang Y, Huang Z, Gao J, et al. Berberine Ameliorates Collagen-Induced Arthritis in Rats Associated with Anti-inflammatory and Anti-angiogenic Effects. *Inflammation*. 2014 May 7;
114. Roubenoff R, Walsmith J, Lundgren N, Snyderman L, Dolnikowski GJ, Roberts S. Low physical activity reduces total energy expenditure in women with rheumatoid arthritis: implications for dietary intake recommendations. *Am J Clin Nutr*. 2002 Oct 1;76(4):774–9.
115. Jurcovicova J. Glucose transport in brain - effect of inflammation. *Endocr Regul*. 2014 Jan;48(1):35–48.
116. O'Neill LAJ, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature*. 2013 Jan 17;493(7432):346–55.
117. Palsson-McDermott EM, O'Neill L a J. The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. *Bioessays*. 2013 Sep 20;965–73.
118. Rössner S, Löfmark C. Dyslipoproteinaemia in patients with active, chronic polyarthritis. A study on serum lipoproteins and triglyceride clearance (intravenous fat tolerance test). *Atherosclerosis*. 1977 Sep;28(1):41–52.
119. Lakatos J, Hárságyi A. Serum total, HDL, LDL cholesterol, and triglyceride levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem*. 1988 Apr 21(2):93–6.
120. Marangoni RG, Hayata AL, Borba EF, Azevedo PM, Bonfá E, Schainberg CG. Decreased high-density lipoprotein cholesterol levels in polyarticular juvenile idiopathic arthritis. *Clinics (Sao Paulo) [Internet]*. 2011 Jan [cited 2014 May 15];66(9):1549–52. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3164402&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
121. Castellote C, Castell M, Ramos-romero S, Pe FJ. Effect of cocoa-enriched diets on lymphocytes involved in adjuvant arthritis in rats. 2012;378–87.
122. De Castro CA, Natali AJ, Cardoso LM, Ferreira-Machado AB, Novello AA, da Silva KA, et al. Aerobic exercise and not a diet supplemented with jussara açaí (*Euterpe edulis Martius*) alters hepatic oxidative and inflammatory biomarkers in ApoE-deficient mice. *Br J Nutr*. 2014 Aug;112(3):285–94.
123. Rodrigues PO, Martins S V, Lopes PA, Ramos C, Miguéis S, Alfaia CM, et al. Influence of feeding graded levels of canned sardines on the inflammatory markers and tissue fatty acid composition of Wistar rats. *Br J Nutr*. 2014 Aug;112(3):309–19.

124. Hamaguchi K, Itabashi A, Kuroe Y, Nakano M, Fujimoto E, Kato T, et al. Analysis of adipose tissues and stromal vascular cells in a murine arthritis model. *Metabolism*. Elsevier Inc.; 2012;61(12):1687–95.
125. Brunner AM, Henn CM, Drewniak EI, Lesieur-Brooks A, Machan J, Crisco JJ, et al. High dietary fat and the development of osteoarthritis in a rabbit model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Jun;20(6):584–92.
126. Griffin TM, Fermor B, Huebner JL, Kraus VB, Rodriguiz RM, Wetsel WC, et al. Diet-induced obesity differentially regulates behavioral, biomechanical, and molecular risk factors for osteoarthritis in mice. *Arthritis Res Ther*. 2010 Jan;12(4):R130.
127. Bosaeus I, Daneryd P, Svanberg E, Lundholm K. Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients. *Int J Cancer*. 2001 Aug 1;93(3):380–3.
128. Aversa Z, Bonetto A, Costelli P, Minero VG, Penna F, Baccino FM, et al.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) attenuates muscle and body weight loss in experimental cancer cachexia. *Int J Oncol*. 2011 Mar;38(3):713–20.
129. May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A, Abumrad NN. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am J Surg*. 2002 Apr;183(4):471–9.
130. Clark RH, Feleke G, Din M, Yasmin T, Singh G, Khan FA, et al. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*;24(3):133–9.
131. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem J*. 2007 Oct 1;407(1):113–20.
132. Mercier S, Breuillé D, Mosoni L, Obled C, Patureau Mirand P. Chronic inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats. *J Nutr*. 2002 Jul;132(7):1921–8.

## 7 ARTIGO EM INGLÊS

**Artigo encaminhado para British Journal of Nutrition**

**Rats with collagen-induced arthritis show a food preference for a high-protein diet**

**Running title:** Diet selection in experimental arthritis

**Authors:**

Eduarda Correa Freitas <sup>1,2</sup>, Priscila Schmidt Lora <sup>2,3</sup>, Vivian de Oliveira Nunes Teixeira <sup>1,2</sup>, Lucécia Fátima Souza <sup>4</sup>, Sandra Helena Machado <sup>5</sup>, Mirian Farinon <sup>1,2</sup>, Patrícia Gnieslaw de Oliveira <sup>2</sup>, Ricardo Machado Xavier<sup>2,6</sup>

**Keyword:** CIA rats, diet selection, high protein diet, chronic inflammation, eating behavior

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Post-graduate Program in Medical Science, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

<sup>2</sup>Laboratory of Autoimmune Disease, Experimental Clinical Research, Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

<sup>3</sup>Assistant Professor, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS).

<sup>4</sup>Post-graduate Program in Phytotecnic, (UFRGS).

<sup>5</sup>Associated Professor, UNISINOS.

<sup>6</sup>Associated Professor, Reumatology Division, Internal Medicine, UFRGS.

**Corresponding author:** Ricardo Machado Xavier MD, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rheumatology Division

Rua Ramiro Barcelos, 2350 – CEP 90035-003

Bairro Rio Branco – Porto Alegre – Rio Grande do Sul – Phone (55-51) 3359.8340

Email: rmaxavier@hcpa.ufrgs.br

## ABSTRACT

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory disease that is associated with changes in energy and protein metabolism. The objective of our study was to investigate food preferences during the development of chronic inflammation in collagen-induced arthritis (CIA) in rats. Female Wistar rats were separated into two groups, control (CO) and CIA, and were simultaneously exposed to four different diets (standard, hypercaloric, hyperlipidic and hyperproteic diets). During the experiment, we observed food consumption, body weight, muscle weight and biochemical parameters. The significance level was set at  $p < 0.05$ , and data were analyzed using two-way ANOVA and *t*-test. To the best of our knowledge, this is the first time that an increased high-protein diet has been reported in a CIA model. In accordance with the literature, CIA animals exhibited reduced voluntary total food intake, body weight and muscle weight compared with the CO animals. In addition, decreased serum creatinine, triglyceride and glucose levels were observed in the CIA group. Chronic inflammatory conditions such as rheumatoid arthritis cause changes in protein and energy metabolism, and these physiological alterations may induce a change in food choice.

**Keyword:** CIA rats, diet selection, high protein diet, chronic inflammation, eating behavior

## INTRODUCTION

Feeding control and behavior is influenced by external and internal factors. Examples of external factors are food availability, cultural habits and food appearance (1). Cellular metabolism (2) and neural control (3) account for most of the internal factors. Inflammation is known to drive significant changes in metabolism (4–7), and these changes may influence food choice (8).

