

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

Vivian de Oliveira Nunes Teixeira

**O Envolvimento do Proteossomo na Perda Muscular de Modelo de Artrite Induzida Por Colágeno e o Efeito do Tratamento com Inibidor do Fator de Necrose Tumoral**

Porto Alegre, Brasil

Dezembro de 2015



Vivian de Oliveira Nunes Teixeira

# O Envolvimento do Proteossomo na Perda Muscular de Modelo de Artrite Induzida Por Colágeno e o Efeito do Tratamento com Inibidor do Fator de Necrose Tumoral

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

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Orientador: Ricardo Machado Xavier

Coorientador: Lidianne Isabel Filippin

Porto Alegre, Brasil

Dezembro de 2015

---

Vivian de Oliveira Nunes Teixeira

O Envolvimento do Proteossomo na Perda Muscular de Modelo de Artrite Induzida Por Colágeno e o Efeito do Tratamento com Inibidor do Fator de Necrose Tumoral/ Vivian de Oliveira Nunes Teixeira. – Porto Alegre, Brasil, Dezembro de 2015-

98 p. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador:Ricardo Machado Xavier

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS  
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Dezembro de 2015.

1. Artrite experimental. 2. Perda muscular. 3. Proteossomo. 4. Inibidor de TNF. I. Xavier, Ricardo Macado, orientador. II. Filippin, Lidiane Isabel, co-orientador. III. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. IV. Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. V. O Envolvimento do Proteossomo na Perda Muscular de Modelo de Artrite Induzida Por Colágeno e o Efeito do Tratamento com Inibidor do Fator de Necrose Tumoral

---

Vivian de Oliveira Nunes Teixeira

O Envolvimento do Proteossomo na Perda Muscular de Modelo de Artrite Induzida Por Colágeno e o Efeito do Tratamento com Inibidor do Fator de Necrose Tumoral

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

**Prof Dr. Ricardo Machado Xavier** - Orientador

**Prof Dra. Lidiane Isabel Filippin** - Coorientadora

**Prof Dr. José Claudio Fonseca Moreira** - Integrante da Banca

**Prof. Dr. Ana Maria Oliveira Battastini** - Integrante da Banca

**Prof Dra. Priscila Schmidt Lora** - Integrante da Banca

**Prof Dr. Claiton Viegas Brenol** - Integrante da Banca

**Dr. Rafael Mendonça da Silva Chakr** - Integrante da Banca

Porto Alegre, Brasil

Dezembro de 2015



# Agradecimentos

Ao Prof. Ricardo Machado Xavier, por ter me orientado não somente no âmbito científico, mas profissional e pessoal também. Foi verdadeiramente meu "pai científico".

À Dra Lidiane Filippin, por ter me acompanhado e trabalhado comigo desde a minha iniciação científica, tendo grande papel na minha formação.

À Dra Patrícia Oliveira, por ter me recebido tão bem no laboratório.

Ao Paulo Vinícius Gil de Alabarse, por ter me ajudado e apoiado durante o meu doutorado.

Aos demais colegas de laboratório, pelo apoio e companheirismo.

Ao Dr Eugen Feist, à Khetam Ghannam e à Lorena Gamboa-Martinez, por terem me recebido tão bem e pela oportunidade da experiência no laboratório deles.

À minha família, especialmente os meus pais, que sempre me apoiaram e auxiliaram na minha caminhada; sua presença me deu forças quando eu precisava.

Ao meu amor, Gabriel, que dividiu e acompanhou todos os passos deste período. Tu me faz querer sempre me melhorar e superar.

OBRIGADO!!!



# Resumo

**Introdução:** A artrite reumatoide é uma doença inflamatória autoimune associada à complicações sistêmicas como fadiga e perda muscular. Perda muscular pode estar relacionada com a ativação do sistema ubiquitina-proteossomo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a perda muscular e o evolcimento do proteossomo no modelo de artrite induzida por colágeno (CIA), com ou sem o tratamento de metotrexato ou inibidor de TNF (etanercepte).

**Métodos:** Camundongos DBA1/J machos foram divididos em 4 grupos (n=8 cada): CIA (salina); ETN (etanercepte, 5.5 mg/kg) e MTX (metotrexato, 35 mg/kg), tratados duas vezes por semana por 6 semanas, e um grupo controle saudável (CO). Tratamentos iniciaram uma semana após a injeção do *booster*. Escore clínico, edema da pata traseira e peso corporal foram analisados durante o período experimental. Músculo gastrocnêmio (GA) foi pesado após a morte e usado para quantificar a atividade, níveis proteicos e expressão de mRNA das diferentes subunidades do proteossomo através de ensaio fluorogênico, Western blot e rtPCR, respectivamente.

**Resultados:** Tratamentos reduziram o desenvolvimento da doença, observado através do menor escore clínico e edema da pata traseira nos grupos ETN e MTX. ETN apresentou maior peso corporal do que MTX nas semanas 5 e 7. Músculo GA estava aumentado em ETN do que CIA e MTX, um resultado também observado no peso muscular normalizado. As propriedades catalíticas do proteossomo 26S muscular mostraram um aumento na atividade do tipo caspase nos grupos CIA e MTX. Tecidos musculares de animais MTX demonstraram maiores níveis proteicos das subunidades do proteossomo PSMB8 e PSMB9 e maior expressão gênica de *Psmb5*, *Psmb8* e *Psmb9*. Por outro lado, a expressão de *Psmb6* estava diminuída e de *Psmb9* estava aumentada em CIA.

**Conclusões:** Apesar de ambos os medicamentos melhorarem o escore da doença, ETN apresentou um efeito anti-artrítico mais forte e foi o único tratamento capaz de prevenir parcialmente a perda muscular. Ao contrário de ETN, CIA e o tratamento com MTX apresentaram perda muscular e atividade e expressão do proteossomo aumentadas.

**Palavras-chaves:** artrite experimental, perda muscular, proteossomo, inibidor de TNF.



# Abstract

**Background:** Rheumatoid arthritis is an autoimmune inflammatory disease associated with systemic complications like fatigue and muscle wasting. Muscle wasting could be related to the activation of the ubiquitin-proteasome system. The aim of this study was to evaluate muscle loss and involvement of the proteasome in collagen-induced arthritis (CIA), with or without treatment with methotrexate or a TNF inhibitor (etanercept).

**Methods:** Male DBA1/J mice were divided into 4 groups (n=8 each): CIA (saline); ETN (etanercept, 5.5 mg/kg) and MTX (methotrexate, 35 mg/kg), treated twice a week for 6 weeks, and a healthy control group (CO). Treatments started one week after booster injection. Clinical score, hind paw oedema, and body weight were analysed during the experimental period. Gastrocnemius muscles (GA) were weighted after death and used to quantify proteasome activity, protein levels and mRNA expression of its subunits by Western blot and rtPCR, respectively.

**Results:** Treatments slowed disease development, observed through smaller clinical score and hindpaw edema in ETN and MTX groups. ETN presented higher body weight compared to MTX group at weeks 5 and 7. GA weight was heavier in ETN than CIA and MTX, a result also observed in the normalized muscle weight. The catalytic properties of 26S proteasome showed an increase of caspase-like activity in CIA and MTX groups. Muscles tissues of MTX treated animals showed higher protein levels for proteasomal subunits PSMB8 and PSMB9 and higher gene expression for *Psmb5*, *Psmb8* and *Psmb9*. In contrast, expression of *Psmb6* was decreased and of *Psmb9* was enhanced in CIA.

**Conclusions:** Although both drugs improved the disease score, ETN presented a stronger anti-arthritic effect and was the only treatment able to partially prevent muscle wasting. In contrast to ETN, CIA and MTX treatment did not prevent muscles loss due to increased proteasome expression and activity.

**Key-words:** experimental arthritis, muscle wasting, proteasome, TNF inhibitor.



# Lista de ilustrações

- Figura 1 – A pirâmide caquexia-sarcopenia (adaptado de (1)). Apesar de possuírem eventos desencadeadores diferentes, ambas caquexia e sarcopenia são caracterizadas por fraqueza e perda muscular marcantes, que leva ao aumento da morbidade e mortalidade. . . . . 19
- Figura 2 – Mecanismos moleculares envolvidos na sarcopenia (2). A perda muscular pode ocorrer por distintos mecanismos, como um déficit de regeneração pela inatividade de células-satélite, apoptose e vias de degradação proteica, como por exemplo, proteases ativadas por cálcio, proteossomo e autofagia. . . . . 31
- Figura 3 – Sistema ubiquitina-proteossomo de degradação proteica (2). O sistema ubiquitina-proteossomo é um complexo multiproteico citoplasmático que degrada proteínas marcadas por ubiquitina. Essa degradação requer a participação de três proteínas distintas (E1, E2 e E3). As proteínas E3 conferem especificidade às proteínas que serão degradadas. Na atrofia muscular foram descritas algumas enzimas E3, como a MuRF-1 e a atrogina-1. . . . . 32
- Figura 4 – Proteossomo 26S e 20S. O sistema ubiquitina-proteossomo é o principal responsável por processar e degradar proteínas intracelulares. O núcleo do proteossomo é chamado proteossomo 20S. Quando o proteossomo 20S se une a uma enzima regulatória (19S), ele é a partir de então chamado proteossomo 26S . . . . . 33
- Figura 5 – Esquema ilustrativo do marco teórico do trabalho. A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica. A inflamação crônica causa alterações metabólicas, como o hipermetabolismo, e pode levar à perda muscular. Este conjunto de características pode ser denominado caquexia reumatoide. A partir destas alterações, ocorre um desequilíbrio no *turnover* proteico, relacionado com o aumento da proteólise muscular, e fraqueza muscular com maior inatividade física, que entram em um processo de retroalimentação negativa entre si. Esse quadro aumenta a incapacitação e morbidade dos indivíduos, levando à maior mortalidade. Ainda se desconhece os efeitos dos tratamentos da AR, como anti-TNF e metotrexato, sobre todas estas características. 42



# Sumário

1	INTRODUÇÃO . . . . .	15
2	REVISÃO DE LITERATURA . . . . .	17
2.1	Estratégias para localizar e selecionar informações . . . . .	17
2.2	Tecido muscular esquelético, seu papel e alterações . . . . .	17
2.2.1	Caquexia . . . . .	18
2.2.2	Sarcopenia . . . . .	20
2.3	Artrite reumatoide . . . . .	22
2.4	Perda de peso e músculo na AR . . . . .	25
2.5	Modelos experimentais de artrite . . . . .	26
2.6	Perda de peso e músculo em artrite experimental . . . . .	29
2.7	Mecanismos de perda muscular . . . . .	30
2.8	O sistema ubiquitina-proteossomo . . . . .	31
2.9	Tratamentos da AR . . . . .	35
2.9.1	Metotrexato . . . . .	37
2.9.2	Etanercepte e tratamentos anti-TNF . . . . .	39
3	MARCO TEÓRICO . . . . .	41
4	JUSTIFICATIVA . . . . .	43
5	OBJETIVOS . . . . .	45
5.1	Objetivo Primário . . . . .	45
5.2	Objetivos Secundários . . . . .	45
6	ARTIGO ORIGINAL . . . . .	47
7	CONCLUSÃO . . . . .	73
8	PERSPECTIVAS FUTURAS . . . . .	75
	Referências . . . . .	77



# 1 Introdução

A artrite reumatoide (AR) foi descoberta no século XVII e descrita por Garrod em 1859. Finalmente em 1957 foi proposta, por Charles Short, como uma entidade clínica (3). Sua complexidade foi reconhecida, entretanto, após anos de pesquisa e sua etiologia permanece desconhecida.

A AR é uma doença sistêmica inflamatória autoimune com prevalência de aproximadamente 1% na população mundial (4). Ela é caracterizada por uma sinovite crônica, simétrica e erosiva, afetando primeiramente as articulações periféricas, resultando em deformidades e incapacitação. Estimativas recentes sugerem um custo anual de \$16 bilhões nos EUA, contudo no Brasil tal estimativa ainda não foi calculada (5).

Alguns sinais e sintomas são característicos a esta população, como fadiga, fraqueza e perda muscular. Isso poderia ser explicado pelos altos níveis circulantes de citocinas e proteínas de fase aguda, somados à dor articular e diminuição do exercício físico, que podem causar perda muscular (6). A perda muscular reduz a capacidade funcional e a qualidade de vida dos portadores de doença, além disso, eleva o impacto econômico e contribui para o aumento da morbidade e mortalidade (6), afetando de 10 (7) a 67% (8) dos pacientes (6).

Embora a perda muscular seja altamente impactante sobre diversos aspectos, os mecanismos intracelulares envolvidos no seu desenvolvimento ainda não foram completamente elucidados, mas provavelmente estão relacionados com o hipermetabolismo causado por citocinas !!! pro inflamatórias ou pró-inflamatórias? (9).

Alguns sistemas proteolíticos são propostos como importantes contribuintes para a degradação muscular (10, 11). Dentre eles, o sistema ubiquitina-proteossomo é considerado a principal maquinaria de degradação proteica não lisossomal em células eucarióticas (12, 13). Ele degrada de 70 a 90% das proteínas celulares e é responsável por processar e degradar proteínas celulares simplesmente danificadas ou essenciais para a regulação de processos celulares básicos (12, 13).

Estudos publicados relacionaram o aumento da expressão de subunidades do proteossomo e de enzimas ubiquinantes com o processo de atrofia muscular, assim como o aumento da expressão de enzimas ligantes de ubiquitina E3 em modelos de perda muscular (14). Esses estudos sugerem que a perda muscular está relacionada com a atividade da MuRF-1 e da atrogina-1, enzimas E3 específicas do músculo. Outros trabalhos ligaram rotas e mediadores inflamatórias com o aumento da proteólise e das enzimas MuRF-1 e da atrogina-1, consideradas marcadores de perda muscular (15).

Neste contexto, doenças inflamatórias sistêmicas como a AR teriam uma expressão aumentada das enzimas E3 MuRF-1 e atrogina-1 musculares e do imunoproteossomo, aumentando a atividade proteásica. Essa atividade aumentada do proteossomo já foi descrita na circulação de pacientes com AR e em modelos experimentais de artrite (16, 17).

Apesar de ainda não existir uma cura, medicamentos podem melhorar a condição dos pacientes com AR. No entanto, estes pacientes continuam a apresentar perda muscular e se desconhece o efeito de tratamento comumente usados nesta doença sobre o músculo. Assim, se selecionou os medicamentos etanercepte (227), uma terapia biológica anti-fator de necrose tumoral (TNF), e metotrexato, primeiro medicamento de escolha para o tratamento da AR, para verificar o efeito destes medicamentos sobre a perda muscular na artrite experimental.

Diante do apresentado acima, a atrofia muscular consequente das artropatias inflamatórias crônicas é uma manifestação extra-articular altamente prevalente e que afeta profundamente a funcionalidade dos indivíduos. O sistema ubiquitina-proteossomo possui papel chave no processo de perda muscular. Entretanto, os processos biomoleculares envolvidos na perda muscular, a atividade do proteossomo, bem como o papel do anti-TNF- $\alpha$  nessa condição, têm sido muito pouco estudados. Paróia isso o uso de modelos experimentais de artrite apresenta-se como uma boa ferramenta. Portanto, o conhecimento mais aprofundado do processo de atrofia e proteólise do músculo cronicamente inflamado, onde o etanercepte e o metotrexato podem apresentar papel significativo, são de alta relevância também para a identificação de potenciais alvos de manipulação terapêutica.

Sendo assim, essa tese está primeiramente composta por uma revisão bibliográfica que será convertida em artigo de revisão, a ser submetido para publicação na Revista Brasileira de Reumatologia (fator de impact 1,087, Qualis CAPES B2).

Em seguida, está composta do manuscrito do trabalho, sendo um artigo original intitulado "**The proteasome is related to muscle wasting in experimental arthritis and is altered by etanercept treatment**". Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante três anos de doutorado no Brasil e um ano no laboratório do Professor Dr Eugen Feist, da Charité - Universitätsmedizin Berlin, na Alemanha. O trabalho está submetido no periódico Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle (fator de impacto 7,315, Qualis CAPES A1).

Esse trabalho contou com o apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínica de Porto Alegre (FIPE), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA pelo número 12-0044.

## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

Esta revisão da literatura está focada nos seguintes itens: artrite, perda muscular, proteossomo, anti-TNF e metotrexato. A estratégia de busca de artigos para esta revisão envolveu as seguintes bases de dados: SciELO, PubMed e Web of Science, no período de 1950 a 2015. Foram realizadas buscas através dos termos "arthritis", "experimental arthritis", "muscle loss", "muscle wasting", "caquexia", "sarcopenia", "proteasome", "proteasome activity", "proteasome subunits", "etanercept", "anti-TNF", "methotrexate" e suas combinações.

### 2.2 Tecido muscular esquelético, seu papel e alterações

Em pessoas não-obesas ou eutróficas, o músculo esquelético representa cerca de 40% da massa corporal, assim constituindo o maior órgão do corpo nestes indivíduos !!! (REF? - se necessário, adicionar livro texto).

Inicialmente, se acreditava que principais funções do músculo esquelético seriam locomoção e movimento. Porém, percebeu-se que a contração muscular também é essencial para manter a temperatura corporal, contribuindo para a homeostase do corpo !!! (REF? - se necessário, adicionar livro texto).

Na década de 50, se hipotetizou que células musculares possuem uma capacidade secretora (18). A ideia que células musculares pudessem produzir e liberar fatores humorais surgiu anos antes da identificação do tecido adiposo como órgão endócrino. Durante a última década, se identificou que células musculares possuem alta capacidade secretória, podendo produzir e secretar centenas de fatores (19, 20, 21). Em 2003, Pedersen *et al* (22) sugeriram que citocinas e outros peptídeos que são produzidos, expressos e secretados por fibras musculares e exercem efeitos endócrinos deveriam ser chamadas "miocinas".

Assim, músculos produzem e liberam miocinas, que trabalham de maneira parecida com hormônios e exercem efeitos endócrinos específicos em órgãos distantes. Outras proteínas que são produzidas pelo músculo esqueléticos, mas não são liberadas na circulação, poderiam ter mecanismos de ação autócrinos e parácrinos, exercendo seu efeito nas vias de sinalização do próprio músculo (23, 24, 25).

Então, miocinas poderiam estar envolvidas mediando os múltiplos efeitos benéficos do exercício físico. Além disso, a identificação do músculo esquelético como um órgão endócrino possui outra implicação, como o papel central do músculo esquelético na

comunicação entre órgãos, incluindo o fígado e o tecido adiposo (24).

A inatividade física/sedentarismo e baixa carga de contração muscular/exercício físico poderia contribuir para o "doença da inatividade física" (*the disease of physical inactivity*), em que o tecido adiposo iria contribuir para o quadro inflamatório, e a falta de exercício aumentaria a perda muscular e acúmulo de gordura, em um círculo vicioso que reduz a força muscular e favorece ainda mais a inatividade (23). Além disso, esta falta dos sinalizadores musculares poderia favorecer a resistência periférica à insulina, arteroesclerose, neurodegeneração e crescimento tumoral (26, 27, 28, 29).

Não somente isso, o músculo também pode ser visto como fonte energética, sendo rico em glicogênio e considerado o maior reservatório de aminoácidos do corpo. Em seres humanos adultos, a massa muscular e sua performance se adaptam a diferentes condições fisiopatológicas através de vias ativadoras que regulam produção/degradação (equilíbrio) de proteína (30). Durante momentos de estresse ou em situações extremas, este tecido pode ser degradado e reduzido para disponibilizar energia e aminoácidos para o resto do organismo (31). Assim, o músculo esquelético funciona como fonte de aminoácidos para serem usados como fonte energética de diversos órgãos (incluindo coração, fígado e cérebro) durante períodos catabólicos, como o jejum e a caquexia (30, 32).

### 2.2.1 Caquexia

O termo caquexia possui origem no Grego, em que *kakos* significa "ruim" e *hexis* "condição". A caquexia é definida como "uma síndrome metabólica complexa associada à outra doença e caracterizada por perda de massa magra, com ou sem alteração de massa gorda". Uma das suas principais características é a perda de músculo em adultos (8, 33).

A caquexia deve ser diferenciada de fome/jejum, perda muscular associada à idade (sarcopenia) (Figura 1), depressão, má-absorção e hipertiroidismo (34, 35, 36), apesar da similaridade de alguns mecanismos com a sarcopenia.

A etiologia da caquexia é multifatorial. Especialistas na área afirmam que a caquexia deveria ser considerada uma síndrome metabólica, originária da inter-relação entre doença crônica, metabolismo do hospedeiro e o desequilíbrio entre mediadores pró- e anti-inflamatórios (37).

Assim, os fatores relacionados com a caquexia incluem a produção acentuada de citocinas pró-inflamatórias, alterações hormonais e inatividade física. O quadro de caquexia é uma das condições clínicas que demonstra ligação entre o metabolismo e a inflamação (8, 33). É clara a participação do TNF- $\alpha$  no desenvolvimento desta síndrome, assim como outros mediadores inflamatórios (interleucina 6 - IL-6 - e a proteína C reativa) (38, 39, 40).

Apesar de se acreditar que a inflamação sistêmica possui papel principal na sinalização muscular alterada na caquexia, hormônios (41), fatores derivados de tumores (e.g.,

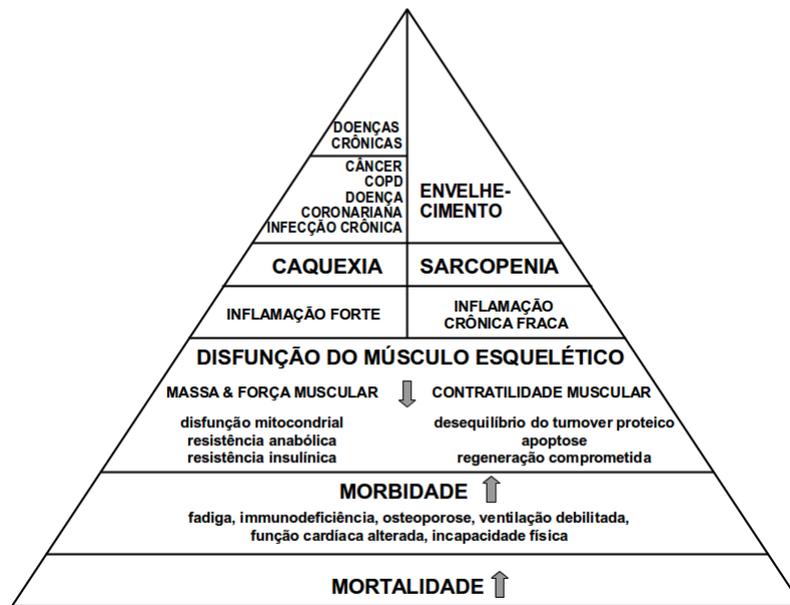


Figura 1 – A pirâmide caquexia-sarcopenia (adaptado de (1)). Apesar de possuírem eventos desencadeadores diferentes, ambas caquexia e sarcopenia são caracterizadas por fraqueza e perda muscular marcantes, que leva ao aumento da morbidade e mortalidade.

fator indutor de proteólise - PIF) (42), repouso, e ingestão inadequada de nutrientes (43) parecem também contribuir para o desenvolvimento da caquexia.

Além disso, a produção anormal de neuropeptídeos e hormônios, juntamente com citocinas pró-inflamatórias, podem causar anorexia, resistência periférica à insulina, aumento do turnover de proteína (36, 44). Isso leva a um aumento do gasto de energia em repouso dos pacientes (38), e por consequência diminuição da massa muscular.

Independentemente da doença adjacente causadora, a perda progressiva de massa muscular é a característica mais relevante da caquexia (37). Perda progressiva de massa muscular afeta negativamente a força muscular, capacidade funcional (como a função respiratória) e riscos de incapacitação (44, 45) e independentemente prediz morbidade e mortalidade (46).

Perda muscular e caquexia podem então se desenvolver a partir de uma grande variedade de condições agudas e crônicas e isto está relacionado a um pior prognóstico destas doenças nos pacientes (47, 48). Dentre estas condições, pode-se citar doenças infecciosas, como HIV/AIDS, malária, e tuberculose, e acometimentos crônicos como câncer, insuficiência cardíaca crônica, obstrução pulmonar crônica, doença renal crônica, cirrose hepática, doença de Crohn, doenças degenerativas neurológicas, doença coronariana e artrite reumatoide (49, 50, 51). Caquexia também foi observada em pacientes após ferimentos traumáticos extensos, queimadura extensa e sepse (47, 48). Ainda assim, um número muito maior de condições médicas do que as citadas acima podem apresentar o

quadro de caquexia.

Esta é uma das razões por que um número acurado de casos de caquexia no mundo é difícil de definir (47, 48, 49, 50, 51). Além disso, diversas definições de diagnóstico e diferentes populações têm sido avaliadas, dificultando um cálculo verdadeiro aproximado. Alguns anos atrás o *Cachexia Consensus Working Group* desenvolveu uma definição acurada baseada nos dados disponíveis até então (33), que atualmente é o critério mais usado na literatura: perda de peso (superior a 5% nos últimos 12 meses ou índice de massa corporal - IMC - inferior a 20 kg/m<sup>2</sup>) como primeiro critério a ser observado, seguindo por mais três dos cinco critérios a seguir: diminuição da força muscular, diminuição do apetite (anorexia), fadiga, e alteração de parâmetros bioquímicos e imunológicos, tais como elevação de IL-6, elevação de proteína C reativa, redução de hemoglobina e redução de albumina sérica.

Esta definição diagnóstica (33) se baseou principalmente em doenças com forte efeito em um curto prazo de tempo, como o câncer. Assim, este critério não parece se encaixar tão bem em outras doenças que também parecem apresentar esta síndrome, como a artrite reumatoide, que é uma doença inflamatória crônica de ação mais lenta (52). Além disso, esse critério pode ser mascarado pelo ganho de massa gorda, característica da caquexia obesa.

Estimativas recentes sugerem que aproximadamente nove milhões de pacientes com doenças crônicas apresentam caquexia (atualmente 1%) provenientes de investigações na América do Norte, Europa e Japão (47). Visto o tamanho populacional mundial, principalmente na Ásia, parece provável que este número continuará a aumentar (53).

Com comentado anteriormente, acredita-se que a prevalência de caquexia está relacionada com condições mais avançadas das doenças relacionadas. Já foi confirmada a forte correlação da presença de caquexia e o aumento da probabilidade de morte nos pacientes, chegando a um ponto que 30% dos pacientes que morrem apresentam caquexia (47). Esse número aumenta muito se considerarmos somente os pacientes com câncer, em que 50% dos pacientes apresentam caquexia e esta é causa de morte em pelo menos 20% dos casos. Neste ponto, a caquexia deixa de ser meramente uma síndrome complexa que ocorre em estados avançados de diversas doenças, mas uma síndrome com altos níveis de mortalidade ao redor do mundo (53).

