

MARIA LUÍSA GASPARINI VIEIRA

**EFEITO DA MIOSTATINA, GDF-11 E IRISINA SOBRE FIBROBLASTOS SINOVIAIS
ISOLADOS DE PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Porto Alegre

2023

1

MARIA LUÍSA GASPARINI VIEIRA

**EFEITO DA MIOSTATINA, GDF-11 E IRISINA SOBRE FIBROBLASTOS SINOVIAIS
EM PACIENTES COM ARTRITE REUMATOIDE**

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

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

Porto alegre

2023

2

CIP - Catalogação na Publicação

Vieira, Maria Luísa Gasparini
Efeito da miostatina, GDF-11 e irisina sobre
fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite
reumatoide / Maria Luísa Gasparini Vieira. -- 2023.
68 f.
Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2023.

1. artrite reumatoide. 2. musculo. 3. sinovia . 4.
miocinas. I. Xavier, Ricardo Machado, orient. II.
Titulo.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Esta seção é dedicada a todos, que de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento como profissional e como pessoa no decorrer destes dois anos de mestrado.

Em primeiro lugar, agradeço minha família. Mãe e Pai, obrigada pela independência que sempre tive para me tornar a pessoa que sou hoje, pelo esforço e abdicção de seus sonhos em prol do meu. Ao meu orientador Ricardo Xavier, pela oportunidade e confiança em mim depositada para a realização deste trabalho. A minha mestra Mirian, por todos os ensinamentos desde do início da minha trajetória acadêmica, e pela parceria genuína que desenvolvemos uma com a outra. Por você tenho muito carinho e profunda admiração.

Ao meu colega de laboratório e amigo de vida, Gustavo, obrigada por todas as palavras e afagos que sempre me foram tão importantes. As minhas colegas e amigas Stephanie, Natália e Thaís, obrigada pelos momentos vividos e pelas risadas compartilhadas, meus dias são melhores com a parceria de vocês. E em especial, ao meu melhor amigo e confidente Daniel, obrigada por me presentear com a sua presença todos os dias, a tua atenção e carinho dedicados a mim foram essenciais nessa trajetória.

Ao aluno de graduação Vinícius, não só pelo seu excelente comprometimento, mas pelo carinho que sempre me forneceu e que me ajudou a desempenhar meu trabalho com maestria. Por fim, a aluna Marina, com quem tive o prazer de dividir meus conhecimentos e também momentos de vida, agradeço pela parceria e pelo cuidado com meu trabalho como se fosse o seu, tua parceria fez tudo ser mais fácil.

RESUMO

Base teórica. A ativação imune na artrite reumatoide (AR) gera uma inflamação sinovial acentuada, levando à ativação de células estromais, como fibroblastos sinoviais (FLS), as quais desenvolvem um fenótipo agressivo e invasivo, participando da degradação articular. Miocinas são moléculas secretadas pelo tecido muscular, podendo agir localmente de maneira autocrina/parácrina, ou endócrina em outros tecidos do corpo. Na AR, há observações de que miocinas, como a miostatina, podem estar envolvidas na fisiopatologia da doença. Foi reportado que miostatina está presente em concentrações maiores na sinóvia de pacientes com AR em comparação com OA. Níveis séricos de miostatina em pacientes com AR já foram associados com a atividade da doença e dano articular. Em contrapartida, na AR, GDF-11 e irisina já demonstraram um efeito protetor na articulação, inibindo a degradação articular. Contudo, mais estudos são necessários para entender o potencial papel dessas miocinas no ambiente articular na AR, visando elucidar seu papel na persistência da resposta inflamatória local e progressivo dano articular.

Objetivo. Avaliar a presença de miostatina, GDF-11 e irisina no fluido sinovial (FS) e seu efeito no fenótipo de fibroblastos sinoviais de pacientes com AR.

Métodos. Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de AR com indicação de artrocentese de joelho. A atividade da doença foi avaliada pelo Índice de Atividade Clínica da Doença (CDAI). A avaliação dos níveis séricos e no fluido sinovial (FS) de miostatina, GDF-11 e irisina foi realizada por ELISA. Os FLS foram isolados do FS dos pacientes, e foram feitos os ensaios de viabilidade celular, capacidade de migração e a invasão tecidual na presença e ausência de miostatina, GDF-11 e irisina.

Resultados. Foram mensurados os níveis de miocinas no LS e no soro dos pacientes: miostatina [FS: mediana-intervalo interquartil: 31,30 pg/ml (31,30-181,8); soro: 817,2 pg/ml (334,3-994,7)], GDF11 [FS: 31,30 pg/ml (31,30-88,13); soro: 347,50 pg/ml (31,30-1818,00)] e irisina [FS: 9,51 pg/ml (8,89- 16,68); soro: 14,05 pg/ml (12,47 -14,96)]. O tratamento com diferentes doses de miostatina, GDF11 e irisina não interferiu na viabilidade celular do FLS quando comparado ao controle. Na migração, na dose de 20nM foi observada uma tendência de aumento no tratamento de miostatina. Além disso, a estimulação com uma dose mais baixa de miostatina e GDF-11 diminuiu a invasão do FLS em 16% e 18% respectivamente. Em doses mais altas, a miostatina e a irisina diminuíram a capacidade de invasão em 10 %, e GDF-11 em 14% quando comparado ao controle.

Conclusão. Este é o primeiro estudo a avaliar os níveis sinoviais e séricos de miocinas em pacientes com AR. Além disso, este é o primeiro estudo a analisar o efeito direto destas moléculas no fenótipo dos FLS de paciente com AR. A miostatina pareceu aumentar a capacidade de migração, mas diminuiu o fenótipo de invasividade. Por outro lado, GDF-11 e irisina foram observados no fluido sinovial e apresentaram resultados protetores, reduzindo a capacidade invasiva do FLS. Considerando a demonstração de miocinas na cavidade articular e ação sobre os FLS, nossos resultados apontam para um potencial papel na fisiopatologia da AR e de interação com o tecido muscular esquelético.

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

ABSTRACT

Background. Immune activation in rheumatoid arthritis (RA) generates an accentuated synovial inflammation, leading to the activation of stromal cells, such as fibroblasts like-synoviocytes (FLS), which develop an aggressive and invasive phenotype, participating in joint degradation. Myokines are molecules secreted by muscle tissue and may act locally in an autocrine/paracrine or endocrine manner in other tissues of the body. In RA, there are observations that myokines, such as myostatin, may be involved in the pathophysiology of the disease. Myostatin has been reported to be present in higher concentrations in the synovium of patients with RA compared to OA. Serum myostatin levels in RA patients have been associated with disease activity and joint damage. On the other hand, in RA, GDF-11 and irisin have already demonstrated a protective effect on the joint, inhibiting joint degradation. However, more studies are needed to understand the potential role of these myokines in the joint environment in RA, aiming to elucidate their role in the persistence of the local inflammatory response and progressive joint damage.

Objective. To evaluate presence of myostatin, GDF-11 and irisin in synovial fluid and their effect on the phenotype of synovial fibroblasts from patients with RA.

Methods. Patients diagnosed with RA with indication of knee arthrocentesis were included in the study. Disease activity was assessed by Clinical Disease Activity Index (CDAI). The evaluation of serum and synovial fluid (SF) levels of myostatin, GDF-11 and irisin was performed by ELISA. FLS were isolated from the SF of RA patients. Cell viability, migration and invasion were determined in the presence and absence of myostatin, GDF-11 and irisin.

Results. The levels of myokines in the SF and serum of the patients were measured: myostatin [SF: median-interquartile range: 31.30 pg/ml (31.30-181.8); serum: 817.2 pg/ml (334.3-994.7)], GDF11 [SF: 31.30 pg/ml (31.30-88.13); serum: 347.50 pg/ml (31.30-1818.00)] and irisin [SF: 9.51 pg/ml (8.89- 16.68); serum: 14.05 pg/ml (12.47 -14.96)]. Treatment with different doses of myostatin, GDF11 and irisin did not interfere with FLS cell viability when compared to control. In migration, at a dose of 20nM, an increasing trend was observed with myostatin treatment. Furthermore, stimulation with a lower dose of myostatin and GDF-11 decreased FLS invasion by 16% and 18% respectively. At higher doses, myostatin and irisin decreased invasiveness by 10%, and GDF-11 by 14% when compared to control.

Conclusion. This is the first study to evaluate synovial and serum myokine levels in patients with RA. Furthermore, this is the first study to analyze the direct effect of these molecules on the FLS phenotype of patients with RA. Myostatin appeared to increase migration capacity but decreased the invasiveness phenotype. Conversely, GDF-11 and irisin were observed in synovial fluid and showed protective results, reducing the invasive capacity of FLS. Considering the demonstration of myokines in the joint cavity and action on the FLS, our results point to a potential role in the pathophysiology of RA and interaction with skeletal muscle tissue.

Key words. Rheumatoid arthritis, muscle, synovium, myokines, myostatin, GDF11, irisin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estratégias para localizar e selecionar as informações.	12
Figura 2: Alterações articulares na artrite reumatoide.	16
Figura 3: Alterações patológicas na sinóvia reumatoide.....	17
Figura 4: Interação dos FLS e células do sistema imunológico na AR.....	27
Figura 5: Marco conceitual artrite reumatoide e miocinas.....	27
Figura 6: Níveis das miocinas no líquido sinovial e no soro dos pacientes com AR.....	41
Figura 7: Viabilidade celular de FLS na presença e ausência de miocinas.....	42
Figura 8: Migração celular de FLS na presença e ausência de miocinas.....	42
Figura 9: Invasão celular de FLS na presença e ausência de miocinas.....	43
Figura 10: Níveis de IL-6 em FLS na presença e ausência de miocinas.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de classificação para AR segundo ACR 2010.	14
Tabela 2: Papel endócrino de miocinas em diferentes tecidos	22
Tabela 3: Características da população em estudo.	40

LISTA DE ABREVIATURAS

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações	12
2.2 Artrite reumatoide	12
2.3 Fisiopatogenia da artrite reumatoide	15
2.4 Fibroblastos sinoviais	16
2.5 Tratamento da AR	19
2.6 Interação músculo sinóvia	21
2.7 Miocinas	22
2.7.1 Miostatina	22
2.7.2 GDF-11	24
2.7.3 Irisina	25
3. MARCO CONCEITUAL	28
4. JUSTIFICATIVA.....	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo principal.....	30
5.2 Objetivos específicos.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
7. ARTIGO.....	38
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
9. PERSPECTIVAS	55
10. ANEXOS	56
10.1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	56
10.2 - CONSORT	59
10.3 - SPIRIT	62

1. INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica e sistêmica, e caracteriza-se por inflamação e degradação das articulações sinoviais. O edema articular é uma das manifestações mais frequentes na AR. Ele é causado pelo infiltrado inflamatório na cavidade articular decorrente de uma hiperplasia sinovial que contribui para a destruição da cartilagem e do osso [1]. Esta hiperplasia sinovial gera um tecido invasivo denominado *pannus*, que tem como principais componentes macrófagos e fibroblastos sinoviais (FLS), que são uma das principais fontes de proteases e citocinas inflamatórias. Os FLS desempenham um papel importante na manutenção da homeostase articular e na orquestração de processos inflamatórios locais. Porém, quando ativado durante a inflamação, os FLS adquirem um fenótipo agressivo, contribuindo para a destruição da articulação [2].

Além das manifestações articulares, devido à inflamação sistêmica, pacientes com AR apresentam também manifestações extra-articulares como, por exemplo, a perda de massa e função do músculo esquelético (sarcopenia) [3]. A sarcopenia na AR é atribuída a diversos fatores como: a exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias, principalmente fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1-beta (IL-1 β) e interleucina-6 (IL-6); alterações hormonais; inatividade física; déficits nutricionais; efeito adverso de fármacos. Ocorre ativação de distintas cascatas intracelulares que induzem a degradação proteica e inibição da regeneração muscular [4]. O músculo esquelético secreta uma série de citocinas, conhecidas como miocinas, com ação autócrina, parácrina e endócrina, reguladas pelo processo de contração muscular e que participam de uma rede sistêmica de comunicação entre órgãos e regulação do metabolismo muscular e sistêmico. Estas moléculas funcionam como hormônios, exercendo efeitos endócrinos específicos na gordura visceral ou mediando efeitos anti-inflamatórios diretos [5,6], os quais ainda são relativamente pouco conhecidos. Uma melhor compreensão de como funciona o cross-talk (comunicação tecidual cruzada) do músculo com outros órgãos é fundamental para entendimento e desenvolvimento de intervenções terapêuticas para a sarcopenia em diversas condições metabólicas e inflamatórias. Entre centenas de miocinas descritas, estão o fator de crescimento e diferenciação (GDF-8), também conhecido como miostatina, GDF-11 e irisina, como foco deste trabalho.

O GDF-8 é um regulador negativo do crescimento muscular esquelético, principalmente por meio da diminuição da miogênese [7]. Em pacientes com AR, já foi demonstrado a presença desta miocina em níveis séricos correlacionados com a atividade da doença [8]. Um estudo também demonstrou que nas membranas sinoviais de pacientes, mais especificamente nos FLS, há aumento significativo na expressão de miostatina, em comparação com pacientes com osteoartrite (OA)[9]. Em estudos *in vitro* com FLS, a miostatina estimula a produção de IL-1 β ,

via inibição de miR-21-5p, um regulador negativo da produção de IL-1 β . Além disso, a miostatina também é capaz induzir produção de TNF via ativação de PI3K-AKT [10]. Porém, além das evidências da ação da miostatina no tecido sinovial, ainda há poucos estudos que reportem os níveis dessa molécula no soro e no líquido sinovial de pacientes com AR.

Por sua vez, GDF-11 apresenta um estreito parentesco com o GDF-8. Recentemente, descobriu-se que GDF-11 suprime a via de sinalização do fator nuclear kappa de cadeia leve das células B ativadas (NF- κ B) e protege contra a inflamação em modelo animal de artrite [11]. Também em modelo de AR foi observado que o GDF-11 antagoniza a inflamação induzida por TNF e protege contra o desenvolvimento de artrite induzida por colágeno em camundongos. Ainda, *in vitro*, foi demonstrado que o tratamento com GDF-11 antagonizou a inflamação induzida por TNF em macrófagos[11]. Em mais estudos *in vitro* com esta miocina se identificou sua ação também no tecido ósseo. Foi observado que o GDF-11 atuou na osteogênese induzindo a diferenciação de osteoblastos. Em camundongos nocaute para o GDF-11, a massa óssea estava reduzida devido ao comprometimento da maturação de osteoblastos e ao aumento da osteoclastogênese [12,13].

A irisina também é uma molécula produzida pelo músculo esquelético [14]. Em contraponto da miostatina, ela induz à hipertrofia e resgata a força óssea [15]. O tratamento de células musculares murinas com irisina induz a expressão de genes pró-miogênicos e de resposta ao exercício físico, além de favorecer a ativação do processo de regeneração muscular [16]. Na literatura, a irisina também tem demonstrado ser um mediador molecular crucial na conectividade entre o tecido muscular e ósseo. Em estudos *in vivo*, a administração de irisina recombinante em camundongos saudáveis estimulou o aumento de massa óssea cortical [17]. Outro estudo também relatou que os níveis séricos e sinoviais de irisina estão negativamente correlacionados com a gravidade da destruição do joelho em pacientes com OA [18]. Estes achados fortalecem a hipótese de que a comunicação entre esses dois tecidos podem ter efeitos benéficos a níveis fisiológicos [19]. Por outro lado, ainda há poucos estudos que visem analisar o papel desta molécula na patologia da AR, e o conhecimento sobre sua ação no tecido sinovial da articulação é ainda muito inicial.

Considerando que a piora da densidade do músculo esquelético está relacionada à maior atividade da doença na AR [20], acredita-se que o músculo esquelético, osso e o tecido sinovial podem interagir para manutenção da homeostasia da unidade motora. Um estudo anterior demonstrou a presença de miostatina na membrana sinovial de pacientes com AR [9], porém não temos dados de sua concentração no líquido sinovial e dados sobre a presença de GDF-11 e irisina, nem sobre ação direta sobre o fenótipo dos FLS, o que poderia indicar uma interação entre músculo esquelético e sinóvia articular reumatoide. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar os níveis sinoviais e séricos de miostatina, GDF-11 e irisina em pacientes com AR, e seus efeitos sobre os fibroblastos sinoviais de pacientes com AR.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed, Lilacs e Embase. As buscas foram realizadas utilizando descritores em língua inglesa envolvendo os termos: rheumatoid arthritis, fibroblast like-sinoviocytes, synovial fibroblasts, myokines, myostatin, GDF-8, GDF-11, irisin e suas combinações. Foram lidos os resumos dos artigos encontrados, com posterior seleção baseada na relevância para os objetivos do presente estudo. Os artigos que não se incluíam nesses critérios foram excluídos. Os resultados da pesquisa estão apresentados na **Figura 1**.

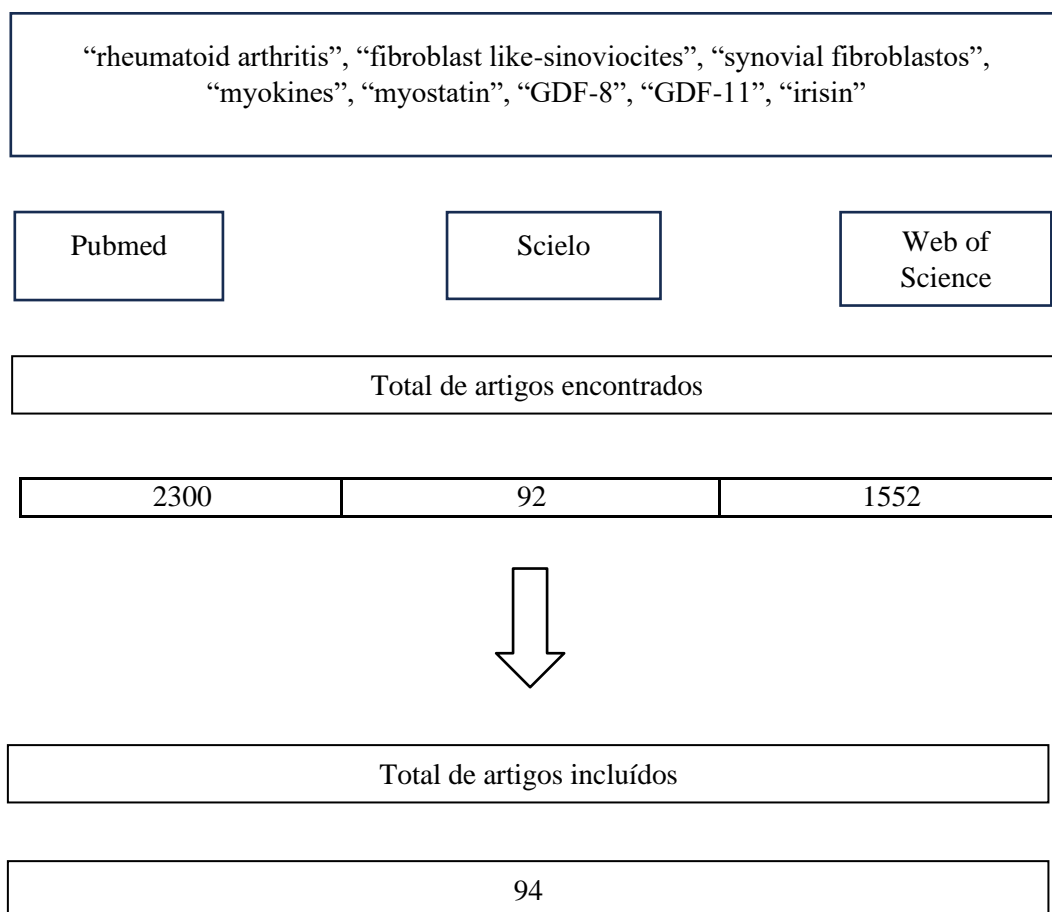


Figura 1: Estratégias para localizar e selecionar as informações.