Significant changes in homeostasis have been demonstrated in patients with rheumatoid arthritis (RA), a chronic and systemic inflammatory condition. Rall and Roubenoff made important observations about RA energy and protein metabolism. First, they demonstrated that RA patients have a lower body cell mass (BCM) and an altered total daily energy expenditure (TEE), with higher resting energy expenditure (REE) but lower energy expenditure of physical activity (EEPA) (9). Second, the same group also showed higher

protein turnover in RA patients (10), and this hypermetabolism was related to an altered proinflammatory cytokine profile, including higher levels of tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ) (11).

Increased levels of adipokines (leptin and resistin) and proinflammatory cytokines (IL-6) have been described in experimental research on mice undergoing a shift from a high-fat to a high-carbohydrate diet (12). The high-fat diet induced down-regulation of antibody subunits and of major histocompatibility complex II components that might reflect an impaired immune defense and immune tolerance (13). By contrast, a high-protein diet decreases loss of lean body mass in healthy older rats, independent of the protein source (14). These studies demonstrated that different diets can cause changes in metabolism and inflammatory response.

We hypothesized that the hypermetabolism observed in RA patients could impact feeding behavior. To investigate food preferences during chronic inflammation, we used an animal model of arthritis, exposed those animals to four different diets (normal, hypercaloric, hyperlipidic and hyperproteic) and observed food consumption before and after arthritis induction.

## **EXPERIMENTAL METHODS**

### **Animals**

Because autoimmune diseases such as RA are more prevalent in females than in males, 21 female adult Wistar rats (150–200 g) were used in our experiments. Animals were housed in a temperature-controlled room at 23°C under an inverted photoperiod regimen of 12: 12 h light: dark cycle (lights were turned on at 18:00 h) with water and food available *ad libitum* for 27 days (7 days before induction arthritis and 20 days after induction). Animals were maintained in accordance with local guidelines, and all experimental procedures were approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **Diets**

All four diets were available to all animals throughout the experiment. The compositions of the diets (as described in Table 1) were as follows: a standard diet for adult Wistar rats (Nuvilab®, Sogorb, São Paulo) (15), a high carbohydrate diet (standard diet + 10% sucrose),

a high lipid diet (standard diet + 10% soybean oil + 0.0014% [g/g] butylated hydroxytoluene [BHT]), and a high protein diet (standard diet + 10% albumin). Pellets were ground, mixed with the respective dietary additions with water and were again pelletized.

Food intake, body weight and diets were measured every three days. Diets were offered separately in the cage, and the position of food was changed at each measurement. The results were plotted as the total food intake and the percentage of each diet consumed.

**Table 1. Composition of the experimental diets (g/kg).**

Ingredients (g/kg)	Diets (%)			
	Standard	High protein	High lipid	High carbohydrate
protein	22	24,2	22	13,9
fat	4	4	4,4	4
carbohydrate	74	66,9	65,3	82,1
Total %	100	100	100	100
KJ/energy	1758,46	1758,46	1935,56	2094,24

### **Collagen-Induced Arthritis (CIA)**

Disease protocols were based on previous studies (16). Two groups were used in the study: a control group (CO, n=10) and a CIA group (CIA, n=11). CIA animals were immunized on day 0 with an intradermal injection at the base of the tail with 0.1 ml emulsion containing 2 mg/ml bovine type II collagen (CII, Chondrex Inc., Redmond, WA, USA) and complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma, St. Louis, MO, USA). During the procedure, rats were anesthetized with isoflurane (1 ml/ml, Abbott Lab., Abbott Park, IL, USA). Animals were monitored for 26 days (6 days before immunization with CII and 20 days after) and were then killed by decapitation under anesthesia.

We used a standard method of arthritis scoring to evaluate the degree of swelling and erythema of the paws, in which 0 was normal, 1 was mild swelling and erythema, 2 was moderate swelling and erythema, 3 was severe swelling and erythema plus loss of function in 2 paws and 4 was total loss of function in a minimum of 3 paws (17).



### Biochemistry and muscle analysis

Blood samples were collected from the retro-orbital venous plexus under anesthesia for biochemical analyses at the following time points: day -6 (baseline), day 0 (arthritis induction), day 15 (acute inflammation) and day 20 (end of experiment). After centrifugation at 400×g for 5 min, supernatants were harvested and stored at -20°C. Glucose, triglycerides, total cholesterol and creatinine were measured using colorimetric enzymatic assay kits purchased from Labtest-Diagnostic (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). The gastrocnemius and tibialis anterior were collected after death and weighed.

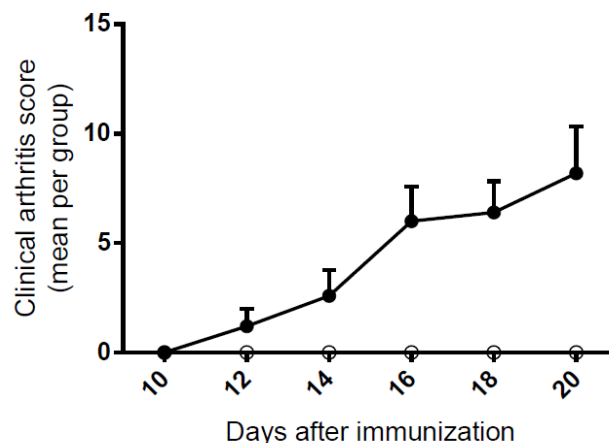
### Statistical analysis

Data are expressed as the means and standard errors (SE). The arthritis clinical score, food intake, body weight and serum biochemistry metabolites were analyzed using repeated-measures two-way ANOVA (Bonferroni post-hoc test). The gastrocnemius, soleus and tibialis anterior relative muscle weight were analyzed using a *t*-test. Statistical significance was defined as a *p* value less than 0.05. Data were analyzed using the statistical package GraphPad Prism version 6.0 (San Diego, California, USA).

## RESULTS

### The incidence and severity of CIA

Clinical signs of arthritis were absent in the control group and appeared in CIA rats 12 days after immunization (Figure 1), when the CIA incidence was 45%. At 18 days, all animals had a clinical signs of arthritis (data not shown).

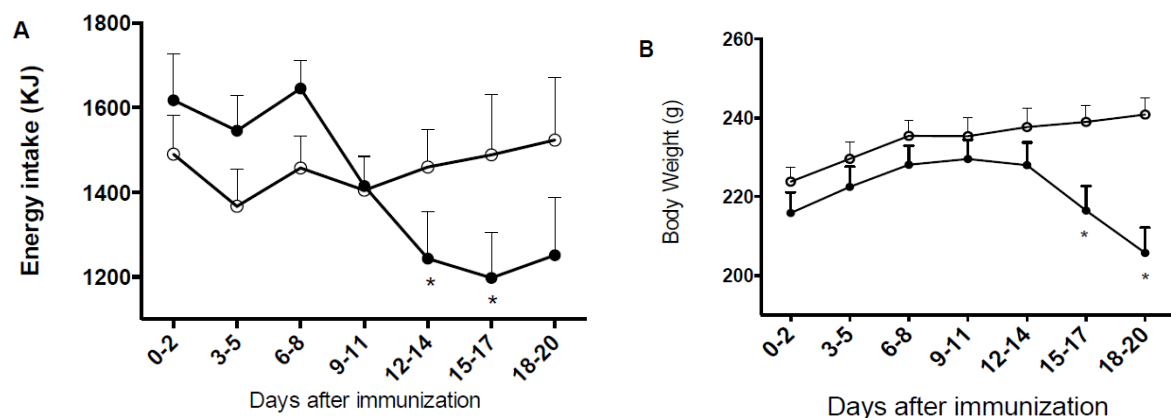


**Figure 1. Arthritis clinical score.** Development of disease after arthritis induction in rats with bovine type II collagen. Two weeks after immunization, the arthritis clinical score was determined as described in the Materials and Methods. Open circles represent CO animals, and black circles represent CIA animals for each day. Data are presented as means  $\pm$  SE;  $p < 0.05$  (two-way ANOVA, CO vs. CIA).