### 2.2.2 Sarcopenia

O termo sarcopenia foi formulado por Rosenberg em 1986 (54) e se origina do Grego "sarx" para carne e "penia" para falta (55). Sarcopenia é atualmente definida como "uma condição caracterizada pela perda progressiva e generalizada de força e massa muscular acompanhada de altos riscos de eventos adversos, como redução da capacidade física,

baixa qualidade de vida e morte" (56). Esta síndrome é considerada primeiramente, mas não exclusivamente, uma condição relacionada com a idade, isto é, um acometimento ligado ao envelhecimento (37).

A população mundial está envelhecendo, e este fato não está mais restrito a países desenvolvidos. O Brasil está envelhecendo rapidamente, e se estima que indivíduos com mais de 65 anos, que atualmente compreende 8% da população, irão alcançar a porcentagem de 14% até 2030, de acordo com o último senso do IBGE em 2015 (57). O Rio Grande do Sul (RS) possui uma população ainda mais velha, em que indivíduos com mais de 65 anos compreendem 11% da população e se espera alcançar a porcentagem de quase 19% em 2030 (57). O grande desafio no envelhecimento é manter a atividade funcional e independência do indivíduo o maior tempo possível, a fim de minimizar a incapacitação.

Com o aumento da expectativa de vida, não se observa um aumento da expectativa de boa saúde com o aumento da idade. É altamente frequente a incidência de perda muscular com o aumento da idade, levando a uma pior qualidade de vida (58). A perda de peso e músculo na população mais velha está relacionada com o aumento do risco de morte (59).

Sarcopenia esta cada vez mais sendo reconhecida como uma síndrome geriátrica de importância chave em estratégias públicas de saúde (60). Iniciando aos 30 anos, indivíduos perdem progressivamente 1% de massa muscular por ano e até os 80 anos 30% da massa muscular foi perdida (61, 60). A prevalência da perda muscular está estimada entre 10–25% dependendo na população e método diagnóstico de sarcopenia. Em octogenários, a prevalência aumenta para 50% (62). Função muscular reduzida está independentemente associada com o aumento do risco de incapacitação funcional, quedas e mortalidade em idosos (63).

Estudos recentes identificaram que o decréscimo da força muscular é mais pronunciado que a redução na massa muscular entre idosos (64, 65, 66), e a força começou a ser considerada um melhor preditor de incapacitação (67). Assim, o *European Working Group on Sarcopenia in Older People* (EWGSOP) desenvolveu um algoritmo para diagnosticar sarcopenia baseados em três critérios: redução da força muscular, redução da massa muscular e desempenho físico prejudicado (56).

A sarcopenia é uma síndrome multifatorial, associada com inatividade física, redução da mobilidade, marcha lenta, e baixa resistência física. Estes fatores estão ligados com perda de unidades motoras, declínio na biogênese mitocondrial e processos inflamatórios crônicos (63, 68, 69), e podem assim desencadear a perda muscular durante o processo de envelhecimento através de mecanismos não completamente elucidados (69) (2). Além disso, envelhecimento e inabilidade física estão relacionados com um aumento na massa gorda, particularmente gordura visceral (70), que esta correlacionada com o desenvolvimento de síndrome metabólica e doença cardiovascular (71), que consequente-

mente aumenta a mortalidade (72).

A prevalência da sarcopenia varia dependendo da definição usada, mas estimativas propõem uma perda de aproximadamente 8% da massa muscular por década até os 70 anos, e após esta idade a perda aumenta para os níveis de 13 a 24% por década (72, 73). Em um estudo na China, Lau *et al* (74) detectaram 12,3% de prevalência de sarcopenia em homens e 7,6% em mulheres. Em estudos similares, Wu *et al* (75) detectaram a prevalência de sarcopenia de 8,2% em homens e 6,5% em mulheres de Taiwan, enquanto Silva *et al* (76) encontraram 14,4% e 16,1%, respectivamente, em amostra de população brasileira.

Apesar de diversos estudos pesquisarem a prevalência da sarcopenia, o custo causado por esta condição é difícil de quantificar. O custo de saúde estimado atribuído para sarcopenia nos Estados Unidos da América (EUA) em 2000 foi \$18,5 bilhões (\$10,8 bilhões para homens e \$7,7 bilhões para mulheres), o que representou aproximadamente 1,5% do valor total gasto em saúde naquele ano. Uma redução em 10% na prevalência de sarcopenia iria resultar na economia de \$1,1 bilhões (dólares ajustados para a taxa de 2000) por ano nos EUA (77). Não se possui estes dados para prevalência e custos da sarcopenia na América Latina.

Por fim, a degradação proteica excessiva do tecido muscular é altamente prejudicial para a economia do corpo humano e pode levar à morte. Dados anteriores mostram que a perda de cerca de 30% da massa magra corporal leva o indivíduo à morte (78). Além disso, perda excessiva da massa muscular é um indicador de prognóstico ruim e pode prejudicar a eficiência de diversos tratamentos terapêuticos. A manutenção de músculos saudáveis é crucial para prevenir doenças metabólicas, mantendo um envelhecimento saudável e provendo energia para órgãos vitais durante situações de estresse (30).

## 2.3 Artrite reumatoide

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória, autoimune, de etiologia desconhecida. Ela é caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva preferencialmente de articulações periféricas, resultando em deformidades e incapacitação (79).

Apesar da artrite reumatoide (AR) ter sido descrita primeiramente na década de 50 (80), os critérios de classificação foram desenvolvidos somente 50 anos atrás (81). Estes critérios usados retratam a AR como uma doença séria de longa-duração com características extra-articulares importantes, limitadas opções de tratamento e prognóstico pobre (82, 83).

Uma linha de pensamento mais moderna prefere considerar a AR como um sín-

drome clínica que abrange diversos subconjuntos de doença (84). Estes diferentes subconjuntos ocasionam diversas cascatas inflamatórias (85), que levam a uma via final comum, em que inflamação sinovial persistente e dano articular estão presentes.

A AR tem uma prevalência de aproximadamente 0,46% na população brasileira (4) e 1% na população mundial (86). A doença ocorre 3 vezes mais em mulheres que homens e sua prevalência aumenta com a idade (87, 88, 89). Estimativas recentes sugerem um custo anual de \$16 bilhões nos EUA(5), enquanto no Brasil uma estimativa mais recente calculou um gasto anual de R\$18,5 milhões (90).

Em relação ao risco de desenvolver AR, 50% é atribuído a fatores genéticos (91). Até o momento, a associação genética está principalmente nos genes de PTPN22 e HLA, enquanto não se encontrou associações fortes com outros grupos gênicos. Dentre as associações fortes, foram identificadas 30 regiões relacionadas com a AR (92, 93, 94), no entanto estas regiões estão contidas em somente 0,1% de DNA do ser humano. Estudos genéticos identificaram a associação destes mesmos loci com outras doenças autoimunes, e alguns estão ligados a cascatas inflamatórias. Analisando estes conjuntos de estudos genéticos, pesquisadores acreditam que estes dados enfatizam que a AR é um grupo heterogêneo de síndromes sobrepostas.

O fator de risco ambiental mais forte para o desenvolvimento da AR é o fumo (95). Outros fatores ambientais incluem a periodontite, consumo de álcool, consumo de café, níveis de vitamina D e uso de contraceptivos orais (96). Assim, o desencadeamento da AR envolve fatores genéticos, fatores ambientais e defeitos na imunorregulação, que causam uma quebra da auto-tolerância e ativam mecanismos que levam ao dano tecidual.

A presença de !!! auto anticorpos ou auto-anticorpos? é característica típica da AR. Em estados mais avançados da doença, um número maior de epítomos são reconhecidos pelos auto anticorpos (97, 98). O fator reumatoide é um auto anticorpo clássico, usado como marcador patogênico da doença. Além disso, variados tipos de auto anticorpos contra proteínas citrulinadas (anti-CCP) foram identificados. O anti-CCP é um tipo de marcador que parece ser mais específico e sensível para o diagnóstico da AR (99) e sua presença está associada com maior dano articular e menores níveis de remissão (85). Também se identificaram auto anticorpos contra colágeno (100), que parecem estar relacionados com dano articular mais acentuado no início da doença (101). E anticorpos anti proteossomo também foram identificados (102), e seus níveis parecem estar relacionados com a atividade da doença (103). De 50 a 80% dos indivíduos com AR apresentam fator reumatoide, anti-CCP ou ambas.

Uma cascata-chave do desenvolvimento da artrite inclui a super-produção e expressão de TNF (104). Esta via guia a inflamação sinovial e destruição articular. A superprodução de TNF possui diversas causas, incluindo a interação entre linfócitos T e B, sinoviócitos do tipo fibroblasto e macrófagos. Este processo leva a superprodução

de diversas citocinas como a interleucina 6 (IL-6) que também guia a inflamação persistente e destruição articular (105). Superprodução de outras citocinas (eg, interleucina 1) também faz parte dos diversos subconjuntos da AR.

A patologia da sinovite reumatoide caracteriza-se fundamentalmente por proliferação da membrana sinovial e erosão subsequente da cartilagem articular e do osso subcondral. Embora se desconheça o evento desencadeador, parece envolver alguma estimulação antigênica específica de linfócitos T suscetíveis que expressam as moléculas de complexo de imunocompatibilidade (MHC) apropriadas. Isto resulta em proliferação das células T e B, estimulação da proliferação de vasos sanguíneos na membrana sinovial, acúmulo de células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, proliferação de células sinoviais e desenvolvimento de um *pannus* invasivo de rápido crescimento. Este último cresce de modo quase semelhante a um tumor benigno, invade a cartilagem, ativa os condrócitos e libera enzimas proteolíticas que degradam a cartilagem e o osso, resultando por fim em erosões e destruição articular (106).

A AR constitui um problema importante em termos de saúde pública com sérias consequências socioeconômicas. Pacientes com AR apresentam maiores morbidade e mortalidade quando comparados com a população normal, estimando-se uma redução de dez anos na expectativa de vida (83). As principais causas de morte descritas são infecções, doenças linfoproliferativas, doenças cardiovasculares (DCV) e cerebrovascular, complicações gastrintestinais e relacionadas à atividade da doença propriamente dita. Dentre os fatores preditivos de mortalidade, estão incluídos idade avançada, incapacidade funcional, número de articulações acometidas, fator reumatoide positivo, nódulos reumatoides e velocidade de sedimentação globular (VSG) elevada (107).

Além das manifestações articulares, a AR apresenta diversas manifestações de cunho sistêmico que impactam significativamente em sua morbimortalidade. Pacientes com AR possuem um risco maior de mortalidade, principalmente decorrente de problemas cardiovasculares e infecção. O risco de infarto do miocárdio e ataque cardíaco é muito aumentado em pacientes com AR (108). Este aumento deve estar associado com dano vascular causado pela inflamação, que deveria diminuir com o tratamento para a doença (107, 108). Comorbidades na AR estão associadas com aumento da incapacitação e consultas médicas frequentes (109).

Existe uma grande gama de manifestações extra-articulares na AR. Dentre esses, pode-se citar fadiga, perda de peso, fraqueza e atrofia generalizada de fibras musculares que está associada com a intensidade da sinovite (110, 111, 112). Até 30% dos pacientes apresentam pelo menos uma desordem extra-articular (113), e fica pior com o aumento da atividade da doença (114). A maior parte das manifestações extra-articulares da AR está associada com a atividade da doença (114).

## 2.4 Perda de peso e músculo na AR

Como comentado acima, a perda muscular é uma complicação comum e importante da AR (111). Estudos detectaram que a perda muscular afeta de 10 (7) a 67% (8) dos pacientes (6). Foi demonstrado que baixa massa magra está presente em 20% dos pacientes com AR (52), causando perda de peso, redução da atividade física e aumento da fadiga e fraqueza. Esse quadro leva a uma perda significativa da capacidade funcional e qualidade de vida, relacionado com um impacto econômico elevado (5, 6). A perda de ou o baixo peso em paciente com AR são importantes fatores prognósticos em relação à piora na atividade da doença, incapacitação e sobrevida (115, 116, 117, 118, 119).

Foi demonstrado que pacientes com AR que perdem peso logo após o diagnóstico se tornam mais incapacitados por causa da doença (117). Em adição, pacientes com baixo peso apresentam maior atividade da doença (116) e pior prognóstico (115). De fato, aumento do IMC parece ser protetor, com paciente obesos sofrendo menor dano articular que pacientes com peso normal (eutróficos) (119). Também foi demonstrado que além da redução da qualidade de vida, a perda de peso pode ser um preditor de maior risco de morte na AR (118).

A perda muscular na AR é atribuída a fatores multifatoriais, como exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (9, 15), alterações hormonais e inatividade física, além da ativação de distintas cascatas intracelulares induzem à degradação proteica (120), entretanto, ainda pouco se sabe sobre essa sinalização. A perda muscular causada pela AR foi associada com a intensidade da inflamação e a severidade da doença (111), enfatizando a importância da inflamação no processo de perda muscular.

Estudos demonstraram que pacientes com AR têm menor composição de massa celular que envolve o músculo e outros órgãos (121). A redução na massa celular inclui alterações no gasto energético como redução no gasto energético diário total, aumento no gasto energético em repouso e baixo gasto energético em atividade física (38). O metabolismo de proteínas na AR também sofre alterações, representadas pelo aumento no *turnover* proteico, o que somado as alterações energéticas caracteriza o hipermetabolismo (122). A partir deste quadro de alterações que a AR apresenta, acredita-se que estas alterações possam se encaixar na síndrome da caquexia.

A primeira descrição de caquexia em portadores de AR foi em 1893 por Paget (123), a qual é caracterizada por alterações hormonais, metabólicas e comportamentais que influenciam na diminuição da massa magra, com manutenção ou leve elevação da massa gorda (total de tecido adiposo), resultando em limitada ou nenhuma perda de peso (massa total) (38, 40, 52).

Também foi observado aumento no gasto energético durante o repouso em pacien-

tes com AR, sugerindo um papel do hipermetabolismo ligado a citocinas pró-inflamatórias (8, 38). Alguns estudos mostram a correlação entre o gasto energético durante o repouso e a atividade da doença (124) (125). Por outro lado, gasto energético geral foi descrito como menor em indivíduos saudáveis (126), atribuído a uma atividade física reduzida (7, 121). Assim, inflamação de longo prazo na AR leva a um estado hipermetabólico que resulta na perda muscular (125).

De maneira geral, o efeito combinado (perda muscular e deposição normal de gordura) manteria o IMC em níveis normais (127). Assim, a caquexia na AR parece não se encaixar no critério diagnóstico de caquexia clássicos. Por isso, foi proposto que esta condição na AR seja chamada de caquexia reumatoide ou obesidade caquética reumatoide (8, 128), que é consistente com os relatos que IMC não é apropriado para a detecção da caquexia reumatoide (129).

Bokhorst et al (52) demonstraram que pacientes com AR não apresentam os critérios diagnósticos estabelecidos por Evans (33) 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 perda de peso corporal ( $\geq 5\%$  no último ano) foi identificada em 1,0% dos pacientes, enquanto anorexia foi vista em 5,8% (por escala analógica) a 10,7% (avaliação funcional) nos pacientes com AR (52). Assim, a caquexia como definida por Evans (33) seria diagnosticada em somente 1,0% dos pacientes. Elkan (130) utilizou um critério diferente de caquexia reumatoide, e observou um total de 39% de prevalência, ou 18% em mulheres e 21% em homens. Por isso, esforços são necessários para estabelecer critérios diagnósticos para a caquexia reumatoide (127).

Não se tem um consenso na literatura sobre os critérios de diagnóstico de caquexia reumatoide e, devido a isto, existe uma grande variação de prevalência entre os estudos (8, 52, 130, 131). Não há, até o momento, proposta terapêutica bem padronizada visando especificamente a esse aspecto da AR, e os efeitos dos tratamentos atuais ainda não foram bem estudados.

## 2.5 Modelos experimentais de artrite

Diversos aspectos da artrite inflamatória podem ser estudados com material humano, usando células imunológicas do sangue periférico ou material de biópsias. No entanto, doenças humanas manifestam uma interação complexa de características específicas da doença, influências ambientais e fundo genético. Esta heterogeneidade na apresentação clínica necessita de um grande tamanho amostral para detectar características específicas do processo da doença ou abordagem terapêutica.

Além disso, existem dificuldades e limitações na análise dos mecanismos da AR. Tecidos relevantes como linfonodos, medula óssea e baço não são facilmente obtidos e até o tecido sinovial, importante fator de estudo e alvo terapêutico, é raramente acessado. O acesso a tecidos de indivíduos saudáveis para comparar as alterações causadas pela doença também é raro.

Portanto, modelos animais são usados para controlar parte da heterogeneidade da artrite e para ter acesso a tecidos de difícil coleta em humanos. Estes modelos experimentais de artrite são de extrema importância para estudar a patogênese da AR, esclarecendo os processos envolvidos na doença e identificando novos alvos terapêuticos. Eles também são indispensáveis para testar novos produtos com potencial terapêutico.

Modelos experimentais de artrite apresentam diversas características similares às presentes na AR, mas com algumas diferenças (132). Dentre estas diferenças importantes, pode-se citar 1) modelos animais de artrite possuem uma progressão da doença mais rápida e por isso possuem respostas inflamatórias agudas mais marcantes; e 2) roedores possuem uma forte tendência de reabsorção e formação óssea em resposta à inflamação articular, especialmente na região periosteal/endosteal (133).

Por isso, é importante selecionar um modelo animal que melhor se encaixe nos pontos que se deseja investigar. Importantes critérios para seleção de um modelo experimental incluem: 1) capacidade de prever a eficácia de agente em humanos; 2) modelo de fácil realização, dados reproduzíveis, duração razoável do período de experimentação; e 3) patologia e/ou patogênese similar à doença em humanos. Na área da AR, há diversos modelos que possuem bons históricos de predicabilidade. Isso se deve em grande parte ao fato que diversas moléculas foram avaliadas em ensaios clínicos desta doença e os critérios de avaliação de eficácia são mensuráveis (133).

De maneira geral, modelos experimentais podem ser divididos em dois grandes grupos: artrite espontânea e artrite induzida experimentalmente. Apesar da grande diversidade entre os modelos, cada um deles apresenta uma série de características similares à AR.

Artrite inflamatória aguda e crônica semelhante à AR pode ser induzida experimentalmente em linhagens suscetíveis de ratos, camundongos e, em alguns casos, coelhos, porcos da Guinéia ou macacos (134). Cada um dos modelos tem características que lembram a clínica da AR em seres humanos. Características histológicas de todos os modelos de artrite incluem hiperplasia sinovial com infiltração severa de células inflamatórias, semelhante às anormalidades histológicas de pacientes com AR. Além disso, os fatores genéticos também determinam a expressão da doença em modelos de ratos e camundongos, destacando as semelhanças com AR em seres humanos. Contudo, apesar da importância do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) sobre a expressão da doença seja aparente, genes não relacionados ao MHC também influenciam, podendo-se observar re-

sistência da doença em animais com MHC “suscetível” ou suscetibilidade da doença nos animais sem um MHC “suscetível” (134, 135).

Modelos de ratos e camundongos, no entanto, também diferem entre si e em relação a AR com respeito a: início da doença, gravidade da inflamação articular, padrões das articulações envolvidas e várias outras manifestações clínicas e sistêmicas. Cada um desses modelos pode fornecer pistas sobre a etiopatogenia da AR e/ou doenças inflamatórias crônicas (133, 134, 135).

Modelos de roedores têm sido cada vez mais usados por causa da disponibilidade de linhagens geneticamente homogêneas. Em adição, uma variedade de *knockouts* geneticamente modificados e camundongos transgênicos estão disponíveis para dissecar eventos patológicos complexos. Também foi desenvolvido um modelo de artrite-induzida por colágeno em primatas.

Dentre os modelos utilizados para o estudo de novas terapias os mais comuns são artrite induzida por adjuvante (AIA) e artrite induzida por colágeno (CIA). Apesar de novos modelos existirem, dados ligando a eficácia pré-clínica com eficácia clínica comprovada não são suficientes (132).

Um dos modelos experimentais de artrite mais utilizado atualmente é o modelo de artrite induzida por colágeno do tipo II (CIA) (136). Esta preferência ao modelo de CIA se deve ao fato de que é um modelo relativamente simples de realizar, reprodutível e com um vasto número de animais susceptíveis para o desenvolvimento. A CIA pode ser induzida em primatas não-humanos, ratos (Wistar, Sprague-Dawley e Wistar-Lewis) e camundongos (DBA/1J e C57BL/6) (137). Ele compartilha várias características patológicas com a doença, como a resposta anti-colágeno tipo II (CII), principal proteína da cartilagem e um dos autoantígenos da AR. No modelo de CIA o CII mais o adjuvante do Freund desencadeiam a artrite experimental autoimune que apresenta características clínicas, histológicas e imunológicas semelhantes à AR (137).

Assim como na AR, a suscetibilidade do modelo está ligada à expressão de genes específicos do complexo de imunoistocompatibilidade (MHC) de classe II (137). A resposta imune no modelo de CIA é caracterizada por uma resposta autoimune inflamatória contra o colágeno, mediada por células T com o envolvimento de células B também (138). Assim como na AR, diversas citocinas pró-inflamatórias são expressas na cartilagem de camundongos com CIA, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e fator de crescimento tumoral (TGF) $\beta$  (139).

Ao contrário da artrite humana, CIA não é simétrica e não existe uma combinação de patas/articulações afetadas. Similaridade nas características clínicas entre CIA e AR incluem eritema e edema articular. Histologicamente, o modelo de CIA é caracterizado por uma sinovite intensa, que corresponde ao início clínico da artrite humana. Alguns

dias após o aparecimento da doença, os animais desenvolvem erosão cartilaginosa e óssea, um tecido invasivo do tipo *pannus*, formação de fibrose e uma evolução progressiva a anquilose (137). Outra diferença entre este modelo experimental e a AR é a ausência de fator reumatoide.

A CIA é induzida em roedores de 8 a 12 semanas de vida com colágeno do tipo II bovino. A primeira imunização intradérmica ocorre no dia 0 e é composta de CII (2 mg/ml) e adjuvante completo de Freund (CFA - 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*) em iguais volumes para formar uma emulsão. Isso resulta em uma reação inflamatória moderada no local da injeção que dura de 1-2 semanas. No 18º dia após a imunização, realiza-se um *booster* com uma emulsão de adjuvante incompleto de Freund (IFA - sem *Mycobacterium*) em um ponto diferente da cauda. Para a maioria das linhagens CIA-sensíveis, o primeiro sinal clínico do desenvolvimento da artrite tornam-se visíveis entre os dias 21 e 35 após a imunização. A incidência de artrite em linhagens de camundongos suscetíveis é geralmente muito elevado, chegando a 80-100%, em sua maioria (138).

## 2.6 Perda de peso e músculo em artrite experimental

Como já citado, modelos experimentais como a artrite induzida por colágeno (CIA) mimetizam a AR, sendo uma importante ferramenta para o estudo desta doença (140, 141). Esses modelos são amplamente usados para estudar aspectos fisiopatológicos da doença e para testar novas terapias (140, 141). Entretanto, ainda é escassa a literatura quanto ao envolvimento muscular nesses modelos e as vias que estão envolvidas neste acometimento, apresentando um padrão semelhante ao da AR.

Em 1997, Roubenoff *et al* (32) descreveram o modelo de AIA como modelo animal de caquexia reumatoide. Ele identificou perda de 6% de peso nos animais doentes e uma forte correlação do TNF com a perda de peso neste modelo. Desde então, poucos trabalhos foram publicados no tema.

Um grupo espanhóis liderado por López-Calderón estudou neste mesmo modelo de AIA alterações hormonais causada pela inflamação crônica da artrite, identificando redução na secreção do hormônio de crescimento (GH), redução de do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), aumento das proteínas ligantes de IGF (IGFBP) e redução da ingesta alimentar (142, 143). Depois, este grupo identificou alterações musculares, como perda de peso, perda muscular, e alteração de algumas proteínas musculares. Entre elas, podemos citar aumento de MuRF-1 e Mafbx (para maiores explicações, vide o Capítulo 2.8 sobre o sistema ubiquitina-proteossomo), aumento de miostatina (miocina que inibe o crescimento muscular), aumento de MyoD e miogenina (marcadores de regeneração muscular e atividade de células satélites) (143, 144).

Interessantemente, Yamada *et al* (145) demonstraram uma redução na força mus-

cular do modelo de CIA, acompanhado de um aumento de marcadores de estresse oxidativo e nitrosativo, que podem estar comprometendo o funcionamento miofibrilar. Hartog *et al* (146) descreveram em modelo de CIA perda muscular, redução da locomoção espontânea e correlação inversa entre locomoção e peso muscular. Neste mesmo modelo, Filippin *et al* (147) descreveram perda de peso e redução da locomoção progressivas e de acordo com o desenvolvimento da artrite, e uma forte perda muscular em estágio mais severo da artrite.

Teixeira *et al* (11) em modelo de CIA em ratos mostraram que os mecanismos de perda muscular do desuso e da artrite são diferentes, confirmando que essa alteração muscular não se deve somente a imobilidade e redução da locomoção dos animais. Neste mesmo trabalho, se observou aumento de MuRF-1, Mafbx e miogenina similar aos trabalhos de Castillero (143, 144), mas sem alteração na miostatina, o que pode ser explicado por causa do modelo animal diferente.

Considerando todas as características que os estudos anteriores obtiveram, modelo de CIA parece ter as características necessárias para estudar a perda muscular na AR e possivelmente ser usado como modelo de caquexia reumatoide.

## 2.7 Mecanismos de perda muscular

Atualmente, apesar de se ter claro quais cascatas de sinalização podem estar atuando na perda muscular, ainda não está claro exatamente o papel de cada um destes elementos. A maior parte do conhecimento sobre esses mecanismos é derivada de estudos em modelos experimentais de atrofia, como modelo de denervação, suspensão da pata, desuso, jejum (148), diabetes mellitus e câncer (149), bem como estudos em biópsias de músculo em pacientes voluntários (150).

Apesar do progresso no conhecimento dos mecanismos moleculares que levam à atrofia muscular em diversas situações, a perda muscular na AR ainda é muito pouco estudada. Funcionalmente, os pacientes com AR apresentam redução significativa na força muscular, mas a velocidade e as propriedades contráteis musculares mantêm-se inalteradas (151). Esses dados demonstram que o impacto da doença ocorre por meio de perda proteica, afetando principalmente sarcômeros em paralelo e preservando o número de sarcômeros em série.

As diversas condições que levam à perda de massa muscular envolvem distintas cascatas de sinalização intracelular que podem levar à morte celular programada (apoptose), ao aumento da degradação proteica ou ainda à diminuição da ativação das células-satélite responsáveis pela regeneração muscular (Figura 2) (152).

