

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

Biomarcadores de caquexia reumatoide
– uma abordagem metabólica em modelo experimental de artrite

Paulo Vinicius Gil Alabarse

Porto Alegre, Brasil

2016

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

Biomarcadores de caquexia reumatoide
– uma abordagem metabólica em modelo experimental de artrite

Autor: Paulo Vinicius Gil Alabarse

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier

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

Banca Examinadora:

Luis Portela (Avaliador externo – Bioquímica UFRGS)

Odirlei Monticielo (Avaliador interno – PPGCM – UFRGS)

Pércio Gulko (Avaliador externo – Icahn School of Medicine at Mount Sinai)

Rafael Chakr (Avaliador interno – PPGCM – UFRGS)

Agradecimentos

É com grande alegria que agradeço a tantos que contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Em primeiro lugar, ao professor Ricardo M. Xavier, meu orientador, que aceitou o desafio de me orientar mesmo sem me conhecer previamente, que me desafiou a desenvolver pesquisa de ponta junto ao grupo do Laboratório de Doenças Autoimunes. Por toda a orientação, apoio e dedicação, meu muito obrigado!

Agradeço a todas companheiras do Lab DAI pela ajuda contínua, discussões, críticas e atenção, desde aquelas que não trabalharam diretamente com esta pesquisa, Patrícia Oliveira, Mirian Farinon, Vanessa Clarimundo, que tornaram o ambiente de trabalho muito produtivo. Em especial à equipe que aceitou partilhar do desafio de desenvolver este trabalho: às iniciações científicas da graduação mais comprometidas que já conheci – Andrelise Almeida, Mayara Oliveira, Mônica Immig –, às agora mestres, que acompanharam meu crescimento e me desafiaram com muito conhecimento e prática nas atividades diárias – Jordana Souza, Eduarda Freitas, Rafaela Cavalheiro –, às doutoras que acompanharam de perto, atendendo a todas minhas necessidades de aprendizado e contribuindo com as melhores discussões possíveis, trazendo toda a qualidade deste trabalho que, em muito especial, agradeço: à Lidiane Filippin, que trouxe a linha de pesquisa para o laboratório e levantou a hipótese; à Priscila Lora, que não apenas deu todo o apoio, mas acreditou em mim e lutou para que o projeto fosse realizado e meu doutorado sanduíche pudesse existir; à Vivian Teixeira, que é minha amiga desde a graduação, quem me convidou a ingressar neste laboratório impressionante, que desenvolveu inúmeras partes de extrema importância como um braço direito, sempre disponível e atenta para ajudar. Agradeço aos colegas que passaram pelo laboratório e estão na memória com suas contribuições significativas.

Agradeço ao Stephen Young, meu supervisor no Reino Unido, que me acompanhou e ensinou muito e tornou este trabalho de qualidade ímpar. À equipe do Rheumatoid Research Group da University of Birmingham, em especial ao Rowan Hardy, que aceitou me ensinar algo mais do que havia sido proposto, à Camilla Bathrust, que auxiliou lado à lado na bancada da universidade, tirando todas as minhas dúvidas e tornando a experiência de trabalho mais agradável.

Agradeço à minha família, como sempre, pelo apoio, possibilidade de poder chegar até o doutorado, incentivo contínuo, então: Paulo e Bete Alabarse, meu sincero muito obrigado. Aos meus irmãos, que sempre me serviram de estímulo e de exemplo: Frederico e Priscila Alabarse, meu muito obrigado!

Agradeço a amigos, conhecidos e profissionais, que me acompanharam e de alguma forma tornaram possível minha formação.

Por último, e tão especial, agradeço de todo o coração a mulher mais importante da minha vida: Cintia Rosa, a pessoa que mais amo, que tão de perto acompanhou, que tanto entendeu e auxiliou em todos momentos. Esta que aceitou tornar os dias no Reino Unido mais ensolarados e produtivos, que apoiou todos os passos e nunca me deixou esquecer o mais importante.

Resumo

Base teórica: Artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune que afeta as articulações e progride de maneira simétrica e erosiva. Além dos achados articulares, pode ocorrer de perda muscular e síndrome da caquexia. Atualmente, não existe um marcador que sirva de preditor da síndrome de caquexia reumatoide. Estudos metabólicos em pacientes com AR demonstram uma complexidade em encontrar um biomarcador para caquexia. Ademais, não há modelo experimental de caquexia descrito na literatura, mas o modelo de artrite induzida por colágeno (CIA) possui potencial de ser modelo de caquexia reumatoide. A partir deste modelo, pode-se fazer a busca por biomarcadores de caquexia reumatoide via metabólica.

Objetivo: Avaliar o modelo de CIA como modelo experimental de caquexia reumatoide. Avaliar o perfil metabólico da urina no modelo de CIA e correlacionar com parâmetros clínicos de caquexia reumatoide em busca de possíveis biomarcadores.

Métodos: Camundongos machos DBA/1J foram induzidos (CIA; n=13) no dia zero e receberam reforço 18 dias após, e grupo mantidos saudáveis sem indução (CO; n=11). Nos dias 0, 18, 25, 35, 45, 55 e 65 após a indução, foram realizados: coleta de urinas; teste de desempenho físico; teste de locomoção espontânea; teste de força; medida do volume do edema da pata traseira; avaliação do escore clínico; pesagem; e avaliação da ingestão alimentar. Após os 65 dias, os animais foram eutanasiados e tecidos musculares (gastrocnêmio – GA; e tibial anterior – TA) foram dissecados para pesagem e realização da razão sarcoplasmática. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni, ou teste t de Pearson, com significância a partir de um $p < 0,05$. A urina coletada foi submetida à ressonância nuclear magnética (1D e 2D J-res). Os metabolitos foram identificados via Chenomx (1D) e pelo Birmingham Metabolite Library (BML; 2D J-res). Utilizou-se o modelo estatístico de PCA, PLSDA e PLSR para criar ranqueamento de metabolitos (significância a partir de um $p < 0,05$). Analizou-se as rotas metabólicas via Metaboanalyst a partir do ranqueamento de metabolitos obtidos. Os metabolitos obtidos foram filtrados para rotas metabólicas que ocorrem no músculo para identificação de potenciais biomarcadores de perda muscular.

Resultados: O grupo CIA apresentou redução de até 24% na locomoção espontânea, de até 66% na força e de até 24% no teste de desempenho físico após 35 dias da indução, bem como redução no peso do GA (24%) e TA (25%), e relação sarcoplasmática (22 e 23%, respectivamente) em relação ao grupo CO. Os modelos estatísticos de PCA, PLSDA e PLSR, e o filtro pelas rotas metabólicas relacionadas com o músculo geraram uma lista de 28 metabolitos e relacionados com o desenvolvimento da doença, sendo eles: 3-metilhistidina, 4-aminobutirato, acetilcolina, arginina, aspartato, carnosina, creatina, creatinina, glutamina, histamina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, lisina, mio-inositol, dimetilglicina, acetilalanina, acetilmetionina, pantotenato, fenilalanina, fosfocolina, fosfocreatina, piridoxina, sarcosina, succinilacetona, tiamina, e urocanato.

Conclusão: Em concordância com os resultados de redução nos parâmetros de: massa muscular, locomoção espontânea, força e desempenho físico, somando-se a ausência de anorexia bem como mudança no peso, o modelo animal de CIA representa um modelo experimental próprio para caquexia reumatoide. A análise do perfil metabólico deste modelo permite sugerir 28 metabolitos relacionados ao processo de perda muscular, que podem vir a ser biomarcadores de caquexia reumatoide, objetivando prognóstico, diagnóstico e acompanhamento da síndrome. Destes metabolitos, os principais são pertencentes ao metabolismo de: histidina; arginina e prolina; glicina, serina e treonina; fosfocreatina, bem como outros aminoácidos e vitaminas do complexo B.