### Food consumption and body weight changes

The food intake of the CIA group decreased significantly throughout the experiment. The greatest difference was observed on day 12 ( $98.3 \pm 10.8$  g control group vs.  $73.5 \pm 15.9$  g CIA group;  $p < 0.05$ ; Figure 2a). At the same time point, food ingestion in the CIA group was 25% less than the CO group.

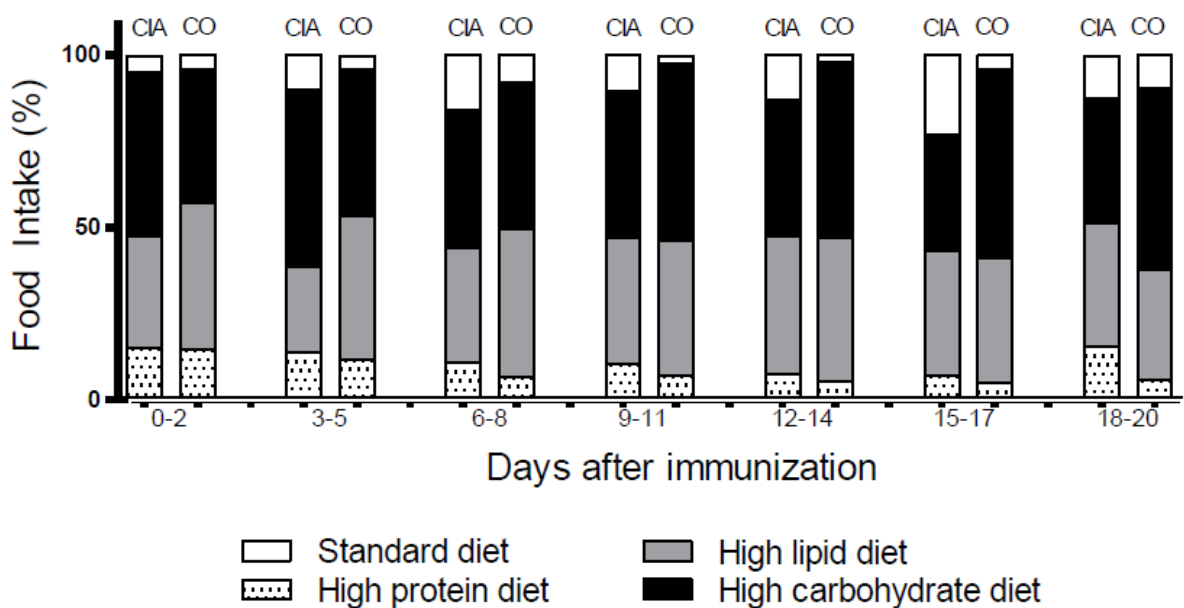
On day 15, CIA rats had lost 10% of their body weight ( $239.0 \pm 13.1$  g CO group vs.  $216.5 \pm 20.5$  g CIA group;  $p < 0.001$ ; Figure 2b). The CIA rats continued losing weight and had lost 15% of body weight by the end of the experiment, an important sign of cachexia. Before arthritis induction, there were no significant differences in total food intake or body weight (data not shown).



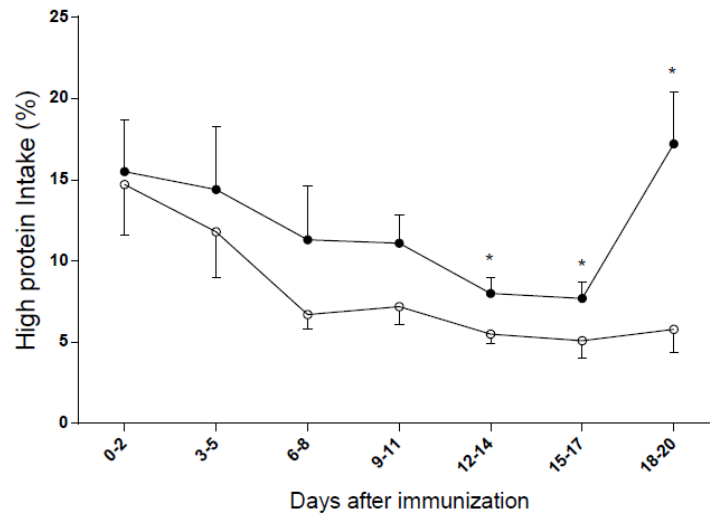
**Figure 2. The CIA group showed reduced total food intake and body weight in response to arthritis induction.** (A) The CIA group showed reduced total food intake from day 12 after disease induction by immunization (two-way ANOVA;  $p < 0.05$ ). (B) In the CIA rats, body weight progressively decreased beginning on day 15 after immunization. Open circles represent CO rats, and black circles represent CIA rats for each day. Data are presented as means  $\pm$  SE; two-way ANOVA, CO vs. CIA;  $p < 0.05$ .

### Animal eating behavior

During the experiment, both groups ate all diets, but arthritis induction disrupted feeding behavior. The percentages of each diet available are shown in figure 3 and table S1 for both groups. Among the diets offered, CIA rats significantly increased the proportion of intake of the high-protein diet starting on day 12 ( $8.0 \pm 3.0\%$  CIA group vs.  $5.5 \pm 1.8\%$  CO group;  $p < 0.05$ ; Figure 4). A greater difference compared with the CO group was observed on day 18 ( $17.2 \pm 10.0\%$  CIA group vs.  $5.8 \pm 4.6\%$  CO group;  $p < 0.05$ ). Coincidentally, day 18 was the time point when the arthritis incidence was 100%. In contrast, CO animals reduced their intake of the high-protein diet over time.



**Figure 3. Total food intake during the experiment.** Animals were exposed to four different diets, and intake was measured over time. The percentages of each of the four diets eaten by the CO and CIA groups during the experiment were calculated. Fill patterns indicate the following: grey, high-lipid diet; black dots, high-protein diet; black, high-carbohydrate diet; and white, standard diet. Data are shown as percentages.