2.2 Artrite reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que atinge principalmente as articulações sinoviais. Ela é caracterizada por uma inflamação sinovial crônica, que pode ocasionar uma deterioração das estruturas que compõem a articulação [1]. Ocorre produção de autoanticorpos, como fator reumatoide (FR) e anticorpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA), os quais estão relacionados com o desenvolvimento de manifestações extra-articulares, incluindo distúrbios pulmonares, cardiovasculares, cutâneos, esqueléticos e musculares [21]. Como consequência da AR, os pacientes apresentam inchaço articular, dor, rigidez matinal, fadiga, impactando na qualidade de vida, aumento da incapacidade funcional e diminuição da produtividade laboral [22]. Sua prevalência é de 0,5-1% no mundo e 0,46% no Brasil e, em geral, mulheres têm 3 vezes mais chances de desenvolver a doença do que homens [23].

Sua etiologia é desconhecida, mas sabe-se que fatores genéticos e ambientais estariam envolvidos com a susceptibilidade e severidade da doença. Evidências apontam que esses fatores têm a capacidade de ocasionar distúrbios que ativam o sistema imunológico, levando ao desenvolvimento anormal de anticorpos que medeiam as reações inflamatórias na doença [24,25]. Atualmente, sabe-se que mais de 30 regiões gênicas estão envolvidas com o desenvolvimento da AR, sendo que a predisposição genética mais forte está associada à herança de haplótipos HLA específicos (como HLA-DRB1), e em segundo lugar o gene PTPN22 [26]. Além disso, fatores ambientais podem ocasionar na ativação da doença. Até o momento, exposição à sílica, tabagismo, deficiência de vitamina D, obesidade e alterações na microbiota foram associados ao desenvolvimento da AR [27]. Dentre outros, a exposição a agentes infecciosos - como o Epstein-Barr vírus - também podem assumir um potencial risco para a doença [28].

A AR pode começar a se desenvolver anos antes do aparecimento dos sinais clínicos da doença. Atualmente, os critérios para a identificação da doença incluem manifestações clínicas e ensaios sorológicos. A orientação para o diagnóstico é baseada nos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (American College of Rheumatology – ACR) e pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (European League Against Rheumatism – EULAR) [29]. Os critérios avaliam a presença de sinovite, incluindo contribuição de exames de imagem, número e distribuição das articulações acometidas, a duração dos sintomas, marcadores sorológicos de autoanticorpos e de fase aguda de inflamação (níveis da proteína C reativa [PCR] e velocidade de sedimentação globular [VSG]); sendo atribuído uma pontuação para cada critério [29].

O diagnóstico de AR se dá quando sintomas de artrite estejam presentes, e os critérios de classificação se dão por uma soma de pontos. São atribuídos de 0 a 5 pontos para as articulações acometidas; 0 a 3 pontos para a sorologia; 0 a 1 para os marcadores de fase aguda e 0 a 1 pontos para a duração dos sintomas (Tabela1).

Tabela 1: Critérios 2010 ACR/EULAR para classificação de artrite reumatoide.

Grupo	Pontuação
Envolvimento articular (0-5)	
1 articulação média a grande	0
2-10 articulações médias a grande	1
1-3 articulações pequenas (excluindo articulações grandes)	2
4-10 articulações pequenas (excluindo articulações grandes)	3
> 10 articulações (pelo menos uma articulação pequena)	5
Sorologia (0-3)	
Fator reumatoide (FR) e Anticorpo contra antígenos citrulinados (ACPA) negativos	0
FR e ACPA fracamente positivos	2
FR e ACPA fortemente positivos	3
Reagentes de fase aguda (0-1)	
Proteína C reativa e taxa de sedimentação eritrocitária normal	0
Proteína C reativa e/ou taxa de sedimentação eritrocitária anormal	1
Duração dos sintomas (0-1)	
< 6 semanas	0
6 semanas ou mais	1
Ponto de corte para a artrite reumatoide: 6 ou mais	

Sabe-se que a doença é bastante heterogênea e apresenta alta variabilidade entre pacientes, tanto no desenvolvimento quanto no prognóstico da doença. O ritmo de progressão da inflamação, manifestações extra-articulares e também o plano de tratamento, podem interferir no curso da AR ao longo da vida do paciente. Por conta disso, o acompanhamento regular da atividade clínica da doença é o principal caminho utilizado para monitorar o tratamento da AR.

Atualmente são empregados escores e critérios que categorizam os pacientes de acordo com o grau de atividade de doença. Dentre esses, o mais estabelecido é o *Disease Activity Score-28* (DAS-28), que consiste na avaliação de 28 articulações que podem ser acometidas pela AR, caracterizando em edemaciadas e doloridas, sendo acompanhado de um marcador inflamatório que pode ser o PCR ou o VSG, e ainda uma avaliação da saúde global feita pelo paciente. Logo, ele é uma medida contínua que combina essas variáveis para classificar a atividade da doença [30]. A classificação da atividade da AR é descrita como: remissão da doença, atividade leve, moderada e alta. Há ainda o *Simplified Disease Activity Index* (SDAI) e o *Clinical Disease Activity*

Index (CDAI), os quais são mais simples de calcular comparados ao DAS-28. Tanto SDAI quanto CDAI apresentam um somatório simples de articulações dolorosas (28 articulações), do número de articulações edemaciadas (28 articulações), da avaliação da atividade da doença feita pelo paciente e da avaliação da atividade da doença feita pelo médico em escalas visuais de 0 a 10 cm. A única diferença é que SDAI adiciona à soma a variável PCR.

Sendo assim, na AR a prática clínica acaba por ser a principal análise para definir em qual estágio se encontra a doença e a resposta aos tratamentos. A partir dessas observações individualizadas é possível inferir qual o curso da patologia e também um prognóstico de melhor manejo.

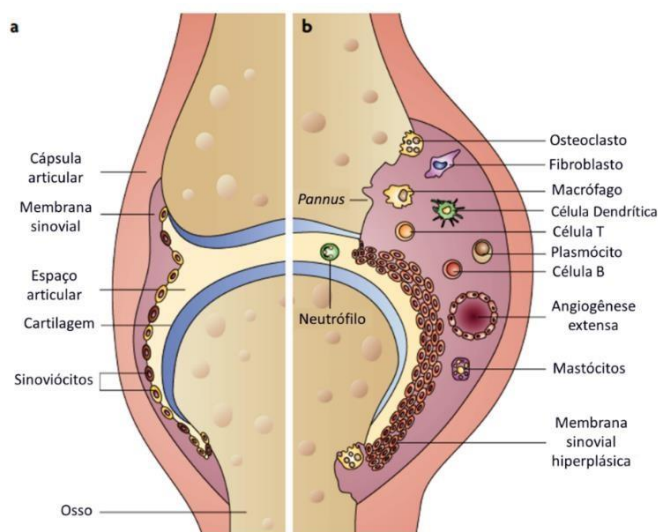
2.3 Fisiopatogenia da artrite reumatoide

O início da AR pode ser ocasionado por diversos fatores, e um processo introdutório são as modificações pós-traducionais de proteínas, sendo a citrulinização um dos processos mais comuns na AR e já usado como biomarcador para diagnóstico da doença [27]. O sistema imune do indivíduo com susceptibilidade genética reconhece essas proteínas modificadas através das células T, que estimulam as células B a produzirem uma variedade de autoanticorpos. O organismo, então, não reconhecendo aquela proteína modificada como própria, realiza a quebra da autotolerância imunológica que dará início ao processo autoimune da doença.

Os principais autoanticorpos presentes na AR são o fator reumatoide, o qual reconhece a porção Fc da imunoglobulina G formando complexos imunes, e sendo encontrados principalmente no sangue de pacientes artríticos [31]. Os ACPA possuem como alvo as proteínas/peptídeos que sofrem citrulinização [31,32], e são os anticorpos mais específicos para a AR. Os ACPA são bastante reativos e se ligam a várias proteínas citrulinadas, incluindo fibrinogênio, colágeno e histonas [33]. Vários estudos identificaram tais proteínas citrulinadas no tecido sinovial da AR, como fibrinogênio/fibrina citrulinada [34] e histonas citrulinadas [35]. Estes autoanticorpos circulantes podem ser detectados anos antes do aparecimento dos sinais clínicos da doença. Além disso, a presença do FR e do ACPA está associada com um pior prognóstico da AR [36].

As articulações são revestidas por uma membrana sinovial que produz o líquido sinovial; esse componente é responsável pela manutenção e funcionamento adequado das estruturas articulares, pois fornece a nutrição e a lubrificação necessárias ao tecido. Já quando ocorre a ativação imune na doença, essa membrana se torna infiltrada por células inflamatórias e hiperplásica. Células imunes ativadas migram e se acumulam na sinóvia, sendo toda essa mobilização consequência de uma ativação endotelial, que aumenta a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, atraindo os leucócitos e induzindo sua proliferação no local [21]. A formação desse microambiente inflamado também influencia em um intenso crescimento e ativação dos sinoviócitos - macrófagos sinoviais (MLS) e fibroblastos sinoviais (FLS) - ocasionando na hiperplasia sinovial,

que é a característica chave na AR [37]. A inflamação em conjunto com esta proliferação celular acaba por formar um tecido invasivo denominado *pannus* - o qual invade as estruturas adjacentes,



gerando danos à cartilagem e ao osso. Isso levará a doença a progredir de predominantemente inflamatória para uma doença mais destrutiva [21].

Figura 2: Alterações articulares na artrite reumatoide. a) Articulação saudável; b) Articulação doente. (Adaptado SMOLEN)

A inflamação da sinóvia é o principal processo para a orquestração da doença. Com base nisso, diferentes tipos celulares estão envolvidos na liberação de citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores. Os neutrófilos são células na linha de frente de toda a mobilização inflamatória, são responsáveis pela síntese de prostaglandinas, proteases e espécies reativas de oxigênio, além de secretarem o TNF [38]. Já as células B são precursoras de plasmócitos secretores de autoanticorpos, que processam e apresentam antígenos promovendo a ativação de células T e que também secretam TNF e IL-6 [39]. Os macrófagos, além de realizarem fagocitose e apresentação de antígenos, conjuntamente liberam TNF, IL-1, IL-6 e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio [40].

Apesar de haver muitas citocinas envolvidas na AR, as mais estudadas são o TNF, a IL-6 e a IL-1, estando envolvidas não só na inflamação, mas na destruição da estrutura articular. Em pacientes com AR ativa, as concentrações séricas e sinoviais dessas citocinas são elevadas; essas moléculas além de promover a inflamação, atuam estimulando a liberação de metaloproteinasas (MMPs), que são enzimas degradantes de matriz tecido articular, e impedindo a produção de inibidores endógenos dessas proteases [25].

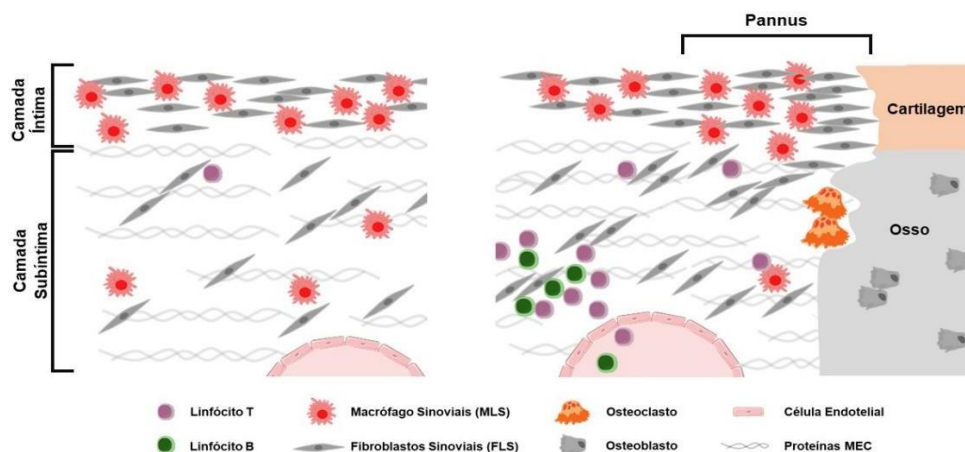
2.4 Fibroblastos sinoviais

As articulações mais numerosas, versáteis e que proporcionam maior liberdade de movimentos são conhecidas como articulações sinoviais. As extremidades ósseas nas articulações são recobertas e protegidas por um tipo de cartilagem lisa e regular. Envolvendo a articulação fica

a cápsula articular, feita de tecido conectivo resistente e fixada às extremidades ósseas. Já a membrana sinovial é um delicado tecido de revestimento interno da cavidade sinovial. Ela é a responsável pela secreção do líquido sinovial viscoso para manter a articulação sempre lubrificada e que alimenta a cartilagem com lipídios e proteínas. A membrana é dividida em dois compartimentos anatômicos e funcionais, denominados camada íntima e camada sub-íntima. A íntima consiste de 1 a 3 camadas de células e é composta de dois tipos celulares em proporções relativamente iguais: tipo A ou macrófagos sinoviais (MLS) e tipo B ou Fibroblastos sinoviais (FLS). A sub-íntima é composta de tecido conjuntivo frouxo, irregular com ocasionais fibroblastos, macrófagos e células adiposas.

Na fisiologia, os FLS estão presentes nessas camadas de revestimento e sub-revestimento da membrana sinovial e são imprescindíveis para manter a integridade da arquitetura articular. São responsáveis pelo remodelamento fisiológico contínuo da matriz extracelular (MEC), através da secreção de vários de seus componentes (como colágenos, fibronectina e laminina), além da secreção das enzimas MMPs e de seus inibidores. Em condições inflamatórias, a espessura da membrana sinovial aumenta para 10-15 camadas de células, assim como o influxo e proliferação de células inflamatórias (células dendríticas, mastócitos, células T e B), promovendo maior proliferação e sobrevivência dos FLS [41].

Sendo assim, o microambiente de tecido inflamado acaba por alterar todo o perfil metabólico do tecido, em especial, os FLS. Ocorre então a ativação destas células, que está diretamente relacionada às interações célula-MEC, aumentando moléculas de adesão que irão facilitar a fixação na superfície da cartilagem. Por sua vez, moléculas de adesão, como integrinas e caderinas, também funcionam como receptores de sinalização, levando ao aumento da expressão de citocinas, MMPs e outros fatores relevantes [42]. Com esse processo, é estabelecida uma rede parácrina/autócrina que perpetua a inflamação, recruta novas células inflamatórias para a articulação e contribui para a degradação da MEC. Em adição à produção e secreção de fatores



inflamatórios, a capacidade proliferativa dos FLS aumenta, por conta de um desequilíbrio entre proliferação e apoptose destes sinoviócitos.

Figura 3: Alterações patológicas na sinóvia reumatóide. Membrana sinovial saudável dividida em dois compartimentos anatômicos e funcionais, denominados camada íntima e camada sub-íntima (a) Na AR, a camada de revestimento sinovial espessada torna-se uma massa hipertrófica de tecido “*pannus*” invadindo a cartilagem articular e o osso adjacentes. A camada sub-revestimento também sofre expansão e aumento da deposição de matriz, com infiltrados de células inflamatórias, incluindo macrófagos, mastócitos, células T, células B, plasma e células dendríticas. (Adaptado de Turner, 2015) [43]

Sabe-se que FLS artríticos desenvolvem uma maior capacidade de secretar uma variedade de citocinas, como IL-1, IL-6 e IL-18, quimiocinas como CCL-2, e fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), quando comparados aos FLS saudáveis. O estímulo extracelular constante feito pelas citocinas pró-inflamatórias é imprescindível para a manutenção dos FLS com um fenótipo alterado, exibindo características agressivas semelhantes a neoplasias, como proliferação intensa, migração e invasão tecidual, alterações críticas para o desenvolvimento do *pannus*. Já foi visto que a estimulação dos FLS com citocinas inflamatórias aumenta a capacidade de migração e invasão dessas células[44].

Conforme citado acima, os FLS têm uma migração acentuada na AR, sendo também capazes de migrar de uma articulação a outra, sendo uma possível explicação para seu caráter poliarticular simétrico [45]. Já sua capacidade de invadir tecidos se deve à capacidade dos FLS de produzirem componentes de degradação da MEC, como colagenases, MMPs e catepsinas, que orientam o equilíbrio entre as proteases e seus inibidores para a destruição tecidual. Essa invasividade é também estimulada por citocinas como IL-1 e TNF, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que têm sua produção favorecida pela hipóxia local. Além disso, secretam RANKL, que estimula a diferenciação de osteoclastos, que geram a erosão óssea, aumentando a destruição da cartilagem e do osso [41].

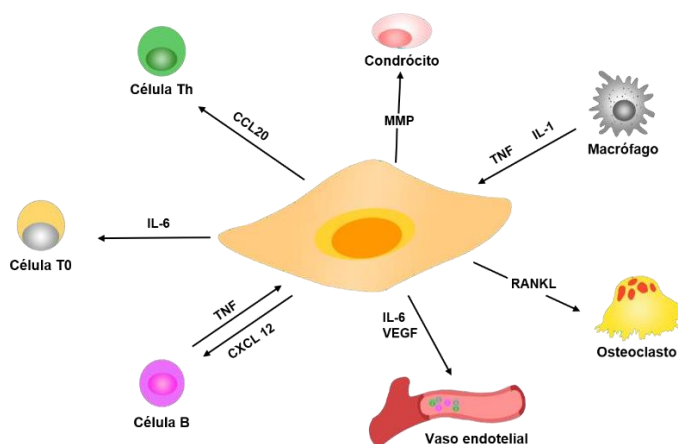


Figura 4: Interação dos FLS e células do sistema imunológico para perpetuação da sinovite. A interação dos fibroblastos com as células T juntamente com as células B inclui a secreção de citocinas constituídas por CXCL12 e TNF para promover a mobilização e retenção de células T e células B. Ao mesmo tempo, as citocinas dos fibroblastos que consistem em IL-6 para a diferenciação de subconjuntos de células Th0. Os fibroblastos promovem a angiogênese secretando VEGF e IL-6, e também secretam o ligante RANKL, que aumenta a diferenciação dos osteoclastos juntamente com a ativação, resultando em erosão óssea [41].