Palavras chave: Ressonância Nuclear Magnética; perda muscular; artrite induzida por colágeno; biomarcador; metabólica; caquexia; artrite reumatoide; autoimunidade.

Abstract

Background: Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease that affects the joints and has a symmetric development and it is erosive. Besides joint damage, it can develop muscle loss progress into cachexia syndrome. Currently, there is no marker that can predict its development in rheumatoid patients. Metabolomics in RA have shown to be complex to find out a biomarker for this syndrome. Also, there is no experimental model of cachexia described in literature yet; however the collagen-induced arthritis (CIA) animal model seems to be a feasible model for rheumatoid cachexia. With this model, the research for a biomarker of rheumatoid cachexia can be done by metabolomics.

Objectives: It will be evaluated if the CIA animal model can be also an animal model of rheumatoid cachexia. Afterwards, it will be evaluated a metabolic profile from urine of this animal model and correlate with clinical signs of rheumatoid cachexia to find out plausible biomarkers of it.

Methods: Male DBA/1J mice were submitted to CIA (n=13), immunization occurred at day zero and a booster was performed 18 days after, and a healthy group with no induction (CO; n=11). At the 0, 18, 25, 35, 45, 55 and 65 days after the first injection, it was done: urine collection; physical performance test; free exploratory locomotion test; strength test; hindpaw edema volume measurement; follow up disease development; weighted; and food intake. After the 65 days, animals were euthanized and muscle (gastrocnemius – GA; and tibial anterior – TA) were dissected, and weighted for sarcoplasmic ratio. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc, and t-test of Pearson, and statistical critical limit was set for $p < 0.05$. The collected urine was used for nuclear magnetic resonance (1D and 2D J-res). Metabolites were identified by Chenomx (1D) and by the Birmingham Metabolite Library (BML; 2D J-res). Statistical models were performed using PCA, PLS-DA and PLSR to create a ranking list of the metabolites (statistical critical limit was set for $p < 0.05$). It was analyzed the metabolic pathway by Metaboanalyst from the data of metabolite ranking list. Then, the metabolite list was filtered by the metabolic pathways that take place in muscle tissue, in order to identify plausible biomarkers of muscle loss.

Results: CIA group has shown reduction in up to 24% of free locomotion fatigue, up to 66% of strength and up to 24% of endurance physical performance after 35 days of the induction, as well as a decrease in GA (24%) and TA (25%) weight, and sarcoplasmic ratio also reduced (22 and 23%, respectively) related to CO group. The PCA, PLS-DA and PLSR statistical models, and the filter by metabolic pathways related to muscle provided a list of 28 metabolites related to disease development, as can be listed: 3-methylhistidine, 4-aminobutyrate, acetylcholine, arginine, aspartate, carnosine, creatine, creatinine, glutamine, histamine, histidine, isoleucine, leucine, methionine, lysine, myo-inositol, dimethylglycine, acetylalanine, acetylmethionine, pantothenate, phenylalanine, phosphocholine, phosphocreatine, pyridoxine, sarcosine, succinylacetone, thiamine, and urocanate.

Conclusions: Accordingly with the data with reduction of: muscle mass, spontaneous locomotion, strength and physical performance, added with absence of anorexia as well as weight change, CIA animal model is a feasible experimental model for rheumatoid cachexia. Concerning the metabolic profile from this model, it can be suggested 28 metabolites related to muscle loss in which can be tested for biomarker of rheumatoid cachexia, targeting prognosis, diagnosis, and syndrome follow up. From those metabolites, the main ones are engaged to metabolism of: histidine; arginine and proline; glycine, serine and threonine; phosphocreatine, as well as other amino acids and vitamins from B complex.

Key Words: Nuclear Magnetic Resonance; muscle loss; collagen-induced arthritis; biomarker; metabolomics; cachexia; rheumatoid arthritis; autoimmunity.

Lista de imagens

Figura 1	Efeito de Warburg
Figura 2	Ressonância Nuclear Magnética – Aquisição do sinal
Figura 3	Espectro de RNM em duas dimensões
Figura 4	Alinhamento de espectros
Figura 5	Processamento total de cada espectro
Figura 6	Interface de identificação dos metabólitos via Chenomx
Figura 7	Rota do metabolismo da histidina do Metaboanalyst
Figura 8	Marco Teórico
Figura 9	Desenho experimental

Índice

Agradecimentos.....	4
Resumo	5
Abstract.....	6
Lista de imagens.....	7
Introdução.....	10
Revisão da Literatura	12
Estratégias para localizar e selecionar informações.....	12
Inflamação.....	12
Artrite Reumatoide	14
Artrite Reumatoide e Síndrome da Caquexia	15
Modelo Experimental de Artrite.....	17
Diagnóstico e Marcadores de Caquexia.....	18
Metabolômica.....	19
Metabolômica e AR.....	27
Marco Teórico.....	29
Justificativa.....	30
Objetivos	31
Objetivos Gerais.....	31
Objetivos Específicos	31
Desenho experimental.....	32
Referências.....	35
Sítios citados	40
Artigo.....	41
Conclusão.....	78
Perspectivas Futuras	80

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância”. Hipócrates

Introdução

A longevidade vem aumentando entre os seres humanos, porém sem o acompanhamento da saúde, resulta em uma população idosa mais afetada com processo de perda muscular, levando a uma qualidade de vida cada vez pior [1]. A perda de peso na população mais velha está altamente relacionada à aumentado risco de morte e este risco relaciona-se fortemente aos fatores de: idade avançada, perda de peso e perda de massa do músculo esquelético. Tanto no caso de envelhecimento saudável quanto relacionado as doenças inflamatórias, a perda muscular é observada e, neste último caso, acentuada [1].

A inflamação é um processo essencial para a manutenção dos seres vivos e este processo é responsável pela defesa do nosso organismo contra patógenos e pela manutenção de tecidos lesados [2]. Apesar de ser inicialmente benéfico, em doenças inflamatórias crônicas, há distúrbios na homeostase do processo inflamatório [3].

Na inflamação, o metabolismo celular sofre drásticas alterações [4], como o aumento da taxa de proliferação celular mediado por células inflamatórias e consequente aumento no gasto energético celular. Essas alterações modificam as principais rotas metabólicas.

Outra relação existente entre a inflamação e o metabolismo é observada no metabolismo de lipídios. Como exemplo, a produção de prostaglandinas - importante mediador inflamatório - utiliza como substrato os fosfolipídios que compõe a membrana celular [5]. Além disso, os linfonodos estão situados dentro do tecido adiposo e este tecido adiposo é amplamente infiltrado por macrófagos [6]. Dessa forma, pela presença dos linfonodos justaposto ao tecido adiposo e por este tecido estar repleto de macrófagos, que utilizam grandes quantidades dos lipídeos para a produção de mediadores inflamatórios, ressalta-se assim a interligação entre processo inflamatório e metabolismo de lipídios.

Dentre as doenças inflamatórias crônicas, podemos citar a artrite reumatoide (AR). Esta é uma doença sistêmica, caracterizada por inflamação da sinóvia, simétrica, produção de auto-anticorpos e pela destruição da cartilagem e do osso subcondral [7]. Trata-se de uma doença reumática de alta prevalência e de alta morbidade. Além disso, um distúrbio metabólico comum a estes pacientes é a atrofia muscular acentuada e a chamada síndrome da caquexia, que está associada a um pior prognóstico nos pacientes com AR [8].