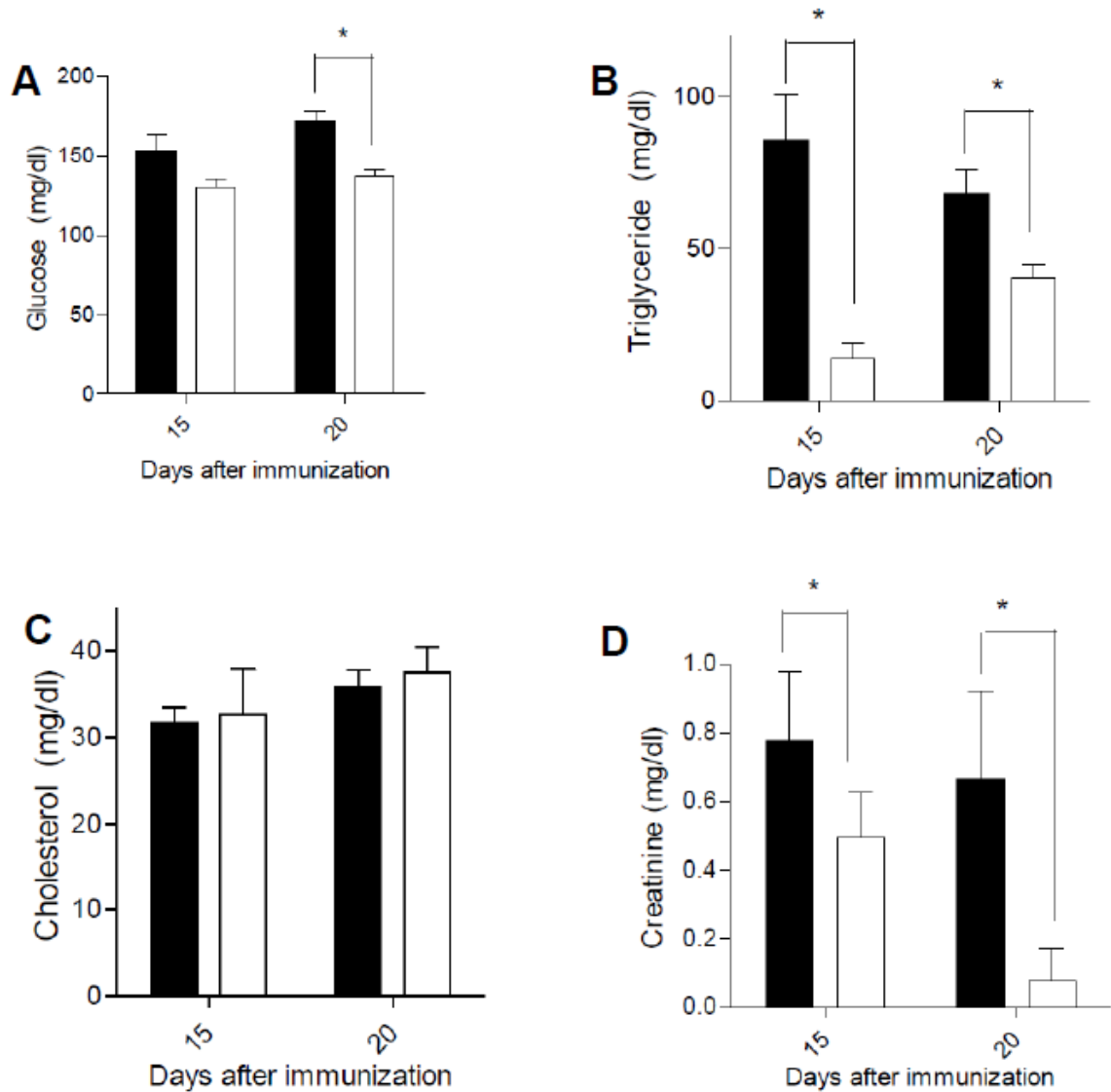


**Figure 4. The CIA group increased intake of the high-protein diet.** The CIA group ate significantly more of the high-protein diet compared with the CO group. On day 18 after immunization, the CIA rats exhibited the greatest difference in intake of the high-protein diet compared with the CO group. Open circles represent CO rats, and black circles represent CIA rats for each day. Data are presented as means  $\pm$  SE; two-way ANOVA, CO vs. CIA;  $p < 0.05$ .

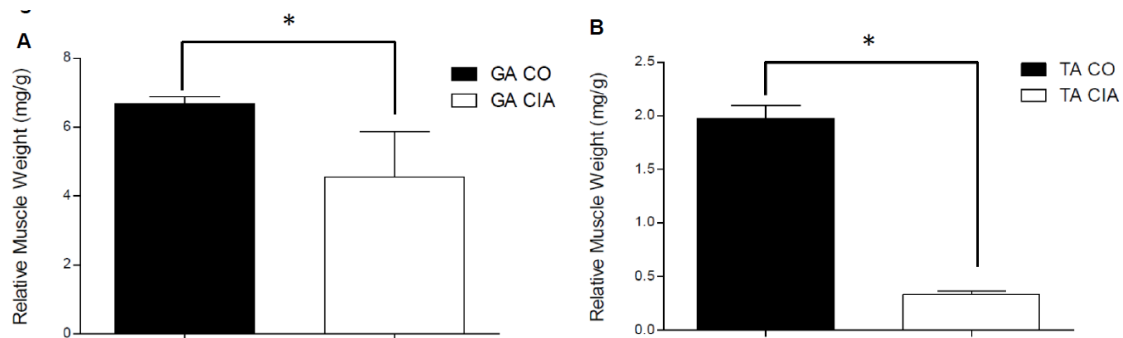
### Serum metabolites and muscle wasting

CIA animals exhibited metabolic changes after arthritis induction (Figure 5). On day 15, CIA animals had lower levels of triglycerides ( $15.5 \pm 12.3$  mg/dl vs.  $77.5 \pm 29.6$  mg/dl; Figure 5b) and creatinine ( $0.45 \pm 0.13$  mg/dl vs.  $0.75 \pm 0.2$  mg/dl; Figure 5d) compared to CO animals. At the end of the experiment (20 days), CIA rats had lower levels of triglycerides ( $36.0 \pm 13.8$  mg/dl vs.  $66.0 \pm 25.0$  mg/dl; Figure 5b) and glucose ( $127.0 \pm 14.1$  mg/dl vs.  $156.0 \pm 24.4$  mg/dl; Figure 5a) compared to CO animals. However, there was no change in total cholesterol levels (Figure 5c). Levels of triglycerides, total cholesterol, glucose and creatinine were measured before the introduction of diet and before induction of arthritis and showed no statistically significant difference (data not shown).

Additionally, the gastrocnemius (GA) and tibialis anterior (TA) weight and relative muscle weight (muscle weight in mg divided by total animal weight in g) were lighter in CIA rats (GA =  $4.6 \pm 0.58$  mg vs.  $6.68 \pm 0.09$  mg,  $p < 0.01$ , Figure 6a; TA =  $0.33 \pm 0.01$  mg vs.  $1.9 \pm 0.05$  mg,  $p < 0.01$ , Figure 6b), suggesting that muscle wasting had occurred in the CIA group.



**Figure 5. After arthritis induction, the CIA group showed changes in their metabolic profile.** After immunization, CIA rats exhibited reduced serum glucose, triglyceride and creatinine levels. White bars represent CIA rats, and black bars represent CO rats for each day. Data are presented as means  $\pm$  SE; two-way ANOVA, CO vs. CIA;  $p < 0.05$ .



**Figure 6. The gastrocnemius and tibialis anterior relative muscle weights were lighter in CIA animals.** After death, the gastrocnemius and tibialis anterior muscles of both groups were weighed. CIA rats exhibited less relative muscle weight in all muscles. White bars represent CO rats, and black bars represent CIA rats. Data are presented as means  $\pm$  SE; t-test, CO vs. CIA;  $p < 0.05$ .