Dentre as vias de proteólise muscular, podemos citar o sistema de autofagia, atra-

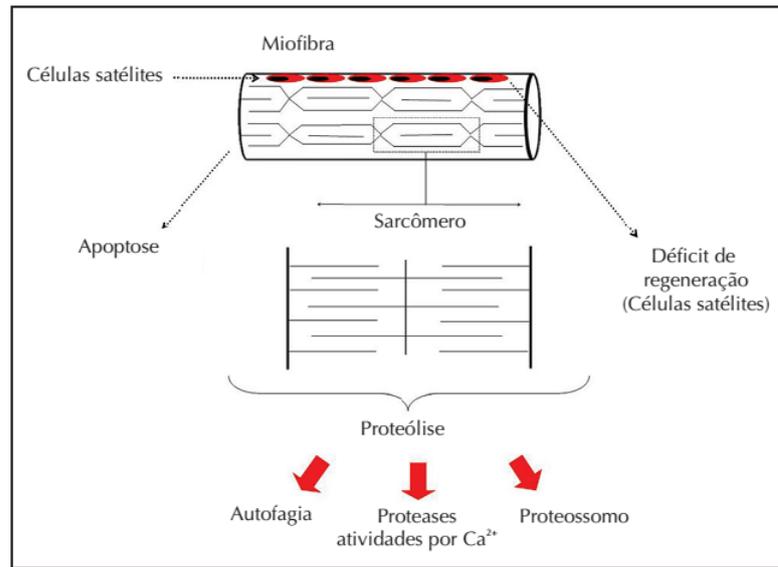


Figura 2 – Mecanismos moleculares envolvidos na sarcopenia (2). A perda muscular pode ocorrer por distintos mecanismos, como um déficit de regeneração pela inatividade de células-satélite, apoptose e vias de degradação proteica, como por exemplo, proteases ativadas por cálcio, proteossomo e autofagia.

vés de proteases lisossomais, proteases ativadas por cálcio, como a calpaina e as caspases, e o sistema proteossomo (Figura 2) (10, 152).

Em modelos experimentais *in vivo* e em humanos não existe consenso sobre a importância relativa das diferentes vias de degradação proteica. Purintrapiban et al. (10) estudaram o papel desses diferentes mecanismos de proteólise em cultura de células musculares. A inibição dos sistemas enzimáticos calpaina, proteossomo e lisossomo ocasionou 20%, 62% e 40% de redução na degradação de proteínas totais, respectivamente. Entretanto, parece claro que há significativa variação na participação de cada uma dessas vias, dependendo da situação clínica envolvida (p. ex., denervação, imobilização, caquexia da malignidade, inflamação crônica) (10, 153, 154). Ainda se desconhece o papel e a importância destas vias na perda muscular causada pela artrite.

## 2.8 O sistema ubiquitina-proteossomo

Um sistema proteolítico relacionado com perda muscular e considerado um dos mais importantes é o sistema ubiquitina-proteossomo. Esse sistema altamente conservado é a principal maquinaria de degradação proteica não lisossomal em células eucarióticas (12, 13) (Figura 2), sendo responsável por degradar 70-90% das proteínas celulares.

O sistema ubiquitina-proteossomo é responsável por processar e degradar proteínas celulares essenciais para a regulação de desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose, transdução de sinal, respostas imune e inflamatória, entre outros, governando,

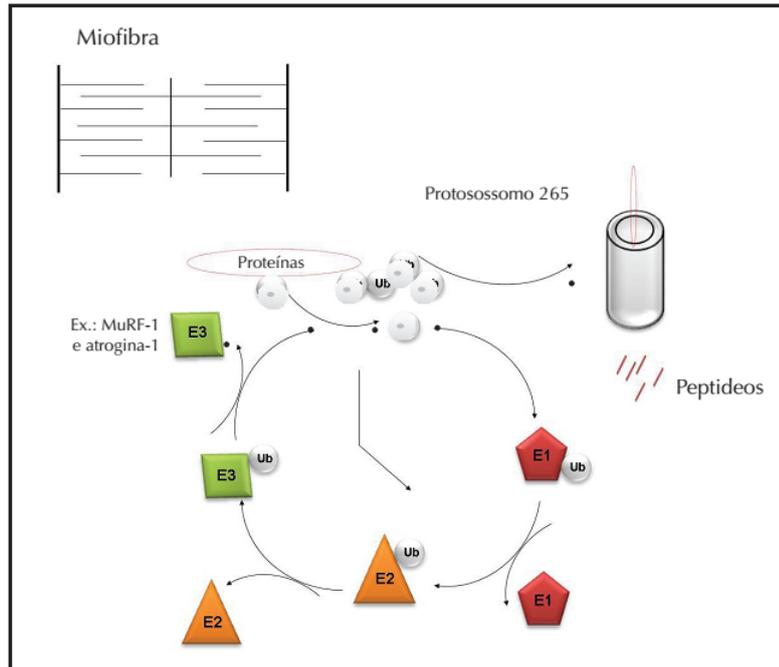


Figura 3 – Sistema ubiquitina-proteossomo de degradação proteica (2). O sistema ubiquitina-proteossomo é um complexo multiproteico citoplasmático que degrada proteínas marcadas por ubiquitina. Essa degradação requer a participação de três proteínas distintas (E1, E2 e E3). As proteínas E3 conferem especificidade às proteínas que serão degradadas. Na atrofia muscular foram descritas algumas enzimas E3, como a MuRF-1 e a atrogina-1.

assim, processos celulares básicos (12, 13).

Proteínas celulares destinadas à degradação pelo proteossomo devem estar devidamente marcadas com uma ligação covalente de múltiplos monômeros de ubiquitina, peptídeos compostos de 76 aminoácidos. A ubiquitina pode ser conjugada a substratos proteicos específicos, processo que requer três componentes enzimáticos (Figura 3): E1, uma enzima ativadora de ubiquitina; E2, uma enzima conjugadora de ubiquitina; e E3, uma enzima ligante de ubiquitina. Inicialmente, a E1 é ativada e, em uma reação dependente de energia, transfere, através da E2, a ubiquitina para a E3, que catalisa a ligação da ubiquitina à proteína, marcando-a para ser degradada (Figura 3) (155).

As enzimas do tipo E3 conferem especificidade à proteína-alvo para degradação. Centenas de diferentes E3 já foram identificadas, e parece que cada uma modula a ubiquitinação de um grupo de substratos proteicos (155). No músculo esquelético foram identificadas duas E3 específicas que estão relacionadas ao processo de atrofia: a atrogina-1 (Muscle Atrophy F-box) ou MAF-bx, e a MuRF-1 (Muscle Ring Finger-1) (153). Foi descrita uma terceira ubiquitina ligase E3, a NEDD-4, que parece facilitar a atrofia muscular em modelos de denervação e de suspensão da pata traseira (156).

A MuRF-1 é uma enzima ubiquitina ligase E3 reconhecida como marcador do

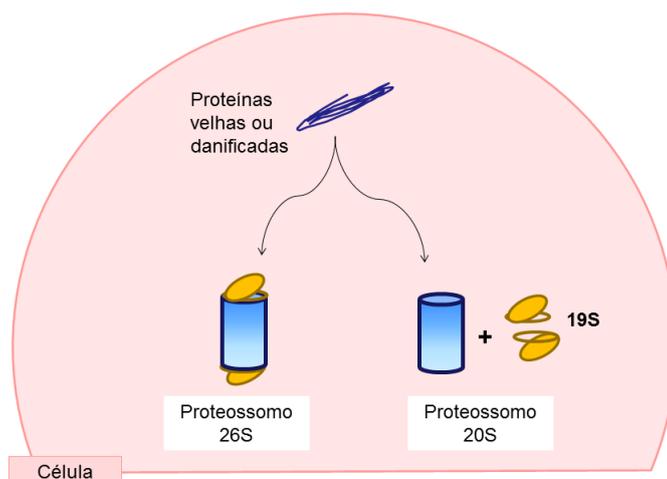


Figura 4 – Proteossomo 26S e 20S. O sistema ubiquitina-proteossomo é o principal responsável por processar e degradar proteínas intracelulares. O núcleo do proteossomo é chamado proteossomo 20S. Quando o proteossomo 20S se une a uma enzima regulatória (19S), ele é a partir de então chamado proteossomo 26S

processo de atrofia muscular em diversos modelos experimentais (14). Essa proteína tem a capacidade de se ligar à titina da linha M (157) a terceira em abundância dentre as proteínas musculares (10%) (158).

O proteossomo é um complexo proteico e suas diferentes partes podem ser nomeadas de acordo com estrutura e atividade. O núcleo do proteossomo é chamado proteossomo 20S (Figura 4). Este núcleo 20S possui forma cilíndrica, é composta por múltiplas subunidades e sua atividade proteásica está localizada na cavidade interna do cilindro, isolada pela parede do mesmo e impedindo a digestão indiscriminada de proteínas. Esse cilindro é composto por quatro anéis empilhados com sete subunidades cada, dois anéis externos com diferentes subunidades  $\alpha$  e dois anéis internos com diferentes subunidades  $\beta$ . Somente as subunidades  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_5$  possuem atividade proteásica (159, 160). Cada subunidade apresenta uma atividade catalítica distinta no proteossomo: atividade do tipo caspase (hidrolisante de peptídeo peptidilglutamil), do tipo tripsina e do tipo quimotripsina, respectivamente.

Quando o proteossomo 20S se une a uma enzima regulatória (19S) (161), ele é a partir de então chamado proteossomo 26S (Figura 4). A enzima 19S reconhece proteínas marcadas com cadeiras de poli-ubiquitina e desnatura estas proteínas para serem degradadas pelo núcleo 20S. A outra proteína reguladora pode ser o 11S, permitindo ao proteossomo a degradação de proteínas não ubiquitinadas. A expressão da enzima 11S é estimulada por mediadores inflamatórios (13, 160).

Quando expostas a citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e interferon (IFN)- $\gamma$

(162), células de eucariotos mais derivados expressam diferentes subunidades,  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  e  $\beta 5i$ , que são incluídas no proteossomo no lugar das subunidades constitutivas durante a neossíntese do proteossomo (160, 163, 164). Este complexo formado por subunidades induzíveis é conhecido como o imunoproteossomo, e possui maior atividade enzimática.

Alguns estudos descreveram o aumento da expressão de subunidades do proteossomo e de enzimas ubiquitinantes durante a atrofia muscular (165) bem como o aumento da expressão de E3 ligases em modelos de denervação, imobilização, restrição alimentar, diabetes mellitus e uremia (14). Esses estudos sugerem que a perda muscular está relacionada com a atividade das E3 ligases MuRF-1 e atrogina-1 (14). Em modelos murinos, a inibição do proteossomo pode reduzir a degradação proteica durante a atrofia (166), indicando um importante papel da via ubiquitina-proteossomo na sarcopenia - mas não é possível extrapolar esses resultados para humanos (167). Inibidores biológicos e sintéticos do proteossomo podem inibir o ciclo celular e induzir apoptose preferencialmente em células neoplásicas (168).

A atrofia muscular que ocorre pela super expressão do sistema ubiquitina-proteossomo parece envolver vias distintas. O aumento das enzimas ligantes de ubiquitina E3 associadas à proteólise muscular já foi identificado no músculo esquelético de modelos murinos de artrite (169, 143), mas os outros componentes da via ubiquitina-proteossomo ainda não foram estudados, como a ubiquitina e subunidades proteossomais, bem como em que estágio da doença ocorre o desenvolvimento da atrofia. Pela via ubiquitina-proteossomo, observou-se o aumento da expressão de MuRF-1 e de MAF-bx 31 pela NF- $\kappa$ B, FOXO3 (170) e miogenina (171), dados não confirmados em músculo de humanos com artrite. Dessa forma, embora seja a via proteolítica mais estudada em geral, sua importância ainda não foi confirmada em pacientes com artropatia crônica.

No tecido muscular saudável há a expressão principalmente das subunidades constitutivas do proteossomo, enquanto a expressão do imunoproteossomo é mínima (172, 173). No entanto, o imunoproteossomo pode ser super-regulado em resposta ao estresse ou dano (174). Por exemplo, está bem definido o aumento da expressão da via ubiquitina-proteossomo na perda muscular de modelos animais de caquexia do câncer (175, 176). Ainda assim, há pouca literatura sobre o envolvimento do proteossomo em condições como a artrite.

Apesar disso, já foi identificado um aumento da expressão e atividade do proteossomo em doenças inflamatórias como a síndrome de Sjögren e a AR (16, 177). Estas alterações foram identificadas em proteossomos circulantes e de células sanguíneas (16, 177). Na verdade, foi detectada uma correlação entre a concentração de proteossomos circulantes e o estado clínico da doença (177, 178).

Interessantemente, cada tipo de proteossomo possui atividades e funções distintas. O proteossomo 26S requer ATP para sua ativação e é responsável pela degradação celular

de proteínas ubiquitinadas (179) e algumas proteínas não ubiquitinadas (180). Evidências *in vitro* parecem mostrar que o proteossomo 20S degrada seletivamente proteínas oxidadas de uma maneira independente de ATP (181), e foi sugerido como o mecanismo primário para degradação de proteínas danificadas devido ao dano oxidativo (182, 183).

Mas, foi observado que a exposição prolongada ao estresse oxidativo iria inibir a atividade do proteossomo e uma nova síntese de subunidades constitutivas e induzíveis ocorreria, formando proteossomos com maior capacidade de degradação e mais resistentes ao estresse oxidativo (184). A presença do estresse oxidativo durante o processo inflamatório, assim como a artrite, já está bem estabelecido (106).

## 2.9 Tratamentos da AR

Apesar de ainda não existir uma cura, medicamentos podem melhorar a condição dos pacientes com AR e reduzir a progressão da doença. O tratamento da AR deve ser iniciado o mais cedo possível e tão intensivo quanto necessário para induzir o controle da doença e, preferencialmente, sua remissão (185).

Inúmeros estudos têm demonstrado melhor resposta terapêutica, menor destruição articular e menor perda funcional nos pacientes tratados mais precocemente, no primeiro ano dos sintomas (185). Atualmente, existe o conceito da "janela terapêutica", que são 12 semanas após os primeiros sinais clínicos da doenças, considerada tempo ideal para que o tratamento tenha efeitos benéficos e sustentados a longo prazo, muitas vezes alcançando a remissão mais rapidamente (185).

Três principais categorias terapêuticas são usadas no tratamento para AR: drogas anti-inflamatórias não esteroides (NSAIDs), glicocorticoides, drogas anti-reumáticas modificadores da doença (DMARDs) e agentes biológicos.

(evitar começar frase com sigla) NSAIDs são atualmente anti-inflamatórios utilizados para tratar alguns dos sintomas da AR, como dor e rigidez articular (79). Esta droga perdeu sua posição como primeira escolha de tratamento por causa de sua baixa efetividade, inabilidade de modificar o curso da doença a longo prazo e efeitos tóxico cardíaco e gastrointestinal (186, 187). Atualmente se recomenda o uso destes agentes juntamente com inibidores de bomba de prótons para minimizar os riscos. NSAIDs muitas vezes são usados nas primeiras semanas após o diagnóstico da AR, para reduzir a inflamação enquanto se espera que DMARD de ação mais lenta façam efeito (188).

Assim como os NSAIDs, glicocorticoides são usados para suprimir a inflamação da AR, reduzindo inchaço articular e dor. A dosagem recomendada de glicocorticoides para AR possui efeito limitado sobre o desenvolvimento da doença (189). Apesar de altas doses de glicocorticoides causarem toxicidade inaceitável, menores doses de prednisona

(ou seu equivalente) de  $\leq 15$  mg pode reduzir dor e inchaço em muitos pacientes (190). Foi demonstrado que efeitos adversos de glicocorticoides são dose-dependentes (191).

Nestas doses menores, glicocorticoides não apresentam efeitos adversos mais sérios (189). No entanto, todas as dosagens de glicocorticoides são danosas para o metabolismo ósseo, levando a redução da formação óssea (192). Por isso, é recomendado a suplementação de vitamina D e cálcio para quem está sendo medicado com glicocorticóides e o uso de bifosfonado para indivíduos com maior risco de osteoporose (190).

DMARDs são uma coleção heterogênea de agentes agrupados juntos por uso e convenção. Elas são os principais tratamentos para AR (188). Muitos dos mecanismos de ação destes medicamentos não são completamente conhecidos. Eles reduzem o inchaço articular, dor e marcadores de fase aguda, limitam o dano articular progressivo e melhoram a função. O principal DMARD é o metotrexato (193), seguido por sulfasalazina (194) e leflunomida (195).

Efeitos adversos dos DMARDs podem ser leves (e.g., náusea) e sérios (e.g., hepatotoxicidade, alterações no sangue, problemas pulmonares) (193). Metotrexato, um imunossupressor amplamente utilizado a partir dos anos 80, é reconhecido atualmente como a droga de referência para o tratamento da AR. Utilizado como monoterapia, é capaz de controlar as manifestações clínicas, levar à melhora funcional e deter a progressão radiológica. Além disso, foi demonstrada a sua capacidade de intervir com o prognóstico da doença, sendo implicado na redução da mortalidade cardiovascular associada à AR (196).

Os agentes biológicos, também chamados de modificadores da resposta biológica, são anticorpos ou proteínas recombinantes que bloqueiam a atividade de mediadores inflamatórios ou moléculas sinalizadoras envolvidas na AR. Estas moléculas podem ser divididas em dois grupos: os agentes anti-TNF, já com mais de 10 anos de experiência de uso, e os mais recentes agentes aprovados para uso comercial no Brasil em 2006-2007, os quais têm diferentes mecanismos de ação (188).

Inibidores do fator de necrose tumoral (TNF) e outros agentes biológicos foram proclamados como a chamada "revolução terapêutica", transformando a perspectiva para pacientes com AR. A maioria desses agentes biológicos são inibidores do TNF- $\alpha$  (197), devido à sua importância no processo inflamatório e destruição das articulações (198), sendo um grande contribuidor na patogênese da AR (199).

TNF, uma citocina pró-inflamatória, liberada por monócitos ativados, macrófagos, e também por linfócitos T, fibroblastos e células endoteliais, está profundamente envolvido na patogênese da AR. Diferentes inibidores de TNF foram e estão sendo desenvolvidos para o tratamento da AR. Atualmente três estão disponíveis em uso comercial, dois anticorpos monoclonais anti-TNF (um anticorpo quimérico - Infiximabe - e outro

um anticorpo totalmente humano - Adalimumabe) e um receptor solúvel do TNF (etanercepte - proteína de fusão composta do receptor do TNF ligado a porção Fc de uma imunoglobulina humana) (197).

Estes agentes inibidores do TNF empregados como monoterapia, mas particularmente quando associados com metotrexato, são eficazes, reduzindo os sinais e sintomas da doença e a progressão radiológica (200). Agentes biológicos que não têm o TNF como alvo terapêutico, como o Rituximabe e Abatacepte, também foram aprovados para o tratamento da AR (201, 202).

Contudo, essas terapias ainda apresentam efeitos adversos significativos e devem ser mantidas por longo prazo, pois não são curativas da doença (203). Dentre os numerosos efeitos advesos provenientes do tratamento com inibidores de TNF- $\alpha$ , infecções são o mais comum (204). O risco é maior para o desenvolvimento de doenças granulomatosas, especialmente a tuberculose (205). Estudos indicam que, apesar de não aumentar o número de tumores sólidos, terapia anti-TNF aumenta o risco de linfoma quando comparado com a população normal (206). Falência cardíaca também foi descrito como um evento adverso de tratamento com inibidores de TNF (207). Ocorre também uma reativação de hepatite crônica B, caso não seja dado um anti-retroviral. Outros eventos adversos descritos com os agentes anti-TNF incluem descompensação citopenias, elevação de enzimas hepáticas, vasculites cutâneas e síndromes desmielinizantes (206).

A formação de auto anticorpos foi descrita na terapia dos três inibidores de TNF- $\alpha$ . Estes anticorpos são especialmente anti-DNA, mas pacientes podem desenvolver anticorpos contra os próprios medicamentos (208, 209, 210). Em pacientes com AR, a presença de anticorpos anti-medicação varia de 5% a 20% (211). Alguns dados sugerem que estes anticorpos estão associados com a perda da eficiência do medicamento e um aumento da frequência de reações contra infusão (212).

No entanto, pacientes que apresentam alterações de peso e músculo ainda de maneira geral estão sendo tratados com drogas anti-reumáticas, mas ainda assim apresentam perda muscular. O papel dos diferentes mecanismos de proteólise e o efeito de drogas anti-reumáticas como anti-TNF e metotrexato são de grande importância para esclarecer os mecanismos de perda muscular e o efeito destes tratamentos sobre estes parâmetros.

### 2.9.1 Metotrexato

Há mais de 20 anos o metotrexato (MTX) é a terapia mais utilizada como tratamento para a AR (193). É a primeira droga utilizada por reumatologistas para impedir a progressão da doença (197). No entanto, seu efeito sobre a perda muscular e o proteossomo na artrite ainda é desconhecido.

Foram propostos quatro mecanismos de ação deste medicamento: 1. função de

agente antifólico, inibindo a proliferação de células que estão rapidamente se dividindo, como linfócitos na AR (213); 2. diminuição do acúmulo de agentes tóxicos, especialmente poliaminas, que são dependentes do tetrafolato e contribuem para o dano tecidual na AR (214); 3. redução dos níveis intracelulares de glutathiona, levando a uma redução no dano oxidativo (215); 4. aumento dos níveis de adenosina extracelular, uma ação anti-inflamatória (216, 217). Todos estes mecanismos parecem estar envolvidos na ação deste medicamento no tratamento da AR (193).

Efeitos adversos comuns no tratamento do MTX com pacientes são: náusea, desconforto abdominal, perda de apetite, fadiga e dores de cabeça. Efeitos adversos mais graves do MTX incluem hepatite, cirrose, úlceras, citopenias e pneumonia intersticial e eventualmente disfunção renal (193). Suplementação de ácido fólico concomitante ao tratamento com MTX aumenta a tolerância ao medicamento, pois reduz os efeitos adversos (193).

MTX é o padrão ouro com que novos medicamentos são comparados. Sua eficiência é comparável às outras DMARDs, mas parece ter ação inferior aos agentes biológicos (218). No entanto, devido à combinação de eficiência, baixo custo e tolerância aceitável, acredita-se que continuará a ser o tratamento de escolha inicial (188).

O efeito do tratamento com metotrexato (MTX) sobre a artrite experimental é controverso. Apesar de já ter sido relatado a efetividade do MTX em modelo de CIA (219), outros trabalhos com estes mesmo modelo não obtiveram resultados positivos da terapia (220).

Na literatura, há pouca informação do efeito do metotrexato sobre o envolvimento muscular. No entanto, estudos descreveram que o tratamento com metotrexato melhorou o ganho de peso em paciente com artrite idiopática juvenil (221) e no modelo experimental de artrite induzida por adjuvante, apesar do peso corporal dos animais tratados não chegarem ao nível dos animais saudáveis (222). Por outro lado, foi descrita a correlação entre aumento do índice de massa corporal e a atividade da doença (223) e o efeito observado nos artigos de Chedeville *et al* (221) e Jurcovicova *et al* (222) poderiam decorrer do efeito do metotrexato sobre a atividade da doença.

Por exemplo, Sasakawa *et al* (224) reportaram que o tratamento terapêutico de MTX não alterou o desenvolvimento da doença, atividade de locomoção espontânea e não protegeu animais com CIA da perda de peso. MTX já foi descrito possuir um efeito na redução da ingestão de água e alimento em ratos saudáveis, causando perda de peso e massa magra (225).

Marcora *et al* (226) observaram uma diferença significativa no ganho e composição de massa corporal em pacientes com AR: o grupo tratado com etanercepte (anti-TNF) ganhou uma proporção maior de massa magra que os pacientes tratados com metotrexato.

### 2.9.2 Etanercepte e tratamentos anti-TNF

O primeiro tratamento biológico que age como inibidor específico do TNF- $\alpha$  aprovado para AR é o etanercepte (ETN). O ETN é uma proteína solúvel que consiste na porção ligante da porção humana 75 kDa (p75) do receptor do TNF (TNFR) fusionada com da fração constante (Fc) do IG1 humano (227). A meia-vida da droga após absorção é aproximadamente quatro dias (227).

Ele se liga tanto ao TNF- $\alpha$  solúvel quanto ao TNF- $\beta$  (*lymphotoxina*) (188), mas não ao TNF- $\alpha$  ligado na membrana. Sua eficiência de ligação ao TNF- $\alpha$  é aproximadamente 1000 vezes maior que o TNFR monomérico solúvel (227). O ETN neutraliza o TNF- $\alpha$  e bloqueia sua atividade pró-inflamatória, assim melhorando a função física e prevenindo maiores danos articulares nos pacientes com AR (227).

Em modelo experimental de artrite, ETN reduziu a severidade da doença, reduzindo a escore clínico, edema da pata traseira e dor (228, 229). Apesar de sua alta eficiência, os mecanismos do ETN não estão completamente claros, e seu efeito sobre a perda muscular e sobre o proteossomo ainda não foram estudados.

TNF- $\alpha$  é considerado ter um papel chave nos mecanismos de perda muscular (121). Apesar de um estudo publicado anteriormente não ter observação ganho de peso em pacientes tratados com etanercepte (226), estudos mais recentes descreveram melhora de peso corporal em pacientes com AR tratados com medicamentos anti-TNF (230, 231, 232, 233). Terapia anti-TNF também reduziu a perda muscular em modelo animal de caquexia do câncer (175, 176).

Foi documentado que o TNF induz um efeito anoréxico ao nível do hipotálamo (234), e terapias anti-TNF poderiam reduzir este efeito (175, 176). Portanto, o TNF demonstra ter efeitos importantes sobre o músculo esquelético, incluindo o aceleração do catabolismo muscular e causando disfunção contrátil e miogênese (revisado em (235)). TNF consegue induzir mudanças no proteossomo muscular, como superexpressão de suas subunidades constitutivas e induzíveis (236, 155, 237).



## 3 Marco Teórico

A seguir, está um esquema ilustrativo do marco teórico do trabalho (Figura 5).