A síndrome da caquexia representa uma resistência anabólica que resulta em uma falha no músculo em sintetizar mais proteínas [9]. A caquexia (do grego, “cacos”: ruim e “hexis”: ter, ou seja, condição ruim) é definida como um estado metabólico complexo acentuado pela progressão de doenças e é caracterizada por perda da massa muscular

acelerada em adultos [10, 11]. A caquexia vem ganhando importância cada vez maior tanto na pesquisa quanto na clínica [12].

Em pacientes com AR, a caracterização da síndrome da caquexia apresenta uma perda muscular sem alteração no tecido adiposo, podendo inclusive ser mascarada pela mesma [9]. Dada esta principal diferença da caquexia em pacientes com AR, que não ocorre em pacientes oncológicos e em muitas das outras doenças inflamatórias crônicas, Roubenoff cunhou pela primeira vez o termo caquexia reumatoide [8, 13, 14]. Assim, ofereceu-se um nome que diferenciaria dos demais casos de caquexia ocasionados por outras doenças, dadas a caracterização mais própria decorrente da AR.

A atrofia muscular é um sinal extra-articular relevante na AR, pois estima-se que até 66% dos pacientes apresentem caquexia [15, 16]. São atribuídos diversos fatores causais à atrofia muscular, como: exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias (e.g. TNF- α , IL-1 β e IL-6), limitação na atividade física e ativação de distintas cascatas intracelulares induzindo à degradação proteica [15, 16].

Uma importante ferramenta para o estudo da AR são os modelos experimentais, como o da artrite induzida por colágeno (CIA), por mimetizar a AR [17]. Esses modelos são amplamente usados, pois demonstram semelhanças morfológicas com a artrite em humanos, incluindo padrões da sinovite, erosão da cartilagem articular e osso, bem como a exacerbação na produção de citocinas pró-inflamatórias e características clínicas como dor, edema e perda funcional [18].

Como ainda não existem marcadores sensíveis e específicos para a identificação da caquexia decorrente da AR, torna-se necessária a busca por marcadores que permitam identificar a síndrome da caquexia, bem como a sua gravidade. O estudo do perfil metabólico tem sido utilizado para a identificação de biomarcadores em diversas doenças. Modelos animais de AR são convenientes para essa pesquisa inicial de biomarcadores, já que a única variável em questão é a doença e sua gravidade.

Revisão da Literatura

Estratégias para localizar e selecionar informações

A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: Scielo, PubMed e Web of Knowledge. O período da pesquisa foi de 1963 a 2016. Foram realizadas buscas através da lista de termos e suas combinações: “cachexia”, “muscle”, “muscle loss”, “muscle wasting”, “muscle mass”, “rheumatoid arthritis”, “collagen-induced arthritis”, “experimental arthritis”, “arthritis”, “biomarkers”, “marker”, “metabolism”, “metabolic change”, “metabolomics” e “nuclear magnetic resonance”.

Inflamação

O processo inflamatório decorrente de doenças inflamatórias crônicas acarreta alterações drásticas no metabolismo celular, modificando as principais rotas metabólicas. Nesse contexto, as células com aumento na taxa de divisão celular, como as neoplásicas ou do sistema imune na inflamação, sofrem mudanças no consumo da glicose. Assim, o produto final do metabolismo da glicose nestas células é alterado, pois, no lugar dos intermediários do ácido cítrico, a glicólise produz lactato (Figura 1) [4]. Essas mudanças são desencadeadas pela elevada demanda de energia em curto espaço de tempo, ou seja, produzir energia transformando o piruvato em lactato, sem a necessidade de oxigênio, acaba sendo mais rápido do que via ciclo do ácido cítrico, que depende de oxigênio e, apesar de ser mais eficiente na produção de energia, é mais demorado. As alterações citadas compõem um fenômeno conhecido como efeito de Warburg.

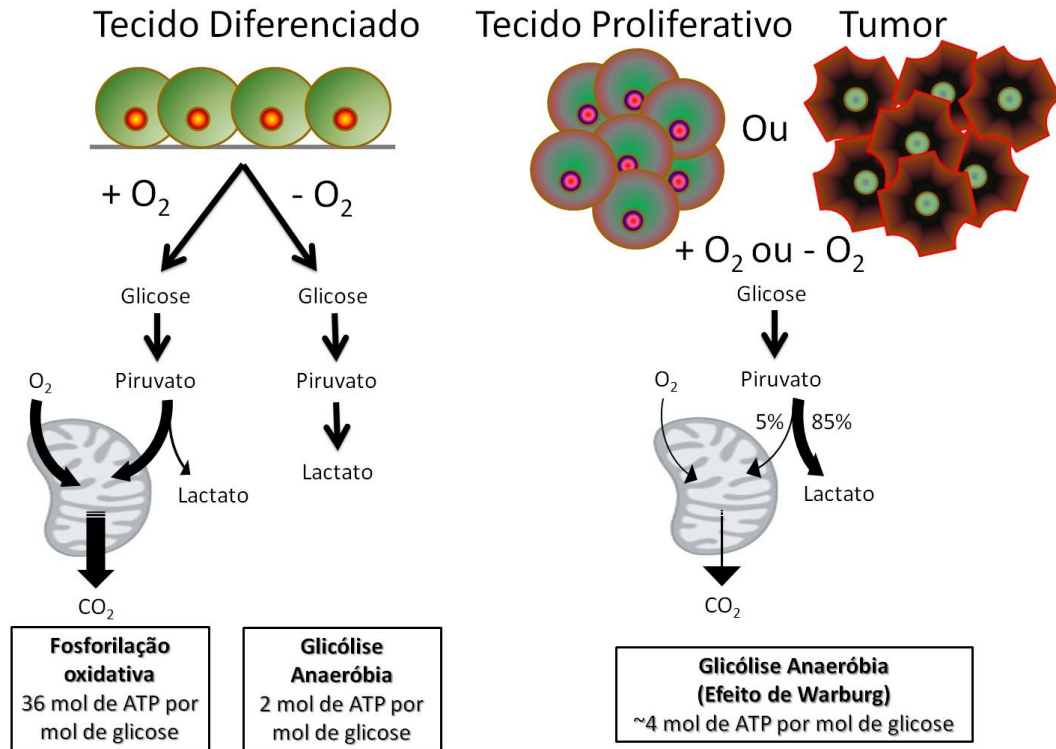


Figura 1. Em tecidos diferenciados (esquerda), em situação com presença de níveis normais de oxigênio ($+ O_2$), a glicose sofre glicólise formando piruvato e, este, por sua vez, dá origem principalmente aos intermediários do ciclo do ácido cítrico na mitocôndria, resultando como produto final dióxido de carbono (CO_2), esta chamada de fosforilação oxidativa possui eficiência de produzir 36 mol de ATP por mol de glicose, outra pequena parcela do piruvato formado irá dar origem à lactato. Em situação de níveis abaixo do normal de oxigênio ($- O_2$), a glicose sofre glicólise formando piruvato e este é integralmente convertido em lactato, nesta situação, a glicólise anaeróbia gera apenas 2 mol de ATP por mol de glicose. Em tecidos proliferativos ou tumorais (direita), em níveis normais de oxigênio ($+ O_2$) ou níveis abaixo do normal de oxigênio ($- O_2$), a glicose sofre glicólise formando piruvato, e este, por sua vez, é principalmente convertido à lactato (cerca de 85%), enquanto que apenas uma pequena parcela de piruvato é convertido aos intermediários do ciclo do ácido cítrico (cerca de 5%). Este processo é chamado de Efeito de Warburg e gera aproximadamente 4 mol de ATP por mol de glicose. Esquema adaptado de <https://www.charlifoundation.org/ketogenic-therapy/therapies-2/brain-tumor-cancer/item/1024-the-warburg-effect>.