## DISCUSSION

In this study, the main effect demonstrated was that animals with CIA exhibited an increased intake of the high-protein diet, which might indicate a relationship between chronic inflammatory conditions and metabolism. To the best of our knowledge, this study marks the first time that food choice has been evaluated for arthritis or in any other animal model of chronic inflammation. Generally, studies related to ours have exposed animals to a modified diet and correlated diet to disease outcomes. We hypothesize that increased protein diet intake may be a response to the reduction in body weight and skeletal muscle loss that result from chronic inflammation in CIA.

A previous consensus defined the initial sign of cachexia, a complex syndrome associated with the activation of an inflammatory response, as unintentional weight loss greater than 5% of body weight. In addition to reduced body weight, cachexia also involves muscle wasting, reduced muscle strength, fatigue, reduced lean mass and anorexia (18). Additionally, it is clearly associated with poor outcomes in RA (9).

Arthritic animals showed markedly reduced body weight in the second week after immunization, and weights remained lower than the baseline values prior to immunization until the end of the experiment. At this time, animals had experienced a 15% reduction in body weight, indicating severe cachexia.

Moreover our animals exhibited signs of anorexia and decreased voluntary food intake. Anorexia has been related to the CIA model and other inflammatory conditions. Hartog 2009 had previously demonstrated significantly reduced food intake in CIA animals (19). The mechanism involved in anorexia-cachexia is the central nervous system-related food regulatory mechanism. Dopamine may respond to interleukin-1 (IL-1), an important proinflammatory cytokine that is involved in RA pathogenesis (20). IL-1 and TNF- $\alpha$  have been linked not only to food regulatory mechanisms but also weight loss in rats submitted to an intradermal injection of lipopolysaccharides (LPS) (21,22). Therefore, this cytokine might act directly on the central nervous system to suppress feeding, and this effect may be operative during acute and chronic disease (23).

Teixeira et al (24), in a similar experiment on CIA animals, demonstrated a reduction of 20% relative muscle weight. Furthermore, in that study, a reduction of 49% in myofiber area was demonstrated, and together these findings were related to muscle tissue loss. We also found a 32% reduction in relative muscle weight, indicating that muscle wasting in CIA animals is a hallmark of cachexia syndrome. Others have also demonstrated that muscle wasting (19,25–29), loss of body weight (25,26,29) and reduced food intake (26,27,30,31) occur in arthritis models. Finally, we suggested that the increased high-protein diet intake may be a response to the reduced body weight and muscle wasting that result from chronic inflammation in CIA. Mosoni et al demonstrated that increased protein intake decreases loss of lean body mass in healthy older rats, independent of protein source (14).

Although we did not measure pro-inflammatory mediators, increased interleukin-6 (IL-6) and TNF- $\alpha$  levels have been reported in our previous work and by others characterizing CIA (24,26,32–34). In summary, loss of body weight, increased muscle wasting and reduced food intake may classify our animals as cachectic. Finally, we hypothesized that cachexia might bias food choice towards a high-protein diet.

Indeed, cachectic metabolic changes driven by inflammation may be indicated by disturbed serum metabolite levels. For example, creatinine, a blood parameter that has been linked to muscle wasting, was also reduced in our CIA rats and in a previous study of CIA in monkeys (26). Creatinine has also been directly correlated with lean mass (26).

Roubenoff et al (9,35–37) previously described a significant increase in REE in RA patients. Increased energy expenditure by a cell is related to an increased rate of cell proliferation that is common in inflammation (e.g., monocytes, lymphocytes and macrophages) (38,39). As a consequence of higher rates of REE, cells increase rates of glucose consumption (40). Indeed, CIA rats exhibited lower levels of serum glucose.

Other blood parameters, such as total cholesterol and triglycerides, were analyzed in our rats. CIA rats exhibited lower levels of serum triglycerides, but the total cholesterol levels were not different. These biochemical markers have appeared normal in patients with early active RA and high-grade inflammation (41–43). Finally, low triglyceride levels in RA may be related to increased REE associated with this disease.

Studies exposing the animals to inflammation and diets (44–46), as well as feeding them a high-fat diet, have been well described. A high-fat diet has been associated with significantly exacerbated joint destruction and aggravated pathology in a murine arthritis model (47). Additionally, a high-fat diet has been linked to osteoarthritis, accelerated development of disease, decreased musculoskeletal force generation and altered motor function (48–50).

The sense of taste and smell allow us to separate undesirable or even lethal foods from those that are pleasant to eat and nutritious. These senses also elicit physiological responses that are involved in digestion and utilization of foods. The importance of taste lies in the fact that it allows a person to select food in accordance with desires and often in accordance with the body tissues' metabolic need for specific substances (51).

Moreover, choices or preferences for certain foods associated with RA have not yet been published. Similarly, voluntarily increased protein intake has not been correlated with inflammation or cachexia (52). However, dietary supplementation with  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate has been proposed as a treatment of cachexia in cancer (53,54), AIDS (55) and RA (56) patients. Indeed, dietary supplementation with branched-chain amino acids (BCAAs) in mice bearing a cachexia-inducing tumor, and leucine in particular, has a protective effect on skeletal muscle atrophy. Leucine acts to stimulate protein synthesis and reduce protein degradation (57).

Finally, adults with RA have increased whole-body protein breakdown that correlates with growth hormone, glucagon and TNF- $\alpha$  levels (10). Additionally, chronic inflammation in rats