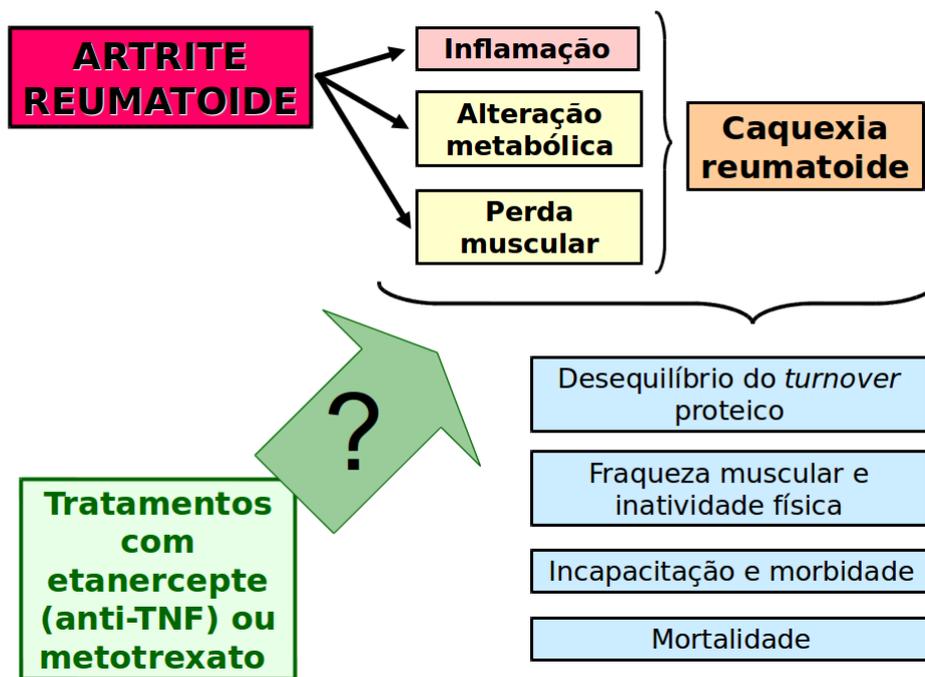


Figura 5 – Esquema ilustrativo do marco teórico do trabalho. A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune inflamatória crônica. A inflamação crônica causa alterações metabólicas, como o hipermetabolismo, e pode levar à perda muscular. Este conjunto de características pode ser denominado caquexia reumatoide. A partir destas alterações, ocorre um desequilíbrio no *turnover* proteico, relacionado com o aumento da proteólise muscular, e fraqueza muscular com maior inatividade física, que entram em um processo de retroalimentação negativa entre si. Esse quadro aumenta a incapacitação e morbidade dos indivíduos, levando à maior mortalidade. Ainda se desconhece os efeitos dos tratamentos da AR, como anti-TNF e metotrexato, sobre todas estas características.

## 4 Justificativa

Diante do apresentado acima, a perda de massa muscular consequente da artrite é uma manifestação extra-articular altamente prevalente e que afeta profundamente a funcionalidade e expectativa de vida dos indivíduos. Ela causa um profundo impacto socioeconômico e funcional nessa população. Não há, até o momento, proposta terapêutica padronizada para essa complicação. Há poucos estudos avaliando o impacto das terapias atuais na perda de massa muscular (238).

Da mesma forma, conforme discutimos anteriormente, praticamente não existem estudos sobre a participação das diversas cascatas que levam à atrofia e à regeneração muscular em modelos experimentais ou em pacientes com artropatias crônicas. Os mecanismos de perda muscular possuem papel significativo neste processo. Ao que tudo indica, o sistema ubiquitina-proteossomo possui papel chave na precissão de perda muscular.

Entretanto, os processos biomoleculares envolvidos na perda muscular, a atividade do proteossomo, bem como o papel do anti-TNF- $\alpha$  nessa condição, têm sido muito pouco estudados. Para isso o uso de modelos experimentais de artrite apresenta-se como uma boa ferramenta.

O conhecimento mais aprofundado do processo de atrofia e proteólise do músculo cronicamente inflamado, onde o etanercepte e o metotrexato podem apresentar papel significativo, são de alta relevância para o esclarecimento do papel das diferentes vias de proteólise e para a identificação de potenciais alvos de manipulação terapêutica.



## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo Primário

Avaliar a atividade e expressão no proteossomo no músculo de modelo experimental de artrite e o efeito da inibição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e do metotrexato sobre estes mesmos parâmetros.

### 5.2 Objetivos Secundários

1. Mensurar o escore clínico e edema dos animais nos diferentes grupos experimentais;
2. Avaliar a atividade de locomoção espontânea dos animais e comparar com o grupo controle;
3. Avaliar periodicamente o peso dos animais nos diferentes grupos durante o período experimental;
4. Pesquisar os músculos gastrocnêmio e tibial anterior dos animais nos diferentes grupos experimentais e avaliar a proporção muscular nos animais, através da normalização do peso muscular com o peso do animal;
5. Determinar a atividade do proteossomo nos diferentes grupos estudados;
6. Determinar a expressão proteica das subunidades do proteossomo no tecido muscular dos diferentes grupos experimentais;
7. Quantificar a expressão gênica das subunidades do proteossomo no tecido muscular dos diferentes grupos experimentais.



## 6 Artigo Original

O manuscrito a partir da pesquisa original deste trabalho é intitulado "**The proteasome is related to muscle wasting in experimental arthritis and is altered by etanercept treatment**". Este manuscrito está submetido no periódico Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle (fator de impacto 7,315, Qualis CAPES A1).

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre durante três anos de doutorado no Brasil e um ano no laboratório do Professor Dr Eugen Feist, da Charité - Universitätsmedizin Berlin, na Alemanha.

Esse trabalho contou com o apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínica de Porto Alegre (FIPE), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA pelo número 12-0044.

Noname manuscript No.  
(will be inserted by the editor)

## The proteasome is related to muscle wasting in experimental arthritis and is altered by etanercept treatment

Vivian Oliveira Nunes Teixeira ·  
Paulo Vinícius Gil Alabarse · Khetam  
Ghannan · Jordana Miranda Souza  
Silva · Lidiane Isabel Filippin · Lorena  
Martinez-Gamboa · Eugen Feist ·  
Ricardo Machado Xavier

Received: date / Accepted: date

**Abstract** Background: Rheumatoid arthritis is an autoimmune inflammatory disease associated with systemic complications like fatigue and muscle wasting. Muscle wasting could be related to the activation of the ubiquitin-proteasome system. The aim of this study was to evaluate muscle loss and involvement of the proteasome in collagen-induced arthritis (CIA), with or without treatment with methotrexate or a TNF inhibitor (etanercept).

Methods: Male DBA1/J mice were divided into 4 groups (n=8 each): CIA (saline); ETN (etanercept, 5.5 mg/kg) and MTX (methotrexate, 35 mg/kg), treated twice a week for 6 weeks, and a healthy control group (CO). Treatments started one week after booster injection. Clinical score, hind paw oedema, and body weight were analysed during the experimental period. Gastrocnemius muscles (GA) were weighted after death and used to quantify proteasome activity, protein levels and mRNA expression of its subunits by Western blot and rtPCR, respectively.

Results: Treatments slowed disease development, observed through smaller clinical score and hindpaw edema in ETN and MTX groups. ETN presented higher body weight compared to MTX group at weeks 5 and 7. GA weight was heavier in ETN than CIA and MTX, a result also observed after normalization of muscle with body weight. Of note, the catalytic properties of 26S proteasome showed an increase of caspase-like activity in CIA and MTX groups. Furthermore, muscles tissues of MTX treated animals showed higher protein

---

Vivian Oliveira Nunes Teixeira  
Laboratório de Doenças Autoimunes  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS  
Rua Ramiro Barcelos, 2350, sala 12109, CEP 90035-903  
Porto Alegre, RS, Brasil  
Tel.: +55-51-33598837  
Fax: +55-51-33598340  
E-mail: voteixeira@hcpa.edu.br

levels for proteasomal subunits PSMB8 and PSMB9 and increased gene expression for *Psmb5*, *Psmb8* and *Psmb9*. In contrast, expression of *Psmb6* was decreased and of *Psmb9* was enhanced in CIA.

Conclusions: Although both drugs improved the disease score, ETN presented a stronger anti-arthritic effect and was the only treatment able to partially prevent muscle wasting. In contrast to ETN, MTX treatment did not prevent muscles loss due to CIA accompanied by persistent up-regulation of proteasome expression and activity.

**Keywords** experimental arthritis · muscle wasting · proteasome · TNF inhibitor

## 1 Introduction

Chronic inflammatory diseases decreases body weight and induce muscle wasting [54]. Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory systemic autoimmune disease with persistent polyarticular synovitis that can progress to joint destruction and several systemic complications, such as muscle wasting. Recently it has been reported that low muscle mass is present in 20% of RA patients [67]. In established disease, 38% of RA patients presented low muscle mass [16], although previous studies described higher rates of 50 and 67% [44, 55]. Muscle wasting in RA is associated with weight loss, decreased physical activity as well as increased fatigue and weakness, all of which can further compromise functional capacity and quality of life, with an elevated socioeconomic impact [13, 61].

The trigger mechanisms of muscle wasting in RA are not fully elucidated, but causes are likely to be anorexia, hormone dysfunction (insulin resistance and enhanced myostatin) and cytokine-driven hypermetabolism [63, 56]. All of these seem to be a consequence of inflammatory mediators, particularly of TNF- $\alpha$  [63, 56]. RA associated muscle wasting has been correlated with the intensity of inflammation and the severity of the disease [21]. In addition to RA, many other diseases that cause muscle wasting have been associated with higher inflammatory status, emphasizing the importance of inflammation in muscle wasting [47].

Muscle wasting is associated with skeletal muscle protein breakdown that can involve different proteolytic pathways. A proteolytic system related to muscle wasting and currently considered one of the most important is the ubiquitin-proteasome system. This highly conserved system is the major machinery of non-lysosomal protein degradation in eukaryotic cells [45, 27] and is responsible for processing and degrading cell proteins essential for the regulation of development, differentiation, proliferation, apoptosis, signal transduction, and immune and inflammatory response [45, 27, 68].

The proteasome is a protein complex and its different parts can be named accordingly to structure and activity. The core structure of the proteasome is referred to as the 20S proteasome. It is cylinder shaped, composed of multiple subunits, and the protease activity is located in the inner cavity of the cylinder,

isolated by its walls. The cylinder is composed of four stacked rings, two outer rings made of seven  $\alpha$  subunits and the two inner rings made of seven  $\beta$  subunits. Only the  $\beta 5$  (*Psmb5*),  $\beta 1$  (*Psmb6*) and  $\beta 2$  (*Psmb7*) sub-units contain protease activities [49,69]. Each subunit presents a distinct catalytic activity in the proteasome: chymotrypsin-like activity, peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing (caspase-like) and trypsin-like, respectively.

When the 20S core attaches to a regulatory enzyme (19S) [3], it is called 26S proteasome. The 19S recognizes and denaturates ubiquitinated proteins in an ATP-dependent fashion, allowing these proteins to be degraded by the 20S core. The other regulator complex is the 11S (or PA 28), which is induced by inflammatory mediators such as IFN- $\gamma$ , enabling the proteasome to degrade non-ubiquitinated proteins [27,69].

Under exposed to inflammatory cytokines like TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  [25], high eukaryotic cells are capable to express new alternative enzymatic sub-units, called the  $\beta 5i$  (*Psmb8*),  $\beta 1i$  (*Psmb9*) and  $\beta 2i$  (*Psmb10*), which can replace their constitutive homologs during proteasome neosynthesis [15,66]. A complex formed with these specialized subunits is known as immunoproteasome providing different enzymatic activity properties, e.g. for the generation of for the main histocompatibility complex (MHC) class I antigen peptides.

The proteasome is an indispensable component for cell survival and plays a pivotal role in the regulation of inflammatory and immune responses. However, only few studies have investigated the role of the proteasome system in chronic-inflammatory diseases such as RA. In this context, increased quantity of proteasome was identified in circulating and blood cell proteasomes in patients with RA [14,72]. Besides, these proteasome activity was shown to correlate to disease severity and immunologic activity [14,72].

Different immunosuppressive drugs like methotrexate (MTX) and TNF- $\alpha$  inhibitors are established in the treatment of RA, improving signs and symptoms of the disease and preventing joint damage. MTX is a synthetic disease modifying anti-rheumatic drug (DMARD) and it is usually the first choice in the therapeutic algorithm. However, its effects over muscle wasting and on the proteasome are unknown.

Among TNF- $\alpha$  inhibitors, etanercept (ETN) was the first target-specific biologic DMARD approved for RA. ETN is a soluble recombinant protein composed by the ligand portion of human 75 kDa (p75) chain of the TNF receptor (TNFR) fused with the constant fraction (Fc) of human IgG1 [?]. ETN neutralizes TNF- $\alpha$  and blocks its biologic (inflammatory) activity, improving physical function and preventing further joint damage in patients with RA [?]. However, ETN effect on muscle wasting of RA is still not well understood. One small phase II clinical trial did not demonstrate any difference of ETN over MTX in RA patient's body composition, although ETN-treated patients had greater increases of fat-free mass on follow-up [42].

This study was designed to investigate muscle wasting with respect to expression and activity of the proteasome in the muscle tissue of collagen-induced arthritis model under treatment with ETN and MTX. Here, we demonstrate

that proteasome is altered in CIA muscle, and that only treatment by ETN was able to reduce this alteration.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Animals and experimental groups

Male DBA/1J mice from 8 to 12 weeks of age were used. The animals were reared at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , with 12 hour light-dark cycles and free access to food and water. All experiments were performed according to the Guiding Principles for Research Involving Animals (NAS) and to the Research and Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Animals were divided in 4 groups (n=8 each): collagen-induced arthritis animals treated with saline (CIA), CIA treated with etanercept (ETN), CIA treated with methotrexate (MTX) and a healthy control group (CO).

### 2.2 Induction of arthritis

Arthritis was induced with bovine type II collagen (CII, Chondrex Inc., Redmond, WA, USA) dissolved in 0.1 M acetic acid at  $4^\circ\text{C}$  for 12 h and emulsified with complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma, St Louis, MO, USA) containing 4 mg/ml of inactivated *Mycobacterium tuberculosis* (Difco, Lawrence, KS, USA). Equal volumes of CII (2 mg/ml) and CFA (4 mg/ml) were mixed to form the emulsion [53].

During the procedure, mice were anaesthetized with isoflurane (Abbott Lab., Abbott Park, IL, USA). At day zero, 50  $\mu\text{l}$  of emulsion were injected intradermally at the base of the tail to induce arthritis [53]. After eighteen days, animals received a booster reinforcement of the emulsion in another site of the tail, but emulsified with IFA (incomplete Freund's adjuvant - without *Mycobacterium*) [53]. Animals were euthanized seven weeks after booster injections, with cervical dislocation after isoflurane anesthesia.

### 2.3 Clinical severity and measurement of oedema

Arthritis severity was evaluated clinically according to a graded scale of 0 to 4 as follows: 0, no evidence of erythema and swelling; 1, erythema and mild swelling confined to the tarsals or ankle joint; 2, erythema and mild swelling extending from the ankle to the tarsal; 3, erythema and moderate swelling extending from the ankle to metatarsal joints; and 4, erythema and severe swelling encompassing the ankle, foot, and digits, or ankylosis of the limb [46]. Clinical score was considered the sum of the four paws, reaching a maximum of score 16.

Joint oedema was assessed by size of latero-lateral extent of the width of the metatarsus of the mice hindpaws with digital calipers (Mitutoyo, Aurora,

IL, USA), as previously described [19]. Arthritis clinical score and hindpaw size measurements were obtained at the time of the booster (18 days) and then every 2 days.

#### 2.4 Drug treatment

Treatments started one week after booster injection and were administered (ip) twice a week for six weeks. Etanercept (50 mg/ml Embrel, Pfizer, New York, NY, EUA) and methotrexate (25 mg/ml Lexato, Laboratrio Pierre Fabre do Brasil Ltda, Arcal, RJ, Brasil) were purchased. Etanercept (5.5 mg/kg) and methotrexate (35 mg/kg) were diluted in sterile saline (NaCl 0.9%) at the day of injection, and maintained cold and in the dark until 10 min before injection [35].

#### 2.5 Assessment of locomotion

Before the induction of arthritis (day 0), at booster injection and at the end of every week mice will be placed individually inside an acrylic 60 x 40 cm box (Monitor de Atividade IR, Insight Equipamentos Ltda Ribeiro Preto, SP, Brazil). Spontaneous exploratory locomotion of the animals was detected by sensors bars located in the sides of the movement box for 5 minutes after 30 seconds of adaptation time [19]. The data from the movement detection was sent to and evaluated by the computer software Insight Equipamentos Ltda (Ribeiro Preto, SP, Brazil) using the following parameters: route design, walked distance and velocity, and number of times standing and resting.

#### 2.6 Animal body weight and muscle weight

Animals were weighted before the induction of arthritis (day 0), at the booster injection and at the end of every week. The difference of animal body weight during the experimental period was calculated ( $\Delta$  weight) considering the weight at induction time as baseline.

Gastrocnemius muscle was removed and quickly weighted after animal euthanasia, immediately frozen in liquid nitrogen and stored in  $-80^{\circ}\text{C}$  freezer. To analyse the proportion of muscle of the animals, muscle weight was normalized with animal final body weight (mg/g).

#### 2.7 Muscle homogenization

Muscle tissue was homogenized in 50 mM Tris-HCL pH 7.4, 150 mM sodium chloride, 5 mM magnesium chloride, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 250 mM sucrose, 0.1% triton X-100 for 20S proteasome activity and added 5 mM adenosine triphosphate and 1 mM dithiothreitol for 26s proteasome

activity. Sample protein concentration was measured using Pierce BCA Protein Assay Kit (Rockford, IL, USA).

### 2.8 Determination of proteasome activity

Fluorogenic peptides hydrolysis by 26S and 20S proteasomes were measured with muscle tissue homogenizate. First, 30  $\mu\text{g}$  of sample was pre-incubated with 26S assay buffer (50 mM Tris-HCL pH 7.4, 40 mM potassium chloride, 5 mM magnesium chloride, 5 mM adenosine triphosphate, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mg/ml BSA) or 20S assay buffer (25 mM HEPES pH 7.4, 0.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.03% sodium dodecyl sulfate) with or without the specific inhibitors 50 nM bortezomib (chymotrypsin-like activity, LKT-B5871, Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland) or 40  $\mu\text{M}$  Z-Pro-Nle-Asp-CHO (caspase-like activity, BML-ZW9490, Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland) for 30 min at 37°C. Afterwrad, substrate (final concentration 100  $\mu\text{M}$ ) was added for chymotrypsin-like activity (Z-GGL-AMC, BML-ZW8505, Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland) or for caspase-like activity (Z-LLE-MCA, BML-ZW9345, Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland). After 120 minutes of incubation at 37°C the enzymatic reaction was measured at 355 nm excitation and 460 nm emission [3, 72].

Proteasome activity of a sample was considered to be the difference between the activity with and without specific inhibitor. Afterwards, proteasome activity was normalized with CO animals, which were considered to have 100% activity.

### 2.9 RNA and protein isolation

Isolation of RNA from muscle tissues was performed with the NucleoSpin RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, Dren, Germany). Homogenized muscles were applied onto the NucleoSpin RNA/Protein column, where RNA and DNA were bound to the silica membrane and protein remained in the flow-through. Quality and quantity of RNA were controlled using a NanoDrop 1000 Spectrophotometer, (Thermo Scientific, Schwerte, Germany).

Flow-through was used to isolate proteins from muscle tissues. Protein isolation was proceeded as described by the manufacturer, except that protein pellet was re-suspended in RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer) composed by 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton x-100, 150 mM sodium chloride, 0.5% sodium deoxycholate, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 50 mM sodium fluoride, 1 mM dithiothreitol, 2% SDS. Sample protein concentration was measured using Pierce BCA Protein Assay Kit (Rockford, IL, USA). Isolated protein was used for immunoblot analysis.

### 2.10 Immunoblot

Protein extracts (25  $\mu\text{g}$ ) were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 12% and transferred to a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane, in which the remaining binding sites were blocked with 5% skim milk in tris buffer saline (TBS) pH 7.4. Then the membranes were incubated overnight with the specific antibodies: anti- $\beta 5$  (1:2000, Ab3330, Abcam, Cambridge, England), anti- $\beta 1$  (1:1000, sc-100455, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti- $\beta 5i$  (1:5000, Ab180606, Abcam, Cambridge, England), anti- $\beta 1i$  (1:300, sc-373689, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Protein expression was normalized by expression of anti-GAPDH (1:1000, sc-25778, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Band detection was accomplished with anti-IgG antibodies coupled with horseradish peroxidase antibodies (11000; Dako, Denmark) and visualised by enhanced electrochemiluminescence Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA).

Quantification on immunoblot images was performed with the integrated density function of ImageJ (Bethesda, MD, USA) [23]. Proteasome subunits expression was normalized with CO animals, which were considered to have 100% activity.

### 2.11 Reverse transcription into cDNA and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

To synthesize first-strand cDNA from total RNA, SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis System for real time RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was used according to the instructions of the manufacturer.

Forward and reverse primers of proteasome subunits *Psm $\alpha$ 4*, *Psm $\beta$ 5*, *Psm $\beta$ 6*, *Psm $\beta$ 7*, *Psm $\beta$ 8*, *Psm $\beta$ 9*, *Psm $\beta$ 10*, *Rsp20*, *Ppia* and *HPRT1* for real time RT-PCR were designed using Primer3 program [65] (Supplementary material Table 1).

Amplification reactions contained SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM forward and reverse primers for each gene and cDNA. Real-time PCR was performed in triplicates using the StepOne Plus<sup>TM</sup> Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.) [23].

Expression of mRNA level was performed for *Rsp20*, *Ppia* and *HPRT1* housekeeping genes. Evaluation of the most stable housekeeping gene was performed using RefFinder [?]. It integrates the major programs (geNorm, Normfinder, BestKeeper, and the comparative delta Ct method) to rank the tested housekeeping genes. In this context, *HPRT1* was more stable, and therefore used for normalization in mice muscle tissue.

Differences in relative expression between target and housekeeping gene were determined using the formula  $R = E^{\Delta CT_{\text{housekeeping gene}}} / E^{\Delta CT_{\text{target gene}}}$  according to [48], where E represents the amplification efficiency of the respec-

tive primer system. After this process, subunits expression were normalized with CO animals, which were considered to have 100% activity.

### 2.12 Statistical Analysis

The results are expressed as mean values with standard error of the mean (SEM). The data were compared by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for one variable and two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for two variables. Significance was accepted if  $p \leq 0.05$ . The values were analyzed using the statistical package GraphPad Prism 6 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

## 3 Results

### 3.1 Development and severity of arthritis

The development of the disease in the animals was assessed with the arthritis clinical score and with hindpaw oedema, analysed through hindpaw diameter.

CIA animals developed arthritis as expected, gradually increasing the disease severity and all animals reached the maximum score seven weeks after the booster injection (Fig. 1a). The same was observed in hindpaw oedema, where CIA presented a gradual increase in hindpaw diameter (Fig. 1b). The greatest hindpaw size in CIA was at day 26 after booster injection, and afterwards oedema gradually lessened as joint disability appeared.

Both drugs, ETN and MTX were able to slow down disease development, observed from days 12 to 26 (Fig. 1a). However, this difference was maintained only with ETN until the end of observation time, whereas MTX animals developed disease scores similar to disease controls (CIA) after day 26.

Hindpaw edema was significantly different between CIA and ETN from day 11 to 22 and for MTX from day 9 to 12 (Fig. 1b).

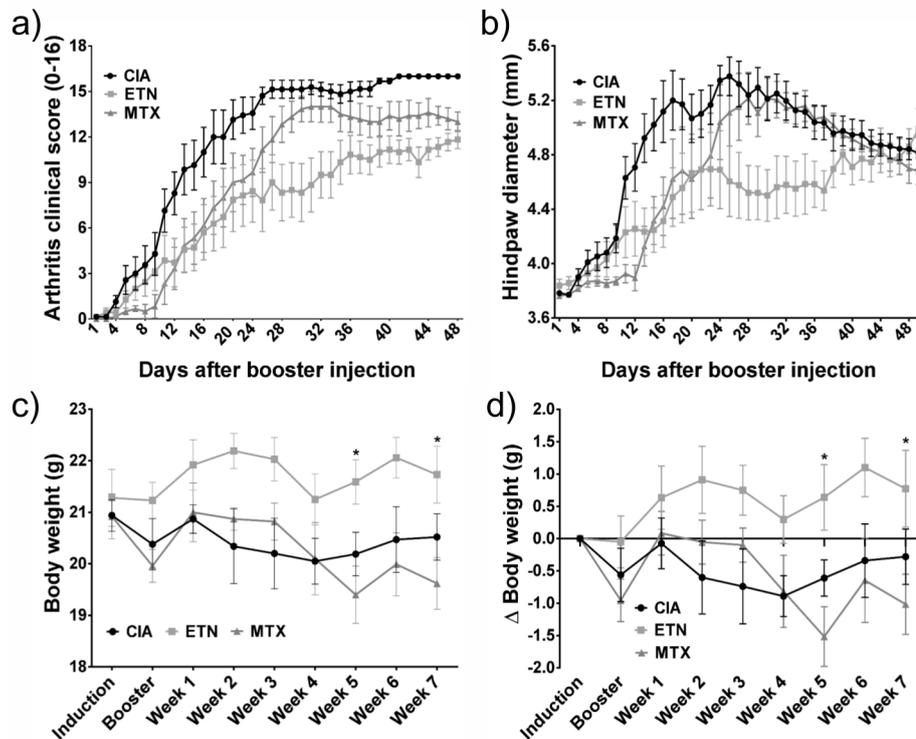
Spontaneous exploratory locomotion did not differ between groups (Supplementary material Fig. 6).

### 3.2 Animal body weight and muscle weight

After disease development, animal body and muscle weight were measured to evaluate if treatments altered these parameters.

CIA animals presented absence of normal gain of weight of mice (Fig. 1c). In fact, besides not gaining any weight these mice present loss of weight compared to their initial weight (Fig. 1d).

Animal body weight was significantly different between ETN and MTX treated animals with ETN being heavier, a result also observed in the changes in body weight (Fig. 1c and d).