Dentre as células ativadas na resposta inflamatória que apresentam essa mudança no metabolismo energético, podemos citar neutrófilos e macrófagos. Tanto neutrófilos quanto macrófagos, quando ativadas, produzem citocinas pró-inflamatórias, em especial IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) [18]. Além disso, essas células também produzem moléculas citotóxicas, como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que são essenciais para promover morte dos patógenos, mas que podem causar lesão celular no organismo hospedeiro [19]. Os neutrófilos são caracterizados pela produção da mieloperoxidase, e os grânulos ricos com essa enzima são liberados em resposta aos patógenos. No entanto, está descrito na literatura que elevados níveis circulantes dessa

proteína estão presentes em pacientes com AR. Níveis elevados desta enzima são capazes de aumentar a produção de espécies reativas no organismo, resultando em dano oxidativo [20].

Artrite Reumatoide

A artrite reumatoide (AR) é uma doença sistêmica inflamatória, autoimune, de etiologia desconhecida. Ela é caracterizada por sinovite crônica, simétrica e erosiva preferencialmente de articulações periféricas, resultando em deformidades e incapacitação [21]. Afeta 1% da população adulta com menos de 35 anos e mais de 2% com mais de 60 anos nos Estados Unidos [22]. Já no Brasil tem uma prevalência de aproximadamente 0,46% [23], e 1% na população mundial [24]. A doença ocorre 3 vezes mais em mulheres do que em homens e sua prevalência aumenta com a idade [25]. Estimativas recentes sugerem um custo anual para o tratamento de \$16 bilhões nos EUA [26], enquanto no Brasil uma estimativa mais recente calculou um gasto anual de R\$18,5 bilhões [27].

Apesar da AR ter sido descrita primeiramente na década de 50 [28], os critérios de diagnóstico começaram a ser melhor estabelecidos somente há 50 anos [29]. Estes critérios usados retratam a AR como uma doença séria de longa-duração com características extra-articulares dominantes, limitadas opções de tratamento e pior prognóstico [30]. Uma linha de pensamento mais moderna prefere considerar a AR como um síndrome clínica que abrange diversos subtipos de doença [31], os quais resultam na ativação de diversas cascatas inflamatórias [32] e que levam a uma via final comum, em que inflamação sinovial persistente e dano articular estão presentes.

Em relação ao risco de desenvolver AR, 50% são atribuídos a fatores genéticos [33]. Até o momento, a associação genética está principalmente nos genes de PTPN22 e HLA, enquanto não se encontrou associações fortes com outros grupos gênicos. Dentre as regiões genéticas em que há associações fortes, foram identificadas 30 regiões diretamente relacionadas com a AR [34, 35]. É interessante notar que estas regiões de importância estão contidas em somente 0,1% do total do DNA do ser humano. Estudos genéticos identificaram a associação destes mesmos loci de importância com outras doenças autoimunes, e alguns estão ligados a cascatas inflamatórias. Analisando estes conjuntos de estudos genéticos, pesquisadores acreditam que estes dados enfatizam que a AR é um grupo heterogêneo de síndromes sobrepostas.

O fator de risco ambiental mais forte para o desenvolvimento da AR é o fumo [36]. Outros fatores ambientais incluem consumo de álcool, consumo de café, níveis de vitamina D, uso de contraceptivos orais, periodontite bem como outras infecções [37]. Assim, o

desencadeamento da AR envolve fatores genéticos, fatores ambientais e defeitos na imunorregulação, que causam uma quebra da auto tolerância e ativa mecanismos que levam ao dano tecidual. A presença de auto anticorpos é característica típica da AR. Em estados mais avançados da doença, um número maior de epítomos são reconhecidos pelos auto anticorpos [38]. O fator reumatoide é um auto anticorpo clássico, usado como marcador prognóstico e diagnóstico da doença. Além disso, variados tipos de auto anticorpos contra proteínas citrulinadas (ACPA – anti-citrulinated protein antibodies) foram identificados. ACPA é um tipo de marcador que parece ser mais específico para o diagnóstico da AR [39] e sua presença está associada com maior dano articular e menor probabilidade de remissão [32]. Também se identificaram auto anticorpos contra colágeno [40], que parecem estar relacionados com dano articular mais acentuado no início da doença [41]. De 50 a 80% dos indivíduos com AR apresentam fator reumatoide, ACPA ou ambos [41].

Artrite Reumatoide e Síndrome da Caquexia

AR é fortemente associada à incapacitação e morte prematura [42]. Alguns sinais e sintomas são característicos desta população, como fadiga, fraqueza e perda muscular. Isso poderia ser explicado pelos altos níveis circulantes de citocinas e proteínas de fase aguda, somados à dor articular e diminuição do exercício físico, que podem causar perda muscular [43]. Nos pacientes com AR têm sido relatado até 66% de problemas relacionados com função muscular, limitando ainda mais a atividade destes pacientes e sua qualidade de vida. É importante ressaltar que estes pacientes por vezes apresentam uma redução na massa muscular mascarada pelo aumento da massa de gordura, levando a uma dificuldade maior na observação do processo de perda muscular [9].

Uma das mais evidentes condições clínicas que demonstram ligação entre o metabolismo e a inflamação é o quadro de caquexia [44]. Do grego, caquexia significa “cacos”: ruim e “hexis”: ter, ou seja, condição ruim, ela é definida como uma complexa mudança metabólica decorrente de doenças inflamatórias crônicas e o progresso da mesma, caracterizada principalmente por uma elevada taxa de perda na massa muscular [10, 11]. Caquexia é uma síndrome metabólica complexa associada à doença inflamatória crônica e caracterizada por perda de peso e perda de massa magra, com ou sem alteração de massa gorda [10]. É clara a participação do TNF- α no desenvolvimento desta síndrome. Também estão relacionadas com o seu desenvolvimento a IL-6 e a proteína C-reativa (PCR) [10].

A caquexia está associada a um pior prognóstico nos pacientes com AR [8] e alterações significativas no metabolismo energético e proteico têm sido elucidadas. Estudos demonstraram que pacientes com AR têm menor composição de massa celular. Essa redução de massa celular é um fator preditor de morte e morbidade em diversas doenças [45, 46].

A redução na massa celular inclui alterações no gasto energético, como redução no gasto energético diário total, aumento no gasto energético em repouso e baixo gasto energético em atividade física [13]. O metabolismo de proteínas na AR também sofre alterações, representadas pelo aumento no *turnover* proteico, o que, somado as alterações energéticas, caracteriza o um estado de hipermetabolismo proteico [47].

Nos achados clínicos da AR comumente se observa fraqueza muscular generalizada, ocasionado pela atrofia de fibras musculares, que pode desenvolver atrofia acentuada do músculo [48, 49]. Atrofia muscular pode decorrer de diversas condições clínicas, tais como desuso, idade avançada, desnutrição, doenças inflamatórias, infecciosas e autoimunes. Essas condições induzem a perda muscular por diferentes mecanismos de sinalização intracelular, por distintas cascatas, tais como, proteases lisossomais, proteases ativadas por cálcio e o sistema proteossomo [50]. Essas cascatas de sinalização intracelular podem levar à apoptose, ao aumento da degradação proteica ou ainda à diminuição da ativação das células satélites responsáveis pela regeneração muscular [49].

Estudos têm demonstrado que a degradação proteica [51] ou a diminuição da síntese proteica podem estar envolvidas na atrofia muscular [52]. Diversos estudos têm investigado a degradação proteica onde algumas proteínas como MuRF-1 (*muscle-specific ring finger protein-1*), enzima E3 do sistema ubiquitina-proteossomo que está associada ao sarcômero, possuem relativa importância na ativação de cascatas de proteólise [51, 52].