Sendo assim, a comunicação cruzada entre FLS e células imunes, e também sua suscetibilidade a uma variedade de moléculas estimuladoras é imprescindível para o estabelecimento e perpetuação de um caráter agressivo. Nesse contexto, as miocinas podem ser um alvo de estudo para investigação de diferentes moléculas que tenham o potencial de afetar o fenótipo agressivo e característico dos FLS na AR e também na fisiopatologia da doença. Dito isso, uma característica que propicia o estudo dos FLS é que eles podem ser isolados do tecido sinovial e cultivados *in vitro*, mantendo o seu fenótipo agressivo [41]. Estudos já demonstraram que seu fenótipo *in vitro* está associado com a taxa de destruição articular de pacientes com AR [46], bem como com o dano histológico da articulação em ratos [47].

Recentemente, verificou-se que a miostatina, que é uma molécula derivada do músculo esquelético, está presente na membrana sinovial de pacientes com AR. Porém, não há conhecimento se há um extravasamento desta molécula para o líquido sinovial. Também, a exposição dos FLS artríticos às citocinas inflamatórias (TNF e IL-1) aumentou a expressão de miostatina na nessas células, e além disso, a presença desta miocina aumentou a diferenciação de osteoclastos induzida por RANKL [9]. Além da miostatina, outras miocinas como o GDF-11 e a irisina, já foram estudadas como tendo papel na homeostase óssea [12,13,17]. No entanto, não se sabe se há presença dessas moléculas na sinóvia, e se os FLS participam da secreção dessas miocinas no ambiente articular, ou se secretam algum mediador que interfere na atividade dessas moléculas na articulação.

2.5 Tratamento da AR

Ao longo dos anos, muitos estudos foram desenvolvidos a fim de encontrar fármacos que fossem eficientes para o tratamento e até uma possível remissão da AR. Devido ao avanço da ciência, muitos trabalhos realizados possibilitaram que, atualmente, haja um melhor manejo com a doença, tanto no âmbito farmacológico quanto em estratégias terapêuticas. Os manejos atuais da doença consistem em um diagnóstico imediato e intervenções de medicamentos imunossupressores, direcionando para a remissão da doença. Porém, a doença ainda é incurável e seu controle depende de tratamentos que atuam a longo prazo na supressão do sistema imune, o que afeta toda a fisiologia do corpo, podendo resultar em efeitos colaterais e riscos a infecções [48].

São utilizadas cinco classes de medicamentos para o tratamento da AR: analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides, corticosteroides e medicamentos modificadores do curso da doença (MMCD) - sintéticos (MMCDs) e biológicos (MMCDbio). A meta terapêutica não é a cura, mas a remissão ou pelo menos uma baixa taxa de atividade da doença, a fim de eliminar a inflamação articular ativa e visando atenuar acometimentos incapacitantes derivados na AR estabelecida. Por conta disso, a utilização de diferentes classes de medicamentos é feita em conjunto, visando não só o controle da doença, mas também manejo da dor, controle das comorbidades e preservação de atividades cotidianas [27].

A base do tratamento da AR são os MMCD, sendo divididos em MMCDs convencionais (como metotrexato e leflunomida), a MMCDs alvo-específicos (inibidores de JAK) e MMCD biológicos (como os inibidores de TNF e bloqueadores do receptor de IL-6). Entre seus efeitos estão, redução do edema e da dor nas articulações, diminuição dos marcadores de fase aguda (PCR e VSG) e, principalmente, a limitação dos danos progressivos nas articulações e a melhora da função. Porém, sua ação só será observada a longo prazo, por conta disso, os glicocorticoides são indicados como estratégia por curtos períodos de tempo até que o efeito farmacológico se inicie. Logo, esses medicamentos têm como intuito agir sistematicamente na inflamação, na tentativa de mudar a orquestração imune mobilizada pela doença. Sendo assim, de acordo com o consenso da Sociedade Brasileira de Reumatologia, após o diagnóstico, a primeira linha de tratamento indicada são os MMCDs convencionais, tendo como primeira escolha o metotrexato, o qual pode ser prescrito em monoterapia ou combinado a outro da mesma classe. Como segunda linha de tratamento são indicados os MMCD biológicos ou MMDCs alvo-específicos.

Visto que a sinóvia é o principal tecido-alvo da artrite inflamatória, o estudo desse microambiente vem sendo cada vez mais estudado diretamente. Os níveis de citocinas inflamatórias no líquido sinovial de pacientes com AR são bastante elevados, o que faz com que haja uma alteração metabólica de todo o tecido, contribuindo para a perpetuação da sinovite articular [25]. Os FLS são células residentes que sofrem uma alteração devido a esse processo inflamatório, sendo ativadas a um perfil invasivo que tem papel principal na destruição da cartilagem e osso. Sabe-se que na membrana sinovial existem 2 subtipos de FLS responsáveis pela resposta inflamatória na AR. FLS THY1+ (CD90+), com repertório inflamatório, presente na camada sub-revestimento, e FLS THY- (C90-) mais envolvido em danos articulares, presente no revestimento [49]. Em um estudo recente, foi visto que a identificação de fenótipos podem ser biomarcadores na identificação de indivíduos com risco aumentado de rápida progressão da doença e destruição grave das articulações [50]. Identificar a heterogeneidade de fibroblastos e subconjuntos de fibroblastos podem ser usados como alvos específicos para o tratamento de doenças pode fornecer novas estratégias eficazes para o tratamento da AR. Logo, o estudo de medicamentos capazes de influenciar diretamente na mudança de fenótipo dos FLS são interessantes para um controle e manejo da doença.

Atualmente, vem sendo estudado o efeito de moléculas biológicas sobre essa ativação dos FLS. Pois, atualmente nenhum dos tratamentos usuais para AR são específicos nessas células, agindo apenas indiretamente na modulação da sinalização, metabolismo e produção de citocinas dos FLS [51]. Além disso, a maioria dos fármacos desenvolvidos para o tratamento da doença age sistematicamente no organismo, sendo direcionados ao controle da resposta imune, o que deixa os pacientes imunocomprometidos e susceptíveis a reações adversas. Por conta disso, drogas e moléculas que tem a capacidade de agir diretamente na articulação vêm sendo estudadas para o desenvolvimento de métodos e intervenções mais direcionados, sem a desvantagem da imunossupressão sistêmica associada aos tratamentos atuais para AR [48].

2.6 Interação músculo sinóvia

As articulações sinoviais são as estruturas que conferem mobilidade em diferentes partes do corpo, sendo a base estrutural para a realização das principais atividades fisiológicas humanas. Porém, são estruturas mais complexas, que carecem de manutenção contínua e de uma maquinaria especial para seu funcionamento saudável. Sendo assim, são compostas por diferentes tipos de estruturas morfológicas, incluindo osso, tendões, cartilagem, membrana sinovial e o espaço sinovial que contém o líquido sinovial [93].

Mesmo sendo um compartimento composto por tecidos tão distintos, estudos sugerem que esses tecidos estabelecem uma comunicação intensa para manter a homeostase articular [93,94]. Logo, pode-se deduzir que patologias articulares não atinjam apenas um tecido específico, e que a comunicação intertecidos seja um fator importante para o estabelecimento e patogenia de doenças articulares, como a AR. Uma das principais características fisiopatológicas da doença é a comunicação célula-célula, principalmente entre células imunes e células estromais. Sabe-se que há uma comunicação entre células T, fibroblastos e osteoblastos, que estão intimamente ligados na destruição da articulação na AR. Os FLS do tecido sinovial expressam o ativador do receptor do ligante NF- κ B (RANKL) e induzem os osteoclastos a promover a destruição óssea, expressando metaloproteinases de matriz (MMPs) que aceleram a degradação da cartilagem [52]. Logo, a interação molecular é imprescindível na destruição articular na AR.

Com base nisso, recentemente a interação músculo e osso está sendo bastante explorada, pois ambos podem ser afetados na AR e, também, são órgãos secretores que se comunicam através de fatores musculares, como as miocinas e fatores ósseos [15]. Apesar da interação mecânica entre músculo e osso ser bastante compreendida, a interação molecular acaba por ser um mecanismo complementar para mais elucidações desta comunicação. Em estudo *in vitro*, foi visto que meios condicionados (MC) coletados de cultura de mioblastos e miotubos C2C12 estimularam significativamente a viabilidade e migração de pré-osteoblastos. Ainda, MC de mioblastos suprimiu a osteoclastogênese e reabsorção óssea, reduzindo também as expressões de marcadores

de diferenciação de osteoclastos [53]. Portanto, existe a possibilidade de que moléculas secretadas pelas células musculares afetem bioquimicamente o tecido ósseo de maneira parácrina.

O músculo é uma fonte de miocinas e estas podem tanto estimular a formação óssea quanto contribuir para a perda da massa óssea. O tecido ósseo, por sua vez, também secreta fatores que possuem efeito no músculo. Sendo assim, as citocinas e fatores de crescimento são importantes reguladores de FLS, condrócitos e osteócitos. Na AR, já foi demonstrado que um destes mediadores moleculares, a miostatina, originalmente secretada pelo músculo, pode ser expressa diretamente nas articulações afetadas, contribuindo, assim, com a degradação articular. Ainda, a expressão dessa miocina é alta em FLS artríticos e foi capaz de diminuir número de osteoclastos na articulação em artrite experimental [9]. A irisina também já demonstrou ter participação na remodelação óssea, agindo como modulador local de osteoblastos e osteoclastos[52,53]. Nesse contexto, a migração de moléculas auxilia na perpetuação da inflamação e atividade da doença. Logo, conhecer mais a respeito de como ocorre a comunicação entre estes tecidos e sobre os fatores secretados por eles, é importante para o conhecimento da fisiopatologia sistêmica da AR.

2.7 Miocinas

As miocinas são caracterizadas como citocinas ou outros peptídeos que são produzidos, expressos e liberados pelas fibras musculares e exercem efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos [56,57]. E tem a capacidade de realizar comunicação intertecidos como tecido adiposo, ósseo, vascular e órgãos como fígado e intestino, bem como, efeitos dentro do próprio músculo; podendo exercer efeitos no metabolismo de glicose, escurecimento de gordura branca, hipertrofia e formação óssea [57].

Tabela 2: Ações endócrinas conhecidas de miocinas em diferentes tecidos [57].

Tecido	Miocinas envolvidas
Cérebro	Catepsina B e irisina: neurogênese do hipocampo; IL-6: estimulação do apetite.
Tecido adiposo	IL-6: estimula a lipólise e diminui a massa gorda visceral; Irisina e IL-6: papel no “escurecimento” do tecido adiposo branco.
Tecido ósseo	Decorina, IL-6, IGF-1 e FGF-2: regulam positivamente a formação óssea. Irisina: remodelação óssea.
Tecido hepático	IL-6: homeostase da glicose.
Mucosa intestinal	Angiogenina, a osteoprotegerina e a IL-6: ação protetora das células β pancreáticas contra citocinas pró-inflamatórias; IL-6: aumento a secreção de insulina.

2.7.1 Miostatina

O fator de crescimento e diferenciação 8 (GDF-8) é uma miocina também conhecida por miostatina. Ela é uma proteína membro da superfamília do TGF- β (fator de crescimento transformador beta), que é responsável pelo controle, diferenciação e proliferação celular, reparo tecidual, apoptose, síntese de componentes de matriz extracelular e controle das respostas imunológicas [7]. A disfunção na sinalização do TGF- β vem sendo associada em diversas patologias humanas, como câncer, doenças fibróticas e distúrbios do tecido conjuntivo [58,59]. Além disso, o TGF- β vem sendo descrito como uma proteína essencial para a homeostase articular [60,61].

Por sua vez, a miostatina é uma molécula principalmente de ação no músculo esquelético, produzida pelas células musculares e que apresenta uma importante função de metabolismo muscular através da regulação do tamanho de miofibras em condições fisiológicas e patológicas [7]. Ela atua como um regulador negativo da massa muscular esquelética, logo, o desbalanço na sinalização nas células musculares leva a alterações no metabolismo celular gerando atrofia (quando ocorre um aumento na síntese de miostatina) e hipertrofia (quando ocorre uma redução de miostatina nas células musculares esqueléticas). Sabe-se que há presença dessa miocina em níveis circulantes e, em níveis baixos, nos tecidos adiposo e cardíaco. No entanto, foi demonstrado recentemente que sua expressão também é alta nos FLS de pacientes com AR [9].

Em modelos de artrite inflamatória, já foi relatado o aumento da miostatina em níveis circulantes e articulares [9,62]. Em estudos mais recentes, a miostatina mostra participação na regulação do tecido ósseo [63]. A homeostase óssea ocorre pelo equilíbrio entre a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. Na AR, ocorre a quebra dessa homeostase, fazendo com que haja ação exacerbada de osteoclastos, responsáveis pela degradação do osso articular [64]. Nesse contexto, a miostatina regula a diferenciação de osteoclastos através de mecanismos que dependem da interação do RANKL e seu receptor RANKL [63]. O RANKL é produzido por osteoblastos, linfócitos T e também pelos FLS de pacientes com AR [65]. Logo, pode ser sugerido que a modulação das vias da miostatina pode ser uma abordagem na fisiopatologia da artrite reumatoide, participando não apenas na diminuição da inflamação articular, mas também na proteção do osso contra a degradação excessiva.

Em pacientes com AR, com remissão da doença, os níveis de miostatina se mostraram mais baixos quando comparados com controles saudáveis. Essa diminuição pode estar relacionada com o efeito do tratamento anti-inflamatório com MMDs, pois a diminuição do ambiente inflamatório pode diminuir a expressão da miostatina [66]. No estudo que avaliou a concentração de miostatina no soro e líquido sinovial de pacientes com osteoartrite (OA) de joelho, foi visto que a concentração da miostatina foi mais elevada no soro comparada a controles saudáveis, sendo as concentrações no soro e no líquido sinovial correlacionadas significativamente com a severidade da OA de joelho [67]. Nas membranas sinoviais de pacientes com AR, foi encontrada

uma maior expressão de miostatina em comparação com pacientes com OA. Ainda, o bloqueio da miostatina atenuou a formação dos osteoclastos induzida por RANKL e reduziu a destruição das articulações em modelo de artrite induzida por soro K/BxN em camundongos [9]. Apesar dos indícios da presença de miostatina na membrana sinovial e sua ação nos osteoclastos, sua presença no líquido sinovial e sua ação no fenótipo agressivo dos FLS ainda não foi avaliada.

Sabe-se que mediadores inflamatórios também estão correlacionados com essa miocina. No estudo já citado anteriormente, a citocina TNF foi capaz de induzir a expressão da miostatina em FLS da AR, sugerindo que a inflamação sinovial pode desencadear a sua regulação [9]. Ainda, na análise do líquido sinovial de pacientes com AR, os níveis de miostatina e IL-1 β estavam superexpressos e correlacionados positivamente. Em análise com FLS artríticos, observou-se que a miostatina regula a expressão de IL-1 β , via inibição de miR-21-5p (um regulador negativo de IL-1 β), indicando que a miostatina tem capacidade de induzir a inflamação nos FLS pelo aumento da expressão de IL-1 β [10]. Em outro estudo *in vitro* com FLS, a citocina pró-inflamatória TNF teve uma correlação positiva com miostatina no tecido sinovial de pacientes com AR. Resultados mostram que a miostatina induz diretamente a expressão do TNF pela via de sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)-Akt [68]. Ademais, a miostatina também foi capaz de regular positivamente o recrutamento de células Th17 para a sinóvia pela via CCL20-CCR6 em artrite experimental [69]. Logo, a miostatina se mostra uma molécula com possível ação, não só na regulação de células estromais envolvidas na destruição articular, mas também possível participação nas vias de inflamação sinovial na AR.

2.7.2 GDF-11

O fator de crescimento e diferenciação 11 (GDF-11) também faz parte da família do TGF- β e possui 90% de identidade de sequência de aminoácidos do GDF-8, sendo as duas proteínas bastante similares estruturalmente [70]. O GDF11 é expresso em tecidos embrionários, como membros e sistema nervoso, e em tecidos adultos, como medula espinhal, tecido olfativo, músculo esquelético, cérebro e coração, porém há diferença nos níveis de expressão entre os tecidos. Por exemplo, os níveis mais elevados de GDF-11 são no hipocampo do cérebro, enquanto que os mais baixos são no fígado [71].

O GDF-11 é bastante estudado no processo de envelhecimento. Essa molécula foi identificada como um fator circulante que diminui com a idade, e pode atuar no resgate de várias patologias que estão associadas ao envelhecimento. Já foi relatado que os níveis de GDF-11 no sangue de camundongos diminui com a idade [72]. Porém, na literatura há resultados contraditórios referente ao envolvimento do GDF-11 no envelhecimento e no acometimento muscular [73,74,75].

Em outro estudo, demonstrou-se que os níveis circulantes de GDF-11 não são alterados com o envelhecimento em mulheres e homens saudáveis[73]. Já em camundongos, os níveis

séricos de GDF-11 se mostraram aumentados com a idade. Além disso, sua administração em camundongos saudáveis inibiu a diferenciação de mioblastos e também a regeneração muscular [74]. Ainda, em estudos *in vitro*, mioblastos da linhagem celular C2C12 foram inibidos pelo tratamento com GDF11 recombinante [75]. Com isso, ainda não é possível entender exatamente a função dessa molécula, mostrando a versatilidade do GDF-11 no desenvolvimento de diferentes acometimentos.

GDF-11 não tem uma ação contraditória apenas no envelhecimento e tecido muscular, mas também no tecido ósseo. Em estudos *in vitro*, foi observado que o GDF11 atuou na osteogênese induzindo a diferenciação de osteoblastos, células responsáveis pela produção da matriz óssea [12]. Já em camundongos nocaute para GDF-11, a massa óssea se mostrou reduzida por conta de um comprometimento da maturação de osteoblastos e ao aumento da maturação de osteoclastos (células responsáveis pela reabsorção óssea) [13]. Porém, em outro trabalho os níveis séricos de GDF-11 foram associados negativamente com a densidade mineral óssea em mulheres pós-menopausa [76]. Em modelo animal, a administração de GDF-11 causou perda óssea e prejudicou a regeneração óssea em camundongos adultos jovens e idosos. Ainda, *in vitro*, GDF-11 inibiu a diferenciação de osteoblastos, além de estimular a osteoclastogênese induzida por RANKL [77].