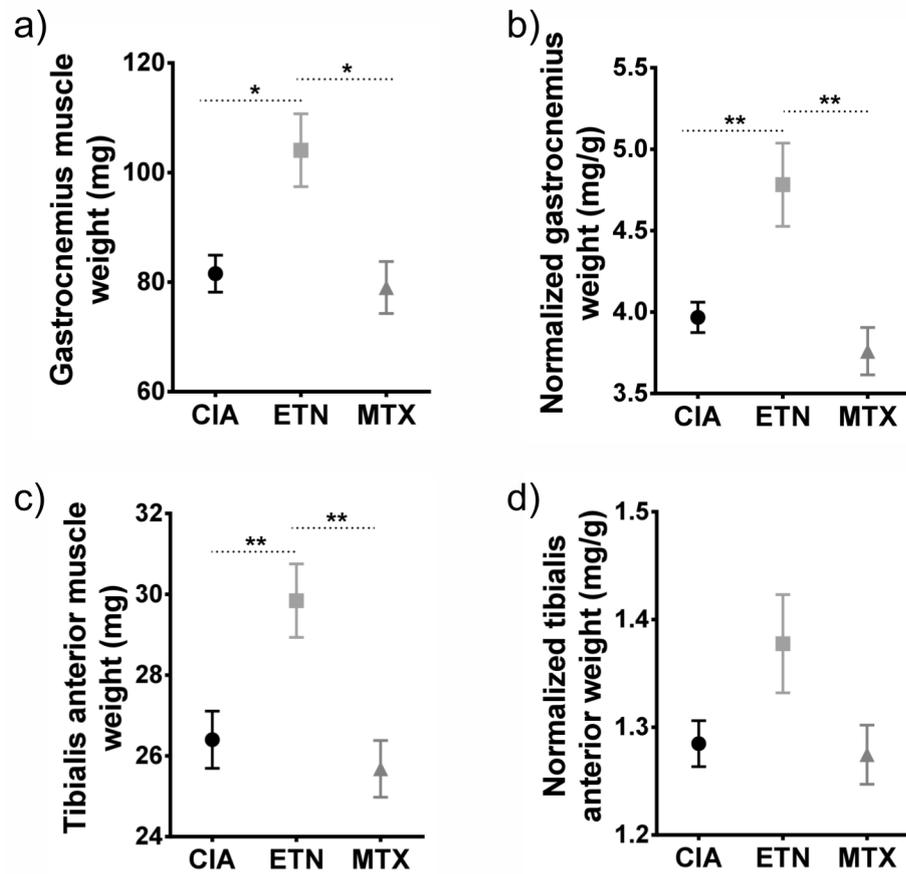


**Fig. 1** Development of the disease and weight gain during experimentation period. Progression of arthritis was analysed by clinical score (a) and hind paw oedema (b), through hind paw diameter, every two days from booster injection (day 0). Animal body weight (c) and  $\Delta$  body weight (d), consisting in the difference of body weight from the induction of arthritis, were evaluated every week after booster injection. CIA: collagen-induced arthritis non-treated; ETN: CIA treated with etanercept; MTX: CIA treated with methotrexate. Data is presented as mean  $\pm$  SEM from 8 animals each group. \* $p < 0.05$  vs MTX analysed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test.

Gastrocnemius as well as tibialis-anterior muscles weights were heavier in ETN animals than CIA and MTX (Fig. 2a and b). However, this difference was maintained only in gastrocnemius muscle after normalization with animal weight (Fig. 2c and d).

### 3.3 Proteasome activity

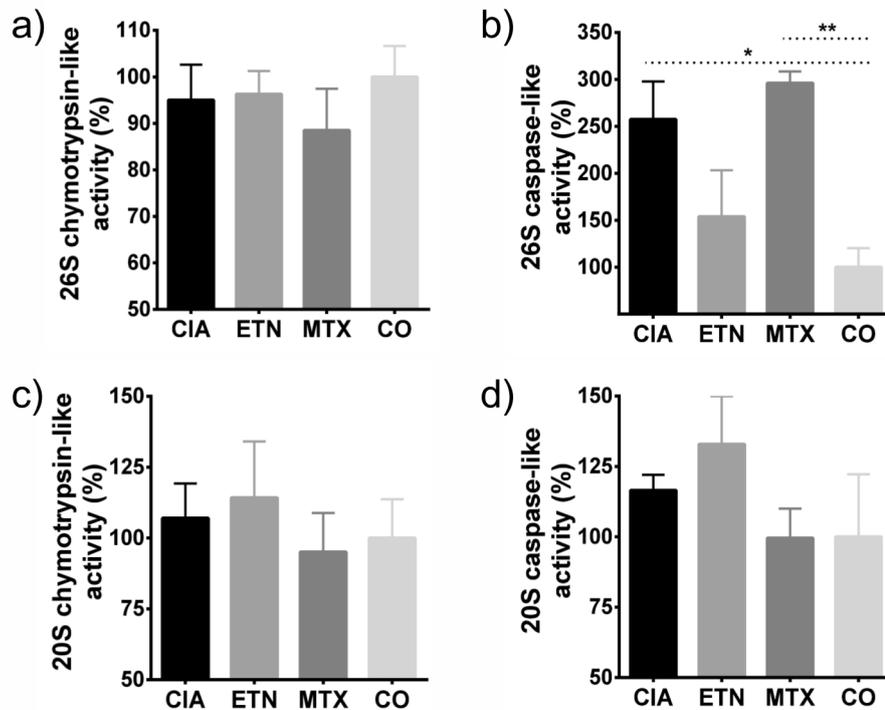
To clarify whether the proteasome was altered in CIA and influenced by treatments, proteasome activity was determined in muscle tissue. Muscle proteasome enzymatic activity was measured using specific fluorescent substrates and specific inhibitors for chymotrypsin-like (PSMB5 and PSMB8) and capase-like activities (PSMB6 and PSMB9).



**Fig. 2** Muscle weight and normalized muscle weight of animals at the end of the experimentation period. After euthanasia, gastrocnemius (a) and tibialis anterior (c) muscles were weighted. Both gastrocnemius (b) and tibialis-anterior (d) muscles weights (mg) were normalized by animal body weight (g) at the end of the experimentation period, so muscle proportion can be analysed. CIA: collagen-induced arthritis non-treated; ETN: CIA treated with etanercept; MTX: CIA treated with methotrexate. Data is presented as mean $\pm$ SEM from 8 animals each group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  analysed by one-way ANOVA followed by Turkey's test.

When performed with ATP and without SDS, 26S activity was measured. Although 26S chymotrypsin-like activity did not differ between groups, 26S capase-like activity was enhanced in CIA ( $p < 0.05$ ) as well as MTX ( $p < 0.01$ ) but not in ETN groups vs CO (Fig. 3a and b).

With respect to 20S activity, no significant differences were observed among groups for chymotrypsin-like and capase-like activities (Fig. 3c and d).



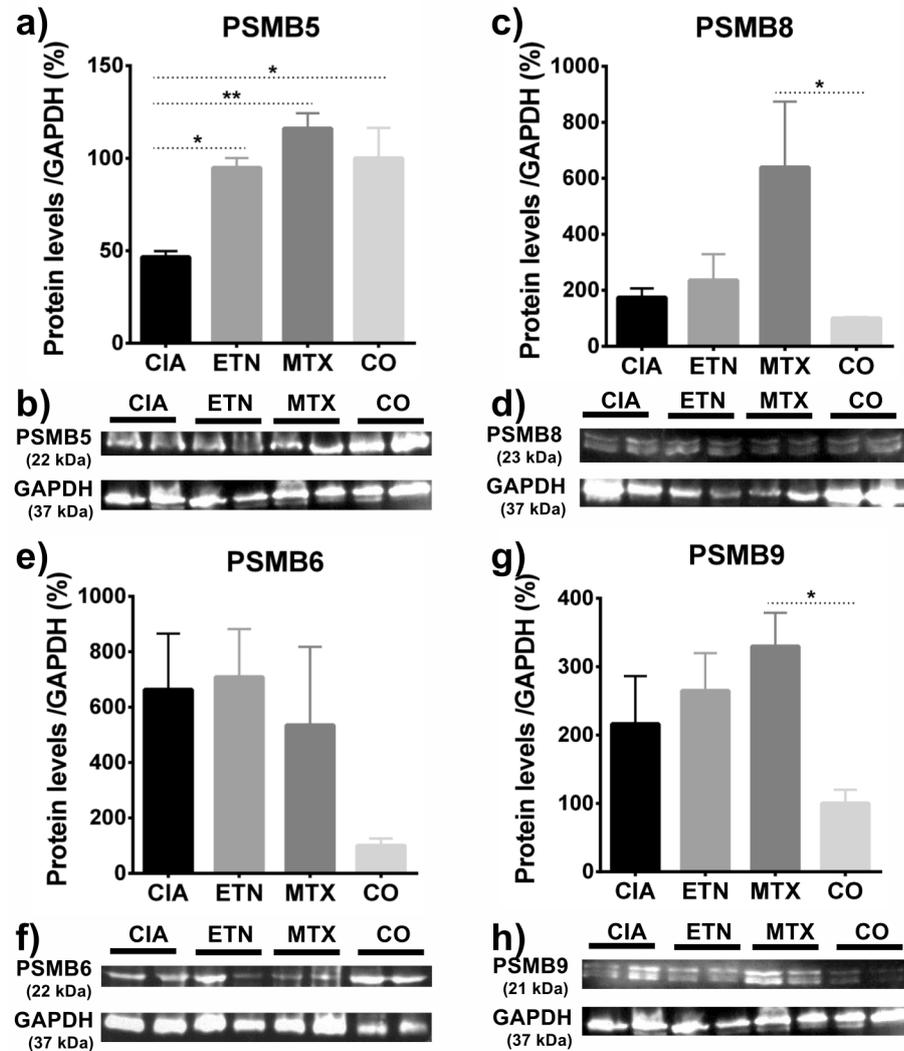
**Fig. 3** Proteasome activity from muscles of arthritic and healthy animals. Gastrocnemius muscles of animals were homogenized and proteasome activity was performed with specific inhibitors and fluorogenic substrates for chymotrypsin-like (a and c) and caspase-like activity (b and d) for 26S (a and b) and 20S (c and d) proteasomes. Activity is presented in % versus CO values. CIA: collagen-induced arthritis non-treated; ETN: CIA treated with etanercept; MTX: CIA treated with methotrexate; CO: healthy control animals. Data is presented as mean $\pm$ SEM from 8 animals each group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  analysed by one-way ANOVA followed by Turkey's test.

### 3.4 Immunoblot

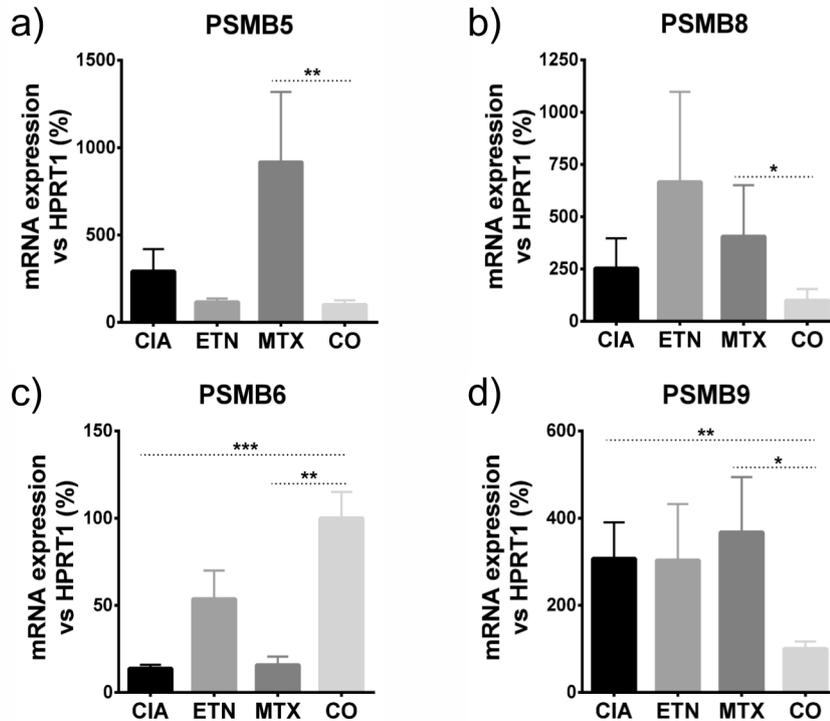
In the next step, immunoblot was performed to evaluate the protein levels of proteasome subunits (PSMB5, PSMB6, PSMB8, PSMB9) in all experimental groups muscles.

By PSMB5 subunit quantification, protein levels were decreased in CIA vs ETN, MTX and CO (Fig. 4a and b). In contrast, PSMB8 subunit levels was increased in MTX group vs CO (Fig. 4c and d).

Although an increase in PSMB6 subunit levels was observed in CIA, ETN and MTX vs protein levels than CO (Fig. 4c and d).



**Fig. 4** Proteasome subunits protein levels from muscles of arthritic and healthy animals. Gastrocnemius muscles of animals were homogenized and Western blot was performed for PSMB5 (a and b), PSMB8 (c and d), PSMB6 (e and f), PSMB9 (g and h) subunits, followed by specific band quantification and normalization with GAPDH. Protein levels are presented in % versus CO values CIA: collagen-induced arthritis non-treated; ETN: CIA treated with etanercept; MTX: CIA treated with methotrexate; CO: healthy control animals. Data is presented as mean $\pm$ SEM from 4 animals each group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  analysed by one-way ANOVA followed by Turkey's test.



**Fig. 5** mRNA expression from muscles of arthritic and healthy animals. Gastrocnemius muscles of animals were used to extract mice muscle mRNA, transform in cDNA and perform real time RT-PCR for PSMB5 (a), PSMB8 (b), PSMB6 (c), PSMB9 (d) subunits, followed by normalization with housekeeping gene HPRT1. mRNA expression is presented in % versus CO values. CIA: collagen-induced arthritis non-treated; ETN: CIA treated with etanercept; MTX: CIA treated with methotrexate; CO: healthy control animals. Data is presented as mean $\pm$ SEM from 7 animals each group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  analysed by one-way ANOVA followed by Turkey's test.

### 3.5 Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

To confirm the findings of proteasome activity and protein levels, quantitative real time RT-PCR was performed to evaluate differences in the gene expression of proteasome subunits.

*Psmb5* and *Psmb8* mRNA expression were increased in MTX vs CO (Fig. 5a and b).

*Psmb9* was increased in CIA and MTX compared to CO group, whereas subsequently *Psmb6* expression was decreased in CIA and MTX, while (Fig. 5c and d).

*Psm4*, *Psmb7* and *Psmb10* expression did not differ among groups (Supplementary material Fig. 7).

#### 4 Discussion

Muscle wasting and weakness is a common clinical feature in RA [21] and has been described in experimental models [19,62]. However little is known about its etiology and development mechanisms, as well as the impact of anti-rheumatic drugs. Therefore, the role of different muscle wasting mechanisms and the effects of drugs such as methotrexate and anti-TNF therapies upon weight, muscle metabolism and proteasome activity is of special interest.

In this study we investigated muscle wasting and muscle expression and activity of the proteasome in the collagen-induced arthritis model, as well as the effects caused by ETN and MTX treatments. The confirmed significant muscle wasting associated with experimental arthritis was differentially influenced by to standard treatments using a synthetic vs biologic DMARD. In contrast to MTX, a partial increase of body weigh was only achieved with the TNF inhibitor ETN (Fig. 1 and 2).

Moreover, we studied the expression and function of the muscle proteasome system and observed an enhanced caspase-like activity from 26S proteasome (150%) (Fig. 3), which were reflected by an increase in Psmb9 ( $\beta$ 1i) and decrease in Psmb6 ( $\beta$ 1) expression in CIA muscles (Fig. 5). Since inducible proteasome subunits are known to have a different enzymatic activity [12,66], our finding could explain the difference in proteasome caspase-like activity. This data indicate that muscle wasting in experimental arthritis may be related to  $\beta$ 1i subunit expression and activity, associated with enhanced disease activity and induction of immunoproteasome subunits in CIA muscle.

There is limited data from the of literature about the role of proteasome in conditions such as arthritis. Previous reports have described higher activity and expression of circulating blood proteasome and immune-cell proteasome in and RA [30,72]. In fact, there was a correlation of concentrations of circulating proteasomes and the clinical state of the disease [14,24]. However, muscle proteasome was not evaluated in this study.

In mouse healthy muscle, constitutive proteasome subunits are mainly expressed, while immunoproteasome expression is minimal [17,28]. However, immunoproteasome may be up-regulated in response to stress and injury, such as aging [17,28] and cancer cachexia [60]. In the animal model of aging, the authors detected increased protein levels of PSMA1, PSMA3, PSMA4, PSMA15, PSMB8 and PSMB9 subunits [17,28]. In patients with idiopathic inflammatory myositis, upregulation of *Psmb8* and *Psmb9* were detected in muscle biopsies besides changes related to inflammatory infiltration [23]. In our study we found only increased expression for *Psmb9* ( $\beta$ 1i) subunit in CIA muscles, indicating a different proteasome expression pattern in arthritic and myositis or aged muscles.

To our knowledge, this is the first study on expression and activity of the proteasome within the muscle tissue in CIA. Regarding proteasome activity, we detected increased caspase-like activity from 26S proteasome. Interestingly, muscle from aged mice presents lower activity of the three 26S proteasome activities, chymotrypsin-like, trypsin-like and caspase-like activities [17,28]. On

the other hand, in the cancer cachexia mice model, there was increased 26S proteasome chymotrypsin-like activity [33]. Studies with other cancer cachexia models identified increased chymotrypsin-like, trypsin-like and caspase-like activities, but no specification or assay description was available to identify if it was 20S or 26S proteasome activity [59,64].

There is no clear explanation why only caspase-like activity from 26S but not from 20S proteasome was enhanced in our study. However, this could be related to the extensive exposure to oxidative stress and high expression of E3 ubiquitin-ligases in muscle wasting.

Each proteasome species performs distinct functions. The 26S proteasome requires ATP for activation and is responsible for most cellular degradation of both ubiquitinated [26] and some non-ubiquitinated proteins [34]. The 20S proteasome selectively degrades oxidized proteins in an ATP-independent manner [18], and seems to be a primary mechanism for degrading damaged proteins following an oxidative insult [9,52]. However, during prolonged exposure to oxidative stress, proteasomal activities are inhibited and *de novo* proteasome synthesis is activated for constitutive and inducible subunits [11,29]. It has been suggested that these new activated proteasomes are better able to degrade oxidized proteins than the standard 26S proteasome [50], and the production of immunoproteasomes may be of particular importance for the response against oxidative stress [1].

Oxidative and nitrosative stress has been reported in RA, probably related to the inflammatory state [20]. Accordingly, Yamada et al [70] reported nitrosative modifications of myofibrillar proteins and impaired muscle contraction in CIA, related to the oxidative and nitrosative stress. Since we studied our animals until 7 weeks of disease, there was a prolonged oxidative stress, with increased activation of the i26S immunoproteasome, explaining its higher caspase-like activity.

Adding to that, several descriptions of enhanced expression of E3 ubiquitin ligases MuRF-1 and atrogenin-1/MAFbx have been made in muscle of arthritis experimental models [6,41,62], increasing the importance of 26S proteasome. E3 ubiquitin ligases are the enzymes that specifically connect ubiquitin to the target protein, and are usually specific to each tissue. MuRF-1 and atrogenin-1/MAFbx have been appointed as muscle atrophy markers to muscle wasting models [4].

We also studied the effect of two standard RA drugs, etanercept (ETN) and methotrexate (MTX).

Even though both drugs improved the arthritis severity at some point, ETN had a longer effect over disease clinical score (Fig. 1). The beneficial effect of ETN over experimental arthritis was expected, since it has already been shown to reduce disease severity, hindpaw edema and pain in previous studies [40,71]. The effects of MTX over experimental arthritis are more controversial. Although previous reports had demonstrated its effectiveness [35], MTX treatment in arthritis experimental models is not always effective [10], as it seems to be the case in our study.

Interestingly, mean animal body weight was higher in ETN than MTX on weeks 5 and 7 (Fig. 1). Moreover, mean muscle weight was higher in ETN than MTX and CIA animals. This difference was maintained in gastrocnemius muscle after normalization by total body weight (Fig. 2).

Regarding the effect of MTX upon weight and muscle, beneficial effects of methotrexate in RA patient's [8] and experimental arthritis weights [31] has been previously reported. However, these results could be related to the effect of the treatment over disease activity, since Jurgens et al [32] reported an inverse correlation between increased body mass index and disease activity. Therefore, the effect on body weight observed could be due to the effect of methotrexate on disease activity.

Similarly to our results, Sasakawa et al [57] reported that therapeutic treatment with MTX did not improve disease development, spontaneous locomotor activity, and did not tend to recover either body weight in CIA rats. Besides, methotrexate also induced reduction in food and water intake in healthy rats, causing loss of weight and lean mass [58]. This data can help explain our results, since animals with MTX developed the similar disease activity of CIA animals, however were still slightly lighter, specially compared to ETN animals.

Related to the effect of ETN upon muscle, TNF- $\alpha$  is considered to play a significant role in the mechanisms of muscle and weight loss [51]. TNF has strong effects on skeletal muscle, including accelerating muscle catabolism and disrupting contractile dysfunction and myogenesis (reviewed in [37]). Proteasome-specific changes that are elicited by exposure of muscle to increased levels of TNF include upregulation of the ubiquitin-proteasome pathway, increased expression and exchange of the inducible  $\beta$ -subunits, and increased expression of PA28 [22,36,39].

Several articles reported improvement in weight of RA patients treated with anti-TNF therapies [2,5,43]. In fact, Marcora et al [42] observed a significant difference in the composition of the body mass gained of patients with RA: the etanercept (anti-TNF) group gained a significantly greater proportion of fat-free mass than did the patients in the methotrexate group. However, other studies with TNF inhibitors in RA have not shown a clear increase in fat-free mass [7], and more studies are necessary. Still, these results go along our finding that ETN improved, but did not fully prevent muscle waisting, indicating that other mechanisms or mediators are probably involved.

Accordingly, we found that 26S caspase-like activity was enhanced in CIA (250%) and in MTX (300%), while ETN seems to be able to reduce this alteration (150%) (Fig. 3). Regarding protein expression,  $\beta$ 5i and  $\beta$ 1i subunit expression were higher in MTX (Fig. 4). Interestingly, Psm6 ( $\beta$ 1 subunit) gene expression decrease and Psm9 ( $\beta$ 1i subunit) increase in CIA were the same in MTX, while these alterations were not observed in ETN (Fig. 5).

Therefore, in terms of caspase-like activity and proteasome subunit expression, ETN treated animals tended to behave more similarly to the controls, although no significant difference was reached when compared to CIA. A similar result was obtained in a cancer cachexia model [60], however it was

hypothesised that these changes were related to the availability of substrates (e.x. proteasome activity and ubiquitination), and not to the changes in the structural components of the proteasome, that may limit the activity of the ubiquitin-proteasome system.

Thus, TNF-induced alterations in the proteasome pathway is a likely mechanism behind muscle atrophy that occurs in inflammatory catabolic diseases. The inhibition of TNF in wasting diseases is described to decrease muscle wasting and proteasome activity and expression [38,60].

## 5 Conclusion and final remarks

An enhanced proteasome activity (caspase-like activity) and altered expression of proteasome subunits (lower *Psmb6* and higher *Psmb9*) were found to be associated within muscle wasting of chronic experimental arthritis model.

Methotrexate (MTX) treatment could alter disease development, but was not able to affect muscle wasting. MTX-treated muscles presented the same pattern as non-treated CIA, even with higher expression of some proteasome subunits (PSMB5 and PSMB8). The reduced effect of MTX treatment over arthritis disease activity can only partially explain the effects of this drug over muscle wasting.

ETN effect on disease development was stronger compared to MTX. ETN partially prevented animals from weight and muscle loss. However, ETN was not able to fully normalize expression of *Psmb9* and caspase-like activity of proteasome. Therefore, additionally signals and mechanisms besides TNF- $\alpha$  could be involved in muscle wasting of arthritis.

Further studies are necessary to explain the role of proteasome and the effects of TNF inhibition on muscle wasting in arthritis. It is important to clarify the other possible signalling mechanisms of muscle wasting in arthritis, so new possible therapy targets can be developed.

**Acknowledgements** We thank the Unidade de Experimentação Animal (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) for their help during animal experimentation.