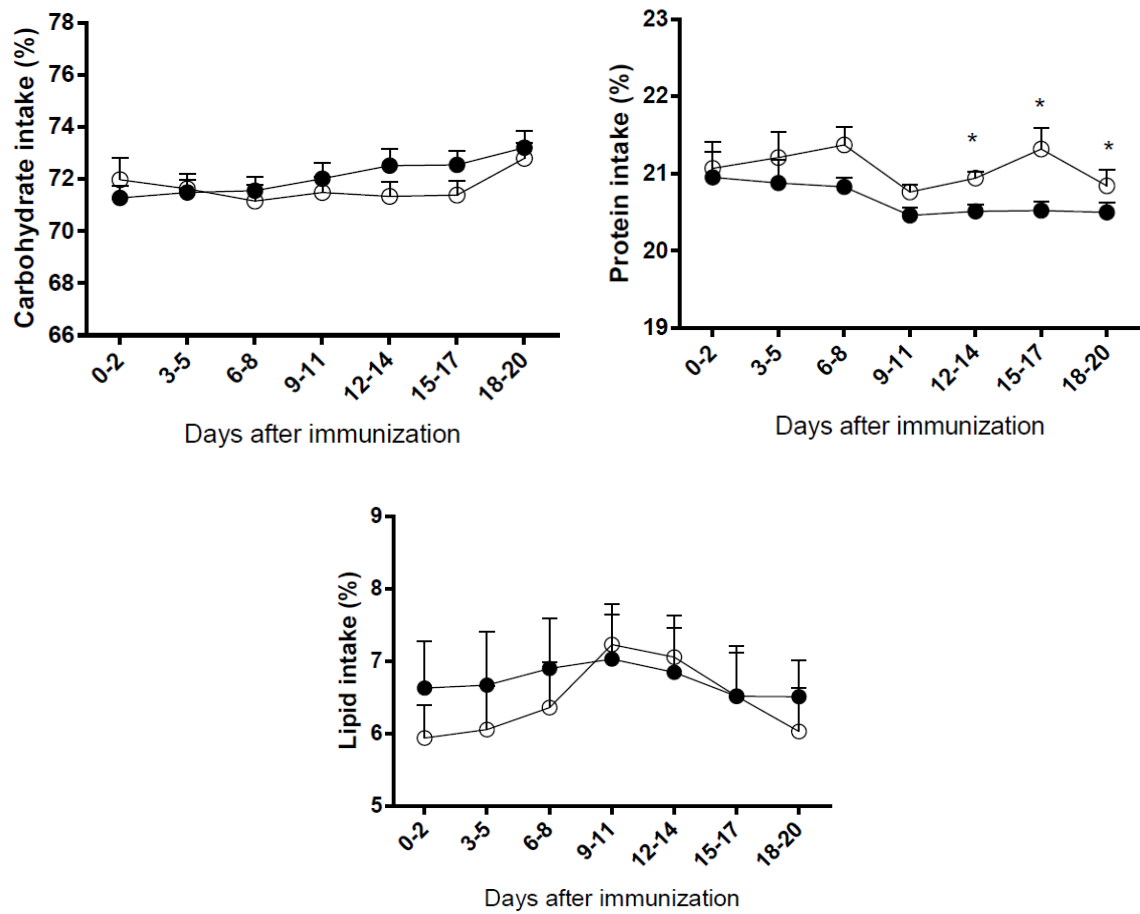


induces a stimulation of protein metabolism in several splanchnic organs and reduced protein synthesis and muscle degradation (58). These extra-articular features in arthritis, along with changes in protein and energy metabolism and physiological alterations, may induce altered food choice.

The findings of this study suggest that an increased consumption of a high-protein diet may be related to muscle wasting and increased protein turnover, which are signs of cachexia. Finally, this study suggests that dietary modification of protein intake, rich in different amino acids, might be one strategy to reduce extra-articular features in RA.

**Table S1. Total food intake during the experiment (in percentages).**

Time (Days)		Total food intake (g)	Standart diet (g)	High Carbohydrate diet (g)	High Lipid diet (g)	High Protein diet (g)
0-2	CIA	105.378 (17.22)	5.78 (7.07)	48.65 (28.95)	25.34 (16.16)	14.80 (10.56)
	CO	105.90 (17.48)	4.60 (3.32)	45.67 (16.48)	44.73 (17.22)	15.18 (8.62)
3-5	CIA	95.06 (9.96)	10.81 (18.37)	40.05 (20.08)	31.98 (18.39)	13.37 (11.40)
	CO	98.11 (17.83)	3.91 (4.37)	41.32 (23.38)	42.96 (24.82)	11.06 (7.35)
6-8	CIA	101.98 (12.12)	11.65 (13.49)	41.85 (18.73)	35.83 (17.92)	10.64 (9.20)
	CO	102.15 (16.37)	6.44 (8.30)	50.86 (16.01)	41.29 (20.28)	6.50 (2.01)
9-11	CIA	95.65 (12.36)	9.31 (9.30)	36.00 (24.18)	38.65 (24.20)	10.63 (5.93)
	CO	101.98 (14.48)	1.86 (1.95)	51.06 (25.89)	43.06 (26.21)	7.62 (4.01)
12-14	CIA	76.53 (15.30)	22.67 (11.17)	21.91 (14.15)	28.33 (17.71)	5.79 (2.66)
	CO	99.12 (9.86)	4.15 (4.29)	53.71 (20.63)	35.05 (17.23)	5.48 (2.03)
15-17	CIA	76.59 (25.86)	11.27 (13.61)	20.79 (8.92)	26.82 (15.04)	5.40 (2.82)
	CO	97.66 (19.95)	7.81 (9.43)	50.05 (19.97)	30.93 (20.73)	5.36 (4.01)
18-20	CIA	79.97 (30.47)	5.75 (8.47)	40.83 (25.62)	21.58 (12.80)	15.05 (10.93)
	CO	98.68 (27.08)	9.45 (8.68)	50.50 (23.41)	30.18(23.31)	6.26 (5.77)



**Figure S1. Lipid, carbohydrate and protein intake during the experiment (in percentages).**

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the employees of Unidade de Experimentação Animal (UEA-HCPA).

## FINANCIAL SUPPORT

The study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Evento (FIPE-HCPA).

## COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

## AUTHORSHIP

ECF coordinated the experimental procedures and the manuscript writing. PSL helped conceive the study, participated in its design, coordination, and experimental procedures and helped draft the manuscript. VONT helped of experimental procedures. LFS participated in its design and experimental procedures. SHM helped conceive the study and participated in its design. MF participated in the animal experimentation. PGO participated in the animal experimentation conducted clinical score in the animal experimentation. RMX participated in the study design and coordination and helped draft the manuscript, critically revising it for important intellectual content. All of the authors read and approved the final manuscript.

## ABBREVIATIONS

RA: rheumatoid arthritis; BCM: body cell mass; TEE: total daily energy expenditure; REE: resting energy expenditure; EEPA: energy expenditure of physical activity; TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor; IL1- $\beta$ : Interleukin-1 beta; BHT: butylated hydroxytoluene; CIA: collagen-induced arthritis; CO: control group; CII: bovine type II collagen; CFA: complete Freund's adjuvant; SE: standard error; GA: gastrocnemius muscle; TA: tibialis anterior muscle; IL-6: interleukine-6; BCAA: branched-chain amino acids.

## REFERENCES

1. Furst T, Connors M, Bisogni C a, Sobal J, Falk LW. Food choice: a conceptual model of the process. *Appetite*. 1996 Jun;26(3):247–65.
2. Fitzpatrick M, Young SP. Metabolomics--a novel window into inflammatory disease. *Swiss Med Wkly*. 2013 Jan;143:w13743.
3. Broberger C, McCormick D a. Excitatory effects of thyrotropin-releasing hormone in the thalamus. *J Neurosci*. 2005 Feb 16;25(7):1664–73.
4. Baudrand R, Lian CG, Lian BQ, Ricchiuti V, Yao TM, Li J, et al. Long-term dietary sodium restriction increases adiponectin expression and ameliorates the proinflammatory adipokine profile in obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013 Oct;
5. Greene MW, Burrington CM, Lynch DT, Davenport SK, Johnson AK, Horsman MJ, et al. Lipid Metabolism, Oxidative Stress and Cell Death Are Regulated by PKC Delta in a Dietary Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. *PLoS One*. 2014 Jan;9(1):e85848.