Sabendo que a AR apresenta erosão óssea nas articulações, tem-se a hipótese de que GDF-11 poderia ser um alvo de investigação dos mecanismos envolvidos na destruição da sinóvia. Em artrite induzida por colágeno, a administração de GDF-11 foi capaz de antagonizar a inflamação e proteger contra o desenvolvimento da artrite inflamatória. Ademais, o GDF11 também antagonizou a indução mediada pelo TNF- α da via de sinalização do NF- κ B em macrófagos, que participa de várias vias inflamatórias, e bastante envolvida na fisiopatologia da artrite [11]. Desse modo, GDF-11 possui uma ação pouco estabelecida na literatura e nenhum estudo sobre sua presença na sinóvia e ação em FLS, sendo necessárias maiores investigações do seu efeito na patologia da AR.

2.7.3 Irisina

A contração muscular pode ser capaz de estimular a produção e liberação de miocinas no sangue que acabam por influenciar o metabolismo de vários tecidos e órgãos [78]. A irisina é uma molécula expressa pelo músculo esquelético em resposta ao exercício físico, e seu impacto positivo vem sendo estudado em muitas doenças crônicas, entre elas diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico e artrite reumatoide [79, 80].

A irisina é um polipeptídeo constituído por 112 aminoácidos, este polipeptídeo é clivado e secretado pelo domínio da fibronectina tipo III, que contém em sua estrutura a proteína 5 (FNDC5), uma proteína de membrana. Aproximadamente 72% de irisina circulante é derivada

do músculo esquelético. O exercício induz a regulação positiva da expressão do receptor coativador-1 α do receptor γ ativado por proliferador de peroxisoma (PGC1- α) nas fibras musculares, o qual causa o aumento de FNDC5 na membrana celular, esta proteína é então processada proteoliticamente para formar a irisina, ocorrendo sua secreção na circulação sanguínea [81].

O exercício então, acaba por ser muito benéfico tendo efeitos anti-inflamatórios, imunorreguladores e metabólicos, regulando a expressão de miocinas e suas possíveis funções no metabolismo [82]. Sendo assim, sabe-se que outros tecidos também são alvos da irisina. Uma de suas principais funções é um efeito específico na redução da gordura visceral, promovendo a conversão do tecido adiposo branco em tecido adiposo marrom [83]. Esse processo de diferenciação desencadeia a termogênese, que aumenta o gasto total de energia corporal e melhora a homeostase da glicose [81]. A irisina possui também um efeito autócrino dentro de seu tecido correspondente, atuando no músculo esquelético como um fator pró-miogênico. Ainda, recentemente essa molécula tem sido citada com uma possível ação sobre osteoblastos e ter uma atuação significativa no tecido [84].

Na literatura, diversos estudos já demonstraram a relação da irisina com o tecido muscular. Utilizando culturas primárias de músculo esquelético humano, foi demonstrado que a expressão de mRNA de FNDC5 e os níveis de irisina estão aumentados durante o processo de diferenciação de miócitos. Ainda, o tratamento com irisina causou um aumento na via de síntese proteica do músculo [85]. Em células miogênicas C2C12, o tratamento com irisina foi capaz de induzir a expressão de vários genes pró-miogênicos. Além disso, o tratamento de camundongos com irisina, após a denervação, recuperou a perda de massa muscular esquelética, melhorando a ativação das células satélites e reduzindo a degradação de proteínas [16].

Em outros estudos, também sugerem que a irisina pode desempenhar um papel regulador fundamental no metabolismo ósseo. Foi visto que a irisina age através da integrina $\alpha V/\beta 5$ prevenindo a perda óssea e agindo como modulador local da remodelação óssea [54]. As integrinas são proteínas localizadas na superfície das membranas celulares e regulam as interações célula-célula e célula-matriz extracelular [86]. A integrina $\alpha V/\beta 5$ tem papéis importantes na manutenção da adesão celular, ativação celular, migração celular, proliferação celular e inflamação. Em outro estudo *in vitro*, a irisina diminuiu a diferenciação e formação dos osteoclastos, induzido por RANKL, por meio da inibição expressão do fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), que é um essencial na regulação do ciclo celular [87].

Em estudos *in vivo*, a irisina também demonstrou agir sobre o tecido ósseo fisiologicamente. Em camundongos machos jovens, o tratamento com doses baixas de irisina recombinante causou ações anabólicas na massa óssea e na densidade mineral, aumentando a massa e a força óssea cortical. Ainda foram observadas diminuição de osteoclastos e aumento na expressão de genes osteoblásticos [17]. Já em modelo murino de osteoporose induzida por

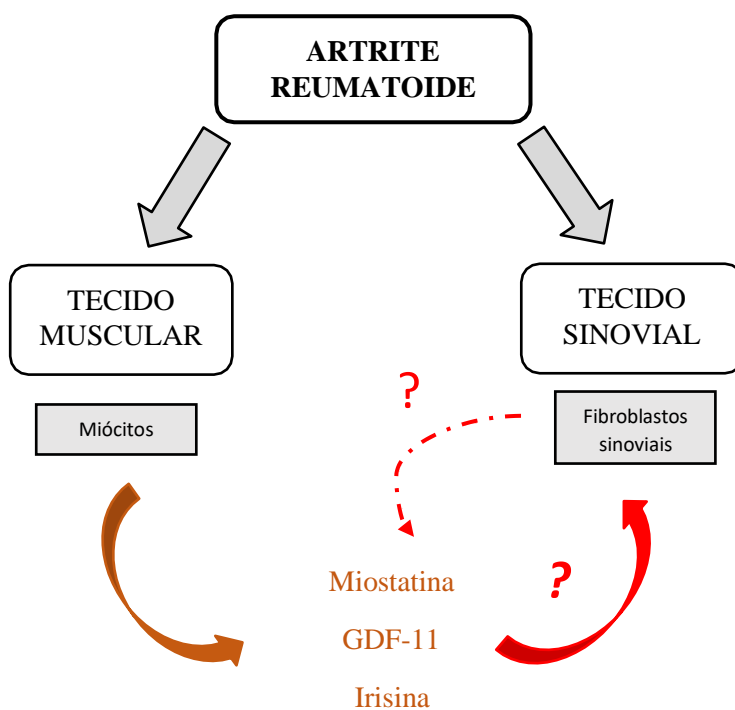
desuso, houve diminuição da diferenciação de osteoblastos, porém o tratamento com irisina recombinante foi capaz de prevenir essa redução na diferenciação. A administração intraperitoneal de irisina em camundongos resultou no aumento da espessura óssea trabecular e cortical e no número de osteoblastos [87]. Ainda, foi demonstrado que a expressão proteica de FNDC5 e irisina aumentou significativamente no tecido ósseo e em menor extensão na cartilagem articular após a exposição ao exercício desses animais. Estes indícios implicam numa possível ação da irisina sobre doenças que causam alterações ósseas.

Em um modelo de OA em ratos, foi visto que a irisina não apenas recuperou a expressão do colágeno II e atenuou a de MMP-13 nos condrócitos, como também inibiu a atividade do receptor tipo nod proteína-3 (NLRP3)/caspase -1 que melhorou a piroptose celular - tipo de morte celular programada desencadeada por inflamação - , atenuando a doença. Logo, a irisina foi capaz de desencadear um mecanismo anti-inflamatório em OA [88]. Em outro estudo, foi visto que condrócitos articulares osteoartríticos humanos expressam níveis diminuídos de FNDC5, e que administração de irisina melhorou a inibição do crescimento mediada por IL-1 β e reprimiu o estresse oxidativo mediado pela inflamação destas células. Ainda, a administração intra-articular de irisina aliviou a erosão da cartilagem e sinovite em modelo animal de OA [89]. Em análise dos níveis de irisina no soro e no líquido sinovial de pacientes com OA severa de joelho, revelou que estes pacientes possuem uma diminuição acentuada dos níveis de irisina tanto no soro quanto no líquido sinovial. Além disso, os níveis de irisina foram correlacionados com a severidade radiográfica da OA [18].

Já na AR ainda são escassas na literatura associações desta miocina com parâmetros fisiopatológicos da doença. Porém, em um estudo recente com modelo de artrite, o grupo artrítico tratado com irisina diminuiu a expressão de mRNA de TNF no tecido articular, o que ocasionou uma redução em marcadores de via bioquímicas de sinalização necroptótica em comparação com o grupo artrítico tratado com o placebo [90]. Em pacientes com AR, que apresentam fraturas ósseas, foi observado um nível reduzido de irisina em 37% dos casos. Além disso, esse grupo apresentou maior grau de atividade da AR e maior perda de função articular, além de uma relação entre o nível de irisina sérica e a presença de fratura óssea na anamnese [91]. Em outro estudo recente, uma diminuição dos níveis de irisina está associada a fraturas vertebrais osteoporóticas em mulheres com AR [92]. Sendo assim, esses indícios sugerem a ação benéfica que a irisina pode desempenhar sobre a degradação da cartilagem e do osso, carecendo de mais estudos acerca dos mecanismos envolvidos, principalmente com foco em sinoviócitos da articulação.

3. MARCO CONCEITUAL

Figura 5. Marco conceitual artrite reumatoide e miocinas. As miocinas são moléculas sintetizadas e liberadas pelas fibras musculares, e recentemente observou-se sua presença no compartimento articular de pacientes com AR, apresentando também uma associação com parâmetros inflamatórios e erosivos da doença. A partir dessas informações, é necessário um maior entendimento quanto ao envolvimento dessas moléculas sobre as alterações articulares observadas na AR e, dessa forma, as seguintes perguntas precisam ser respondidas: Há presença dessas moléculas no líquido sinovial? As miocinas (miostatina, GDF-11 e irisina) poderiam apresentar um efeito na destruição articular? Se sim, seria por via celular direta com FLS? Esse efeito seria positivo ou negativo? Essas miocinas seriam expressas pelos FLS?



4. JUSTIFICATIVA

As miocinas (miostatina, GDF-11 e irisina) são moléculas produzidas e secretadas pelo músculo esquelético que possivelmente têm uma função de comunicação entre órgãos e sistemas, por sua função parácrina e endócrina. Estas moléculas apresentam funções relevantes em diferentes tecidos, principalmente tecido ósseo e o músculo esquelético. Recentemente foi reportado que a miostatina é expressa por FLS na membrana sinovial da articulação de pacientes com AR. Em relação ao GDF11 e à irisina, apesar de ambos apresentarem também ações nos tecidos ósseo e muscular, existem poucos dados na literatura em relação aos níveis sinoviais e séricos dessas miocinas na AR. Também não há estudos que reportem sua contribuição para a destruição articular na sinóvia de pacientes artríticos, nem sua ação no fenótipo agressivo dos FLS. Sendo a AR uma doença sistêmica, faz-se interessante e necessário investigar a presença de miocinas na cavidade articular e sua interação com diferentes células atuantes na propagação e avanço da doença, como as células do tecido sinovial. Assim, testes com miostatina, GDF-11 e irisina sobre os FLS de pacientes com AR podem auxiliar no entendimento da influência destas moléculas na atividade da doença e na destruição articular.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo principal

Avaliar a presença de miostatina, GDF-11 e irisina no líquido sinovial e seu efeito no fenótipo de fibroblastos sinoviais de pacientes com AR.

5.2 Objetivos específicos

Avaliar os níveis sinoviais e séricos de miostatina, GDF-11 e irisina em pacientes com AR.

Avaliar os efeitos da miostatina, GDF-11 e irisina em culturas de FLS através dos ensaios de:

- Migração
- Invasão
- Viabilidade celular (MTT)
- Níveis de IL-6, miostatina, GDF-11 e irisina no sobrenadante celular

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] J. S. Smolen, D. Aletaha, and I. B. McInnes, “Rheumatoid arthritis,” *Lancet*, vol. 388, no. 10055, pp. 2023–2038, Oct. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30173-8.
- [2] M. Mellado, L. Martínez-Muñoz, G. Cascio, P. Lucas, J. L. Pablos, and J. M. Rodríguez-Frade, “T cell migration in rheumatoid arthritis,” *Front. Immunol.*, vol. 6, no. JUL, 2015, doi: 10.3389/fimmu.2015.00384.
- [3] M. A. E. van Bokhorst - de van der Schueren, N. P. C. Konijn, I. E. M. Bultink, W. F. Lems, C. P. Earthman, and L. H. D. van Tuyl, “Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis,” *Clin. Nutr.*, vol. 31, no. 6, pp. 1008–1010, Dec. 2012, doi: 10.1016/J.CLNU.2012.05.012.
- [4] W. Fukuda *et al.*, “Contribution of rheumatoid arthritis disease activity and disability to rheumatoid cachexia,” *Mod. Rheumatol.*, vol. 20, no. 5, pp. 439–443, 2010, doi: 10.3109/s10165-010-0306-6.
- [5] B. K. Pedersen, “Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases,” *Brain. Behav. Immun.*, vol. 25, no. 5, pp. 811–816, Jul. 2011, doi: 10.1016/J.BBI.2011.02.010.
- [6] J. H. Lee and H. S. Jun, “Role of myokines in regulating skeletal muscle mass and function,” *Front. Physiol.*, vol. 10, no. JAN, p. 42, Jan. 2019, doi: 10.3389/FPHYS.2019.00042/BIBTEX.
- [7] “Myostatin in Muscle Growth and Repair : Exercise and Sport Sciences Reviews.” https://journals.lww.com/acsm-essr/Fulltext/2001/10000/Myostatin_in_Muscle_Growth_and_Repair.4.aspx (accessed Apr. 20, 2023).
- [8] J. D. Murillo-Saich *et al.*, “Association of myostatin, a cytokine released by muscle, with inflammation in rheumatoid arthritis A cross-sectional study,” 2021, doi: 10.1097/MD.00000000000024186.
- [9] B. Dankbar *et al.*, “Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice,” *Nat. Med.* 2015 219, vol. 21, no. 9, pp. 1085–1090, Aug. 2015, doi: 10.1038/nm.3917.
- [10] S. L. Hu, A. C. Chang, C. C. Huang, C. H. Tsai, C. C. Lin, and C. H. Tang, “Myostatin promotes interleukin-1 β expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through inhibition of miR-21-5p,” *Front. Immunol.*, vol. 8, no. DEC, p. 1747, Dec. 2017, doi: 10.3389/FIMMU.2017.01747/BIBTEX.
- [11] W. Li *et al.*, “GDF11 antagonizes TNF- α -induced inflammation and protects against the development of inflammatory arthritis in mice,” *FASEB J.*, vol. 33, no. 3, pp. 3317–3329, Mar. 2019, doi: 10.1096/FJ.201801375RR.
- [12] Y. Zhang *et al.*, “Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPAR γ ,” *Gene*, vol. 557, no. 2, pp. 209–214, Feb. 2015, doi: 10.1016/J.GENE.2014.12.039.
- [13] J. Suh *et al.*, “GDF11 promotes osteogenesis as opposed to MSTN, and follistatin, a MSTN/GDF11 inhibitor, increases muscle mass but weakens bone,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 9, pp. 4910–4920, Mar. 2020, doi: 10.1073/PNAS.1916034117/SUPPL_FILE/PNAS.1916034117.SM03.MP4.
- [14] X. Zhong *et al.*, “The production, detection, and origin of irisin and its effect on bone

- cells,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 178, pp. 316–324, May 2021, doi: 10.1016/J.IJBIOMAC.2021.02.181.
- [15] G. Colaianni, T. Mongelli, S. Colucci, S. Cinti, and M. Grano, “Crosstalk Between Muscle and Bone Via the Muscle-Myokine Irisin,” *Curr. Osteoporos. Rep.*, vol. 14, no. 4, pp. 132–137, Aug. 2016, doi: 10.1007/S11914-016-0313-4/FIGURES/1.
- [16] M. M. Reza *et al.*, “Irisin is a pro-myogenic factor that induces skeletal muscle hypertrophy and rescues denervation-induced atrophy,” *Nat. Commun.* 2017 81, vol. 8, no. 1, pp. 1–17, Oct. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01131-0.
- [17] G. Colaianni *et al.*, “The myokine irisin increases cortical bone mass,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 39, pp. 12157–12162, Sep. 2015, doi: 10.1073/PNAS.1516622112/SUPPL_FILE/PNAS.201516622SI.PDF.
- [18] Y. Mao, W. Xu, Z. Xie, and Q. Dong, “Association of Irisin and CRP Levels with the Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis,” doi: 10.1089/gtmb.2015.0170.
- [19] M. Gomasasca, G. Banfi, and G. Lombardi, “Myokines: The endocrine coupling of skeletal muscle and bone,” *Adv. Clin. Chem.*, vol. 94, pp. 155–218, Jan. 2020, doi: 10.1016/BS.ACC.2019.07.010.
- [20] J. F. Baker *et al.*, “Deficits in Muscle Mass, Muscle Density, and Modified Associations With Fat in Rheumatoid Arthritis,” *Arthritis Care Res. (Hoboken).*, vol. 66, no. 11, pp. 1612–1618, Nov. 2014, doi: 10.1002/ACR.22328.
- [21] I. Goeldner, T. L. Skare, I. T. De Messias Reason, and S. R. Da Rosa Utiyama, “Artrite reumatoide: uma visão atual,” *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, vol. 47, no. 5, pp. 495–503, 2011, doi: 10.1590/s1676-24442011000500002.
- [22] R. Khurana and S. M. Berney, “Clinical aspects of rheumatoid arthritis,” *Pathophysiology*, vol. 12, no. 3, pp. 153–165, 2005, doi: 10.1016/j.pathophys.2005.07.009.
- [23] D. L. Scott, F. Wolfe, and T. W. J. Huizinga, “Rheumatoid arthritis,” *Lancet*, vol. 376, no. 9746, pp. 1094–1108, Sep. 2010, doi: 10.1016/S0140-6736(10)60826-4.
- [24] H. U. Scherer, T. Häupl, and G. R. Burmester, “The etiology of rheumatoid arthritis,” *J. Autoimmun.*, vol. 110, p. 102400, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.JAUT.2019.102400.
- [25] I. B. McInnes and G. Schett, “Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 429–442, 2007, doi: 10.1038/nri2094.
- [26] T. C. Messemaker, T. W. Huizinga, and F. Kurreeman, “Immunogenetics of rheumatoid arthritis: Understanding functional implications,” *J. Autoimmun.*, vol. 64, pp. 74–81, Nov. 2015, doi: 10.1016/J.JAUT.2015.07.007.
- [27] J. S. Smolen *et al.*, “Rheumatoid arthritis,” *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2018 41, vol. 4, no. 1, pp. 1–23, Feb. 2018, doi: 10.1038/nrdp.2018.1.
- [28] N. Balandraud and J. Roudier, “Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis,” *Jt. Bone Spine*, vol. 85, no. 2, pp. 165–170, Mar. 2018, doi: 10.1016/J.JBSPIN.2017.04.011.
- [29] T. Neogi *et al.*, “The 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report,” *Arthritis Rheum.*, vol. 62, no. 9, pp. 2582–2591, 2010, doi: 10.1002/ART.27580.
- [30] P. L. C. M. van Riel and L. Renskers, “The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis,” *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 34, pp. 40–44, 2016, Accessed: May 24, 2023.