Olhando por outro prisma, a caquexia representa uma resistência anabólica em que há uma falha na capacidade de síntese proteica no músculo [12]. Dada a gravidade desta síndrome e a ausência de tratamentos efetivos, ela vem ganhando mais atenção na clínica [12]. A caquexia é mais comumente observada e documentada por oncologistas, entretanto, desde 1994 foi descrita a relação entre a perda muscular e inflamação crônica, com aumento de citocinas circulantes, em pacientes com perfil de caquexia e AR [13]. Como já ressaltado anteriormente, pacientes com AR podem perder massa magra sem perder peso ou até apresentar o perfil de ganho de peso via massa de gordura. Entretanto, é clara a presença de uma síndrome similar à da caquexia do câncer em pacientes com AR [13].

De acordo com esta principal diferença entre pacientes oncológicos e AR, tem sido sugerido o termo caquexia reumatoide como a síndrome que afeta estes pacientes em que há perda na massa muscular, com concomitante perda na sua função e força, sem apresentar necessariamente perda de peso ou até podendo apresentar ganho de massa de gordura [13]. Este termo não é amplamente aceito, mas será adotado por este estudo, já que as características da síndrome nos pacientes acometidos por diferentes doenças são em suma iguais, exceto pelo aspecto da alteração na massa de gordura.

Modelo Experimental de Artrite

Modelos animais são amplamente utilizados para estudos de doenças e seus fatores. A principal vantagem para seu uso é a possibilidade de se isolar fatores, já que modelos animais podem possuir: genética idêntica, oferta nutricional e influências ambientais controladas. Com estes fatores isolados, as pesquisas conseguem focar de forma mais específica e sensível para uma única variável e identificar mais claramente suas alterações. Dos vários modelos experimentais usados para mimetizar artrite, o modelo de artrite induzida por colágeno (do inglês, *collagen-induced arthritis* – CIA) é chamado de padrão ouro para estudos referentes à AR [53].

O modelo CIA apresenta inflamação nas articulações periféricas de forma simétrica, apresentando erosão cartilaginosa e óssea, hiperplasia da membrana sinovial, aumento de células mononucleares na articulação, neo angiogênese articular, presença de auto anticorpos (contra o colágeno do tipo II), aumento de citocinas inflamatórias circulantes (como TNF-alfa, IL-1beta e IL-6) e um contexto de inflamação crônica a longo prazo [53]. Todas as características citadas mimetizam o que ocorre com um pacientes com AR. Ademais, o modelo de CIA já foi utilizado amplamente para a avaliação inicial de diversos agentes terapêuticos para AR [54-56].

Por outro lado, está pouco presente na literatura estudos utilizando modelos animais como modelo de caquexia e, quando utilizado, os mesmos não são tidos como convincentes [1, 57]. Essa problemática é levantada porque estes modelos não desenvolvem a síndrome da caquexia de forma isolada, mas sempre resultante de alguma doença inflamatória crônica, como câncer [1]. Neste contexto, observando estudo prévio do nosso grupo, foi demonstrado que camundongos com artrite induzida por colágeno apresentaram achados compatíveis com os da caquexia. No desenvolvimento da doença foi possível observar diferença de peso entre saudável e doente, superior a 5%, com maior perda de massa magra e aumento da IL-6 [58]. Com estas evidências, o modelo de CIA em

camundongos DBA/1J se apresenta como um forte candidato para um modelo de caquexia, sendo mais específico à caquexia reumatoide.

Diagnóstico e Marcadores de Caquexia

Reconhecendo a importância do processo de atrofia muscular na AR e que até 66% dos pacientes apresentam quadro de caquexia há necessidade de diagnóstico sensível e precoce para esta síndrome, possibilitando o pronto manejo dessa complicação, ainda em suas fases iniciais. Atualmente, os critérios mais citados pela literatura para diagnóstico de caquexia são os definidos por Evans e colaboradores [10], sendo estes: perda de peso (superior a 5% nos últimos 12 meses), como primeiro critério a ser observado, seguindo por mais três dos cinco critérios a seguir: índice de massa corporal (IMC) inferior a 20 kg/m², diminuição da força muscular, diminuição do apetite (anorexia), fadiga, e de alteração de parâmetros bioquímicos e imunológicos, tais como elevação de IL-6, elevação de proteína C reativa, redução de hemoglobina e redução de albumina sérica. Apesar desses critérios de Evans serem precisos e eficientes para diversas situações, ainda não existe um consenso para diagnóstico da caquexia, havendo muitas pesquisas utilizando outros parâmetros para avaliar um paciente com caquexia, como o uso de um ponto de corte para a perda de peso ou até a presença de uma série de sintomas relacionados à função muscular, por exemplo [59].

Até o momento, para tentativa de diagnóstico do processo de perda muscular, o maior problema reside na precisão em avaliar as mudanças e o estado do músculo esquelético nos pacientes [60]. As formas para identificar a perda muscular têm sido diversas, como: medidas antropométricas, análise por bioimpedância elétrica, técnicas de imagem (tomografia computadorizada, imagem por ressonância nuclear, “*dual x-ray absorptiometry*”), pesquisa de moléculas (contagem de potássio-40 total), quantidade de creatinina na urina, ultrassom, e demais testes funcionais focados em músculo. Alguns problemas são observados nas formas de identificar a perda muscular como o exemplo: falham em termos de sensibilidade ou especificidade na hora do diagnóstico, alguns possuem altos custos, ou ainda não poderiam ser realizados com grande frequência por conta do prejuízo à saúde do paciente (por exemplo, exposição frequente à radiação) [60-62].

Ainda, a literatura vem apresentado diversos marcadores com potencial para detecção e diagnóstico de processos relacionados à perda muscular, como: uso isótopo radioativo de 3-metil-histidina [63], quantificação de fragmento C-terminal da agrina [64], quantificação de

creatinina [65, 66], atividade da creatina kinase [67], quantificação de fragmento do colágeno do tipo 6 [63], uso de isótopo radioativo da fenilalanina [68], dentre outros. Muitos destes marcadores podem ser identificados no soro e alguns na urina e ainda há estudos em andamento para o processo de validação, identificação de novos marcadores, testes de sensibilidade e especificidade (para revisão vide [63]).

A partir dos critérios sugeridos por Evans (2008), estes parecem ser mais fidedignos para determinação da síndrome nos pacientes oncológicos do que em outras doenças, como nos pacientes reumatológicos, conforme demonstrado previamente [69]. Desta forma, a busca por marcadores que possam representar o quadro de caquexia poderiam auxiliar o diagnóstico da síndrome na artrite reumatoide, bem como direcionar no tratamento para a mesma [43].

Metabolômica

A metabolômica é um novo ramo de pesquisa que trata da biologia de sistemas, juntamente com a genômica, transcriptômica e proteômica [70]. Esta abordagem vem ganhando grande força no campo da investigação de biomarcadores que sirvam para prognóstico, diagnóstico e acompanhamento de doenças, por se tratar de uma técnica sensível, abrangente, com alto grau de reprodutibilidade e custo acessível por amostra. Além do mais, esta técnica pode ser utilizada em diversos tipos de amostras, como urina e outras excretas, sendo identificado como “footprinting” metabólico (tradução livre: marca da pegada ou evidência). Desta forma, a metabolômica é utilizada para evidenciar diferenças entre situações de saúde e doença focando principalmente na pesquisa de biomarcadores para estas doenças [71].