6. Thind K, Jensen MD, Hegarty E, Chen AP, Lim H, Martinez-Santesteban F, et al. Mapping metabolic changes associated with early Radiation Induced Lung Injury post conformal radiotherapy using hyperpolarized (13)C-pyruvate Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging. *Radiother Oncol*. 2014 Jan;
7. Yamashita A, Zhao Y, Matsuura Y, Yamasaki K, Moriguchi-Goto S, Sugita C, et al. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. *PLoS One*. 2014 Jan;9(1):e86426.
8. Grimsley DL. Effects of experience with salty food on salt selection in adrenalectomized rats. *Integr Physiol Behav Sci*.;29(1):17–24.
9. Roubenoff R, Roubenoff R a, Cannon JG, Kehayias JJ, Zhuang H, Dawson-Hughes B, et al. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *J Clin Invest*. 1994 Jun;93(6):2379–86.
10. Rall LC, Rosen CJ, Dolnikowski G, Hartman WJ, Lundgren N, Abad LW, et al. Protein metabolism in rheumatoid arthritis and aging. Effects of muscle strength training and tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum*. 1996 Jul;39(7):1115–24.
11. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jun;7(6):429–42.
12. Lee IS, Shin G, Choue R. Shifts in diet from high fat to high carbohydrate improved levels of adipokines and pro-inflammatory cytokines in mice fed a high-fat diet. *Endocr J*. 2010 Jan;57(1):39–50.
13. Wiśniewski JR, Friedrich A, Keller T, Mann M, Koepsell H. The Impact of High Fat Diet on Metabolism and Immune Defense in Small Intestine Mucosa. *J Proteome Res*. American Chemical Society; 2014 Oct 6;
14. Mosoni L, Gatineau E, Gatellier P, Migné C, Savary-Auzeloux I, Rémond D, et al. High Whey Protein Intake Delayed the Loss of Lean Body Mass in Healthy Old Rats, whereas Protein Type and Polyphenol/Antioxidant Supplementation Had No Effects. *PLoS One*. 2014 Jan;9(9):e109098.
15. Reeves P, Nielsen F, Jr GF. Committee report AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-. *J Nutr*. 1993;1939–51.
16. Rosloniec EF, Cremer M, Kang AH, Myers LK, Brand DD. Collagen-induced arthritis. *Curr Protoc Immunol*. 2010 Apr;Chapter 15:Unit 15.5.1–25.
17. 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*. 2005 Jun;174(12):7894–903.

18. Evans WJ, Morley JE, Argilés J, Bales C, Baracos V, Guttridge D, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* 2008 Dec;27(6):793–9.
19. Hartog A, Hulsman J, Garssen J. Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2009 Jan;10:59.
20. Laviano A, Gleason JR, Meguid MM, Yang ZJ, Cangiano C, Rossi Fanelli F. Effects of intra-VMN mianserin and IL-1ra on meal number in anorectic tumor-bearing rats. *J Investig Med.* 2000 Jan;48(1):40–8.
21. Kent S, Bret-Dibat JL, Kelley KW, Dantzer R. Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 1996 Jan;20(1):171–5.
22. Bluthé RM, Dantzer R, Kelley KW. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on the behavioral effects of lipopolysaccharide in rat. *Brain Res.* 1992 Feb 28;573(2):318–20.
23. Plata-Salamán CR, Oomura Y, Kai Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain Res.* 1988 May 10;448(1):106–14.
24. De Oliveira Nunes Teixeira V, Filippin LI, Viacava PR, de Oliveira PG, Xavier RM. Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Exp Biol Med (Maywood).* 2013 Dec 1;238(12):1421–30.
25. Castellero E, Martín AI, López-Menduiña M, Villanúa MA, López-Calderón A. Eicosapentaenoic acid attenuates arthritis-induced muscle wasting acting on atrogen-1 and on myogenic regulatory factors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009 Nov;297(5):R1322–31.
26. Horai N, Nagaoka T, Higuchi I, Kasai H, Yoshioka T, Umekita Y, et al. Muscle wasting associated with pathologic change is a risk factor for the exacerbation of joint swelling in collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys. *BMC Musculoskelet Disord.* 2013 Jul 9;14(1):205.
27. Gómez-SanMiguel AB, Martín AI, Nieto-Bona MP, Fernández-Galaz C, López-Menduiña M, Villanúa MÁ, et al. Systemic  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone administration decreases arthritis-induced anorexia and muscle wasting. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013 May 15;304(10):R877–86.
28. Ozawa J, Kurose T, Kawamata S, Yamaoka K. Morphological changes in hind limb muscles elicited by adjuvant-induced arthritis of the rat knee. *Scand J Med Sci Sports.* 2010 Feb;20(1):e72–9.
29. Okiura T, Nagatomo F, Gu N, Taguchi Y, Morimatsu F, Ishihara A. Bone density of the femur and fiber cross-sectional area and oxidative enzyme activity of the tibialis anterior muscle in type II collagen-induced arthritic mice. *J Physiol Sci.* 2008 Aug;58(4):221–7.

30. Castellero E, Martín AI, López-Menduiña M, Granado M, Villanúa MA, López-Calderón A. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. *Mol Cell Endocrinol*. 2009 Oct 15;309(1-2):8–16.
31. Castellero E, Nieto-Bona MP, Fernández-Galaz C, Martín AI, López-Menduiña M, Granado M, et al. Fenofibrate, a PPAR{alpha} agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* . 2011 May ;300(5):E790–9.
32. Filippin LI, Teixeira VN, Viacava PR, Lora PS, Xavier LL, Xavier RM. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2013 Feb 7;
33. Filippin LI, Moreira AJ, Marroni NP, Xavier RM. Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury. *Nitric Oxide*; 21(3-4):157–63.
34. Wang Z, Chen Z, Yang S, Wang Y, Huang Z, Gao J, et al. Berberine Ameliorates Collagen-Induced Arthritis in Rats Associated with Anti-inflammatory and Anti-angiogenic Effects. *Inflammation* . 2014 May 7;
35. Rall L, Roubenoff R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology* . 2004 ;43(10):1219–23.
36. Roubenoff R. Rheumatoid cachexia : a complication of rheumatoid arthritis moves into the 21st century. 2009;2:5–6.
37. Roubenoff R, Walsmith J, Lundgren N, Snyderman L, Dolnikowski GJ, Roberts S. Low physical activity reduces total energy expenditure in women with rheumatoid arthritis: implications for dietary intake recommendations. *Am J Clin Nutr* . 2002 Oct 1;76(4):774–9.
38. Jurcovicova J. Glucose transport in brain - effect of inflammation. *Endocr Regul* . 2014 Jan ;48(1):35–48.
39. O’Neill LAJ, Hardie DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* . 2013 Jan 17 ;493(7432):346–55.
40. Palsson-McDermott EM, O’Neill L a J. The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases. *Bioessays* . 2013 Sep 20; 965–73.
41. Rössner S, Löfmark C. Dyslipoproteinaemia in patients with active, chronic polyarthritis. A study on serum lipoproteins and triglyceride clearance (intravenous fat tolerance test). *Atherosclerosis* . 1977 Sep ;28(1):41–52.
42. Lakatos J, Hárságyi A. Serum total, HDL, LDL cholesterol, and triglyceride levels in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* . 1988 Apr; 21(2):93–6.