- [Online]. Available: <https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=11135>.
- [31] B. E. Holm, N. Sandhu, J. Tronstrøm, M. Lydolph, N. H. Trier, and G. Houen, “Species cross-reactivity of rheumatoid factors and implications for immunoassays,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 75, no. 1, pp. 51–63, Jan. 2015, doi: 10.3109/00365513.2014.965738.
- [32] F. Carubbi, A. Alunno, R. Gerli, and R. Giacomelli, “Post-Translational Modifications of Proteins: Novel Insights in the Autoimmune Response in Rheumatoid Arthritis,” *Cells 2019, Vol. 8, Page 657*, vol. 8, no. 7, p. 657, Jun. 2019, doi: 10.3390/CELLS8070657.
- [33] A. Ioan-Facsinay *et al.*, “Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies are a collection of anti-citrullinated protein antibodies and contain overlapping and non-overlapping reactivities,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 70, no. 1, pp. 188–193, Jan. 2011, doi: 10.1136/ARD.2010.131102.
- [34] O. Sanchez-Pernaute *et al.*, “Citrullination enhances the pro-inflammatory response to fibrin in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts,” *Ann. Rheum. Dis.*, vol. 72, no. 8, pp. 1400–1406, Aug. 2013, doi: 10.1136/ANNRHEUMDIS-2012-201906.
- [35] R. Khandpur *et al.*, “NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis,” *Sci. Transl. Med.*, vol. 5, no. 178, Mar. 2013, doi: 10.1126/SCITRANSLMED.3005580/SUPPL_FILE/5-178RA40_SM.PDF.
- [36] D. Aletaha and S. Blüml, “Therapeutic implications of autoantibodies in rheumatoid arthritis,” doi: 10.1136/rmdopen-2014-000009.
- [37] G. S. Firestein and I. B. McInnes, “Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis,” *Immunity*, vol. 46, no. 2, pp. 183–196, Feb. 2017, doi: 10.1016/J.IMMUNI.2017.02.006.
- [38] M. Fresneda Alarcon, Z. McLaren, and H. L. Wright, “Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O.,” *Front. Immunol.*, vol. 12, p. 570, Mar. 2021, doi: 10.3389/FIMMU.2021.649693/BIBTEX.
- [39] E. Choy, “Understanding the dynamics: Pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis,” *Rheumatol. (United Kingdom)*, vol. 51, no. SUPPL.5, pp. 3–11, 2012, doi: 10.1093/rheumatology/kes113.
- [40] I. A. Udalova, A. Mantovani, and M. Feldmann, “Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis,” *Nat. Rev. Rheumatol. 2016 128*, vol. 12, no. 8, pp. 472–485, Jul. 2016, doi: 10.1038/nrrheum.2016.91.
- [41] B. Bartok and G. S. Firestein, “Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis,” *Immunol. Rev.*, vol. 233, no. 1, pp. 233–255, Jan. 2010, doi: 10.1111/J.0105-2896.2009.00859.X.
- [42] S. K. Agarwal and M. B. Brenner, “Role of adhesion molecules in synovial inflammation,” *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 18, no. 3, pp. 268–276, May 2006, doi: 10.1097/01.BOR.0000218948.42730.39.
- [43] J. D. Turner and A. Filer, “The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis,” *Curr. Opin. Rheumatol.*, vol. 27, no. 2, pp. 175–182, 2015, doi: 10.1097/BOR.000000000000148.
- [44] N. Bottini and G. S. Firestein, “Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive responders and imprinted aggressors,” *Nat. Rev. Rheumatol. 2012 91*, vol. 9, no. 1, pp. 24–33, Nov. 2012, doi: 10.1038/nrrheum.2012.190.
- [45] S. Lefèvre *et al.*, “Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints,”

- Nat. Med.* 2009 1512, vol. 15, no. 12, pp. 1414–1420, Nov. 2009, doi: 10.1038/nm.2050.
- [46] T. C. A. Tolboom, A. H. M. Van Der Helm-Van Mil, R. G. H. H. Nelissen, F. C. Breedveld, R. E. M. Toes, and T. W. J. Huizinga, “Invasiveness of fibroblast-like synoviocytes is an individual patient characteristic associated with the rate of joint destruction in patients with rheumatoid arthritis,” *Arthritis Rheum.*, vol. 52, no. 7, pp. 1999–2002, Jul. 2005, doi: 10.1002/ART.21118.
- [47] T. Laragione, M. Brenner, A. Mello, M. Symons, and P. S. Gulko, “The arthritis severity locus *Cia5d* is a novel genetic regulator of the invasive properties of synovial fibroblasts,” *Arthritis Rheum.*, vol. 58, no. 8, pp. 2296–2306, Aug. 2008, doi: 10.1002/ART.23610.
- [48] I. B. McInnes and G. Schett, “Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis,” *Lancet*, vol. 389, no. 10086, pp. 2328–2337, 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(17)31472-1.
- [49] A. P. Croft *et al.*, “Distinct fibroblast subsets drive inflammation and damage in arthritis,” *Nat.* 2019 5707760, vol. 570, no. 7760, pp. 246–251, May 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1263-7.
- [50] M. J. Lewis *et al.*, “Molecular Portraits of Early Rheumatoid Arthritis Identify Clinical and Treatment Response Phenotypes,” *Cell Rep.*, vol. 28, no. 9, pp. 2455-2470.e5, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.091.
- [51] V. Tsaltskan and G. S. Firestein, “Targeting fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis,” *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 67, p. 102304, 2022, doi: 10.1016/j.coph.2022.102304.
- [52] N. Komatsu and H. Takayanagi, “Mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis — immune cell–fibroblast–bone interactions,” *Nat. Rev. Rheumatol.* 2022 187, vol. 18, no. 7, pp. 415–429, Jun. 2022, doi: 10.1038/s41584-022-00793-5.
- [53] J. Y. Lee *et al.*, “The effects of myokines on osteoclasts and osteoblasts,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 517, no. 4, pp. 749–754, Oct. 2019, doi: 10.1016/J.BBRC.2019.07.127.
- [54] H. Kim *et al.*, “Irisin Mediates Effects on Bone and Fat via αV Integrin Receptors,” *Cell*, vol. 175, no. 7, pp. 1756-1768.e17, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.CELL.2018.10.025.
- [55] J. Zhang *et al.*, “Exercise-induced irisin in bone and systemic irisin administration reveal new regulatory mechanisms of bone metabolism,” *Bone Res.* 2017 51, vol. 5, no. 1, pp. 1–14, Feb. 2017, doi: 10.1038/boneres.2016.56.
- [56] B. SM *et al.*, “Myokines: a descriptive review,” *J. Sports Med. Phys. Fitness*, vol. 60, no. 12, pp. 1591–1602, Dec. 2020, doi: 10.23736/S0022-4707.20.10884-3.
- [57] M. C. K. Severinsen and B. K. Pedersen, “Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines,” *Endocr. Rev.*, vol. 41, no. 4, pp. 594–609, 2020, doi: 10.1210/ENDREV/BNAA016.
- [58] Z. Zi, “Molecular Engineering of the TGF- β Signaling Pathway,” 2019, doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.022.
- [59] C. J. David and J. Massagué, “Contextual determinants of TGF β action in development, immunity and cancer,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018 197, vol. 19, no. 7, pp. 419–435, Apr. 2018, doi: 10.1038/s41580-018-0007-0.
- [60] K. K. Kim, D. Sheppard, and H. A. Chapman, “TGF- β 1 Signaling and Tissue Fibrosis,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, no. 4, p. a022293, Apr. 2018, doi:

10.1101/CSHPERSPECT.A022293.

- [61] P. M. Van Der Kraan, “The changing role of TGF β in healthy, ageing and osteoarthritic joints,” *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017 133, vol. 13, no. 3, pp. 155–163, Feb. 2017, doi: 10.1038/nrrheum.2016.219.
- [62] C. Ramírez *et al.*, “Joint inflammation alters gene and protein expression and leads to atrophy in the tibialis anterior muscle in rats,” *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 90, no. 11, pp. 930–939, 2011, doi: 10.1097/PHM.0B013E31822DEA3C.
- [63] M. Fennen, T. Pap, and B. Dankbar, “Smad-dependent mechanisms of inflammatory bone destruction,” *Arthritis Res. Ther.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–10, Dec. 2016, doi: 10.1186/S13075-016-1187-7/FIGURES/1.
- [64] G. Schett and E. Gravallesse, “Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment,” *Nat. Rev. Rheumatol.* 2012 811, vol. 8, no. 11, pp. 656–664, Sep. 2012, doi: 10.1038/nrrheum.2012.153.
- [65] S. M. Jung, K. W. Kim, C. W. Yang, S. H. Park, J. H. Ju, and M. Mamura, “Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis,” *J. Immunol. Res.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/263625.
- [66] K. Kersch-Schindl *et al.*, “Rheumatoid arthritis in remission: Decreased myostatin and increased serum levels of periostin,” *Wien. Klin. Wochenschr.*, vol. 131, no. 1–2, pp. 1–7, Jan. 2019, doi: 10.1007/S00508-018-1386-0/TABLES/3.
- [67] C. Zhao *et al.*, “Myostatin serum concentrations are correlated with the severity of knee osteoarthritis,” *J. Clin. Lab. Anal.*, vol. 31, no. 5, Sep. 2017, doi: 10.1002/JCLA.22094.
- [68] C. M. Su *et al.*, “Myostatin induces tumor necrosis factor- α expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the PI3K-Akt signaling pathway,” *J. Cell. Physiol.*, vol. 234, no. 6, pp. 9793–9801, Jun. 2019, doi: 10.1002/JCP.27665.
- [69] M. Fennen *et al.*, “A myostatin-CCL20–CCR6 axis regulates Th17 cell recruitment to inflamed joints in experimental arthritis,” *Sci. Reports* 2021 111, vol. 11, no. 1, pp. 1–12, Jul. 2021, doi: 10.1038/s41598-021-93599-6.
- [70] U. A. Ochsner, L. S. Green, T. P. Rice, E. Olivas, N. Janjic, and E. Katilius, “Targeting Unique Epitopes on Highly Similar Proteins GDF-11 and GDF-8 with Modified DNA Aptamers,” *Biochemistry*, pp. 4632–4640, 2019, doi: 10.1021/ACS.BIOCHEM.9B00760/ASSET/IMAGES/LARGE/BI9B00760_0005.JPEG.
- [71] A. Jamaiyar, W. Wan, D. M. Janota, M. K. Enrick, W. M. Chilian, and L. Yin, “The versatility and paradox of GDF 11,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 175, pp. 28–34, Jul. 2017, doi: 10.1016/J.PHARMTHERA.2017.02.032.
- [72] T. Poggioli *et al.*, “Circulating Growth Differentiation Factor 11/8 Levels Decline with Age,” *Circ. Res.*, vol. 118, no. 1, pp. 29–37, Jan. 2016, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307521/-/DC1.
- [73] M. J. Schafer *et al.*, “Quantification of GDF11 and myostatin in human aging and cardiovascular disease,” *Cell Metab.*, vol. 23, no. 6, p. 1207, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.CMET.2016.05.023.
- [74] M. A. Egerman *et al.*, “GDF11 Increases with Age and Inhibits Skeletal Muscle Regeneration,” *Cell Metab.*, vol. 22, no. 1, pp. 164–174, Jul. 2015, doi: 10.1016/J.CMET.2015.05.010.
- [75] F. Jeanplong *et al.*, “Growth and differentiation factor-11 is developmentally regulated in skeletal muscle and inhibits myoblast differentiation,” *Open J. Mol. Integr. Physiol.*,

- vol. 2, no. 4, pp. 127–138, Nov. 2012, doi: 10.4236/OJMIP.2012.24018.
- [76] Y. Chen *et al.*, “Relationship of serum GDF11 levels with bone mineral density and bone turnover markers in postmenopausal Chinese women,” *Bone Res.* 2016 41, vol. 4, no. 1, pp. 1–5, Jun. 2016, doi: 10.1038/boneres.2016.12.
- [77] W. Liu *et al.*, “GDF11 decreases bone mass by stimulating osteoclastogenesis and inhibiting osteoblast differentiation,” *Nat. Commun.* 2016 71, vol. 7, no. 1, pp. 1–13, Sep. 2016, doi: 10.1038/ncomms12794.
- [78] B. K. Pedersen, T. C. A. Åkerström, A. R. Nielsen, and C. P. Fischer, “Role of myokines in exercise and metabolism,” <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00080.2007>, vol. 103, no. 3, pp. 1093–1098, Sep. 2007, doi: 10.1152/JAPPLPHYSIOL.00080.2007.
- [79] R. A. L. De Sousa, A. C. Improta-Caria, and B. S. de F. Souza, “Exercise-Linked Irisin: Consequences on Mental and Cardiovascular Health in Type 2 Diabetes,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 4, pp. 1–15, Feb. 2021, doi: 10.3390/IJMS22042199.
- [80] B. B. Díaz, D. A. González, F. Gannar, M. C. R. Pérez, and A. C. de León, “Myokines, physical activity, insulin resistance and autoimmune diseases,” *Immunol. Lett.*, vol. 203, pp. 1–5, Nov. 2018, doi: 10.1016/J.IMLET.2018.09.002.
- [81] P. Boström *et al.*, “A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis,” *Nat.* 2011 4817382, vol. 481, no. 7382, pp. 463–468, Jan. 2012, doi: 10.1038/nature10777.
- [82] S. Nielsen and B. K. Pedersen, “Skeletal muscle as an immunogenic organ,” *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 8, no. 3, pp. 346–351, Jun. 2008, doi: 10.1016/J.COPH.2008.02.005.
- [83] J. Liu, Y. Hu, H. Zhang, Y. Xu, and G. Wang, “Exenatide treatment increases serum irisin levels in patients with obesity and newly diagnosed type 2 diabetes,” *J. Diabetes Complications*, vol. 30, no. 8, pp. 1555–1559, Nov. 2016, doi: 10.1016/J.JDIACOMP.2016.07.020.
- [84] G. Colaianni, L. Sanesi, G. Storlino, G. Brunetti, S. Colucci, and M. Grano, “Irisin and Bone: From Preclinical Studies to the Evaluation of Its Circulating Levels in Different Populations of Human Subjects,” *Cells* 2019, Vol. 8, Page 451, vol. 8, no. 5, p. 451, May 2019, doi: 10.3390/CELLS8050451.
- [85] J. Y. Huh, F. Dincer, E. Mesfum, and C. S. Mantzoros, “Irisin stimulates muscle growth-related genes and regulates adipocyte differentiation and metabolism in humans,” *Int. J. Obes.* 2014 3812, vol. 38, no. 12, pp. 1538–1544, Mar. 2014, doi: 10.1038/ijo.2014.42.
- [86] R. O. Hynes, “Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines,” *Cell*, vol. 110, no. 6, pp. 673–687, Sep. 2002, doi: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6.
- [87] J. Zhang *et al.*, “Exercise-induced irisin in bone and systemic irisin administration reveal new regulatory mechanisms of bone metabolism,” *Bone Res.* 2017 51, vol. 5, no. 1, pp. 1–14, Feb. 2017, doi: 10.1038/boneres.2016.56.
- [88] S. Jia *et al.*, “Mechanical Stimulation Protects Against Chondrocyte Pyroptosis Through Irisin-Induced Suppression of PI3K/Akt/NF- κ B Signal Pathway in Osteoarthritis,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 10, p. 797855, Mar. 2022, doi: 10.3389/FCELL.2022.797855/BIBTEX.
- [89] F. S. Wang *et al.*, “Irisin Mitigates Oxidative Stress, Chondrocyte Dysfunction and Osteoarthritis Development through Regulating Mitochondrial Integrity and Autophagy,” *Antioxidants*, vol. 9, no. 9, pp. 1–17, Sep. 2020, doi: 10.3390/ANTIOX9090810.

- [90] R. Raafat Ibrahim *et al.*, “The emerging role of irisin in experimentally induced arthritis: a recent update involving HMGB1/MCP1/Chitotriosidase I-mediated necroptosis,” *Redox Rep.*, vol. 27, no. 1, pp. 21–31, Dec. 2022, doi: 10.1080/13510002.2022.2031516.
- [91] D. P. Lavrova *et al.*, “[Irisin as a new marker for the early diagnosis of low-traumatic fractures in rheumatoid arthritis.]” *Klin. Lab. Diagn.*, vol. 63, no. 11, pp. 702–706, Jan. 2018, doi: 10.18821/0869-2084-2018-63-11-702-706.
- [92] J. I. Gamez-Nava *et al.*, “Serum irisin concentrations and osteoporotic vertebral fractures in women with rheumatoid arthritis: A cross-sectional study,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 101, no. 6, p. E28799, Feb. 2022, doi: 10.1097/MD.00000000000028799.
- [93] Goldring, Steven R, and Mary B Goldring. “Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk.” *Nature reviews. Rheumatology* vol. 12,11 (2016): 632-644. doi:10.1038/nrrheum.2016.148.
- [94] Bailey, Karsyn N, and Tamara Alliston. “At the Crux of Joint Crosstalk: TGF β Signaling in the Synovial Joint.” *Current rheumatology reports* vol. 24,6 (2022): 184-197. doi:10.1007/s11926-022-01074-6.

7. ARTIGO

O artigo seguinte será submetido na revista “*Clinical and Experimental Rheumatology*”.

Presence of myokines secreted by muscle in synovial fluid and their action on fibroblasts like-synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis

Maria Luísa Gasparini^{1,2}; Mirian Farinon ^{1,2}; Renata Ternus Pedó¹; Jordana Miranda de Souza Silva^{1,2}; Marina Piccoli ¹; Gustavo Flores Chapacais; Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo ^{1,2}; Suelen Pizzolatto Dalmolin¹; Manuela dos Santos¹; Barbara Jonson Bartikoski¹; Vanessa Hax ³; Ricardo Machado Xavier ^{1,2,3}.

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

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

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

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

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

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

Degree information for all authors:

Maria Luísa Gasparini, Graduated.

Renata Ternus Pedó, MD.

Mirian Farinon, MD.

Jordana Miranda de Souza Silva, PhD.

Marina Piccoli, Student.