The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) granted scholarships for students that helped develop this study. This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

1. Aiken, C.T., Kaake, R.M., Wang, X., Huang, L.: Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **10**(5), R110.006,924 (2011). DOI 10.1074/mcp.M110.006924
2. Alcorn, N., Tierney, A., Wu, O., Gilmour, H., Madhok, R.: Impact of anti-tumour necrosis factor therapy on the weight of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **69**(8), 1571–1571 (2010). DOI 10.1136/ard.2009.122424. URL <http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2009.122424>

3. Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E.: The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**(3), 367–80 (1998). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476896>
4. Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Kumar Dharmarajan, I, Zhen-Qiang Pan, 3 David M. Valenzuela, 1 Thomas M. DeChiara, 1 Trevor N. Stitt, 1 George D. Yancopoulos, .D.J.G.: Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science* **294**(November), 1704–1708 (2001)
5. Brown, R.A., Spina, D., Butt, S., Summers, G.D.: Long-term effects of anti-tumour necrosis factor therapy on weight in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology* **31**(3), 455–461 (2012). DOI 10.1007/s10067-011-1863-6. URL <http://link.springer.com/10.1007/s10067-011-1863-6>
6. Castillero, E., Martín, A.L., López-Mendiña, M., Granado, M., Villanúa, M.A., López-Calderón, A.: IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. *Molecular and cellular endocrinology* **309**(1-2), 8–16 (2009). DOI 10.1016/j.mce.2009.05.017. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501629>
7. Challal, S., Minichiello, E., Boissier, M.C., Semerano, L.: Cachexia and adiposity in rheumatoid arthritis. Relevance for disease management and clinical outcomes. *Joint Bone Spine* **in press** (2015). DOI 10.1016/j.jbspin.2015.04.010
8. Chédeville, G., Quartier, P., Miranda, M., Brauner, R., Prieur, A.M.: Improvements in growth parameters in children with juvenile idiopathic arthritis associated with the effect of methotrexate on disease activity. *Joint Bone Spine* **72**(5), 392–396 (2005). DOI 10.1016/j.jbspin.2005.03.006. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1297319X05000862>
9. Davies, K.J.: Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie* **83**(3-4), 301–310 (2001). DOI 10.1016/S0300-9084(01)01250-0. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295490> \nhttp://ac.els-cdn.com/S0300908401012500/1-s2.0-S0300908401012500-main.pdf?\_tid=c9619ec2-26f7-11e5-a15f-00000aacb362&acdnat=1436528318\_dea3d874a8868ce2ce24d13403eec429\nhttp://ac.els-cdn.com/S0300908401012500/1-
10. Delano, D.L., Montesinos, C., Desai, A., Wilder, T., Fernandez, P., DEustachio, P., Wiltshire, T., Cronstein, B.N.: Genetically-based resistance to the anti-inflammatory effect of methotrexate in the air pouch model of acute inflammation. *Arthritis Rheum* **52**(8), 2567–2575 (2005)
11. Ding, Q., Reinacker, K., Dimayuga, E., Nukala, V., Drake, J., Butterfield, D.A., Dunn, J.C., Martin, S., Bruce-Keller, A.J., Keller, J.N.: Role of the proteasome in protein oxidation and neural viability following low-level oxidative stress. *FEBS Letters* **546**(2-3), 228–232 (2003). DOI 10.1016/S0014-5793(03)00582-9
12. Driscoll, J., Brown, M.G., Finley, D., Monaco, J.J.: MHC-linked LMP gene products specifically alter peptidase activities of the proteasome. *Nature* **365**, 262–264 (1993). DOI 10.1038/365262a0
13. Dunlop, D.D., Manheim, L.M., Yelin, E.H., Song, J., Chang, R.W.: The costs of arthritis. *Arthritis and rheumatism* **49**(1), 101–13 (2003). DOI 10.1002/art.10913. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12579600>
14. Egerer, K., Kuckelkorn, U., Rudolph, P.E., Rückert, J.C., Dörner, T., Burmester, G.R., Kloetzel, P.M., Feist, E.: Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol.* **29**(10), 2045–2052 (2002). DOI 0315162X-29-2045 [pii]. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12375310>
15. Eleuteri, A.M., Kohanski, R.A., Cardozo, C., Orlowski, M.: Bovine Spleen Multicatalytic Proteinase Complex (Proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by Lmp7, Lmp2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *Journal of Biological Chemistry* **272**(18), 11,824–11,831 (1997). DOI 10.1074/jbc.272.18.11824. URL <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.18.11824>
16. Elkan, A.C., Håkansson, N., Frostegård, J., Cederholm, T., Hafström, I.: Rheumatoid cachexia is associated with dyslipidemia and low levels of atheroprotective natural antibodies against phosphorylcholine but not with dietary fat in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis research & therapy* **11**(2), R37 (2009). DOI 10.1186/ar2643

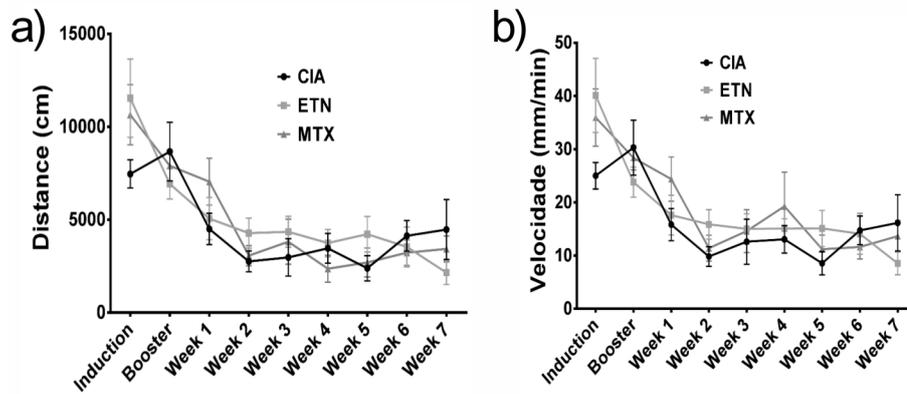
17. Ferrington, D.a., Husom, A.D., Thompson, L.V.: Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **19**(6), 644–646 (2005). DOI 10.1096/fj.04-2578fje
18. Ferrington, D.A., Sun, H., Murray, K.K., Costa, J., Williams, T.D., Bigelow, D.J., Squier, T.C.: Selective Degradation of Oxidized Calmodulin by the 20 S Proteasome. *Journal of Biological Chemistry* **276**(2), 937–943 (2001). DOI 10.1074/jbc.M005356200. URL <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M005356200>
19. Filippin, L.I., Teixeira, V.N., Viacava, P.R., Lora, P.S., Xavier, L.L., Xavier, R.M.: Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* **4**(3), 231–238 (2013). DOI 10.1007/s13539-013-0102-1. URL <http://doi.wiley.com/10.1007/s13539-013-0102-1>
20. Filippin, L.I., Vercelino, R., Marroni, N.P., Xavier, R.M.: Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental immunology* **152**(3), 415–22 (2008). DOI 10.1111/j.1365-2249.2008.03634.x. URL [http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2453196&tool=pmcentrez&rende](http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2453196&tool=pmcentrez&rend)
21. Fukuda, W., Omoto, A., Oku, S., Tanaka, T., Tsubouchi, Y., Kohno, M., Kawahito, Y.: Contribution of rheumatoid arthritis disease activity and disability to rheumatoid cachexia. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association* **20**(5), 439–43 (2010). DOI 10.1007/s10165-010-0306-6. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508962>
22. Garcia-Martinez, C., Llovera, M., Agell, N., Lópiz-Soriano, F.J., Argilés, J.M.: Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased during sepsis: involvement of TNF-alpha but not IL-1. *Biochem Biophys Res Commun* **217**(3), 1995 (1995)
23. Ghannam, K., Martinez-Gamboa, L., Spengler, L., Krause, S., Smiljanovic, B., Bonin, M., Bhattarai, S., Grützkau, A., Burmester, G.R., Häupl, T., Feist, E.: Upregulation of Immunoproteasome Subunits in Myositis Indicates Active Inflammation with Involvement of Antigen Presenting Cells, CD8 T-Cells and IFN $\gamma$ . *PLoS ONE* **9**(8), e104048 (2014). DOI 10.1371/journal.pone.0104048. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0104048>
24. Gruner, M., Moncsek, A., Rödiger, S., Kühnhardt, D., Feist, E., Stohwasser, R.: Increased proteasome activator 28 gamma (PA28 $\gamma$ ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders* **15**(1), 414 (2014). DOI 10.1186/1471-2474-15-414. URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2474/15/414>
25. Hallermalm, K., Seki, K., Wei, C., Castelli, C., Rivoltini, L., Kiessling, R., Levitskaya, J.: Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. *Blood* **98**(4), 1108–1115 (2001). DOI 10.1182/blood.V98.4.1108
26. Hochstrasser, M.: Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405–39 (1996)
27. Huber, E.M., Groll, M.: Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: current and future trends in drug development. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **51**(35), 8708–20 (2012). DOI 10.1002/anie.201201616. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711561>
28. Husom, A.D., Peters, E.A., Kolling, E.A., Fugere, N.A., Thompson, L.V., Ferrington, D.A.: Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **421**(1), 67–76 (2004). DOI 10.1016/j.abb.2003.10.010. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986103005721>
29. Hussong, S.A., Kapphahn, R.J., Phillips, S.L., Maldonado, M., Ferrington, D.A.: Immunoproteasome deficiency alters retinal proteasome's response to stress. *J Neurochem* **113**(6), 1481–90 (2010). DOI 10.1016/j.jneurochem.2011.07.011. *Innate*
30. Jones, B.A., Riegsecker, S., Rahman, A., Beamer, M., Aboualawi, W., Khuder, S.A., Ahmed, S.: Role of ADAM-17, p38 MAPK, Cathepsins, and the Proteasome Pathway in the Synthesis and Shedding of Fractalkine/CX<sub>3</sub>CL1 in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **65**(11), 2814–2825 (2013). DOI 10.1002/art.38095. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/art.38095>

31. Jurcovicova, J., Svik, K., Scsukova, S., Bauerova, K., Rovensky, J., Stancikova, M.: Methotrexate treatment ameliorated testicular suppression and anorexia related leptin reduction in rats with adjuvant arthritis. *Rheumatology international* **29**(10), 1187–91 (2009). DOI 10.1007/s00296-009-0838-2. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19156421>
32. Jurgens, M.S., Jacobs, J.W.G., Geenen, R., Bossema, E.R., Bakker, M.F., Bijlsma, J.W.J., van Albada-Kuipers, I.A., Ehrlich, J.C., Lafeber, F.P.J.G., Welsing, P.M.J.: Increase of body mass index in a tight controlled methotrexate-based strategy with prednisone in early rheumatoid arthritis: Side effect of the prednisone or better control of disease activity? *Arthritis Care & Research* **65**(1), 88–93 (2013). DOI 10.1002/acr.21797. URL <http://doi.wiley.com/10.1002/acr.21797>
33. Khal, J., Wyke, S.M., Russell, S.T., Hine, A.V., Tisdale, M.J.: Expression of the ubiquitin-proteasome pathway and muscle loss in experimental cancer cachexia. *British Journal of Cancer* **93**(7), 774–780 (2005). DOI 10.1038/sj.bjc.6602780
34. Kisselev, A.F., Akopian, T.N., Woo, K.M., Goldberg, A.L.: The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *Journal of Biological Chemistry* **274**(6), 3363–3371 (1999). DOI 10.1074/jbc.274.6.3363
35. Lee, S.W., Kim, J.H., Park, M.C., Park, Y.B., Chae, W.J., Morio, T., Lee, D.H., Yang, S.H., Lee, S.K., Lee, S.K., Lee, S.K.: Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. *Biomaterials* **33**(5), 1563–1572 (2012). DOI 10.1016/j.biomaterials.2011.10.079. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211013123>
36. Li, Y.P., Chen, Y., Li, A.S., Reid, M.B.: Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *American journal of physiology. Cell physiology* **285**(4), C806–12 (2003). DOI 10.1152/ajpcell.00129.2003. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773310>
37. Li, Y.P., Reid, M.B.: Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on skeletal muscle metabolism. *Current Opinion in Rheumatology* **13**(6), 483–487 (2001)
38. Lin, S.Y., Wang, Y.Y., Chuang, Y.H., Chen, C.J.: Skeletal muscle proteolysis is associated with sympathetic activation and TNF- $\alpha$ -ubiquitin-proteasome pathway in liver cirrhotic rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (1650), n/a–n/a (2015). DOI 10.1111/jgh.13159. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/jgh.13159>
39. Llovera, M., García-Martínez, C., Agell, N., López-Soriano, F.J., Argilés, J.M.: TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochemical and biophysical research communications* **230**(2), 238–241 (1997). DOI S0006291X96958271 [pii]
40. Lon, H.K., Liu, D., Zhang, Q., DuBois, D.C., Almon, R.R., Jusko, W.J.: Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Disease Progression Model for Effect of Etanercept in Lewis Rats with Collagen-Induced Arthritis. *Pharmaceutical Research* **28**(7), 1622–1630 (2011). DOI 10.1007/s11095-011-0396-7. URL <http://link.springer.com/10.1007/s11095-011-0396-7>
41. López-Mendiúña, M., Martín, A., Castellero, E., Villanúa, M., López-Calderón, A.: Short-term growth hormone or IGF-I administration improves the IGF-IGFBP system in arthritic rats. *Growth Hormone & IGF Research* **22**(1), 22–29 (2012). DOI 10.1016/j.ghir.2011.12.003. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096637411001225>
42. Marcora, S.M., Chester, K.R., Mittal, G., Lemmey, A.B., Maddison, P.J.: Randomized phase 2 trial of anti-tumor necrosis factor therapy for cachexia in patients with early rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr* **84**(6), 1463–1472 (2006)
43. Metsios, G.S., Stavropoulos-Kalinoglou, A., Douglas, K.M.J., Koutedakis, Y., Nevill, A.M., Panoulas, V.F., Kita, M., Kitas, G.D.: Blockade of tumour necrosis factor in rheumatoid arthritis: effects on components of rheumatoid cachexia. *Rheumatology* **46**(12), 1824–1827 (2007). DOI 10.1093/rheumatology/kem291. URL <http://www.rheumatology.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/rheumatology/kem291>
44. Munro, R., Capell, H.: Prevalence of low body mass in rheumatoid arthritis: association with the acute phase response. *Annals of the Rheumatic Diseases* **56**(5), 326–329 (1997). DOI 10.1136/ard.56.5.326

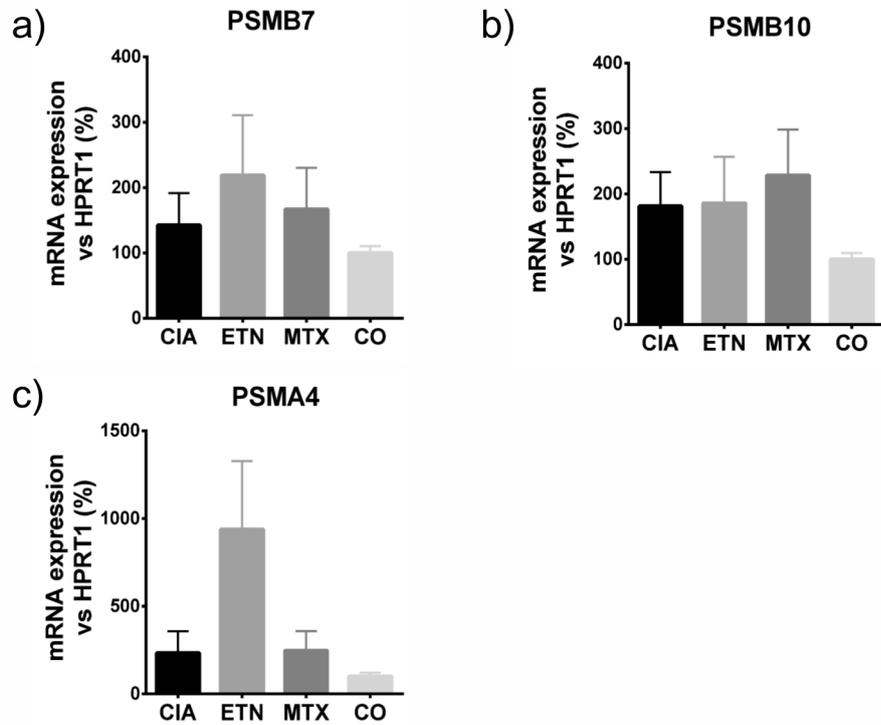
45. Naujokat, C., Fuchs, D., Berges, C.: Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochimica et biophysica acta* **1773**(9), 1389–97 (2007). DOI 10.1016/j.bbamcr.2007.05.007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582523>
46. Oliveira, P.G., Grespan, R., Pinto, L.G., Meurer, L., Brenol, J.C.T., Roesler, R., Schwartzmann, G., Cunha, F.Q., Xavier, R.M.: Protective effect of RC-3095, an antagonist of the gastrin-releasing peptide receptor, in experimental arthritis. *Arthritis and rheumatism* **63**(10), 2956–65 (2011). DOI 10.1002/art.30486. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953084>
47. Petroski, M.D.: The ubiquitin system, disease, and drug discovery. *BMC biochemistry* **9 Suppl 1**, S7 (2008). DOI 10.1186/1471-2091-9-S1-S7. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2582801&tool=pmcentrez&rende>
48. Pfaffl, M.W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research* **29**(9), e45 (2001). DOI 10.1093/nar/29.9.e45. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886>
49. Phillips, S.M., Glover, E.I., Rennie, M.J.: Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology* **107**(3), 645–54 (2009). DOI 10.1152/jappphysiol.00452.2009. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608931>
50. Pickering, A.M., Koop, A.L., Teoh, C.Y., Ermak, G., Grune, T., Davies, K.J.A.: The immunoproteasome, the 20S proteasome, and the PA28 $\alpha\beta$  proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem J* **432**(3), 585–594 (2010). DOI 10.1042/BJ20100878.THE
51. Rall, L.C., Roubenoff, R.: Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology (Oxford, England)* **43**(10), 1219–23 (2004). DOI 10.1093/rheumatology/keh321. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292530>
52. Reinheckel, T., Sitte, N., Ullrich, O., Kuckelkorn, U., Davies, K.J., Grune, T.: Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *The Biochemical journal* **335** ( Pt 3), 637–642 (1998)
53. Rosloniec, E.F., Cremer, M., Kang, A.H., Myers, L.K., Brand, D.D.: Collagen-induced arthritis. In: *Current protocols in immunology*, vol. Chapter 15, pp. Unit 15.5.1–25 (2010). DOI 10.1002/0471142735.im1505s89. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376842>
54. Roubenoff, R., Freeman, L.M., Smith, D.E., Abad, L.W., Dinarello, C.a., Kehayias, J.J.: Adjuvant arthritis as a model of inflammatory cachexia. *Arthritis and rheumatism* **40**(3), 534–9 (1997). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082942>
55. Roubenoff, R., Roubenoff, R.A., Ward, L.M., Holland, S.M., Hellmann, D.B.: Rheumatoid cachexia: depletion of lean body mass in rheumatoid arthritis. Possible association with tumor necrosis factor. *The Journal of rheumatology* **19**(10), 1505–1510 (1992). URL <http://europepmc.org/abstract/MED/1464859>
56. Sakuma, K., Yamaguchi, A.: Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle* **3**(2), 77–94 (2012). DOI 10.1007/s13539-011-0052-4. URL <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3374017&tool=pmcentrez&rende>
57. Sasakawa, T., Sasakawa, Y., Ohkubo, Y., Mutoh, S.: FK506 ameliorates spontaneous locomotor activity in collagen-induced arthritis: implication of distinct effect from suppression of inflammation. *International Immunopharmacology* **5**(3), 503–510 (2005). DOI 10.1016/j.intimp.2004.10.012. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576904003534>
58. Sinno, M.H., Coquerel, Q., Boukhattala, N., Coëffier, M., Gallas, S., Terashi, M., Ibrahim, A., Breuillé, D., Déchelotte, P., Fetissov, S.O.: Chemotherapy-induced anorexia is accompanied by activation of brain pathways signaling dehydration. *Physiology & Behavior* **101**(5), 639–648 (2010). DOI 10.1016/j.physbeh.2010.09.016. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938410003446>
59. Springer, J., Tschirner, A., Hartman, K., Palus, S., Wirth, E.K., Ruis, S.B., Möller, N., von Haehling, S., Argiles, J.M., Köhrle, J., Adams, V., Anker, S.D., Doehner, W.: Inhibition of xanthine oxidase reduces wasting and improves outcome in a rat model of cancer cachexia. *International journal of cancer. Journal international du cancer* **131**(9), 2187–96 (2012). DOI 10.1002/ijc.27494

60. Steffen, B.T., Lees, S.J., Booth, F.W.: Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) **105**(6), 1950–1958 (2008). DOI 10.1152/jappphysiol.90884.2008
61. Summers, G.D., Deighton, C.M., Rennie, M.J., Booth, a.H.: Rheumatoid cachexia: a clinical perspective. *Rheumatology (Oxford, England)* **47**(8), 1124–31 (2008). DOI 10.1093/rheumatology/ken146. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448480>
62. Teixeira, V.O.N., Filippin, L.I., Viacava, P.R., Oliveira, P.G., Xavier, R.M.: Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Experimental Biology and Medicine* **238**(12), 1421–1430 (2013). DOI 10.1177/1535370213505961. URL <http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1535370213505961>
63. Tracey, K.J., Morgello, S., Koplin, B., Fahey III, T.J., Fox, J., Aledo, A., Manogue, K.R., Cerami, A.: Metabolic Effects of Cachectin/Tumor Necrosis Factor Are Modified by Site of Production. *J. Clin. Invest.* **86**, 2014–24 (1990)
64. Trobec, K., Palus, S., Tschirner, A., von Haehling, S., Doehner, W., Lainscak, M., Anker, S.D., Springer, J.: Rosiglitazone reduces body wasting and improves survival in a rat model of cancer cachexia. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **30**(9), 1069–1075 (2014). DOI 10.1016/j.nut.2013.12.005
65. Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B., Remm, M., Rozen, S.: Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**(15), e115 (2012)
66. Ustrell, V., Pratt, G., Rechsteiner, M.: Effects of interferon  $\gamma$  and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 584–88 (1995)
67. van Bokhorst-de van der Schueren, M.a.E., Konijn, N.P.C., Bultink, I.E.M., Lems, W.F., Earthman, C.P., van Tuyl, L.H.D.: Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)* **31**(6), 1008–10 (2012). DOI 10.1016/j.clnu.2012.05.012. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695407>
68. Wolf, D.H., Hilt, W.: The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica et biophysica acta* **1695**(1-3), 19–31 (2004). DOI 10.1016/j.bbamcr.2004.10.007. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15571806>
69. Wu, J.: On the Role of Proteasomes in Cell Biology and Proteasome Inhibition as a Novel Frontier in the Development of Immunosuppressants. *American Journal of Transplantation* **2**, 904–912 (2002)
70. Yamada, T., Place, N., Kosterina, N., Ostberg, T., Zhang, S.J., Grundtman, C., Erlandsson-Harris, H., Lundberg, I.E., Glenmark, B., Bruton, J.D., Westerblad, H.: Impaired myofibrillar function in the soleus muscle of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* **60**(11), 3280–9 (2009). DOI 10.1002/art.24907. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19877058>
71. Zanella, J.M., Burreight, E.N., Hildebrand, K., Hobot, C., Cox, M., Christoferson, L., McKay, W.F.: Effect of etanercept, a tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor, on neuropathic pain in the rat chronic constriction injury model. *Spine* **33**(3), 227–34 (2008). DOI 10.1097/BRS.0b013e318162340a. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18303453>
72. Zoeger, A., Blau, M., Egerer, K., Feist, E., Dahlmann, B.: Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clinical chemistry* **52**(11), 2079–86 (2006). DOI 10.1373/clinchem.2006.072496. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990418>

## 6 Supplementary material



**Fig. 6** Spontaneous locomotion of animals during experimentation period. Spontaneous walking distance (a) and velocity (b) were evaluated at induction day, booster injection and every week after. CIA: collagen-induced arthritis non-treated; ETN: CIA treated with etanercept; MTX: CIA treated with methotrexate. Data is presented as mean $\pm$ SEM from 8 animals each group and was analysed by two-way ANOVA followed by Bonferroni's test.



**Fig. 7** mRNA expression from muscles of arthritic and healthy animals. Gastrocnemius muscles of animals were used to extract mice muscle mRNA, transform in cDNA and perform real time RT-PCR for *Psmb7* (a), *Psmb10* (b) and *Psma4* subunits, followed by normalization with housekeeping gene *HPRT1*. mRNA expression is presented in % versus CO values. CIA: collagen-induced arthritis non-treated; ETN: CIA treated with etanercept; MTX: CIA treated with methotrexate; CO: healthy control animals. Data is presented as mean $\pm$ SEM from 7 animals each group and was analysed by one-way ANOVA followed by Turkey's test.

**Table 1** Primers designed for mice muscle proteasome subunits. Forward and reverse primers of mice proteasome subunits *PsmA4*, *PsmB5*, *PsmB6*, *PsmB7*, *PsmB8*, *PsmB9*, *PsmB10*, *Rsp20*, *Ppia* and *HPRT1* for real time RT-PCR were designed using Primer3 program [65].

Gene	Forward 5'- 3'	Reverse 5'- 3'	Product size
<b>PSMA4</b>	ctgatctgcaccctcaccgt	aagcttggatgttgcgcc	218
<b>PSMB5</b>	atggggctgtctatgggcac	tggctggtagatggctcgg	214
<b>PSMB6</b>	ccactgggtcctacatcgcc	aaagagactggcggctgtgt	188
<b>PSMB7</b>	ccactcttgaccactggcc	ttgctccaaggagccagaa	209
<b>PSMB8</b>	tcatcgtggctgtggactcc	acggagatgcttcccatt	193
<b>PSMB9</b>	gggacaaccatcatggcagt	cagcagcggaacctgagag	154
<b>PSMB10</b>	agaccgggtccagccaaaca	caggtgtggtccaggagca	215
<b>Ppia</b>	gggttcctccttcacagaa	gatgccaggacctgtatgct	145
<b>Rps20</b>	ctgctccgtcctgactcacc	ccgcacaaccttctccagc	183
<b>HPRT1</b>	cccagcgtcgtgattagcga	cacacagagggccacaatgt	186

## 7 Conclusão

Apesar de significativa perda de massa muscular que ocorre na maioria dos pacientes com artrite reumatoide, com um profundo impacto socioeconômico e funcional nesta população, não há até o momento proposta terapêutica padronizada para essa complicação. Há muito poucos estudos avaliando o impacto das terapias atuais na perda de massa muscular. Da mesma forma, conforme discutimos acima, praticamente não existem estudos sobre a participação das diversas cascatas que levam a atrofia e a regeneração muscular em modelos experimentais ou em pacientes com artropatias crônicas.

Na tese em questão, foi investigada no músculo de modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) as alterações do proteossomo, importante mecanismo de proteólise intracelular. Esse estudo demonstrou pela primeira vez um aumento na atividade do proteossomo (atividade do tipo caspase) e expressão alterada de subunidades do proteossomo (redução de *Psmb6* e aumento de *Psmb9*) na perda muscular de modelo crônica de artrite induzida por colágeno (CIA).

Além disso, também investigamos o efeito de duas drogas anti-reumaticas, o metotrexato e o etanercepte, um anti-TNF, sobre a perda muscular e as alterações do proteossomo observadas no modelo de CIA.

O tratamento com metotrexato (MTX) conseguiu alterar parcialmente o desenvolvimento da doença, mas não foi capaz de alterar a perda muscular. Músculos dos animais tratados com MTX apresentaram o mesmo padrão que os animais CIA, e até apresentou uma maior expressão de algumas subunidades do proteossomo ( $\beta 5$  e  $\beta 5i$ ). O efeito reduzido do MTX sobre a atividade clínica da artrite explica somente parcialmente estes resultados.

O efeito do tratamento de ETN sobre o desenvolvimento da doença foi mais forte que MTX. ETN parece ser capaz de parcialmente proteger os animais da perda de peso e músculo, demonstrado do maior peso corporal e muscular dos animais tratados com este medicamento. No entanto, o efeito de ETN não foi capaz de significativamente reduzir o aumento na expressão de  $\beta 1$  e na atividade do tipo caspase do proteossomo apresentado por CIA. Provavelmente outros mecanismos sinalizadores além do TNF estão envolvidos na perda muscular e nas alterações do proteossomo em dito músculo.

Estudos futuros são necessários para explicar o papel do proteossomo e os efeitos da inibição de TNF na perda muscular da artrite. É importante esclarecer também os outros possíveis mecanismos envolvidos no processo de perda muscular da artrite, pois assim é possível o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.



## 8 Perspectivas Futuras

Na continuidade desse trabalho, pretendemos investigar no nosso grupo de pesquisa:

- o efeito do inibidor de proteossomo, Bortezomib, sobre a perda muscular e alterações do proteossomo em CIA;
- as rotas de sinalização intracelular podem estar envolvidas nas alterações observadas no músculo de animais com CIA;
- mecanismos envolvidos nas alterações musculares em pacientes com artrite reumatoide.