43. Marangoni RG, Hayata AL, Borba EF, Azevedo PM, Bonfá E, Schainberg CG. Decreased high-density lipoprotein cholesterol levels in polyarticular juvenile idiopathic arthritis. *Clinics (Sao Paulo)* . 2011 Jan ;66(9):1549–52.
44. Castellote C, Castell M, Ramos-romero S, Pe FJ. Effect of cocoa-enriched diets on lymphocytes involved in adjuvant arthritis in rats. 2012;378–87.
45. Cardoso LM, Castro CA De, Jose A, Ferreira-machado B, Novello AA, Ana K, et al. Aerobic exercise and not a diet supplemented with jussara ac ( *Euterpe edulis Martius* ) alters hepatic oxidative and inflammatory biomarkers in ApoE-deficient mice *British Journal of Nutrition*. 2014;285–94.
46. Rodrigues PO, Martins S V, Lopes PA, Ramos C, Migue S, Alfaia CM, et al. Influence of feeding graded levels of canned sardines on the inflammatory markers and tissue fatty acid composition of Wistar rats. 2014;309–19.
47. Hamaguchi K, Itabashi A, Kuroe Y, Nakano M, Fujimoto E, Kato T, et al. Analysis of adipose tissues and stromal vascular cells in a murine arthritis model. *Metabolism* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;61(12):1687–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2012.05.018>
48. Brunner AM, Henn CM, Drewniak EI, Lesieur-Brooks A, Machan J, Crisco JJ, et al. High dietary fat and the development of osteoarthritis in a rabbit model. *Osteoarthritis Cartilage*. 2012 Jun;20(6):584–92.
49. Mooney R a, Sampson ER, Lerea J, Rosier RN, Zuscik MJ. High-fat diet accelerates progression of osteoarthritis after meniscal/ligamentous injury. *Arthritis Res Ther* . BioMed Central Ltd; 2011 Jan;13(6):R198.
50. Griffin TM, Fermor B, Huebner JL, Kraus VB, Rodriguiz RM, Wetsel WC, et al. Diet-induced obesity differentially regulates behavioral, biomechanical, and molecular risk factors for osteoarthritis in mice. *Arthritis Res Ther* . 2010 Jan;12(4):R130.
51. Teixeira G, Paschoal PO, de Oliveira VL, Pedruzzi MMB, Campos SMN, Andrade L, et al. Diet selection in immunologically manipulated mice. *Immunobiology* . 2008 Jan ;213(1):1–12.
52. Bosaeus I, Daneryd P, Svanberg E, Lundholm K. Dietary intake and resting energy expenditure in relation to weight loss in unselected cancer patients. *Int J Cancer* . 2001 Aug 1 ;93(3):380–3.
53. Aversa Z, Bonetto A, Costelli P, Minero VG, Penna F, Baccino FM, et al.  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylbutyrate (HMB) attenuates muscle and body weight loss in experimental cancer cachexia. *Int J Oncol* . 2011 Mar ;38(3):713–20.
54. May PE, Barber A, D'Olimpio JT, Hourihane A, Abumrad NN. Reversal of cancer-related wasting using oral supplementation with a combination of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, arginine, and glutamine. *Am J Surg* . 2002 Apr ;183(4):471–9.

55. Clark RH, Feleke G, Din M, Yasmin T, Singh G, Khan FA, et al. Nutritional treatment for acquired immunodeficiency virus-associated wasting using beta-hydroxy beta-methylbutyrate, glutamine, and arginine: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.*;24(3):133–9.
56. Marcora S, Lemmey A, Maddison P. Dietary treatment of rheumatoid cachexia with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate, glutamine and arginine: a randomised controlled trial. *Clin Nutr* . 2005 Jun ;24(3):442–54.
57. Eley HL, Russell ST, Tisdale MJ. Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem J* . 2007 Oct 1 ;407(1):113–20.
58. Mercier S, Breuillé D, Mosoni L, Obled C, Patureau Mirand P. Chronic inflammation alters protein metabolism in several organs of adult rats. *J Nutr*. 2002 Jul;132(7):1921–8.



## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstrou que o processo inflamatório crônico decorrente da artrite reumatoide foi capaz de alterar a preferência alimentar dos animais, aumentando o consumo da dieta rica em proteína. Ainda este processo foi capaz de diminuir a ingestão alimentar dos animais, o peso corporal, o peso muscular e os níveis séricos de creatina, triglicerídeos e glicose.

A partir destes resultados sugerimos que o aumento no consumo da dieta rica em proteína pode estar relacionado à perda de massa muscular e ao aumento do *turnover* proteico, componentes da caquexia reumatoide.

## **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

O rastreamento inicial obtido neste trabalho deu origem a uma nova linha de pesquisa no Laboratório de Doenças Autoimunes (LABDAI), denominado Metabolismo e Inflamação. Ainda, como perspectiva deste trabalho, iremos continuar as pesquisas com este modelo experimental unindo terapias alternativas, como a manipulação de dieta rica em proteína e exercício físico, a drogas já utilizadas em pacientes.

## **10 ANEXOS**

### **10.1 Metodologia estendida**

#### **10.1.1 Modelo de poliartrite indizada por colágeno**

Poliartrite induzida por Colágeno Bovino tipo II (CII) em ratas Wistar foi realizada segundo Brand e colaboradores (40). CII foi dissolvido em 0,1 M de ácido acético a 4°C por 12h. O adjuvante completo de Freund's (CFA, Sigma, St Louis, MO, USA) foi misturado com CII (2 mg/ml) em volumes iguais para formar a emulsão.

A CIA foi induzida por CII no dia zero, com imunização intradérmica na base da cauda com 100 µl de emulsão. Para as imunizações, os animais foram expostos ao anestésico inalatório isoflurano (1 ml/ml, Abbott). Após 20 dias, os animais foram eutanásidos por guilhotinamento.

#### **10.1.2 Avaliação do escore clínico da artrite**

Os animais foram monitorados três vezes por semana para análise dos sinais clínicos da artrite conforme descrito por Brand et. al. (40) como segue: 0 – sem sinais de eritema ou edema; 1 – eritema e edema leve (tarsos ou metatarsos); 2 – eritema e edema moderado (tarsos e metatarsos ou tarsos e tornozelo); 3 – eritema e edema severo (metatarsos a tornozelo) e 4 – todas as articulações afetadas com perda da função (anquilose).

#### **10.1.3 Avaliação da preferência alimentar**

Os animais (distribuídos um por caixa) foram expostos as 4 dietas descritas abaixo de forma simultânea desde o início da indução da doença. A exposição às

diferentes dietas foi feita a partir de uma semana antes da indução da artrite, para a verificação da preferência alimentar sem nenhuma intervenção. Para avaliar a preferência alimentar em todas as fases do desenvolvimento da artrite, os animais continuarão a ser expostos às diferentes dietas até 20 dias após a indução.

Os animais e a sobra da ração de cada dieta foram pesados a cada 3 dias para saber o quanto o animal consumiu de cada uma delas e quanto isso afetou o seu peso. Após o término do experimento foi realizado o cálculo do ganho de peso corporal e consumo alimentar.

Composição das dietas:

**Dieta 1:** dieta controle composta por ração comercial peletizada;

**Dieta 2:** dieta hipercalórica composta por ração comercial peletizada + adição de 10 % de sacarose;

**Dieta 3:** dieta hiperprotéica composta por ração comercial peletizada + adição de 10 % de albumina;

**Dieta 4:** dieta hiperlipídica composta por ração comercial peletizada + adição de 10 % de óleo de soja;

A ração peletizada, especial para ratas em crescimento (AIN-93), foi adquirida juntamente a Unidade de Experimental Animal do HCPA. Os pellets foram triturados e adicionados os macronutrientes, juntamente com corantes artificiais para a diferenciação.