Existem algumas formas de obter perfis metabólicos a partir de diferentes amostras para busca de biomarcadores [72]. Pode-se citar a obtenção deste perfil a partir de espectrometria de massas ou por ressonância nuclear magnética (RNM) [72-74]. A técnica de RNM faz com que todos os átomos de hidrogênio presente na amostra se alinhem ao campo gerado e capta o tempo de retorno de cada conjunto de hidrogênios à sua posição inicial (gera um espectro de uma dimensão, 1D; Figura 2) [75]. Ainda, durante a aquisição deste espectro, diferente número de ligações presentes nos átomos ligados ao de hidrogênio irão gerar sinais simples ou múltiplos, de acordo com o tipo de ligação encontrada (ligação simples, dupla, tripla, etc). Outra forma de adquirir informação a partir da ressonância magnética é gerar um campo eletromagnético e fazer mais de um registro referente ao retorno dos átomos à sua orientação original, de forma que há uma aquisição considerada em duas dimensões (2D J-res; Figura 3) [75-77]. Dessa forma, a partir de uma

amostra, pode-se adquirir um espectro contendo informação quanto a sua composição química e concentração pelo perfil de ressonância com o hidrogênio das moléculas que compõe esta amostra.

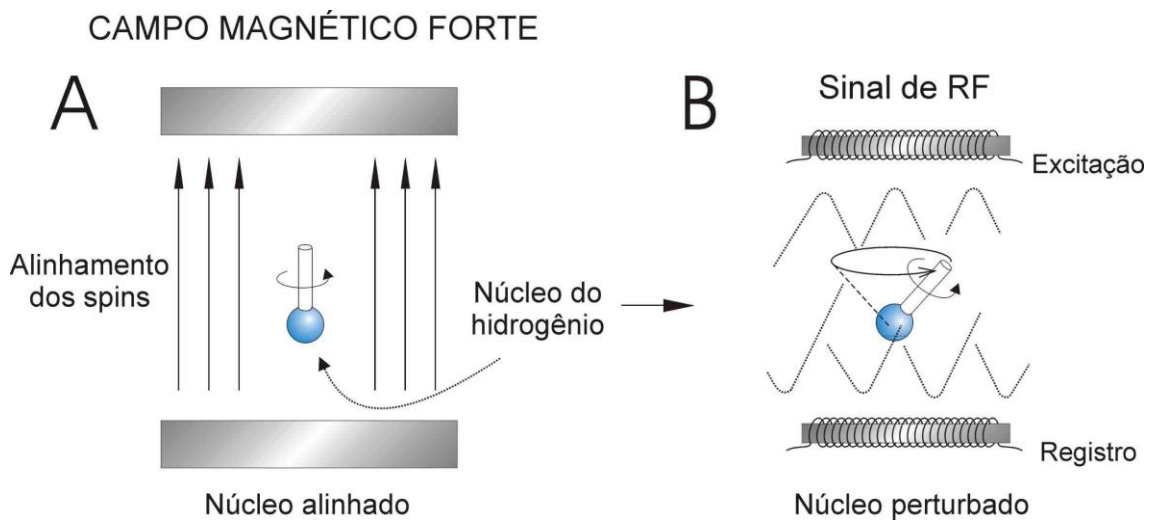


Figura 2. O núcleo atômico produz um sinal de ressonância magnética da seguinte forma: quando elementos com um peso atômico par, como o hidrogênio, são expostos a um campo magnético estático, forte e homogêneo, os núcleos dos átomos se comportam como magnetos e seus spins se alinham na direção do campo aplicado (A). O alinhamento dos spins dos núcleos pode ser perturbado por um pulso curto de ondas de rádio (do inglês, "radio frequency" - RF), como no caso de ressonância nuclear magnética para fins de imagem, ou ondas com maior energia (de 60 à 1000 MHz), como no caso para perfil metabólico. A perturbação referida serve para tirar os spins do núcleo de sua orientação paralela ao campo magnético e para fornecer a energia necessária para movimentos do tipo giroscópio dos spins dos núcleos, denominados de precessão. Quando o pulso de ondas é apagado, o núcleo tende a voltar para sua situação original e, assim fazendo, libera energia em forma de ondas de rádio (B). A frequência dessas ondas de rádio são distintas para diferentes espécies de átomos, assim como para um dado átomo em diferentes meios químicos ou físicos. Portanto, os núcleos ressonantes tornam-se transmissores de ondas de rádio com frequências características e revelam sua presença na amostra pelos seus sinais RF. Núcleos diferentes absorvem energia de ondas de frequência diferente. A habilidade do núcleo atômico de absorver energia de ondas é denominada ressonância magnética nuclear, dando o nome ao experimento. O núcleo atômico, tendo absorvido energia pelas ondas aplicadas externamente, libera esta energia como um sinal ao retornar ao seu estado de menor energia. A taxa com a qual um núcleo volta ao seu estado de energia mais baixa é chamada de relaxação e é inicialmente descrito por sua constante de tempo (T). Há dois tipos de relaxação de importância em ressonância magnética: relaxação "spin-lattice" (rotação-quadratura) ou T1 e relaxação "spin-spin" (rotação-rotação) ou T2. Para um átomo em particular, esses tempos de relaxação variam de composto para composto. Por exemplo, o hidrogênio tem um tempo de relaxação muito mais curto em lipídios (ou gorduras) do que na água. Tempos de relaxação podem também variar de acordo com a condição local da mostra, tais como, composição principal do diluente sendo água ou outro composto.

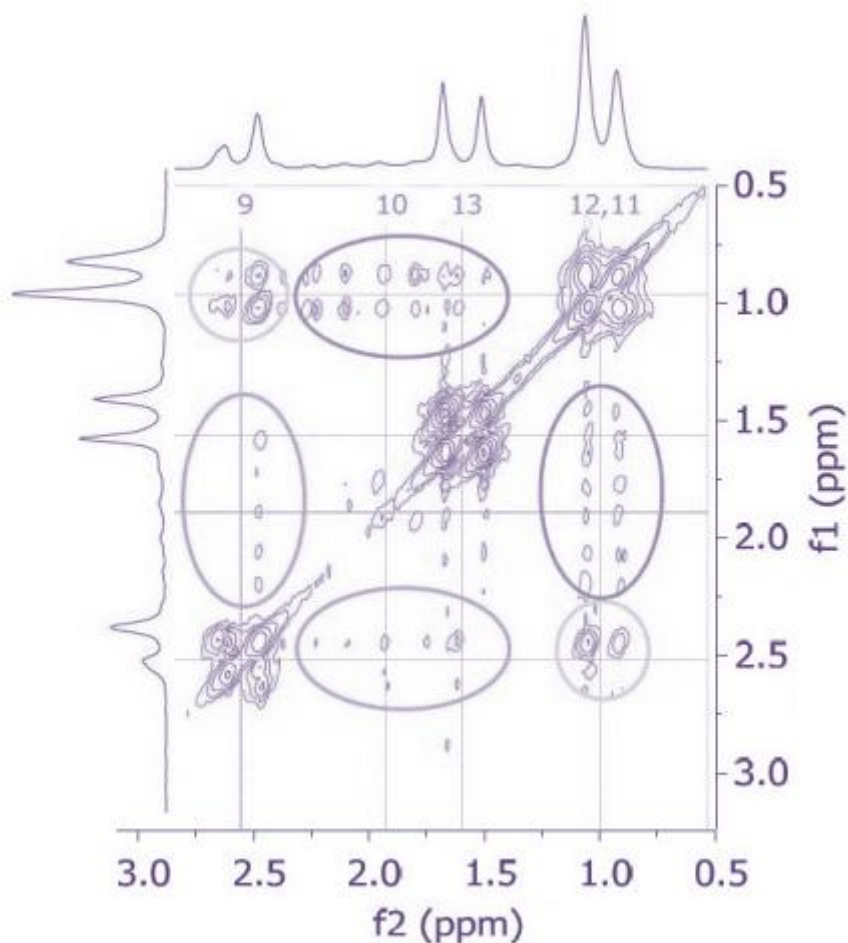


Figura 3. O gráfico representa uma aquisição em duas dimensões. A primeira dimensão é adquirida por uma leitura padrão de ressonância. Já a segunda, é obtida por um acompanhamento do sinal em um tempo secundário e posterior. O segundo sinal valida a posição e intensidade da primeira leitura, facilitando a identificação do composto e possibilitando uma melhor resolução e quantificação dos compostos. Esta leitura em duas dimensões é chamada de 2D J-res. Representação adaptada da leitura parcial da droga ibuprofeno.