Gustavo Flores Chapacais, Graduated.

Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo, PhD.

Bárbara Jonson Bartikoski, MD.

Vanessa Hax, PhD.

Ricardo Machado Xavier, PhD.

Corresponding author:

Maria Luísa Gasparini

Laboratório de Doenças Autoimunes, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Abstract

Objectives: Myokines are proteins secreted by muscle fibers. Myostatin, the growth differentiation factor (GDF) 11 and irisin, have autocrine and paracrine activities on muscle tissue metabolism and endocrine activities in diverse tissues, such as adipose tissue and bone. In rheumatoid arthritis (RA), there is increased expression of myostatin in the synovial membrane, more specifically by fibroblast-like synoviocytes (FLS). On the other hand, treatment with GDF-11 appears to have a protective effect against the development of experimental arthritis. Therefore, more studies evaluating the serum and synovial levels of these myokines in RA patients are needed to better define their possible roles in this disease. Our objective was to evaluate myostatin, GDF-11 and irisin serum and synovial levels in RA patients and to assess their effect on FLS *in vitro*.

Methods: Patients diagnosed with RA with indication of knee arthrocentesis were included in the study. Disease activity was assessed by Clinical Disease Activity Index (CDAI). The evaluation of serum and synovial fluid (SF) levels of myostatin, GDF-11 and irisin was performed by ELISA. FLS were isolated from the synovial fluid of RA patients. Cultured SF FLS viability, migration and invasiveness were determined in the presence and absence of myostatin, GDF-11 and irisin.

Results: Myostatin, GDF11 and irisin were present in SF and serum of RA patients: myostatin [SF: 31.30 pg/ml (31.30-181.8); serum: 817.2 pg/ml (334.3-994.7)], GDF11 [SF: 31.30 pg/ml (31.30-88.13); serum: 347.50 pg/ml (31.30-1818.00)] and irisin [liquid: 9.51 pg/ml (8.89- 16.68); serum: 14.05 pg/ml (12.47 -14.96)] (median, IQR). Treatment with different doses of myostatin, GDF11 and irisin did not interfere with FLS cell viability when compared to control. In migration, at a dose of 20nM, an increasing trend was observed with myostatin treatment. Furthermore, stimulation with a lower dose of myostatin and GDF-11 decreases FLS invasion by 16% (myostatin: $83.7 \pm 0.0\%$; control: $100 \pm 0.0\%$; $p=0.036$) and 18% (GDF-11: $81 \pm 0.0\%$ vs control: $100 \pm 0.0\%$; $p=0.024$). At higher doses, myostatin (myostatin: $90.6\% \pm 0.0$; control: $100 \pm 0.0\%$; $p<0.01$) and irisin (irisin: $90.5 \pm 0.0\%$; control: $100 \pm 0.0\%$; $p<0.01$) decreased invasiveness by 10%, and GDF-11 by 14% when compared to control (GDF-11: $86.0 \pm 0.0\%$; control: $100 \pm 0.0\%$; $p<0.01$).

Conclusion: This is the first study to evaluate synovial and serum myokine levels in patients with RA. Furthermore, this is the first study to analyze the direct effect of these molecules on the FLS-RA phenotype. Myostatin has demonstrated the ability to induce migration but decrease invasion. Conversely, GDF-11 and irisin were observed in SF and showed protective results, reducing the invasive capacity of FLS. Considering the demonstration of myokines in the joint cavity, and possible relevant action in FLS-RA, our positive results contribute to the knowledge about the participation of myokines in the pathogenesis of RA.

Keywords: myokines; synovium; rheumatoid arthritis; fibroblast-like synoviocytes, myostatin; GDF-11; irisin.

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that affects synovial joints. This disease is characterized by infiltration of inflammatory cells in the joint, which induces a chronic synovitis causing cartilage and bone destruction [1,2]. In arthritic synovium, the inflamed microenvironment alters the cellular metabolism of the entire synovial tissue, activating fibroblast-like synoviocytes (FLS) to aggressive phenotype, causing marked proliferation and invasive behavior, damaging the joint through increased secretion of metalloproteinases, matrix and cathepsins that degrade cartilage and bone tissues. When activated, FLS secrete various proinflammatory growth factors, cytokines and chemokines, these molecules regulate the intercellular communication between FLS and immune cells for the perpetuation of tissue inflammation [3]. Therefore, this crosstalk generates a cycle of generalized inflammatory stimuli that promote the establishment and chronicity of RA.

In addition to joint manifestations, extra-articular manifestations frequently are present in RA patients, such as skeletal muscle wasting [4]. This loss may be associated with several factors, such as: physical inactivity, use of glucocorticoids and also the muscle fiber exposure to increased concentrations of inflammatory cytokines, which can increase protein degradation [5,6]. Skeletal muscle is considered an endocrine organ and capable of communicating with other tissues through the secretion of myokines [5,7]; These molecules are proteins secreted by muscle fibers in response to exercise and can have autocrine and paracrine effects. They play a common role in regulating metabolism, but how each molecule acts alone and in conjunction with others still needs to be clarified. They function like hormones, exerting specific endocrine effects on visceral fat or mediating direct anti-inflammatory effects [7,8,9].

The growth differentiation factor (GDF) 8, also known as myostatin, is a myokine that negatively regulates muscle growth and increases the secretion of inflammatory cytokines. Its expression in the synovium is higher in patients with RA when compared to osteoarthritis patients [10]. Myostatin levels have been positively correlated with TNF- α in synovial tissue from patients with RA [11], which may indicate a relation between myostatin and inflamed synovial microenvironment. GDF-11, which is closely related to myostatin, was protective against the development of inflammatory arthritis in mice [12]. In addition to the evidence of the presence of these molecules in the synovium, studies on their mechanism of action in the pathophysiology of arthritis are little explored. Irisin is another molecule produced by skeletal muscle [13]. In contrast to myostatin, it induces hypertrophy and restores bone strength by stimulating osteoclasts [14]. In the literature, irisin is shown to be a crucial molecular mediator in the connectivity between muscle and bone tissue and its serum and synovial levels of irisin are negatively correlated with the severity of knee destruction in patients with OA [15].

Although known that myostatin is expressed in the synovial membrane, it is not yet clear whether this molecule also leaks into the synovial fluid. Besides that, it is still unclear whether it has any effect on the aggressive phenotype of FLS. Furthermore, the action of GDF-11 and irisin on FLS has not been described in the literature, but they may have a protective effect on joint degradation. Therefore, in the pathology of RA, and knowledge about its action on the synovial tissue of the joint is still very early, in addition to its systemic involvement in the disease

Materials and Methods

Study design and patients

This cross-sectional study was performed at a tertiary public hospital in Rio Grande do Sul, Brazil (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA). Patients diagnosed with RA according to the American College of Rheumatology/American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) criteria [16], with active disease and with indication of knee arthrocentesis by the attending rheumatologist were included in study. Patients with positive infection serology tests (HIV, HBV, HCV, syphilis, tuberculosis) and indication of arthrocentesis on other joints were excluded. This study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethics Committee and registered under number 21-0616. All subjects signed an informed consent form. All subjects signed an informed consent form.

Collection procedure of synovial fluid and serum

The arthrocentesis procedure was performed by a rheumatologist. Briefly, local anesthetic was used in the area of the joint and a needle with a syringe attached is inserted within the joint (joint injection) and joint fluid is drawn back under suction (aspirated) into the syringe. The synovial liquid was placed in a 15 ml falcon tube and stored in ice until processing. After the sample was centrifuged and stored in aliquots at -80°C until use. Venous blood collections were performed in patients without previous fasting. After collection, samples were centrifuged and serum was stored at -80°C for subsequent measurements.

Isolation and Culture of FLS cells

The synovial fluid of RA patients was processed for the isolation of FLS. The liquid was centrifuged at 2000 x g for 5 min, resuspended in Dulbecco's Modified Eagle's Medium - High glucose (DMEM-HG, Gibco by Life Technologies, USA) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS, Gibco), 200 mM L- glutamine (Gibco), 100 units/mL penicillin (Gibco), 100 mg/mL streptomycin (P/S) (Gibco), 50 mg/mL of gentamicin and transferred to a 6-well plate for culture (Thermo Fisher Scientific, USA). Cells were allowed to attach during three days before replacing the growth medium. The cultures were kept at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, and the medium was replaced every 3 days. The initial culture was monitored until 70–80% of confluence and then cells were detached with trypsin-EDTA (Gibco) and transferred to a culture flask for the tests. FLS between 5 and 11 passages were used for experiments.

Viability assay (MTT)

The FLS cells were added to 96-well culture plates containing DMEM medium mixed with 20% FBS at 2x10³ cells per well concentration. Incubation of the cells at 37°C with 10, 20, 50 nM doses of myostatin, GDF-11 and irisin. After 24 h and 48 h of treatment, MTT (0.5 mg/ml) was put into each well, and incubation was carried out for 4 h more. Insoluble materials generated in the plates were dissolved by adding 100 µl of dimethyl sulfoxide to each well (DMSO). The absorbance of each well was measured at 570 nm and 690 nm (SpectraMax M3) spectrophotometer and

background was discounted. Cell viability was expressed as percent of average of control (or vehicle control). Three experiments were performed independently (n=3).

Wound healing assay

The wound healing assay was performed by seeding 2×10^5 cells/ml in 24-well plates overnight and by treating them with 20 nM and 50 nM doses of myostatin, GDF-11 and irisin for 48h [39]. A linear wound through attached cells was created in the bottom of the well using a 200 μ L micropipette tip and then washed with medium to remove unattached cells. Light microscopy images were taken immediately 0 and 24 h after wounding and, at the end of the experiment, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with crystal violet. The distance of the wound was measured in “inch” by ImageJ software and was expressed as percent of the average of control. Three experiments were performed independently (n=3).

Invasion assay

To determine the effect of myostatin, GDF11 and irisin in FLS invasiveness we performed the matrigel assay [40]. Cells were seeded in a T75 culture flask and, after reaching 80% of confluence, were trypsinized and resuspended in DMEM-HG without FBS at a density of 1×10^5 cells/well. Then, FLS were mixed at 1:1 in Geltrex (A14132-02, Gibco), pipetted as a spot in a 12-well plate, and incubated at 37°C for 12 min. DMEM-HG supplemented with 20% FBS in the presence or absence of 20 nM and 50 nM doses of Myostatin, GDF-11 and Irisin was added and incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h. After 24 h, cells that invaded through the matrix were stained with Crystal Violet (Sigma-Aldrich), photographed by microscope, and analyzed in the ImageJ software. Two experiments were performed independently (n=2).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Serum and synovial liquid levels of myostatin (DY788-05; R&D Systems), GDF11 (DY1958-05; R&D Systems) and irisin (EK-067-29; Phoenix Pharmaceuticals) were measured by ELISA according to manufacturer's instructions (n=11). FLS were stimulated with myostatin, GDF-11 and irisin for 24h and levels of IL-6 (430504, BioLegend) were determined in supernatants by ELISA according to the manufacturer's recommendations (n=2).

Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov method was used to test for normality. Results are expressed as mean \pm standard deviation, median and interquartile range (25-75%) or number as percent of total (%) as appropriate. The Student's t-test was used to compare the difference of myokines synovial fluid and serum levels between RA patients and controls. *In vitro* groups treatments were compared by one or two-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's adjustment for multiple comparisons using GraphPad Prism 6.0. Statistical differences were considered significant with a p value <0.05.

Results

Clinical and demographic disease

Clinical and demographic data of the 11 RA patients included are shown in **Table 1**. RA patients presented a mean age of 65 years and mean disease duration of 16 years. Mean disease activity was 12.8, and 3 patients were classified in low disease activity and 8 patients in moderate disease activity.

Characteristics	RA (n=11)
Age years (mean \pm SD)	65 \pm 9.26
Women, n (%)	10 (90.0)
Disease duration in years (mean \pm SD)	16 \pm 12.41
CDAI (mean \pm SD)	12.8 \pm 5.68
Low activity, n (%)	3 (27.3)
Moderate activity, n (%)	8 (72.7)

Table 1. Clinical and demographic features of study population.

Presence of myostatin, GDF-11 and irisin in synovial fluid and serum

Levels myostatin [liquid: 31.30 pg/ml (31.30-181.80) IQR; serum: 817.20 pg/ml (334.30-994.70)], GDF-11 [liquid: 31.30 pg/ml (31.30- 88.13); serum: 347.50 pg/ml (31.30- 1818.00)] and irisin [liquid: 9,51 pg/ml (8,89- 16,68); serum: 14,05 pg/ml (12,47 -14,96)] (median, IQR) were observed in synovial liquid and serum (**Figure 1**). Myostatin, GDF-11 and irisin synovial levels were not associated with CDAI.

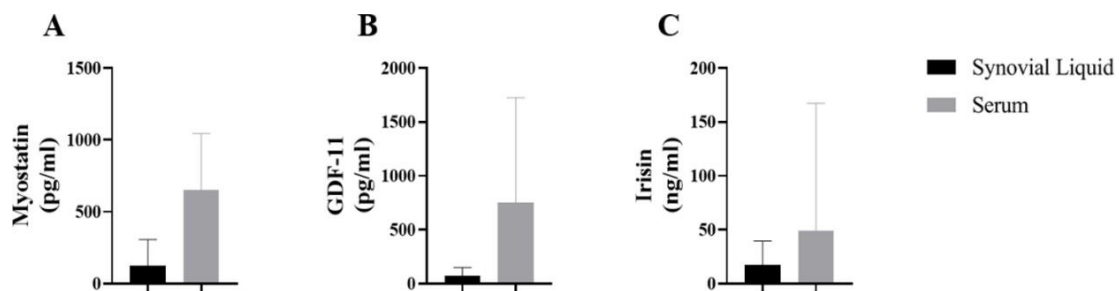


Figure 1. Myostatin (A), GDF-11 (B) and irisin (C) synovial fluid and serum levels of RA patients. Myokine levels in serum and synovial fluid were measured by ELISA. Data were analyzed by t test (n=11) and are represented by median (interquartile range).

Different concentrations of myostatin, GDF-11 and irisin did not affect FLS cell viability

To study the effects of myostatin, GDF-11 and irisin on the altered phenotype of RA FLS, first their viability after exposure to different concentrations (10nM, 20nM and 50nM) and time points (24 and 48h) was assessed. The doses of myostatin in 24h and 48h (did not interfere with cell viability. Treatment with GDF-11 and irisin also did not interfere with cell viability in 24h and

48h, respectively [Figure 2]. Based on these results, two doses (20nM and 50nM) of exposure were chosen as the treatment protocol for further analysis.

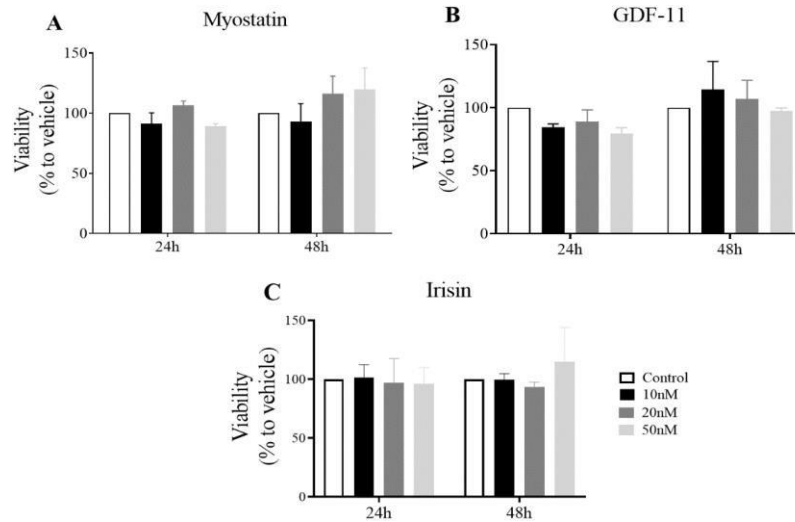


Figure 2: Myostatin (A), GDF-11 (B) and irisin (C) were tested at different concentrations (10, 20 and 50nM) and timepoints (24 and 48h) in FLS cultures. Cell viability was evaluated by the MTT test. Data were normalized as percent of control at each time point and is expressed as mean \pm SD. ANOVA two-way (n=3).

Myostatin showed a tendency to increase migration at a lower dose

To determine the FLS migratory potential, cultured FLS from RA patients were treated with myostatin, GDF-11 and irisin (20nM and 50nM) for 24h and then a linear wound was created in the bottom of the well. Light microscopy images were taken immediately 0 and 24h after wounding and images were analyzed by ImageJ. The distance of the wound was measured in “inch” and expressed as percent of the mean of control (n=3). Treatment with 20nM myostatin tended to a possible increase in migration ($136.3 \pm 55.5\%$ vs $100 \pm 0.0\%$). On the other hand, 50nM of myokines showed no difference between the groups when compared to the control. [Figure 3].

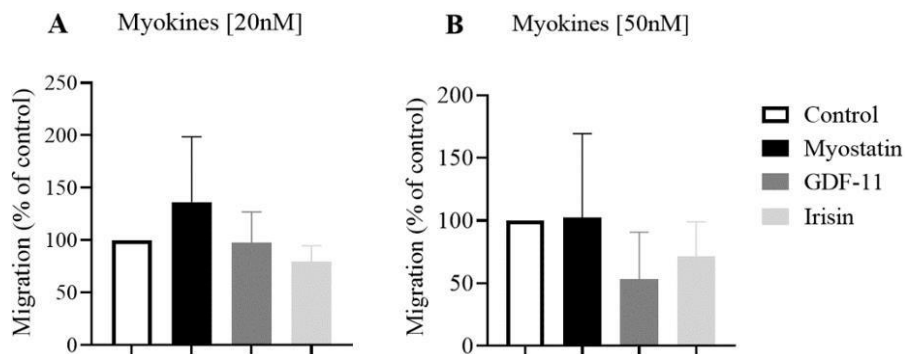


Figure 3: Migratory potential of FLS was tested for 24h in the absence and in the presence of 20nM (A) and 50nM (B) and of myokines after wound healing. Data was normalized as percent of control at each time point and is expressed as mean \pm SD. One-way ANOVA (n=3).

Stimulation with myokines decreased invasion capacity of FLS

To evaluate the invasion potential of FLS we performed the matrigel assay. FLS mixed with Geltrex were pipetted as a spot in a 12-well plate and stimulated with myokines at 20nM and 50nM. Stimulation with a lower dose of myostatin and GDF-11 decreases FLS invasion by 16% (83.7 % \pm 0.0 vs 100 % \pm 0.0 control; p=0.036) and 18% (81 % \pm 0.0 vs 100% \pm 0.0 control; p=0.024), respectively. Stimulation with a higher dose of myostatin (90.6 % \pm 0.0 vs 100% \pm 0.0 control; p=0.0043) and irisin (90.5 \pm 0.0 vs 100% \pm 0.0 control; p= 0.0042) decreases invasion capacity by 10%. GDF-11 reduced invasion by 14% compared to the control (86.0 % \pm 0.0 vs 100% \pm 0.0 p=0.006).