## Referências

- 1 ARGILÉS, J. M. et al. Cachexia and sarcopenia: mechanisms and potential targets for intervention. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 22, p. 100–106, 2015. ISSN 14714892. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471489215000405>>. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 19.
- 2 TEIXEIRA, V. D. O. N.; FILIPPIN, L. I.; XAVIER, R. M. Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia. *Revista brasileira de reumatologia*, v. 52, n. 2, p. 252–9, 2012. ISSN 1809-4570. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3493982&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado 4 vezes nas páginas 11, 21, 31 e 32.
- 3 SHORT, C. L.; BAUER, W.; REYNOLDS, W. Rheumatoid arthritis. *Harvard University Press*, 1957. Citado na página 15.
- 4 SENNA, É. R. et al. Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach. *The Journal of rheumatology*, v. 31, n. 3, p. 594–7, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>>. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 23.
- 5 DUNLOP, D. D. et al. The costs of arthritis. *Arthritis and rheumatism*, v. 49, n. 1, p. 101–13, feb 2003. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12579600>>. Citado 3 vezes nas páginas 15, 23 e 25.
- 6 SUMMERS, G. D. et al. Rheumatoid cachexia: a clinical perspective. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 47, n. 8, p. 1124–31, aug 2008. ISSN 1462-0332. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448480>>. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 25.
- 7 MORLEY, J. E.; THOMAS, D. R.; WILSON, M.-M. G. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *The American journal of clinical nutrition*, v. 83, n. 4, p. 735–43, apr 2006. ISSN 0002-9165. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16600922>>. Citado 3 vezes nas páginas 15, 25 e 26.
- 8 ROUBENOFF, R. et al. Rheumatoid cachexia: depletion of lean body mass in rheumatoid arthritis. Possible association with tumor necrosis factor. *The Journal of rheumatology*, v. 19, n. 10, p. 1505–1510, 1992. ISSN 0315-162X. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/1464859>>. Citado 4 vezes nas páginas 15, 18, 25 e 26.
- 9 TRACEY, K. J. et al. Metabolic Effects of Cachectin/Tumor Necrosis Factor Are Modified by Site of Production. *J. Clin. Invest.*, v. 86, p. 2014–24, 1990. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 25.
- 10 PURINTRAPIBAN, J.; WANG, M.-c.; FORSBERG, N. E. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 136, p. 393–401, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 31.

- 11 TEIXEIRA, V. O. N. et al. Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy. *Experimental Biology and Medicine*, v. 238, n. 12, p. 1421–1430, 2013. ISSN 1535-3702. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1535370213505961>>. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 30.
- 12 NAUJOKAT, C.; FUCHS, D.; BERGES, C. Adaptive modification and flexibility of the proteasome system in response to proteasome inhibition. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1773, n. 9, p. 1389–97, sep 2007. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582523>>. Citado 3 vezes nas páginas 15, 31 e 32.
- 13 HUBER, E. M.; GROLL, M. Inhibitors for the immuno- and constitutive proteasome: current and future trends in drug development. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, v. 51, n. 35, p. 8708–20, aug 2012. ISSN 1521-3773. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22711561>>. Citado 4 vezes nas páginas 15, 31, 32 e 33.
- 14 BODINE, S. C. et al. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. *Science*, v. 294, n. November, p. 1704–1708, 2001. Citado 3 vezes nas páginas 15, 33 e 34.
- 15 SAKUMA, K.; YAMAGUCHI, A. Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*, v. 3, n. 2, p. 77–94, jun 2012. ISSN 2190-6009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3374017&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 25.
- 16 ZOEGER, A. et al. Circulating proteasomes are functional and have a subtype pattern distinct from 20S proteasomes in major blood cells. *Clinical chemistry*, v. 52, n. 11, p. 2079–86, nov 2006. ISSN 0009-9147. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990418>>. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 34.
- 17 YANNAKI, E. et al. The proteasome inhibitor bortezomib drastically affects inflammation and bone disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *Arthritis and rheumatism*, v. 62, n. 11, p. 3277–88, nov 2010. ISSN 1529-0131. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20722034>>. Citado na página 16.
- 18 GOLDSTEIN, M. Humoral Nature of the Hypoglycemic Factor of Muscular Work. *Diabetes*, v. 10, n. 3, p. 232–234, 1961. ISSN 0012-1797. Citado na página 17.
- 19 BORTOLUZZI, S. et al. Computational reconstruction of the human skeletal muscle secretome. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 62, n. 3, p. 776–792, 2005. ISSN 08873585. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/prot.20803>>. Citado na página 17.
- 20 HENNINGSEN, J. et al. Dynamics of the Skeletal Muscle Secretome during Myoblast Differentiation. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 9, n. 11, p. 2482–2496, 2010. ISSN 1535-9476. Citado na página 17.
- 21 YOON, J. H. et al. Comparative proteomic analysis of the insulin-induced L6 myotube secretome. *Proteomics*, v. 9, n. 1, p. 51–60, 2009. ISSN 16159853. Citado na página 17.

- 22 PEDERSEN, B. K. et al. Searching for the exercise factor: is IL-6 a candidate? *Journal of Muscle Research & Cell Motility*, Kluwer Academic Publishers, v. 24, n. 2-3, p. 113–119, 2003. ISSN 0142-4319. Citado na página 17.
- 23 PEDERSEN, B. K. The disease of physical inactivity - and the role of myokines in muscle-fat cross talk. *The Journal of Physiology*, v. 587, n. 23, p. 5559–5568, 2009. ISSN 00223751. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 18.
- 24 PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. a. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nature Reviews Endocrinology*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 8, p. 457–465, 2012. ISSN 1759-5029. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 18.
- 25 WALSH, K. Adipokines, myokines and cardiovascular disease. *Circ J*, v. 73, n. 1, p. 13–18, 2009. ISSN 1346-9843. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{\\\_}u](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve{&}db=PubMed{&}dopt=Citation{&}list{\_}u)>. Citado na página 17.
- 26 BRANDT, C.; PEDERSEN, B. K. The Role of Exercise-Induced Myokines in Muscle Homeostasis and the Defense against Chronic Diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, p. 1–6, 2010. ISSN 1110-7243. Citado na página 18.
- 27 BRUUNSGAARD, H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *Journal of leukocyte biology*, v. 78, n. 4, p. 819–835, 2005. ISSN 0741-5400. Citado na página 18.
- 28 PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise: its role in diabetes and cardiovascular disease control. *Essays Biochem*, v. 42, p. 105–117, 2006. Citado na página 18.
- 29 PRATESI, A.; TARANTINI, F.; Di Bari, M. Skeletal muscle: an endocrine organ. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, v. 10, n. 1, p. 11–4, 2013. ISSN 1724-8914. Citado na página 18.
- 30 BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. *Disease Models & Mechanisms*, v. 6, n. 1, p. 25–39, 2013. ISSN 1754-8403. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 22.
- 31 TISDALE, M. J. Cachexia in Cancer Patients. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p. 862–871, 2002. ISSN 1471-0056. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrg927>>. Citado na página 18.
- 32 ROUBENOFF, R. et al. Adjuvant arthritis as a model of inflammatory cachexia. *Arthritis and rheumatism*, v. 40, n. 3, p. 534–9, mar 1997. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9082942>>. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 29.
- 33 EVANS, W. J. et al. Cachexia: a new definition. *Clinical Nutrition*, v. 27, n. 6, p. 793–9, 2008. ISSN 1532-1983. Citado 3 vezes nas páginas 18, 20 e 26.
- 34 Marín Caro, M. M.; LAVIANO, A.; PICHARD, C. Nutritional intervention and quality of life in adult oncology patients. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, v. 26, n. 3, p. 289–301, 2007. ISSN 0261-5614. Citado na página 18.

- 35 MUSCARITOLI, M. et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: Joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) “cachexia-anorexia in chronic wasting diseases” and “nutrition in geriatrics”. *Clinical Nutrition*, v. 29, n. 2, p. 154–159, 2010. ISSN 02615614. Citado na página 18.
- 36 TISDALE, M. J. Mechanisms of Cancer Cachexia. *Physiol Rev*, v. 89, p. 381–410, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 19.
- 37 MUSCARITOLI, M. et al. Muscle atrophy in aging and chronic diseases: is it sarcopenia or cachexia? *Internal and emergency medicine*, jul 2012. ISSN 1970-9366. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773188>>. Citado 3 vezes nas páginas 18, 19 e 21.
- 38 ROUBENOFF, R. et al. Rheumatoid cachexia: cytokine-driven hypermetabolism accompanying reduced body cell mass in chronic inflammation. *The Journal of clinical investigation*, v. 93, n. 6, p. 2379–86, jun 1994. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=294444&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado 4 vezes nas páginas 18, 19, 25 e 26.
- 39 ONESTI, J. K.; GUTTRIDGE, D. C. Inflammation based regulation of cancer cachexia. *BioMed research international*, v. 2014, p. 168407, 2014. ISSN 2314-6141. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4022077&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 18.
- 40 WALSMITH, J. et al. Tumor necrosis factor-alpha production is associated with less body cell mass in women with rheumatoid arthritis. *The Journal of Rheumatology*, v. 31, n. 1, p. 23–29, 2004. ISSN 0315-162X. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 25.
- 41 SAINI, A. et al. Waste management - cytokines, growth factors and cachexia. *Cytokine & growth factor reviews*, v. 17, n. 6, p. 475–86, dec 2006. ISSN 1359-6101. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17118696>>. Citado na página 18.
- 42 TISDALE, M. J. The 'cancer cachectic factor'. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, v. 11, n. 2, p. 73–8, 2003. ISSN 0941-4355. Citado na página 19.
- 43 JEEJEEBHOY, K. N. Malnutrition, fatigue, frailty, vulnerability, sarcopenia and cachexia: overlap of clinical features. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, v. 15, n. 3, p. 213–9, may 2012. ISSN 1473-6519. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450775>>. Citado na página 19.
- 44 KRASNOW, S. M.; MARKS, D. L. Neuropeptides in the pathophysiology and treatment of cachexia. *Current opinion in supportive and palliative care*, v. 4, n. 4, p. 266–271, 2010. ISSN 1751-4258. Citado na página 19.
- 45 SCHOLS, A. M. et al. Body composition and mortality in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Clin Nutr.*, v. 82, p. 53–9, 2005. Citado na página 19.
- 46 VIGANO, A. et al. Quality of life and survival prediction in terminal cancer patients. *Cancer*, v. 101, n. 5, p. 1090–1098, 2004. ISSN 0008-543X. Citado na página 19.

- 47 HAEHLING, S. von; ANKER, S. D. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2010. ISSN 21905991. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.
- 48 LAINSCAK, M. et al. Cachexia: common, deadly, with an urgent need for precise definition and new therapies. *The American journal of cardiology*, v. 101, n. 11A, p. 8E–10E, 2008. ISSN 0002-9149. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.
- 49 ONWUAMAEGBU, M. E.; HENEIN, M.; COATS, a. J. Cachexia in malaria and heart failure: therapeutic considerations in clinical practice. *Postgraduate medical journal*, v. 80, n. 949, p. 642–649, 2004. ISSN 0032-5473. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.
- 50 MAK, R. H. et al. Wasting in chronic kidney disease. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 2, n. 1, p. 9–25, 2011. ISSN 21905991. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.
- 51 HAEHLING, S. von et al. Cardiac cachexia: A systematic overview. *Pharmacology and Therapeutics*, Elsevier Inc., v. 121, n. 3, p. 227–252, 2009. ISSN 01637258. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 20.
- 52 van Bokhorst-de van der Schueren, M. a. E. et al. Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, Elsevier Ltd, v. 31, n. 6, p. 1008–10, dec 2012. ISSN 1532-1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22695407>>. Citado 3 vezes nas páginas 20, 25 e 26.
- 53 FARKAS, J. et al. Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 4, n. 3, p. 173–178, 2013. ISSN 21905991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1007/s13539-013-0105-y>>. Citado na página 20.
- 54 ROSENBERG, I. H. Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. *Am J Clin Nutr*, v. 50, p. 1231–3, 1989. ISSN 0717-6163. Citado na página 20.
- 55 ROSENBERG, I. H. Sarcopenia: diagnosis and mechanisms. *Journal of Nutrition*, v. 127, p. 990–991, 1997. Citado na página 20.
- 56 CRUZ-JENTOFT, A. J. et al. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing*, v. 39, n. 4, p. 412–423, 2010. ISSN 0002-0729. Citado na página 21.
- 57 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação*. 2015. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>>. Citado na página 21.
- 58 ROMANICK, M.; THOMPSON, L. V.; BROWN-BORG, H. M. Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, Elsevier B.V., v. 1832, n. 9, p. 1410–1420, 2013. ISSN 09254439. Citado na página 21.

- 59 THOMAS, D. R. Loss of skeletal muscle mass in aging: Examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia. *Clinical Nutrition*, v. 26, n. 4, p. 389–399, 2007. ISSN 02615614. Citado na página 21.
- 60 ALI, S.; GARCIA, J. M. Sarcopenia, cachexia and aging: diagnosis, mechanisms and therapeutic options - a mini-review. *Gerontology*, v. 60, n. 4, p. 294–305, 2014. ISSN 1423-0003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4112511&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 21.
- 61 FRONTERA, W. R. et al. Aging of skeletal muscle: a 12-yr longitudinal study. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, v. 88, n. 4, p. 1321–1326, 2000. ISSN 8750-7587. Citado na página 21.
- 62 FIELDING, R. A. et al. Sarcopenia: an undiagnosed condition in older adults. Consensus Definition: Prevalence, Etiology, and Consequences. *J Am Med Dir Assoc.*, v. 12, n. 4, p. 249–256, 2011. Citado na página 21.
- 63 JANSSEN, I.; HEYMSFIELD, S. B.; ROSS, R. Low Relative Skeletal Muscle Mass (Sarcopenia) in Older Persons Is Associated with Functional Impairment and Physical Disability. *JAGS*, v. 50, p. 889–896, 2002. Citado na página 21.
- 64 Newman, Anne, B. et al. Strength, But Not Muscle Mass, Is Associated With Mortality in the Health, Aging and Body Composition Study Cohort. *Journal of Gerontology*, v. 61, n. 1, p. 72–77, 2006. Citado na página 21.
- 65 LAURETANI, F. et al. Age-associated changes in skeletal muscles and their effect on mobility: an operational diagnosis of sarcopenia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, v. 95, n. 5, p. 1851–1860, 2003. ISSN 8750-7587. Citado na página 21.
- 66 Silva Alexandre, T. et al. Sarcopenia according to the European working group on Sarcopenia in older people (EWGSOP) versus dynapenia as a risk factor for mortality in the elderly. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, v. 18, n. 8, p. 547–553, 2014. ISSN 17604788. Citado na página 21.
- 67 MANINI, T. M.; CLARK, B. C. Dynapenia and aging: An update. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, v. 67 A, n. 1, p. 28–40, 2012. ISSN 10795006. Citado na página 21.
- 68 CEDERHOLM, T.; CRUZ-JENTOFT, a. J.; MAGGI, S. Sarcopenia and fragility fractures. *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, v. 49, n. 1, p. 111–117, 2013. ISSN 19739087. Citado na página 21.
- 69 MCINTOSH, E. I.; SMALE, K. B.; VALLIS, L. A. Predicting fat-free mass index and sarcopenia: a pilot study in community-dwelling older adults. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, v. 35, n. 6, p. 2423–34, 2013. ISSN 1574-4647. Citado na página 21.
- 70 RIECHMAN, S. E. et al. Association of physical activity and visceral adipose tissue in older women and men. *Obesity research*, v. 10, n. 10, p. 1065–1073, 2002. ISSN 1071-7323. Citado na página 21.
- 71 RYAN, a. S.; NICKLAS, B. J. Age-related changes in fat deposition in mid-thigh muscle in women: relationships with metabolic cardiovascular disease risk factors. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the*

- International Association for the Study of Obesity*, v. 23, n. 2, p. 126–132, 1999. ISSN 0307-0565. Citado na página 21.
- 72 FILIPPIN, L. I. et al. Sarcopenia: a predictor of mortality and the need for early diagnosis and intervention. *Aging clinical and experimental research*, Springer International Publishing, v. 27, n. 3, p. 249–254, 2014. ISSN 1720-8319. Citado na página 22.
- 73 KIM, T. N.; CHOI, K. M. Sarcopenia: definition, epidemiology, and pathophysiology. *Journal of bone metabolism*, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2013. ISSN 2287-6375. Citado na página 22.
- 74 LAU, E. M. C. et al. Prevalence of and Risk Factors for Sarcopenia in Elderly Chinese Men and Women. v. 60, n. 2, p. 213–216, 2005. Citado na página 22.
- 75 WU, I.-C. et al. Epidemiology of sarcopenia among community-dwelling older adults in Taiwan: a pooled analysis for a broader adoption of sarcopenia assessments. *Geriatrics & gerontology international*, v. 14 Suppl 1, p. 52–60, 2014. ISSN 1447-0594. Citado na página 22.
- 76 SILVA, K. A. S. et al. Inhibition of Stat3 Activation Suppresses Caspase-3 and the Ubiquitin-Proteasome System, Leading to Preservation of Muscle Mass in Cancer Cachexia. *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 17, p. 11177–11187, 2015. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.641514>>. Citado na página 22.
- 77 JANSSEN, I. Skeletal Muscle Cutpoints Associated with Elevated Physical Disability Risk in Older Men and Women. *American Journal of Epidemiology*, v. 159, n. 4, p. 413–421, feb 2004. ISSN 0002-9262. Disponível em: <<http://aje.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/aje/kwh058>>. Citado na página 22.
- 78 GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Metabolic disturbances and wasting in the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England Journal of Medicine*, v. 327, n. 24, p. 329–37, 1992. Citado na página 22.
- 79 SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, Elsevier Ltd, v. 376, n. 9746, p. 1094–108, sep 2010. ISSN 1474-547X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870100>>. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 35.
- 80 STOREY, G. O.; COMER, M.; SCOTT, D. L. Chronic arthritis before 1876: early British cases suggesting rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 53, n. 9, p. 557–60, 1994. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1005403&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 22.
- 81 ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, v. 31, n. 3, p. 315–324, 1988. ISSN 0021-5384. Citado na página 22.
- 82 SCOTT, D. et al. Long-Term Outcome of Treating Rheumatoid Arthritis: Results After 20 Years. *The Lancet*, v. 329, n. 8542, p. 1108–1111, 1987. ISSN 01406736. Disponível

- em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673687916722>>. Citado na página 22.
- 83 PINCUS, T.; SOKKA, T.; WOLFE, F. Premature Mortality in Patients With Rheumatoid Arthritis: Evolving Concepts. *Arthritis & Rheumatology*, v. 44, n. 6, p. 1234–1236, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 24.
- 84 van der Helm-van Mil, A. H. M.; HUIZINGA, T. W. J. Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. *Arthritis research & therapy*, v. 10, n. 2, p. 205, 2008. ISSN 1478-6362. Disponível em: <<http://arthritis-research.com/content/10/2/205>>. Citado na página 23.
- 85 Van Oosterhout, M. et al. Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 58, n. 1, p. 53–60, 2008. ISSN 00043591. Citado na página 23.
- 86 LEE, D. M.; WEINBLATT, M. E. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, v. 358, n. 9285, p. 903–911, 2001. ISSN 0140-6736. Citado na página 23.
- 87 SYMMONS, D. et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 41, n. 7, p. 793–800, 2002. ISSN 1462-0324. Citado na página 23.
- 88 CARBONELL, J. et al. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 47, n. 7, p. 1088–92, 2008. ISSN 1462-0332. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511475>>. Citado na página 23.
- 89 PEDERSEN, J. K. et al. Incidence of rheumatoid arthritis from 1995 to 2001: impact of ascertainment from multiple sources. *Rheumatology international*, v. 29, n. 4, p. 411–5, 2009. ISSN 1437-160X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18853167>>. Citado na página 23.
- 90 COSTA, J. et al. Tratamento da artrite reumatoide no Sistema Único de Saúde , Brasil : gastos com infliximabe em comparação com medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos , 2003 a 2006 Treatment of rheumatoid arthritis in the Brazilian Unified National Health. *Cad Saude Pública*, v. 30, n. 2, p. 283–295, 2014. ISSN 16784464. Citado na página 23.
- 91 Van Der Woude, D. et al. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, v. 60, n. 4, p. 916–923, 2009. ISSN 00043591. Citado na página 23.
- 92 OROZCO, G. et al. Association of CD40 with rheumatoid arthritis confirmed in a large UK case-control study. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 69, n. 5, p. 813–6, 2010. ISSN 1468-2060. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3009392&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 23.
- 93 STAHL, E. A. et al. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet*, v. 42, n. 6, p. 508–14, 2010. Citado na página 23.

- 94 PLENGE, R. M. Recent progress in rheumatoid arthritis genetics: one step towards improved patient care. *Current opinion in rheumatology*, v. 21, p. 262–271, 2009. ISSN 1040-8711. Citado na página 23.
- 95 CARLENS, C. et al. Smoking, Use of Moist Snuff, and Risk of Chronic Inflammatory Diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 181, n. 11, p. 1217–1222, 2010. ISSN 1073-449X. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/rccm.200909-1338OC>>. Citado na página 23.
- 96 LIAO, K. P.; ALFREDSSON, L.; KARLSON, E. W. Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 21, n. 3, p. 279–283, 2009. Citado na página 23.
- 97 VERPOORT, K. N. et al. Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response. *Arthritis and rheumatism*, v. 54, n. 12, p. 3799–808, 2006. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17133560>>. Citado na página 23.
- 98 IOAN-FACSINAY, A. et al. Marked differences in fine specificity and isotype usage of the anti-citrullinated protein antibody in health and disease. *Arthritis and rheumatism*, v. 58, n. 10, p. 3000–8, 2008. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18821680>>. Citado na página 23.
- 99 Van Der Linden, M. P. M. et al. Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rh. *Arthritis and Rheumatism*, v. 60, n. 8, p. 2232–2241, 2009. ISSN 00043591. Citado na página 23.
- 100 BEARD, H. K. et al. Anti-collagen antibodies in sera from rheumatoid arthritis patients. *Journal of clinical pathology*, v. 33, n. 11, p. 1077–81, 1980. ISSN 0021-9746. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1146339&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 23.
- 101 MULLAZEHI, M. et al. Anti-type II collagen antibodies are associated with early radiographic destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, BioMed Central Ltd, v. 14, n. 3, p. R100, 2012. ISSN 1478-6362. Disponível em: <[http://arthritis-research.com/content/14/3/R100\\$%delimitter%026E30F\\$nhhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3446477&tool=pmcentrez&rendertype=ab](http://arthritis-research.com/content/14/3/R100$%delimitter%026E30F$nhhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3446477&tool=pmcentrez&rendertype=ab)>. Citado na página 23.
- 102 SCHEFFLER, S. et al. Autoimmune reactivity against the 20S-proteasome includes immunosubunits LMP2 (beta1i), MECL1 (beta2i) and LMP7 (beta5i). *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 47, n. 5, p. 622–6, may 2008. ISSN 1462-0332. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18375405>>. Citado na página 23.
- 103 GRUNER, M. et al. Increased proteasome activator 28 gamma (PA28 $\gamma$ ) levels are unspecific but correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, v. 15, n. 1, p. 414, 2014. ISSN 1471-2474. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2474/15/414>>. Citado na página 23.

- 104 FELDMANN, M.; BRENNAN, F. M.; MAINI, R. N. Rheumatoid arthritis. *Cell*, v. 85, p. 307–10, 1996. ISSN 0003-4967. Citado na página 23.
- 105 CHOY, E. H. S. et al. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Arthritis and rheumatism*, v. 46, n. 12, p. 3143–50, 2002. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12483717>>. Citado na página 24.
- 106 FILIPPIN, L. I. et al. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 48, n. 1, p. 17–24, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 35.
- 107 SOKKA, T.; ABELSON, B.; PINCUS, T. Mortality in rheumatoid arthritis: 2008 update. *Clinical and experimental rheumatology*, v. 26, n. 5 Suppl 51, p. S35–61, 2008. ISSN 0392-856X. Citado na página 24.
- 108 LEVY, L. et al. Incidence and risk of fatal myocardial infarction and stroke events in rheumatoid arthritis patients. A systematic review of the literature. *Clin Exp Rheumatol*, v. 26, n. 4, p. 673–679, 2008. Citado na página 24.
- 109 MICHAUD, K.; WOLFE, F. Comorbidities in rheumatoid arthritis. *Best Practice and Research: Clinical Rheumatology*, v. 21, n. 5, p. 885–906, 2007. ISSN 15216942. Citado na página 24.
- 110 KHURANA, R.; BERNEY, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology*, v. 12, n. 3, p. 153–165, 2005. ISSN 09284680. Citado na página 24.
- 111 FUKUDA, W. et al. Contribution of rheumatoid arthritis disease activity and disability to rheumatoid cachexia. *Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association*, v. 20, n. 5, p. 439–43, oct 2010. ISSN 1439-7609. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20508962>>. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 25.
- 112 TURESSON, C. et al. Occurrence of extraarticular disease manifestations is associated with excess mortality in a community based cohort of patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, v. 29, n. 1, p. 62–67, 2002. ISSN 0315162X. Citado na página 24.
- 113 YOUNG, A.; KODURI, G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, v. 21, n. 5, p. 907–27, 2007. ISSN 1521-6942. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521694207000630>>. Citado na página 24.
- 114 NYHALL-WAHLIN, B. M. et al. High disease activity disability burden and smoking predict severe extra-articular manifestations in early rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, v. 48, n. 4, p. 416–420, 2009. ISSN 1462-0332. Citado na página 24.
- 115 FLEMING, a.; CROWN, J. M.; CORBETT, M. Prognostic value of early features in rheumatoid disease. *British medical journal*, v. 1, n. 6020, p. 1243–5, 1976. ISSN 0007-1447. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1639812&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 25.

- 116 HELLIWELL, M. et al. Nutritional status in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 43, p. 386–390, 1984. Citado na página 25.
- 117 MUNRO, R.; CAPELL, H. Prevalence of low body mass in rheumatoid arthritis: association with the acute phase response. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 56, n. 5, p. 326–329, 1997. ISSN 0003-4967. Citado na página 25.
- 118 BAKER, J. F. et al. Weight Loss, the Obesity Paradox, and the Risk of Death in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatology*, v. 67, n. 7, p. 1711–1717, 2015. ISSN 23265191. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.39136>>. Citado na página 25.
- 119 WESTHOFF, G.; RAU, R.; ZINK, A. Radiographic joint damage in early rheumatoid arthritis is highly dependent on body mass index. *Arthritis & Rheumatism*, v. 56, n. 11, p. 3575–3582, 2007. ISSN 00043591. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.23033>>. Citado na página 25.
- 120 KANDARIAN, S. C.; JACKMAN, R. W. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle & nerve*, v. 33, n. 2, p. 155–65, feb 2006. ISSN 0148-639X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16228971>>. Citado na página 25.
- 121 RALL, L. C.; ROUBENOFF, R. Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 43, n. 10, p. 1219–23, oct 2004. ISSN 1462-0324. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292530>>. Citado 3 vezes nas páginas 25, 26 e 39.
- 122 RALL, L. C. et al. Protein metabolism in rheumatoid arthritis and aging. Effects of muscle strength training and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis & Rheumatism*, v. 39, n. 7, p. 1115–1124, 1996. ISSN 00043591. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.1780390707>>. Citado na página 25.
- 123 PAGET, J. Clinical Lectures on the Nervous Mimicry of Organic Diseases. *Lancet*, v. 102, n. 2615, p. 511–3, 1873. Citado na página 25.
- 124 ROUBENOFF, R. et al. Low physical activity reduces total energy expenditure in women with rheumatoid arthritis: implications for dietary intake recommendations. *The American journal of clinical nutrition*, v. 76, n. 4, p. 774–9, 2002. ISSN 0002-9165. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12324290>>. Citado na página 26.
- 125 BINYMIN, K. et al. The effect of disease activity on body composition and resting energy expenditure in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of inflammation research*, v. 4, p. 61–6, 2011. ISSN 1178-7031. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3218753&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 26.
- 126 HENCHOZ, Y. et al. Physical activity and energy expenditure in rheumatoid arthritis patients and matched controls. *Rheumatology (Oxford, England)*, v. 51, n. 8, p. 1500–7, 2012. ISSN 1462-0332. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22539478>>. Citado na página 26.