A partir da aquisição dos espectros, inicia-se a etapa de processamento do espectro “cru” para que este possa ser utilizado para identificação dos compostos e processamento estatístico [78]. Os espectros “crus” são alinhados, de forma que os picos dos mesmos compostos em diferentes amostras estejam em um mesmo intervalo de aquisição, isto é feito com base em um padrão externo adicionado em todas as amostras na mesma concentração, com a presença de um pico homogêneo, presente como ponto zero da aquisição (Figura 4) [78]. Após, estes picos são separados em intervalos (“binning”) iguais. Esta etapa possibilita que os picos possam ser utilizados nas ferramentas estatísticas.

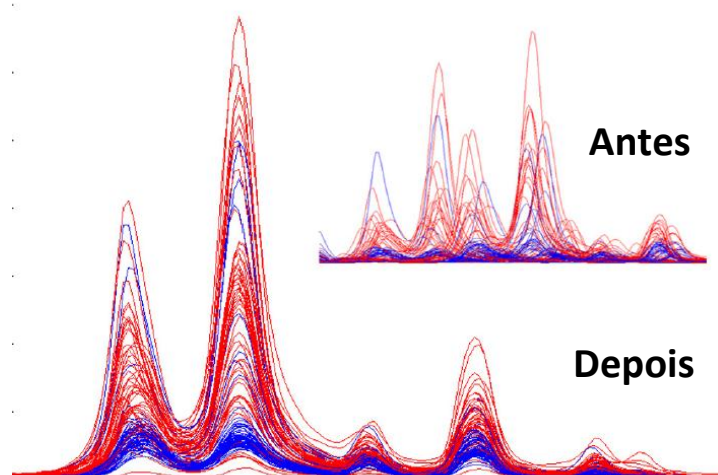


Figura 4. Durante o processo de aquisição de espectro via RNM, pode haver uma demora em valor de tempo muito pequeno, mas que acaba “desalinhando” a aquisição de seu verdadeiro ponto inicial. Para que os espectros possam ser diretamente comparáveis, estes devem ser alinhados de acordo com um padrão externo adicionado em cada amostra. Aqui está a representação de espectros antes (painel superior menor) e após (painel inferior maior) alinhamento através de molécula sintética externa adicionada à amostra [78]. Após o alinhamento dos espectros, é possível identificação das mesmas moléculas e uso na etapa estatística.

No próximo passo do processamento, como não há uma forma de normalização da concentração dos compostos na amostra, já que algumas podem ter conteúdo de água maior que outras ou ter evaporado mais água que outra, gerando fatores de confusão, o que é realizado durante o processamento do espectro é uma normalização pela área total do espectro. Desta forma, todos os espectros possuem um percentual da concentração original, ou seja, somando a concentração de todos os compostos identificados em cada espectro, o total será sempre o mesmo, diferindo apenas no percentual de cada composto encontrado.

Por fim, para diminuir o ruído de fundo, que atrapalha todas as etapas estatísticas, utiliza-se de uma série de transformações matemáticas (por exemplo, transformação logarítmica) em que sinais de compostos com pequena concentração podem ser perdidos, entretanto, todos os sinais que são mais fortes que o ruído, estes são melhor evidenciados. Esta etapa permite que o ruído não participe da análise estatística e, ainda, permite uma melhor distinção entre os picos de diferentes amostras. A Figura 5 apresenta detalhadamente todas as etapas do processamento do espectro, desde o momento de sua aquisição.

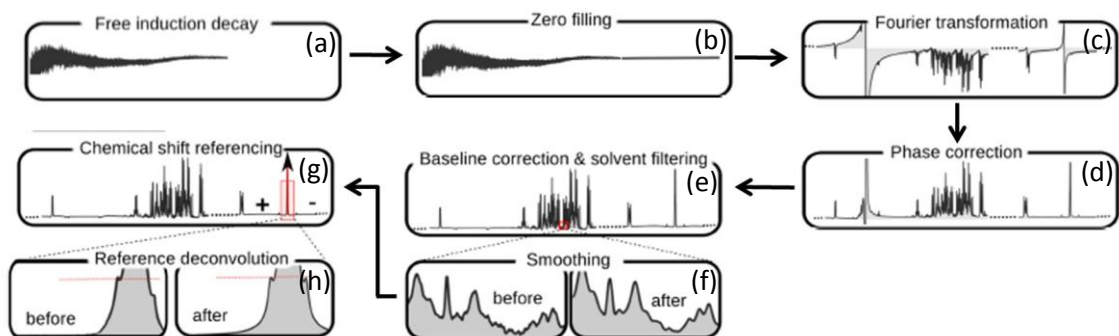


Figura 5. O espectro oriundo da aquisição do equipamento de ressonância nuclear magnética é um sinal com decaimento livre como representado no primeiro painel (a). Este espectro recebe um preenchimento de sinal nulo (“zero filling”) em cada sinal adquirido (b), este preenchimento resulta em maior qualidade e uma melhor definição do sinal. Em seguida, os picos sofrem a transformação de Fourier (c), esta transformação faz o sinal obtido por tempo ser decomposto em sua frequência. No próximo passo, há uma correção na fase do espectro (d), em que todos os picos “inversos” (com relação negativa à linha de base) são espelhados para se tornar “positivos” (em relação positiva à linha de base). Em seguida, há uma correção na linha de base (e) e se retirando principalmente o sinal do solvente (água, por exemplo), seguido de um efeito que torna o sinal mais suave, em que se remove majoritariamente o ruído (f). Por final, todos os espectros são alinhados (g) em referência a seu pico de referência (composto adicionado a todas as amostras) e, ainda, há a deconvolução dos picos, que faz com que todos os picos se tornem nitidamente espelhados (h) [79].

A partir do momento em que os espectros estão processados, há duas etapas que podem ocorrer de forma concomitante: a identificação dos compostos e o processamento estatístico. A identificação dos compostos ocorre de acordo com o tipo de espectro obtido. O programa Chenomx é utilizado para a identificação dos compostos a partir dos espectros de 1D [79, 80]. Este programa permite que o usuário utilize de um banco de perfis de picos para diversos metabólitos (cerca de 40.000, para bancos relacionados a metabólitos de origem humana) em que o usuário vai identificando um a um cada pico no espectro (Figura 6; vide [79] para detalhamento do processo) e, após, há uma automação capaz de gerenciar a identificação destes mesmos compostos em todos os outros espectros (quando presentes) [70, 79]. Existe outra forma de identificação dos compostos, que é por automação ligada a um banco de dados contendo diversos espectros de compostos puros, as conhecidas bibliotecas, estas podem ser utilizadas para identificação e também quantificação de diversos compostos de forma totalmente automática, mas estas necessariamente se utilizam apenas dos espectros adquiridos pela ferramenta de duas dimensões, ou seja, o 2D J-res. As bibliotecas automáticas são servidores online que possuem a identificação em duas dimensões de diversos padrões de picos puros (um único espectro para um único metabólito). Há limitações nesta aquisição, pois não há nenhuma etapa em que o usuário possa validar o resultado ou confrontar com outras formas de identificação. Outra limitação é que o banco é capaz de identificar apenas os compostos já

apresentados no banco, compostos não presentes no banco são simplesmente ignorados. Para este trabalho, utilizou-se a Birmingham Metabolite Library (BML) [81], que foi possível identificar 208 metabólitos nas amostras de camundongo deste estudo.