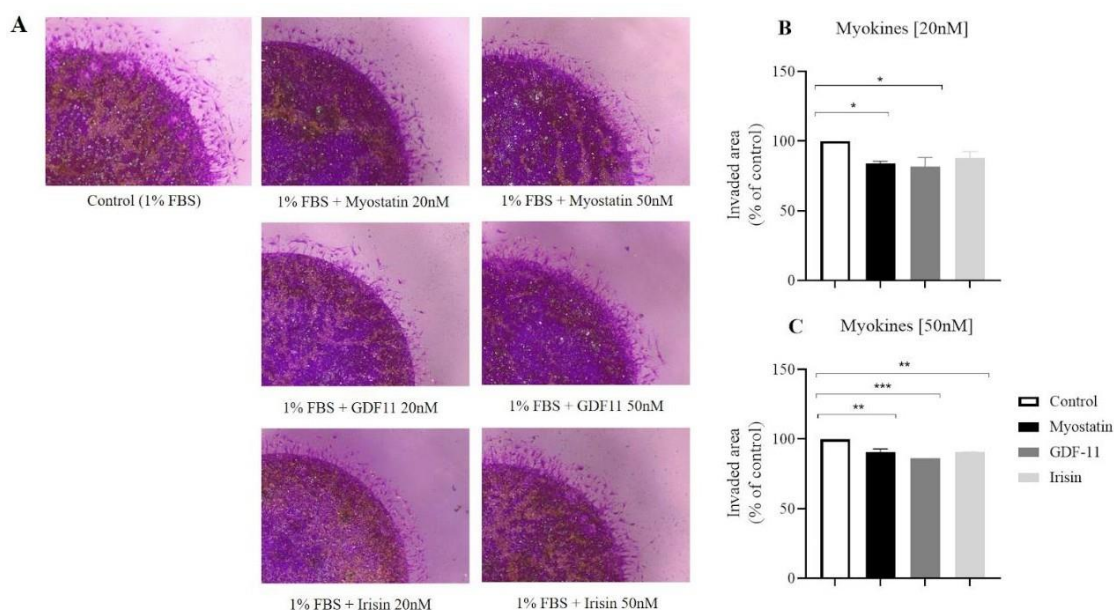


Figure 4: Representative image of invasiveness (A). Invasion potential of FLS was tested at doses 20nM (B) and 50nM (C). Invasive capacity of FLS was evaluated by matrigel assay for 24h. Data were normalized as percent of control at each time point and is expressed as mean \pm SD. One-way ANOVA (n=2) * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001.

Myokines did not affect IL-6 release by FLS

Stimulation with myostatin, GDF-11 and irisin did not influence the release of IL-6 by FLS at doses of 20nM (myostatin: 27645 pg/ml \pm 6626; GDF-11: 28240 pg/ml \pm 2291; Irisin: 18050 pg/ml \pm 8400 vs 29575 pg/ml \pm 6399 control) and 50nM (myostatin: 28460 pg/ml \pm 8259; GDF-11: 26210 pg/ml \pm 311,1; Irisin: 19585 pg/ml \pm 4688 vs 29575 pg/ml \pm 6399 control).

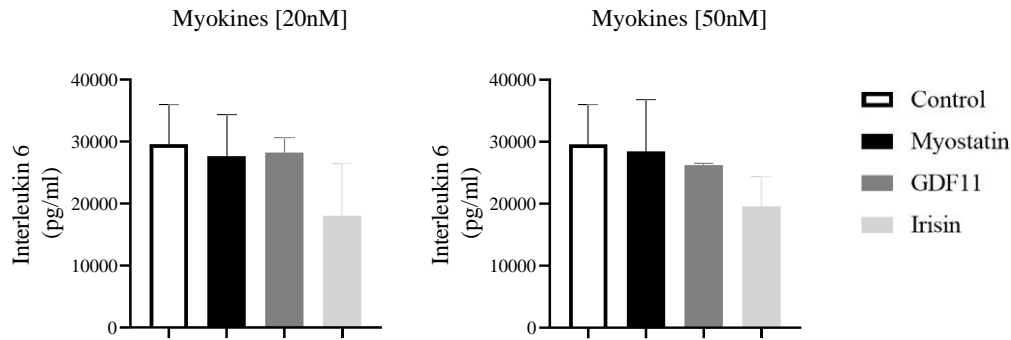


Figure 5: IL-6 secretion by FLS after stimulation with 20nM (A) and 50nM (B) of myokines for 24h. Data are expressed as mean \pm SD. One-way ANOVA (n=2).

Discussion

Myokines are molecules synthesized and released by muscle fibers, and their presence was recently observed in the joint compartment of patients with RA, also showing an association with inflammatory and erosive parameters of the disease. In this study, we evaluated myostatin, GDF-11 and irisin in synovial fluid and serum of patients with RA, where a higher level of myokines was demonstrated in the blood than in the synovial environment. Furthermore, we analyzed the effect of different doses of myokines on the migratory and invasive capacity of FLS, and found an inverse action of myostatin and irisin on FLS migration, and a decrease in invasiveness with stimulation of myostatin, GDF-11 and irisin. However, stimulation with different doses of myokines did not influence the secretion of the pro-inflammatory cytokine IL-6 by FLS.

Our results demonstrated that myostatin, GDF-11 and irisin are present in the synovial fluid of patients with RA, but at lower concentrations than in serum. It is known that skeletal muscle produces molecules that, released into the blood, allow cross-communication between the muscle and other organs [17]. The presence of myostatin in the synovial membrane of patients with RA has recently been reported [18], but it is not yet well described where these molecules observed in synovial fluid come from. More studies must be carried out to verify the source and kinetics of these molecules in the synovium. It is already known that FLS from RA patients are capable of expressing higher levels of myostatin when compared to FLS from OA [18]. However, the presence of GDF-11 and irisin had not yet been described in synovial fluid. Synovial levels lower than in serum can be considered closer to the physiological condition and to our knowledge, this is one of the first studies to simultaneously evaluate serum and synovial fluid levels of myokines in RA. Therefore, we decided to carry out a study to evaluate the presence of myokines in the synovial fluid and serum of patients with RA. The presence of GDF-11 and irisin in synovial fluid was described for the first time. Furthermore, observe a possible action of these molecules on FLS of patients with RA.

The inflammatory process in the synovium is capable of metabolically altering the FLS, which end up acquiring a great capacity for proliferation, in addition to migration and marked invasion, playing a fundamental role in the formation of *pannus* and joint destruction [19]. However, despite many advances in recent years, it is still not clear how this phenotypic change occurs and what are the best alternatives for modulating these cells. Therefore, new molecules

capable of modifying the aggressive cellular profile have been explored. In our results, we saw that myokines were may able to act by modifying parameters associated with the aggressive profile of FLS, such as migration and invasion potential. A possible increase in FLS migration was demonstrated in the presence of myostatin. In muscle involvement, this molecule acts as an inhibitor of muscle growth [38]. Studies have already demonstrated that the gene expression of this molecule was positively regulated in FLS-AR when compared to FLS-OA and also stimulated the expression of pro-inflammatory cytokines [18]. Therefore, this molecule appears to contribute to the pathogenesis of arthritis, but its direct action on FLS has not yet been studied. It has been demonstrated that mice lacking myostatin have a negative impact on wound healing, leading to reduced myofibroblast activation and differentiation, as well as reduced collagen deposition in skin [20]. Myostatin is a member of the transforming growth factor (TGF)- β superfamily and these evidences may demonstrate the involvement of the TGF- β and myostatin signaling pathways in the migration and deposition of collagen in other tissues. In another study with FLS in RA, it was observed that TGF- β 1, another molecule that binds to TGF- β receptors, is capable of promoting cell migration by decreasing the expression of cadherin through the Smad signaling pathway, proteins responsible by cell adhesion [21]. Therefore, corroborating our findings, these growth factors can influence these signaling pathways for greater migratory capacity, but further investigations into the signaling pathways and receptors of these molecules in FLS are needed.

The invasiveness acquired by FLS is also a marked phenotype of FLS-RA. In contrast to migration results, here myostatin reduced invasion by 16% even at the lower dose. The TGF- β superfamily of cytokines acts through the Smad signaling pathway, this pathway is responsible for several cellular functions, including the synthesis of extracellular matrix (ECM) components and the control of immune responses, including inflammatory bone destruction in RA. In arthritic diseases, such as OA and RA [22,23], an imbalance can occur between the production and degradation of the ECM, leading to joint destruction. Interestingly, although myostatin possibly stimulates FLS migration, this observed difference in invasion phenotype may indicate that myostatin has a greater action on joint degradation pathways.

GDF-11 is also part of the TGF- β family and has 90% amino acid sequence identity of myostatin [24]. It is a molecule that has been extensively studied in the aging process and has been identified as a circulating factor that decreases with age, and may act to rescue various pathologies that are associated with aging [25]. In a recent study, the effects of GDF-11 in a young systemic environment and of GDF-11 on aging cartilage were studied. GDF-11 was able to promote chondrocyte proliferation and cartilaginous matrix synthesis in old mice exposed to a young systemic environment [26]. In our results, this molecule was able to reduce invasive capacity. In collagen-induced arthritis, administration of GDF-11 was able to antagonize inflammation and protect against the development of inflammatory arthritis [27]. Corroborating with our result, GDF-11 also antagonized the TNF- α -mediated induction of the NF- κ B signaling pathway in macrophages, a protein that is activated in several inflammatory conditions, and is closely involved in the pathophysiology of arthritis [28]. Therefore, this evidence indicates a possible favorable action of GDF-11 in protecting against RA joint damage.

Irisin is a molecule secreted by muscle tissue in response to exercise. This molecule has already been shown to act on bone tissue, having a protective effect against bone degradation at a cellular and physiological level [29,30]. Here, we found an effect opposite to that of myostatin on FLS migration, with irisin being able to reduce FLS invasion by 10%. In another *in vitro* study, irisin increased control of chondrocytes isolated from osteoarthritic patients. It has been observed that human osteoarthritic articular chondrocytes express decreased levels of FNDC5, and that irisin administration improved growth inhibition mediated by IL-1 β and repressed oxidative stress mediated by inflammation of these cells. Furthermore, intra-articular administration of irisin alleviated cartilage erosion and synovitis in the animal model of OA [31]. It is known that damage

to articular cartilage is associated with chondrocyte hypertrophy, and this together with the degradation of the ECM are characteristics of chronic degenerative joint diseases. In the same study, irisin was able to attenuate the expression of MMP-1 and 13 in these cells [32]. In another study in chondrocytes, treatment with irisin was able to attenuate the expression of MMP-13, which is a collagenase related to bone resorption, but is also involved in the degradation of the ECM in inflammatory conditions [33]. Based on this, our results can infer that irisin can also exert a protective effect on joint destruction by influencing cell-ECM interaction signaling pathways. However, the communication between RA-FLS and ECM needs to be further elucidated in the pathology of the disease.

IL-6 was also measured in FLS supernatant, to verify the pro-inflammatory capacity in the presence and absence of myokines. In our results, we did not find a difference in IL-6 expression in any of the groups, but we expected higher expression in FLS stimulated with myostatin, as previously seen in *Dankbar et. al.*, and anti-inflammatory effect in cells treated with GDF-11 and irisin as previously seen in different studies [12,34]. However, in the present study, myokine stimulation was performed only for 24 hours. Therefore, the effect of these myokines over FLS production of IL-6 may take a longer time to be observed, as 48 or 72 hours.

To our knowledge, this is the first study to evaluate synovial and serum myokine levels in patients with RA. Also, this is the first study to analyze the direct effect of these molecules on the FLS-RA phenotype. Myostatin has demonstrated an ability to induce migration but to decrease invasion. This result could be very interesting for us to explore in which ways it can interfere and cause these different effects. Conversely, GDF-11 and irisin were observed in synovial fluid and showed protective results, reducing the invasive capacity of FLS. Considering the demonstration of myokines in the joint cavity, and possible relevant action in FLS-RA, additional studies will be carried out to clarify the signaling pathways that are being influenced in FLS by myokines, trying to clarify how much these myokines are impacting joint pathophysiology in RA.

References

1. Smolen, J. S., Aletaha, D., & McInnes, I. B. (2016). Rheumatoid arthritis. *Lancet* (London, England), 388(10055), 2023–2038. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8).
2. Smolen, J. S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G. R., Emery, P., Firestein, G. S., Kavanaugh, A., McInnes, I. B., Solomon, D. H., Strand, V., & Yamamoto, K. (2018). Rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Disease primers*, 4, 18001. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>.

3. Pap, T., Dankbar, B., Wehmeyer, C., Korb-Pap, A., & Sherwood, J. (2020). Synovial fibroblasts and articular tissue remodelling: Role and mechanisms. *Seminars in cell & developmental biology*, 101, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.12.006>.
4. Bennett, J. L., Pratt, A. G., Dodds, R., Sayer, A. A., & Isaacs, J. D. (2023). Rheumatoid sarcopenia: loss of skeletal muscle strength and mass in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 19(4), 239–251. <https://doi.org/10.1038/s41584-023-00921-9>.
5. Huffman, K. M., Jessee, R., Andonian, B., Davis, B. N., Narowski, R., Huebner, J. L., Kraus, V. B., McCracken, J., Gilmore, B. F., Tune, K. N., Campbell, M., Koves, T. R., Muoio, D. M., Hubal, M. J., & Kraus, W. E. (2017). Molecular alterations in skeletal muscle in rheumatoid arthritis are related to disease activity, physical inactivity, and disability. *Arthritis research & therapy*, 19(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1215-7>.
6. Fukuda, W., Omoto, A., Oku, S., Tanaka, T., Tsubouchi, Y., Kohno, M., & Kawahito, Y. (2010). Contribution of rheumatoid arthritis disease activity and disability to rheumatoid cachexia. *Modern rheumatology*, 20(5), 439–443. <https://doi.org/10.1007/s10165-010-0306-6>.
7. Lee, J. H., & Jun, H. S. (2019). Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function. *Frontiers in physiology*, 10, 42. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00042>.
8. Pedersen, B. K., Akerström, T. C., Nielsen, A. R., & Fischer, C. P. (2007). Role of myokines in exercise and metabolism. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 103(3), 1093–1098. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00080.2007>.
9. Pedersen B. K. (2011). Exercise-induced myokines and their role in chronic diseases. *Brain, behavior, and immunity*, 25(5), 811–816. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.02.010>.
10. Zhao, C., Shao, Y., Lin, C., Zeng, C., Fang, H., Pan, J., & Cai, D. (2017). Myostatin serum concentrations are correlated with the severity of knee osteoarthritis. *Journal of clinical laboratory analysis*, 31(5), e22094. <https://doi.org/10.1002/jcla.22094>.
11. Su, C. M., Hu, S. L., Sun, Y., Zhao, J., Dai, C., Wang, L., Xu, G., & Tang, C. H. (2019). Myostatin induces tumor necrosis factor- α expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through the PI3K-Akt signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 9793–9801. <https://doi.org/10.1002/jcp.27665>.
12. Li, W., Wang, W., Liu, L., Qu, R., Chen, X., Qiu, C., Li, J., Hayball, J., Liu, L., Chen, J., Wang, X., Pan, X., & Zhao, Y. (2019). GDF11 antagonizes TNF- α -induced inflammation and protects against the development of inflammatory arthritis in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33(3), 3317–3329. <https://doi.org/10.1096/fj.201801375RR>.
13. Zhong, X., Sun, X., Shan, M., Zhao, X., Zhang, R., Zhao, Y., & Yang, Q. (2021). The production, detection, and origin of irisin and its effect on bone cells. *International journal of biological macromolecules*, 178, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.181>.

14. Colaianni, G., Mongelli, T., Colucci, S., Cinti, S., & Grano, M. (2016). Crosstalk Between Muscle and Bone Via the Muscle-Myokine Irisin. *Current osteoporosis reports*, 14(4), 132–137. <https://doi.org/10.1007/s11914-016-0313-4>.
15. Mao, Y., Xu, W., Xie, Z., & Dong, Q. (2016). Association of Irisin and CRP Levels with the Radiographic Severity of Knee Osteoarthritis. *Genetic testing and molecular biomarkers*, 20(2), 86–89. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2015.0170>.
16. Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A. J., Funovits, J., Felson, D. T., Bingham, C. O., 3rd, Birnbaum, N. S., Burmester, G. R., Bykerk, V. P., Cohen, M. D., Combe, B., Costenbader, K. H., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Hazes, J. M., Hobbs, K., Huizinga, T. W., Kavanaugh, A., Kay, J., ... Hawker, G. (2010). 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis and rheumatism*, 62(9), 2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>.
17. Barbalho, S. M., Prado Neto, E. V., De Alvares Goulart, R., Bechara, M. D., Baisi Chagas, E. F., Audi, M., Guissoni Campos, L. M., Landgraf Guiger, E., Buchaim, R. L., Buchaim, D. V., & Cressoni Araujo, A. (2020). Myokines: a descriptive review. *The Journal of sports medicine and physical fitness*, 60(12), 1583–1590. <https://doi.org/10.23736/S0022-4707.20.10884-3>.
18. Dankbar, B., Fennen, M., Brunert, D., Hayer, S., Frank, S., Wehmeyer, C., Beckmann, D., Paruzel, P., Bertrand, J., Redlich, K., Koers-Wunrau, C., Stratis, A., Korb-Pap, A., & Pap, T. (2015). Myostatin is a direct regulator of osteoclast differentiation and its inhibition reduces inflammatory joint destruction in mice. *Nature medicine*, 21(9), 1085–1090. <https://doi.org/10.1038/nm.3917>.
19. Turner, J. D., & Filer, A. (2015). The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis. *Current opinion in rheumatology*, 27(2), 175–182. <https://doi.org/10.1097/BOR.000000000000148>.
20. Zhang, C., Tan, C. K., McFarlane, C., Sharma, M., Tan, N. S., & Kambadur, R. (2012). Myostatin-null mice exhibit delayed skin wound healing through the blockade of transforming growth factor- β signaling by decorin. *American journal of physiology. Cell physiology*, 302(8), C1213–C1225. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00179.2011>.
21. Zhu, D., Zhao, J., Lou, A., Huang, Q., OuYang, Q., Zhu, J., Fan, M., He, Y., Ren, H., & Yang, M. (2019). Transforming growth factor β 1 promotes fibroblast-like synoviocytes migration and invasion via TGF- β 1/Smad signaling in rheumatoid arthritis. *Molecular and cellular biochemistry*, 459(1-2), 141–150. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03557-0>.
22. Liu, H., Zhu, Y., Gao, Y., Qi, D., Zhao, L., Zhao, L., Liu, C., Tao, T., Zhou, C., Sun, X., Guo, F., & Xiao, J. (2020). NR1D1 modulates synovial inflammation and bone destruction in rheumatoid arthritis. *Cell death & disease*, 11(2), 129. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2314-6>.
23. Lan, Q., Lu, R., Chen, H., Pang, Y., Xiong, F., Shen, C., Qin, Z., Zheng, L., Xu, G., & Zhao, J. (2020). MMP-13 enzyme and pH responsive theranostic nanoplatform for osteoarthritis. *Journal of nanobiotechnology*, 18(1), 117. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00666-7>.
24. Ochsner, U. A., Green, L. S., Rice, T. P., Olivas, E., Janjic, N., & Katilius, E. (2019). Targeting Unique Epitopes on Highly Similar Proteins GDF-11 and GDF-8 with Modified DNA Aptamers. *Biochemistry*, 58(46), 4632–4640.