- 127 MASUKO, K. Rheumatoid Cachexia Revisited: A Metabolic Co-Morbidity in Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Nutrition*, v. 1, n. November, p. 1–7, 2014. ISSN 2296-861X. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnut.2014.00020/abstract>>. Citado na página 26.
- 128 WALSMITH, J. M.; ROUBENOFF, R. Cachexia in rheumatoid arthritis. *International Journal of Cardiology*, v. 85, p. 89–99, oct 2002. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14705214>>. Citado na página 26.
- 129 ELKAN, A.-C. et al. Rheumatoid cachexia, central obesity and malnutrition in patients with low-active rheumatoid arthritis: feasibility of anthropometry, Mini Nutritional Assessment and body composition techniques. *European journal of nutrition*, v. 48, n. 5, p. 315–22, 2009. ISSN 1436-6215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19333642>>. Citado na página 26.
- 130 ELKAN, A.-C. et al. Rheumatoid cachexia is associated with dyslipidemia and low levels of atheroprotective natural antibodies against phosphorylcholine but not with dietary fat in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study. *Arthritis research & therapy*, v. 11, n. 2, p. R37, 2009. ISSN 1478-6362. Citado na página 26.
- 131 HAEHLING, S. von; ANKER, S. D. Prevalence, incidence and clinical impact of cachexia: facts and numbers-update 2014. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 5, n. 4, p. 261–263, 2014. ISSN 21905991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1007/s13539-014-0164-8>>. Citado na página 26.
- 132 HEGEN, M. et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 67, n. 11, p. 1505–1515, 2008. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2007.076430>>. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.
- 133 BENDELE, A. Animal models of rheumatoid arthritis. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, v. 1, n. 4, p. 377–385, 2001. ISSN 1108-7161. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.
- 134 HU, Y. et al. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, v. 32, n. 2, p. 161–165, 2013. ISSN 07703198. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.
- 135 SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N. Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Current Opinion in Immunology*, v. 17, n. 6, p. 589–594, 2005. ISSN 09527915. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791505001561>>. Citado na página 28.
- 136 BEVAART, L.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. Chapter 11 Collagen-Induced Arthritis in Mice. In: *Methods in Molecular Biology*. [S.l.: s.n.], 2010. p. 181–192. Citado na página 28.
- 137 ROSLONIEC, E. F. et al. Collagen-induced arthritis. In: *Current protocols in immunology*. [s.n.], 2010. Chapter 15, p. Unit 15.5.1–25. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376842>>. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 29.

- 138 BRAND, D. D.; LATHAM, K. a.; ROSLONIEC, E. F. Collagen-induced arthritis. *Nature protocols*, v. 2, n. 5, p. 1269–75, jan 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17546023>>. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 29.
- 139 WILLIAMS, R. O. Collagen-Induced Arthritis in Mice:A Major Role for Tumor Necrosis Factor-alpha. In: *Methods in Molecular Biology: Target Discovery and Validation Reviews and Protocols Volume*. [S.l.: s.n.], 2007. v. 361, p. 265–284. Citado na página 28.
- 140 KOLLIAS, G. et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 70, n. 8, p. 1357–1362, 2011. ISSN 0003-4967. Citado na página 29.
- 141 ASQUITH, D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, v. 39, p. 1991–2058, 2009. ISSN 1108-7161. Citado na página 29.
- 142 LÓPEZ-CALDERÓN, A.; SOTO, L.; MARTÍN, A. Chronic inflammation inhibits GH secretion and alters the serum insulin-like growth factor system in rats. *Life Sciences*, v. 65, n. 20, p. 2049–2060, 1999. Citado na página 29.
- 143 CASTILLERO, E. et al. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 309, n. 1-2, p. 8–16, oct 2009. ISSN 1872-8057. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501629>>. Citado 3 vezes nas páginas 29, 30 e 34.
- 144 CASTILLERO, E. et al. Fenofibrate, a PPAR{alpha} agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 300, p. E790–E799, 2011. ISSN 0193-1849. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 30.
- 145 YAMADA, T. et al. Impaired myofibrillar function in the soleus muscle of mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*, v. 60, n. 11, p. 3280–9, nov 2009. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19877058>>. Citado na página 29.
- 146 HARTOG, A.; HULSMAN, J.; GARSSSEN, J. Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis. *BMC musculoskeletal disorders*, v. 10, p. 59, jan 2009. ISSN 1471-2474. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2700074&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 30.
- 147 FILIPPIN, L. I. et al. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 4, n. 3, p. 231–238, 2013. ISSN 21905991. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1007/s13539-013-0102-1>>. Citado na página 30.
- 148 CALURA, E. et al. Meta-analysis of expression signatures of muscle atrophy: gene interaction networks in early and late stages. *BMC genomics*, v. 9, p. 630, jan 2008. ISSN 1471-2164. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2642825&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 30.

- 149 BOER, M. D. de et al. The temporal responses of protein synthesis, gene expression and cell signalling in human quadriceps muscle and patellar tendon to disuse. *The Journal of physiology*, v. 585, n. Pt 1, p. 241–51, nov 2007. ISSN 0022-3751. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2375459&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 30.
- 150 MURTON, a. J.; CONSTANTIN, D.; GREENHAFF, P. L. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. *Biochimica et biophysica acta*, Elsevier B.V., v. 1782, n. 12, p. 730–43, dec 2008. ISSN 0006-3002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18992328>>. Citado na página 30.
- 151 MATSCHKE, V. et al. Skeletal muscle properties in rheumatoid arthritis patients. *Medicine and science in sports and exercise*, v. 42, n. 12, p. 2149–55, dec 2010. ISSN 1530-0315. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20404765>>. Citado na página 30.
- 152 TEIXEIRA, V. O. N.; FILIPPIN, L. I.; XAVIER, R. M. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 52, n. 2, p. 247–259, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 30 e 31.
- 153 HASSELGREN, P.-O.; WRAY, C.; MAMMEN, J. Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 290, n. 1, p. 1–10, jan 2002. ISSN 0006-291X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11779124>>. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 32.
- 154 POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; DERUISSEAU, K. C. Mechanisms of disuse muscle atrophy: role of oxidative stress. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 288, n. 2, p. R337–44, feb 2005. ISSN 0363-6119. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637170>>. Citado na página 31.
- 155 LI, Y.-P. et al. Hydrogen peroxide stimulates ubiquitin-conjugating activity and expression of genes for specific E2 and E3 proteins in skeletal muscle myotubes. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 285, n. 4, p. C806–12, oct 2003. ISSN 0363-6143. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773310>>. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 39.
- 156 KONCAREVIC, A.; JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The ubiquitin-protein ligase Nedd4 targets Notch1 in skeletal muscle and distinguishes the subset of atrophies caused by reduced muscle tension. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 21, n. 2, p. 427–37, feb 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172638>>. Citado na página 32.
- 157 CENTNER, T. et al. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *Journal of molecular biology*, v. 306, p. 717–726, 2001. ISSN 0022-2836. Citado na página 33.
- 158 WANG, K.; MCCLURE, J.; TU, A. Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 76, n. 8, p. 3698–3702, 1979.

ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/76/8/3698.abstract>>. Citado na página 33.

159 PHILLIPS, S. M.; GLOVER, E. I.; RENNIE, M. J. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, v. 107, n. 3, p. 645–54, sep 2009. ISSN 8750-7587. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608931>>. Citado na página 33.

160 WU, J. On the Role of Proteasomes in Cell Biology and Proteasome Inhibition as a Novel Frontier in the Development of Immunosuppressants. *American Journal of Transplantation*, v. 2, p. 904–912, 2002. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 34.

161 BAUMEISTER, W. et al. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, v. 92, n. 3, p. 367–80, feb 1998. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9476896>>. Citado na página 33.

162 HALLERMALM, K. et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface. *Blood*, v. 98, n. 4, p. 1108–1115, 2001. ISSN 00064971. Citado na página 34.

163 ELEUTERI, A. M. et al. Bovine Spleen Multicatalytic Proteinase Complex (Proteasome). Replacement of X, Y, and Z subunits by Lmp7, Lmp2, and MECL1 and changes in properties and specificity. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 18, p. 11824–11831, may 1997. ISSN 00219258. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.272.18.11824>>. Citado na página 34.

164 USTRELL, V.; PRATT, G.; RECHSTEINER, M. Effects of interferon  $\gamma$  and major histocompatibility complex-encoded subunits on peptidase activities of human multicatalytic proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 92, p. 584–88, 1995. Citado na página 34.

165 LECKER, S. H. et al. Muscle Protein Breakdown and the Critical Role of the Ubiquitin- Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *The Journal of Nutrition*, v. 129, p. 227S–237S, 1999. Citado na página 34.

166 TAWA, N. E.; ODESSEY, R.; GOLDBERG, a. L. Inhibitors of the proteasome reduce the accelerated proteolysis in atrophying rat skeletal muscles. *The Journal of clinical investigation*, v. 100, n. 1, p. 197–203, jul 1997. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=508180&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 34.

167 RENNIE, M. J. et al. Facts, noise and wishful thinking: muscle protein turnover in aging and human disuse atrophy. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, v. 20, n. 1, p. 5–9, feb 2010. ISSN 1600-0838. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19558380>>. Citado na página 34.

168 RAJKUMAR, S. V. et al. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 23, n. 3, p. 630–9, jan 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659509>>. Citado na página 34.

- 169 GRANADO, M. et al. Tumour necrosis factor blockade did not prevent the increase of muscular muscle RING finger-1 and muscle atrophy F-box in arthritic rats. *The Journal of endocrinology*, v. 191, n. 1, p. 319–26, oct 2006. ISSN 0022-0795. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17065414>>. Citado na página 34.
- 170 MAMMUCARI, C. et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell metabolism*, v. 6, n. 6, p. 458–71, dec 2007. ISSN 1550-4131. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054315>>. Citado na página 34.
- 171 MORESI, V. et al. Myogenin and class II HDACs control neurogenic muscle atrophy by inducing E3 ubiquitin ligases. *Cell*, Elsevier Ltd, v. 143, n. 1, p. 35–45, oct 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2982779&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 34.
- 172 FERRINGTON, D. a.; HUSOM, A. D.; THOMPSON, L. V. Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 19, n. 6, p. 644–646, 2005. ISSN 0892-6638. Citado na página 34.
- 173 HUSOM, A. D. et al. Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 421, n. 1, p. 67–76, 2004. ISSN 00039861. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986103005721>>. Citado na página 34.
- 174 FERRINGTON, D. a.; GREGERSON, D. S. *Immunoproteasomes: Structure, Function, and Antigen Presentation*. [S.l.: s.n.], 2012. 75–112 p. ISSN 18771173. ISBN 9780123978639. Citado na página 34.
- 175 STEFFEN, B. T.; LEES, S. J.; BOOTH, F. W. Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, v. 105, n. 6, p. 1950–1958, 2008. ISSN 8750-7587. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 39.
- 176 TORELLI, G. F. et al. Use of recombinant human soluble TNF receptor in anorectic tumor-bearing rats. *The American journal of physiology*, v. 277, n. 3 Pt 2, p. R850–5, 1999. ISSN 0002-9513. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484503>>. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 39.
- 177 EGERER, K. et al. Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol.*, v. 29, n. 10, p. 2045–2052, 2002. ISSN 0315-162X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12375310>>. Citado na página 34.
- 178 JONES, B. A. et al. Role of ADAM-17, p38 MAPK, Cathepsins, and the Proteasome Pathway in the Synthesis and Shedding of Fractalkine/CX<sub>3</sub>CL1 in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 65, n. 11, p. 2814–2825, 2013. ISSN 00043591. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.38095>>. Citado na página 34.
- 179 HOCHSTRASSER, M. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, v. 30, p. 405–39, 1996. Citado na página 35.

- 180 KISSELEV, A. F. et al. The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 6, p. 3363–3371, 1999. ISSN 00219258. Citado na página 35.
- 181 FERRINGTON, D. A. et al. Selective Degradation of Oxidized Calmodulin by the 20 S Proteasome. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 2, p. 937–943, 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M005356200>>. Citado na página 35.
- 182 DAVIES, K. J. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*, v. 83, n. 3-4, p. 301–310, 2001. ISSN 03009084. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11295490>\$\delimiter"026E30F\$http://ac.els-cdn.com/S0300908401012500/1-s2.0-S0300908401012500-main.pdf?{\\_}tid=c9619ec2-26f7-11e5-a15f-0000aacb362{\&}acdnat=1436528318{\\_}dea3d874a8868ce2ce24d13403eec429\$\delimiter"026E30F\$http://ac.els-cdn.com/S0300908401}>. Citado na página 35.
- 183 REINHECKEL, T. et al. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *The Biochemical journal*, v. 335 ( Pt 3, p. 637–642, 1998. ISSN 0264-6021. Citado na página 35.
- 184 AIKEN, C. T. et al. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, v. 10, n. 5, p. R110.006924, 2011. ISSN 1535-9476. Citado na página 35.
- 185 MONTI, S. et al. Rheumatoid arthritis treatment: the earlier the better to prevent joint damage. *RMD Open*, v. 1, n. Suppl 1, p. e000057, 2015. ISSN 2056-5933. Disponível em: <<http://rmdopen.bmj.com/lookup/doi/10.1136/rmdopen-2015-000057>>. Citado na página 35.
- 186 SCOTT, P. a. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and myocardial infarctions: comparative systematic review of evidence from observational studies and randomised controlled trials. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 66, n. 10, p. 1296–304, 2007. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1994282{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=ab>>. Citado na página 35.
- 187 SCHAFFER, D. et al. Risk of serious NSAID-related gastrointestinal events during long-term exposure: a systematic review. *The Medical journal of Australia*, v. 185, n. 9, p. 501–6, 2006. ISSN 0025-729X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17137455>>. Citado na página 35.
- 188 GAFFO, A.; SAAG, K. G.; CURTIS, J. R. Treatment of rheumatoid arthritis. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 63, n. 24, p. 2451–2465, 2006. ISSN 1079-2082. Disponível em: <<http://www.ajhp.org/cgi/doi/10.2146/ajhp050514>>. Citado 4 vezes nas páginas 35, 36, 38 e 39.
- 189 BIJLSMA, J. W. J. et al. Glucocorticoids in the treatment of early and late RA. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 62, n. 11, p. 1033–1037, 2003. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1754359{\&}tool=pmcentrez{\&}rendertype=ab>>. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 36.

- 190 BIJLSMA, J.; JACOBS, J.; BUTTGEREIT, F. Glucocorticoids in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, v. 33, n. Suppl. 92, p. S34–36, 2015. Citado na página 36.
- 191 SAAG, K. G. et al. Low dose long-term corticosteroid therapy in rheumatoid arthritis: an analysis of serious adverse events. *Am J Med*, v. 96, n. 2, p. 115–23, 1994. ISSN 0002-9343. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0002934394901317>\$\delimiter"026E30F\$http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8109596>. Citado na página 36.
- 192 TON, F. N. et al. Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 20, n. 3, p. 464–470, 2005. ISSN 0884-0431. Disponível em: <[wiley.com](http://wiley.com)>. Citado na página 36.
- 193 LOPEZ-OLIVO, M. A. et al. Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. *The Cochrane database of systematic reviews*, v. 6, n. 6, p. CD000957, 2014. ISSN 1469-493X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24916606>>. Citado 3 vezes nas páginas 36, 37 e 38.
- 194 SUAREZ-ALMAZOR, M. E. et al. Sulfasalazine for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane database of systematic reviews*, v. 2, n. 7, p. CD000958, 2010. Citado na página 36.
- 195 OSIRI, M. et al. Leflunomide for the treatment of rheumatoid arthritis: a systematic review and metaanalysis. *J Rheumatol*, v. 30, n. 6, p. 1182–90, 2003. ISSN 0315-162X (Print);0315-162x. Citado na página 36.
- 196 CHOI, H. K. et al. Methotrexate and mortality in patients with rheumatoid arthritis: a prospective study. *The Lancet*, v. 359, p. 1173–1177, 2002. ISSN 01406736. Citado na página 36.
- 197 FEELY, M. G.; ERICKSON, A.; O'DELL, J. R. Therapeutic options for rheumatoid arthritis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 10, n. 13, p. 2095–2106, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 36 e 37.
- 198 TRACEY, D. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 117, n. 2, p. 244–279, 2008. ISSN 01637258. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725807002069>>. Citado na página 36.
- 199 CHOI, J.-J. et al. Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice. *Clinical and experimental immunology*, v. 153, n. 2, p. 269–76, aug 2008. ISSN 1365-2249. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2492894&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 36.
- 200 HOCHBERG, M. C. et al. Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept, and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 62 Suppl 2, p. ii13–i16, 2003. ISSN 0003-4967. Citado na página 37.

- 201 KREMER, J. M. et al. Effects of abatacept in patients with methotrexate-resistant active rheumatoid arthritis: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, v. 144, n. 12, p. 865–876, 2006. ISSN 00034819. Citado na página 37.
- 202 EDWARDS, J. C. W. et al. Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, v. 350, n. 25, p. 2572–2581, 2004. ISSN 0028-4793. Citado na página 37.
- 203 SINGH, J. A. et al. 2015 American College of Rheumatology Guideline for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care & Research*, 2015. ISSN 2151464X. Citado na página 37.
- 204 LISTING, J. et al. Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. *Arthritis & Rheumatism*, v. 52, n. 11, p. 3403–3412, 2005. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.21386>>. Citado na página 37.
- 205 DORAN, M. F. et al. Predictors of infection in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, v. 46, n. 9, p. 2294–2300, 2002. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.10529>>. Citado na página 37.
- 206 DESAI, S. B.; FURST, D. E. Problems encountered during anti-tumour necrosis factor therapy. *Best practice & research. Clinical rheumatology*, v. 20, n. 4, p. 757–90, 2006. ISSN 1521-6942. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16979537>>. Citado na página 37.
- 207 ANKER, S. D.; COATS, a. J. S. How to RECOVER from RENAISSANCE? The significance of the results of RECOVER, RENAISSANCE, RENEWAL and ATTACH. *International Journal of Cardiology*, v. 86, n. 2-3, p. 123–130, 2002. ISSN 01675273. Citado na página 37.
- 208 HANAUER, S. B. et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: The ACCENT I randomised trial. *Lancet*, v. 359, n. 9317, p. 1541–1549, 2002. ISSN 01406736. Citado na página 37.
- 209 WEINBLATT, M. E. et al. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: The ARMADA trial. *Arthritis & Rheumatism*, v. 48, n. 1, p. 35–45, 2003. ISSN 00043591. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.10697>>. Citado na página 37.
- 210 GONNET-GRACIA, C. et al. Anti-nuclear antibodies, anti-DNA and C4 complement evolution in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis treated with TNF-alpha blockers. *Clin Exp Rheumatol*, v. 26, n. 3, p. 401–407, 2008. ISSN 0392-856X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18578960>>. Citado na página 37.
- 211 KEYSTONE, E. C. et al. Once-weekly administration of 50 mg etanercept in patients with active rheumatoid arthritis: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis & Rheumatism*, v. 50, n. 2, p. 353–363, 2004. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/art.20019>>. Citado na página 37.

- 212 BAERT, F. et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *The New England journal of medicine*, v. 348, n. 7, p. 601–608, 2003. ISSN 0028-4793. Citado na página 37.
- 213 QUÉMÉNEUR, L. et al. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. *J Immunol*, v. 170, n. 10, p. 4986–4995, 2003. ISSN 0022-1767. Citado na página 38.
- 214 CRONSTEIN, B. N. Low-dose methotrexate: a mainstay in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacological reviews*, v. 57, n. 2, p. 163–72, 2005. ISSN 0031-6997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15914465>>. Citado na página 38.
- 215 PHILLIPS, D. C.; WOOLLARD, K. J.; GRIFFITHS, H. R. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *British journal of pharmacology*, v. 138, n. 3, p. 501–511, 2003. ISSN 0007-1188. Citado na página 38.
- 216 CRONSTEIN, B. N.; NAIME, D.; OSTAD, E. The antiinflammatory mechanism of methotrexate. Increased adenosine release at inflamed sites diminishes leukocyte accumulation in an in vivo model of inflammation. *The Journal of clinical investigation*, v. 92, n. 6, p. 2675–82, 1993. ISSN 0021-9738. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=288465&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado na página 38.
- 217 MONTESINOS, M. C. et al. Adenosine A2A or A3 receptors are required for inhibition of inflammation by methotrexate and its analog MX-68. *Arthritis and rheumatism*, v. 48, n. 1, p. 240–7, 2003. ISSN 0004-3591. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12528125>>. Citado na página 38.
- 218 BATHON, J. M. et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, v. 343, n. 22, p. 1586–93, 2000. Citado na página 38.
- 219 LEE, S.-W. et al. Alleviation of rheumatoid arthritis by cell-transducible methotrexate upon transcutaneous delivery. *Biomaterials*, Elsevier Ltd, v. 33, n. 5, p. 1563–1572, 2012. ISSN 01429612. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211013123>>. Citado na página 38.
- 220 DELANO, D. L. et al. Genetically-based resistance to the anti-inflammatory effect of methotrexate in the air pouch model of acute inflammation. *Arthritis Rheum*, v. 52, n. 8, p. 2567–2575, 2005. Citado na página 38.
- 221 CHÉDEVILLE, G. et al. Improvements in growth parameters in children with juvenile idiopathic arthritis associated with the effect of methotrexate on disease activity. *Joint Bone Spine*, v. 72, n. 5, p. 392–396, 2005. ISSN 1297319X. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1297319X05000862>>. Citado na página 38.
- 222 JURCOVICOVA, J. et al. Methotrexate treatment ameliorated testicular suppression and anorexia related leptin reduction in rats with adjuvant arthritis. *Rheumatology international*, v. 29, n. 10, p. 1187–91, aug 2009. ISSN 1437-160X.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19156421>>. Citado na página 38.

223 JURGENS, M. S. et al. Increase of body mass index in a tight controlled methotrexate-based strategy with prednisone in early rheumatoid arthritis: Side effect of the prednisone or better control of disease activity? *Arthritis Care & Research*, v. 65, n. 1, p. 88–93, 2013. ISSN 2151464X. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/acr.21797>>. Citado na página 38.

224 SASAKAWA, T. et al. FK506 ameliorates spontaneous locomotor activity in collagen-induced arthritis: implication of distinct effect from suppression of inflammation. *International Immunopharmacology*, v. 5, n. 3, p. 503–510, 2005. ISSN 15675769. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567576904003534>>. Citado na página 38.

225 SINNO, M. H. et al. Chemotherapy-induced anorexia is accompanied by activation of brain pathways signaling dehydration. *Physiology & Behavior*, v. 101, n. 5, p. 639–648, 2010. ISSN 00319384. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938410003446>>. Citado na página 38.

226 MARCORA, S. M. et al. Randomized phase 2 trial of anti-tumor necrosis factor therapy for cachexia in patients with early rheumatoid arthritis. *Am J Clin Nutr*, v. 84, n. 6, p. 1463–1472, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 39.

227 JARVIS, B.; FAULDS, D. Etanercept: a review of its use in rheumatoid arthritis. *Drugs*, v. 57, n. 6, p. 945–66, 1999. ISSN 0012-6667. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 39.

228 ZANELLA, J. M. et al. Effect of etanercept, a tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor, on neuropathic pain in the rat chronic constriction injury model. *Spine*, v. 33, n. 3, p. 227–34, 2008. ISSN 1528-1159. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18303453>>. Citado na página 39.

229 LON, H.-K. et al. Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Disease Progression Model for Effect of Etanercept in Lewis Rats with Collagen-Induced Arthritis. *Pharmaceutical Research*, v. 28, n. 7, p. 1622–1630, 2011. ISSN 0724-8741. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11095-011-0396-7>>. Citado na página 39.

230 ALCORN, N. et al. Impact of anti-tumour necrosis factor therapy on the weight of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 69, n. 8, p. 1571–1571, 2010. ISSN 0003-4967. Disponível em: <<http://ard.bmj.com/cgi/doi/10.1136/ard.2009.122424>>. Citado na página 39.

231 BROWN, R. A. et al. Long-term effects of anti-tumour necrosis factor therapy on weight in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Rheumatology*, v. 31, n. 3, p. 455–461, 2012. ISSN 0770-3198. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10067-011-1863-6>>. Citado na página 39.

232 ENGVALL, I.-L. et al. Infliximab therapy increases body fat mass in early rheumatoid arthritis independently of changes in disease activity and levels of leptin and adiponectin: a randomised study over 21 months. *Arthritis Research & Therapy*, BioMed Central Ltd, v. 12, n. 5, p. R197, 2010. ISSN 1478-6354. Disponível em: <<http://arthritis-research.com/content/12/5/R197>>. Citado na página 39.

- 233 METSIOS, G. S. et al. Blockade of tumour necrosis factor- in rheumatoid arthritis: effects on components of rheumatoid cachexia. *Rheumatology*, v. 46, n. 12, p. 1824–1827, 2007. ISSN 1462-0324. Disponível em: <<http://www.rheumatology.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/rheumatology/kem291>>. Citado na página 39.
- 234 PLATA-SALAMÁN, C. R.; OOMURA, Y.; KAI, Y. Tumor necrosis factor and interleukin-1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system. *Brain research*, v. 448, n. 1, p. 106–14, 1988. ISSN 0006-8993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3260533>>. Citado na página 39.
- 235 LI, Y.-P.; REID, M. B. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on skeletal muscle metabolism. *Current Opinion in Rheumatology*, v. 13, n. 6, p. 483–487, 2001. Citado na página 39.
- 236 GARCIA-MARTINEZ, C. et al. Ubiquitin gene expression in skeletal muscle is increased during sepsis: involvement of TNF-alpha but not IL-1. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 217, n. 3, p. 1995, 1995. Citado na página 39.
- 237 LLOVERA, M. et al. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 230, n. 2, p. 238–241, 1997. ISSN 0006-291X. Citado na página 39.
- 238 ROCHA, O. M. D. et al. Sarcopenia da caquexia reumatoide: conceitualização, mecanismos, consequências clínicas e tratamentos possíveis. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 49, n. 3, p. 288–301, jun 2009. ISSN 0482-5004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0482-50042009000300010&lng=pt&nrm](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042009000300010&lng=pt&nrm)>. Citado na página 43.