<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00760>.

25. Poggioli, T., Vujic, A., Yang, P., Macias-Trevino, C., Uygur, A., Loffredo, F. S., Pancoast, J. R., Cho, M., Goldstein, J., Tandias, R. M., Gonzalez, E., Walker, R. G., Thompson, T. B., Wagers, A. J., Fong, Y. W., & Lee, R. T. (2016). Circulating Growth Differentiation Factor 11/8 Levels Decline With Age. *Circulation research*, *118*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307521>.
26. Li, L., Wei, X., Wang, D., Lv, Z., Geng, X., Li, P., Lu, J., Wang, K., Wang, X., Sun, J., Cao, X., & Wei, L. (2020). Positive Effects of a Young Systemic Environment and High Growth Differentiation Factor 11 Levels on Chondrocyte Proliferation and Cartilage Matrix Synthesis in Old Mice. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, *72*(7), 1123–1133. <https://doi.org/10.1002/art.41230>.
27. Li, W., Wang, W., Liu, L., Qu, R., Chen, X., Qiu, C., Li, J., Hayball, J., Liu, L., Chen, J., Wang, X., Pan, X., & Zhao, Y. (2019). GDF11 antagonizes TNF- α -induced inflammation and protects against the development of inflammatory arthritis in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *33*(3), 3317–3329. <https://doi.org/10.1096/fj.201801375RR>.
28. Colaianni, G., Cuscito, C., Mongelli, T., Pignataro, P., Buccoliero, C., Liu, P., Lu, P., Sartini, L., Di Comite, M., Mori, G., Di Benedetto, A., Brunetti, G., Yuen, T., Sun, L., Reseland, J. E., Colucci, S., New, M. I., Zaidi, M., Cinti, S., & Grano, M. (2015). The myokine irisin increases cortical bone mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(39), 12157–12162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516622112>.
29. Zhang, J., Valverde, P., Zhu, X., Murray, D., Wu, Y., Yu, L., Jiang, H., Dard, M. M., Huang, J., Xu, Z., Tu, Q., & Chen, J. (2017). Exercise-induced irisin in bone and systemic irisin administration reveal new regulatory mechanisms of bone metabolism. *Bone research*, *5*, 16056. <https://doi.org/10.1038/boneres.2016.56>.
30. Wang, F. S., Kuo, C. W., Ko, J. Y., Chen, Y. S., Wang, S. Y., Ke, H. J., Kuo, P. C., Lee, C. H., Wu, J. C., Lu, W. B., Tai, M. H., Jahr, H., & Lian, W. S. (2020). Irisin Mitigates Oxidative Stress, Chondrocyte Dysfunction and Osteoarthritis Development through Regulating Mitochondrial Integrity and Autophagy. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *9*(9), 810. <https://doi.org/10.3390/antiox9090810>.
31. Vadalà, G., Di Giacomo, G., Ambrosio, L., Cannata, F., Cicione, C., Papalia, R., & Denaro, V. (2020). Irisin Recovers Osteoarthritic Chondrocytes In Vitro. *Cells*, *9*(6), 1478. <https://doi.org/10.3390/cells9061478>.
32. He, Z., Li, H., Han, X., Zhou, F., Du, J., Yang, Y., Xu, Q., Zhang, S., Zhang, S., Zhao, N., Yan, M., & Yu, Z. (2020). Irisin inhibits osteocyte apoptosis by activating the Erk signaling pathway in vitro and attenuates ALCT-induced osteoarthritis in mice. *Bone*, *141*, 115573. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115573>.
33. Planella-Farrugia, C., Comas, F., Sabater-Masdeu, M., Moreno, M., Moreno-Navarrete, J. M., Rovira, O., Ricart, W., & Fernández-Real, J. M. (2019). Circulating Irisin and Myostatin as Markers of Muscle Strength and Physical Condition in Elderly Subjects. *Frontiers in physiology*, *10*, 871. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00871>.
34. Zhang, X., Zhang, D., Wang, Q., Guo, X., Chen, J., Jiang, J., Li, M., Liu, W., Gao, Y., Zhang, Q., Bao, G., & Cui, Z. (2021). Sprouty2 Inhibits Migration and Invasion of Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis by Down-regulating ATF2 Expression and Phosphorylation. *Inflammation*, *44*(1), 91–103.

Acknowledgements

The authors acknowledge the staff from Serviço de Reumatologia, Unidade de Pesquisa Laboratorial and Unidade de Patologia Experimental from Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Funding

The authors acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) for providing funding.

Ethics Declarations

Collection of synovial liquid and in vitro procedures were approved by the Research Ethics Committee (CEP) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (project identification: 21-0616, Plataforma Brasil CAAE: 56125222.0000.5327, approval date: 03/04/2022) and written informed consent was obtained from each patient, complying with all methods in accordance with CEP guidelines and regulations.

Competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a avaliar os níveis sinoviais e séricos de miocinas em pacientes com AR. Além disso, este é o primeiro estudo a analisar o efeito direto destas moléculas no fenótipo FLS-AR. No trabalho, a miostatina demonstrou capacidade influenciar na migração, mas de diminuir a invasão. Entretanto, mais amostras e estudos precisam ser realizados para comprovar o efeito nos fibroblastos sinoviais. Os resultados encontrados podem ser muito interessante para explorarmos de que forma a miocina pode interferir e causar esses diferentes efeitos. Por outro lado, GDF-11 e irisina foram observados no líquido sinovial e apresentaram resultados protetores, reduzindo a capacidade invasiva do FLS. Considerando a demonstração de miocinas na cavidade articular, e possível ação relevante na FLS-AR, estudos adicionais serão realizados para esclarecer as vias de sinalização que estão sendo influenciadas na FLS pelas miocinas, tentando esclarecer o quanto essas miocinas estão impactando a fisiopatologia articular em AR.

9. PERSPECTIVAS

Este estudo se encontra em andamento e tem como perspectivas a coleta de um número maior de amostras, bem como avaliação do escore radiológico e inflamatório dos pacientes com AR, a fim de mensurar o dano articular e poder compará-los com os níveis articulares e circulantes de miocinas. Também visamos a realização de um aumento de tamanho amostral nos testes *in vitro*, para minimizar as variações individuais dos pacientes e comprovar um efeito terapêutico das miocinas em condições adversas. Ainda, ensaios adicionais para inferir as vias em que as miocinas estão interferindo para mudança de fenótipo dos FLS.

10. ANEXOS

10.1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 56125222800005327

Título do Projeto: Efeito da miostatina, GDF-11 e irisina sobre os fibroblastos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o potencial de moléculas envolvidas na fisiopatologia da artrite reumatoide. Os testes para avaliação dessa molécula serão realizados em células (fibroblastos) de pacientes que tem artrite reumatoide. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Laboratório de Doenças Autoimunes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Você está sendo convidado (a) a participar deste estudo porque possui o diagnóstico de artrite reumatoide e realiza tratamento no ambulatório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes:

- Autorizar a utilização de uma amostra de líquido sinovial que será obtida após o procedimento de punção articular, no ambulatório clínico. O líquido sinovial removido na punção é habitualmente descartado. Você não precisará passar por nenhum procedimento adicional durante a punção em decorrência da participação na pesquisa. Você deverá assinar este documento dando permissão para utilizarmos o material biológico cedido para a obtenção das células (fibroblastos) que serão utilizadas nesta pesquisa.
 - Será necessário acessar o seu prontuário para obter algumas informações como data do diagnóstico da doença e medicamentos utilizados para o tratamento. Por isso, solicitamos a sua autorização para realizar este acesso.
 - O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa e você poderá ser chamado para autorizar o uso do material, de acordo com as resoluções de pesquisa vigentes.
- () Autorizo que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.
- () Não autorizo que minhas amostras sejam armazenadas para pesquisas futuras.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, exceto potencial de quebra de confidencialidade. Para evitar isso, suas informações serão codificadas e sua identificação não aparecerá em qualquer divulgação da pesquisa.

A pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre diferentes abordagens terapêuticas em diversas doenças.

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

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

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

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

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Ricardo Machado Xavier, pelo telefone (51) 3359-8000 ramal 7614, com a pesquisadora Maria Luísa Gasparini pelo telefone (51) 3359-8000 ramal 8837 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, telefone (51) 33597640 ou Av. Protásio Alves, 211 - Portão 4 - 5º andar do Bloco C - Rio Branco - Porto Alegre/RS, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

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

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

10.2 – STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies)

STROBE Statement — checklist of items that should be included in reports of observational studies

	Item No	Recommendation	Page No
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	38
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	39
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	40
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	40
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	41
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	41
Participants	6	(a) <i>Cohort study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up <i>Case-control study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of case ascertainment and control selection. Give the rationale for the choice of cases and controls <i>Cross-sectional study</i> —Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	41
		(b) <i>Cohort study</i> —For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed <i>Case-control study</i> —For matched studies, give matching criteria and the number of controls per case	
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	41
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	N/A
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	N/A
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	41

Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	41
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	42
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	42
		(c) Explain how missing data were addressed	42
		(d) <i>Cohort study</i> —If applicable, explain how loss to follow-up was addressed <i>Case-control study</i> —If applicable, explain how matching of cases and controls was addressed <i>Cross-sectional study</i> —If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	
		(e) Describe any sensitivity analyses	42

Results

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed	43
		(b) Give reasons for non-participation at each stage	N/A
		(c) Consider use of a flow diagram	N/A
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders	43
		(b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	N/A
		(c) <i>Cohort study</i> —Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	N/A
Outcome data	15*	<i>Cohort study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures over time	N/A
		<i>Case-control study</i> —Report numbers in each exposure category, or summary measures of exposure	N/A
		<i>Cross-sectional study</i> —Report numbers of outcome events or summary measures	N/A
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included	N/A
		(b) Report category boundaries when continuous variables were categorized	N/A

		(c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	N/A
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	N/A
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	46-48
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	46-48
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	46-48
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	46-48
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	52

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

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

10.3 SPIRIT (Standard Protocol Items: Recommendations For Interventional Trials)



SPIRIT 2013 Checklist: Recommended items to address in a clinical trial protocol and related documents*

Section/item	Item No	Description	Addressed on page number
Administrative information			
Title	1	Descriptive title identifying the study design, population, interventions, and, if applicable, trial acronym	38-41
Trial registration	2a	Trial identifier and registry name. If not yet registered, name of intended registry	41
	2b	All items from the World Health Organization Trial Registration Data Set	N/A
Protocol version	3	Date and version identifier	N/A
Funding	4	Sources and types of financial, material, and other support	52
Roles and responsibilities	5a	Names, affiliations, and roles of protocol contributors	38-41
	5b	Name and contact information for the trial sponsor	38
	5c	Role of study sponsor and funders, if any, in study design; collection, management, analysis, and interpretation of data; writing of the report; and the decision to submit the report for publication, including whether they will have ultimate authority over any of these activities	N/A

5d	Composition, roles, and responsibilities of the coordinating centre, steering committee, endpoint adjudication committee, data management team, and other individuals or groups overseeing the trial, if applicable (see Item 21a for data monitoring committee)	N/A
----	--	-----

Introduction

Background and rationale	6a	Description of research question and justification for undertaking the trial, including summary of relevant studies (published and unpublished) examining benefits and harms for each intervention	40
	6b	Explanation for choice of comparators	N/A
Objectives	7	Specific objectives or hypotheses	40
Trial design	8	Description of trial design including type of trial (eg, parallel group, crossover, factorial, single group), allocation ratio, and framework (eg, superiority, equivalence, noninferiority, exploratory)	41

Methods: Participants, interventions, and outcomes

Study setting	9	Description of study settings (eg, community clinic, academic hospital) and list of countries where data will be collected. Reference to where list of study sites can be obtained	41
Eligibility criteria	10	Inclusion and exclusion criteria for participants. If applicable, eligibility criteria for study centres and individuals who will perform the interventions (eg, surgeons, psychotherapists)	41
Interventions	11a	Interventions for each group with sufficient detail to allow replication, including how and when they will be administered	41-42
	11b	Criteria for discontinuing or modifying allocated interventions for a given trial participant (eg, drug dose change in response to harms, participant request, or improving/worsening disease)	N/A
	11c	Strategies to improve adherence to intervention protocols, and any procedures for monitoring adherence (eg, drug tablet return, laboratory tests)	41-42
	11d	Relevant concomitant care and interventions that are permitted or prohibited during the trial	N/A

Outcomes	12	Primary, secondary, and other outcomes, including the specific measurement variable (eg, systolic blood pressure), analysis metric (eg, change from baseline, final value, time to event), method of aggregation (eg, median, proportion), and time point for each outcome. Explanation of the clinical relevance of chosen efficacy and harm outcomes is strongly recommended	N/A
Participant timeline	13	Time schedule of enrolment, interventions (including any run-ins and washouts), assessments, and visits for participants. A schematic diagram is highly recommended (see Figure)	N/A
Sample size	14	Estimated number of participants needed to achieve study objectives and how it was determined, including clinical and statistical assumptions supporting any sample size calculations	41
Recruitment	15	Strategies for achieving adequate participant enrolment to reach target sample size	41

Methods: Assignment of interventions (for controlled trials)

Allocation:

Sequence generation	16a	Method of generating the allocation sequence (eg, computer-generated random numbers), and list of any factors for stratification. To reduce predictability of a random sequence, details of any planned restriction (eg, blocking) should be provided in a separate document that is unavailable to those who enrol participants or assign interventions	N/A
Allocation concealment mechanism	16b	Mechanism of implementing the allocation sequence (eg, central telephone; sequentially numbered, opaque, sealed envelopes), describing any steps to conceal the sequence until interventions are assigned	N/A
Implementation	16c	Who will generate the allocation sequence, who will enrol participants, and who will assign participants to interventions	N/A
Blinding (masking)	17a	Who will be blinded after assignment to interventions (eg, trial participants, care providers, outcome assessors, data analysts), and how	N/A
	17b	If blinded, circumstances under which unblinding is permissible, and procedure for revealing a participant's allocated intervention during the trial	N/A

Methods: Data collection, management, and analysis

Data collection methods	18a	Plans for assessment and collection of outcome, baseline, and other trial data, including any related processes to promote data quality (eg, duplicate measurements, training of assessors) and a description of study instruments (eg, questionnaires, laboratory tests) along with their reliability and validity, if known. Reference to where data collection forms can be found, if not in the protocol	N/A
	18b	Plans to promote participant retention and complete follow-up, including list of any outcome data to be collected for participants who discontinue or deviate from intervention protocols	N/A
Data management	19	Plans for data entry, coding, security, and storage, including any related processes to promote data quality (eg, double data entry; range checks for data values). Reference to where details of data management procedures can be found, if not in the protocol	N/A
Statistical methods	20a	Statistical methods for analysing primary and secondary outcomes. Reference to where other details of the statistical analysis plan can be found, if not in the protocol	42
	20b	Methods for any additional analyses (eg, subgroup and adjusted analyses)	N/A
	20c	Definition of analysis population relating to protocol non-adherence (eg, as randomised analysis), and any statistical methods to handle missing data (eg, multiple imputation)	N/A

Methods: Monitoring

Data monitoring	21a	Composition of data monitoring committee (DMC); summary of its role and reporting structure; statement of whether it is independent from the sponsor and competing interests; and reference to where further details about its charter can be found, if not in the protocol. Alternatively, an explanation of why a DMC is not needed	N/A
	21b	Description of any interim analyses and stopping guidelines, including who will have access to these interim results and make the final decision to terminate the trial	N/A
Harms	22	Plans for collecting, assessing, reporting, and managing solicited and spontaneously reported adverse events and other unintended effects of trial interventions or trial conduct	N/A
Auditing	23	Frequency and procedures for auditing trial conduct, if any, and whether the process will be independent from investigators and the sponsor	N/A

Ethics and dissemination

Research ethics approval	24	Plans for seeking research ethics committee/institutional review board (REC/IRB) approval	52
Protocol amendments	25	Plans for communicating important protocol modifications (eg, changes to eligibility criteria, outcomes, analyses) to relevant parties (eg, investigators, REC/IRBs, trial participants, trial registries, journals, regulators)	N/A
Consent or assent	26a	Who will obtain informed consent or assent from potential trial participants or authorised surrogates, and how (see Item 32)	55
	26b	Additional consent provisions for collection and use of participant data and biological specimens in ancillary studies, if applicable	55
Confidentiality	27	How personal information about potential and enrolled participants will be collected, shared, and maintained in order to protect confidentiality before, during, and after the trial	55
Declaration of interests	28	Financial and other competing interests for principal investigators for the overall trial and each study site	53
Access to data	29	Statement of who will have access to the final trial dataset, and disclosure of contractual agreements that limit such access for investigators	55
Ancillary and post-trial care	30	Provisions, if any, for ancillary and post-trial care, and for compensation to those who suffer harm from trial participation	N/A
Dissemination policy	31a	Plans for investigators and sponsor to communicate trial results to participants, healthcare professionals, the public, and other relevant groups (eg, via publication, reporting in results databases, or other data sharing arrangements), including any publication restrictions	N/A
	31b	Authorship eligibility guidelines and any intended use of professional writers	N/A
	31c	Plans, if any, for granting public access to the full protocol, participant-level dataset, and statistical code	N/A
Appendices			
Informed consent materials	32	Model consent form and other related documentation given to participants and authorised surrogates	55
Biological specimens	33	Plans for collection, laboratory evaluation, and storage of biological specimens for genetic or molecular analysis in the current trial and for future use in ancillary studies, if applicable	41-42

*It is strongly recommended that this checklist be read in conjunction with the SPIRIT 2013 Explanation & Elaboration for important clarification on the items. Amendments to the protocol should be tracked and

dated. The SPIRIT checklist is copyrighted by the SPIRIT Group under the Creative Commons [“Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported”](#) license.