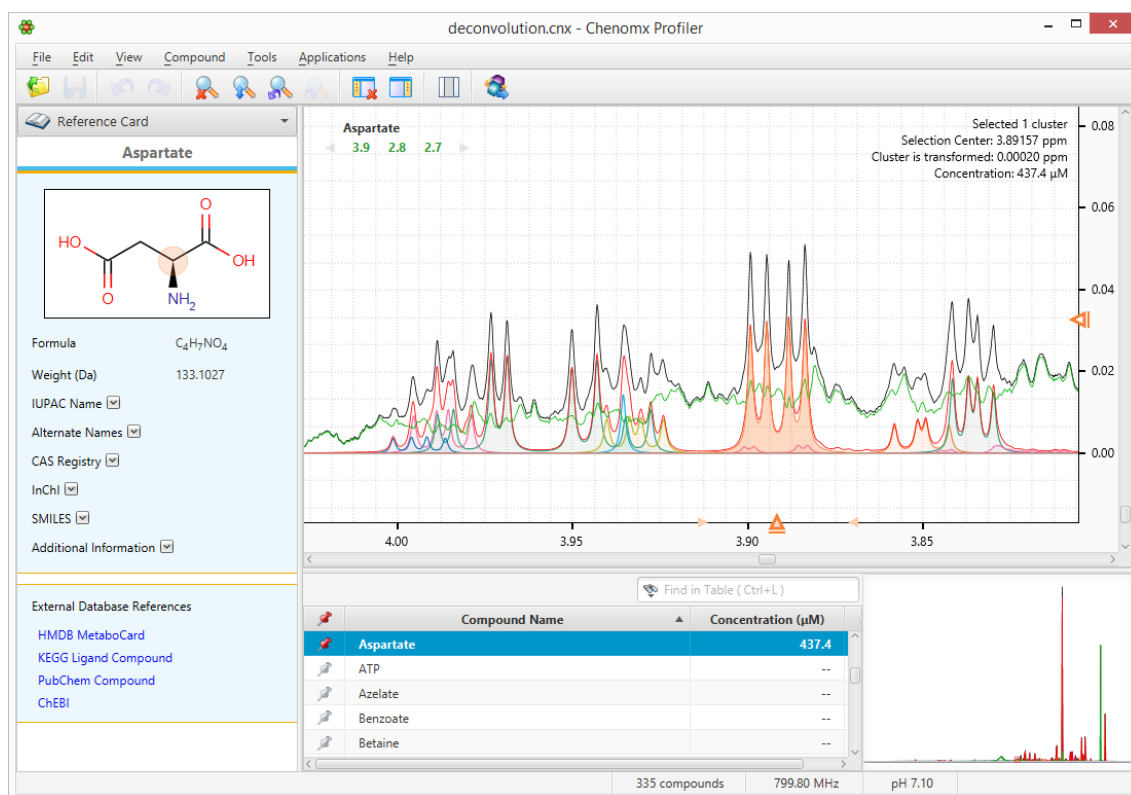


Figura 6. Representação da interface de identificação dos compostos via Chenomx. No painel de maior importância, o espectro adquirido e processado é representado por uma linha preta. Os compostos identificados são apresentados por linhas de diferentes cores. A somatória de compostos apresenta um perfil em vermelho. O composto que está sendo identificado e sua intensidade sendo ajustado para melhor se enquadrar a amplitude do sinal, neste caso o "Aspartate", fica em vermelho com uma sombra vermelha. O programa possui uma série de ferramentas que permitem que o usuário identifique diversos compostos e oferece quais são as possibilidades de compostos em cada período de tempo da aquisição, restringindo e facilitando o usuário a identificar qual perfil de picos pertence ao perfil observado no intervalo de tempo em questão. Imagem da interface do usuário.

Por final, o maior desafio das técnicas envolvendo a metabolômica é o processamento estatístico e interpretação dos resultados. Para isso, foram criados programas de computador complexos capazes de processar o grande número de dados obtidos pelos perfis metabólicos e criar um sistema de ranqueamento para diferenciação entre os grupos que classificam previamente a amostra. Destes programas, o Matlab é um programa muito utilizado, capaz de processar centenas de milhares de metabólitos distribuídos em diversos grupos, de forma sensível, reproduzível e estatisticamente robusta [82].

Dos vários testes e modelos que avaliam o agrupamento e diferenciação entre grupos dos perfis metabólicos, um amplamente utilizado é o "Principal Component Analysis" (PCA)

para agrupamento e avaliação de homogeneidade de um grupo de amostras, enquanto que o “*Partial Least Square Discriminant Analysis*” (PLSDA) é a análise mais amplamente utilizada para distinção entre dois grupos e criação de um ranqueamento de metabólitos com valores de importância de acordo com a homogeneidade do grupo e a diferença entre os grupos testados no modelo [82, 83]. Como ferramenta interna para tornar a análise ainda mais robusta e clara, há o teste concomitante chamado “*Veatinan Blind Test*” (VBT) que seleciona aleatoriamente um grupo de amostras que não serão incluídos no modelo e não serão utilizadas suas informações de qual grupo pertencem e, após a construção do modelo oriundo pela análise de PCA e PLSDA, verifica-se quanto esta amostra se encaixa no modelo, oferecendo, dessa maneira, valores de sensibilidade e especificidade [82].

Apenas para tornar o mais claro possível, no contexto de metabolômica, o teste de PCA serve para avaliar o quanto cada grupo é homogêneo, sem considerar os outros grupos entre si. Já o teste de PLSDA avalia o quanto um grupo é diferente dos demais na análise. Por fim, o VBT apresenta quão sensível e específico são os modelos criados são capazes de classificar uma amostra através de seu perfil metabólico.

Há ainda outras ferramentas que podem ser utilizadas para a análise metabolômica. Algoritmos distintos foram criados em diferentes softwares para obter esta separação e ranqueamento de melhor metabólito. Por exemplo, o Galgo é um algoritmo genético, um *plug-in* do programa R, que é capaz de considerar os metabólitos como genes em um genoma e, via lógica de evolução genética, criar um ranqueamento de importância a partir do perfil metabólico, levando em conta a classificação de grupos [84, 85].

Após a etapa estatística e obtenção do ranqueamento metabólico, realiza-se uma busca por rotas metabólicas que possuem importância para o modelo estudado, que é feita uma busca pela presença de um grupo de metabólitos distinto entre os grupos analisados e comum a uma mesma rota. Dentre as ferramentas utilizadas, o sítio www.metaboanalyst.ca é uma ferramenta muito poderosa para este fim [86-88]. O banco de dados utilizado são os mais completos em termos de conteúdo e informação sobre metabólitos, sendo o KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), o PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) os bancos utilizados. Com esta ferramenta, pode-se inferir que uma rota metabólica está se comportando de maneira significativamente diferente entre os grupos comparados; quanto maior o número de metabólitos encontrados como diferentes pelo ranqueamento do PLSDA e de uma mesma rota metabólica, menor é o valor de significância para a rota (valor p), e quanto maior número de metabólitos presente em cada etapa da rota, maior o valor de importância da rota, sendo este valor de importância um total

máximo igual a 100%. Vide Figura 7 para uma representação com o caso do metabolismo da histidina.

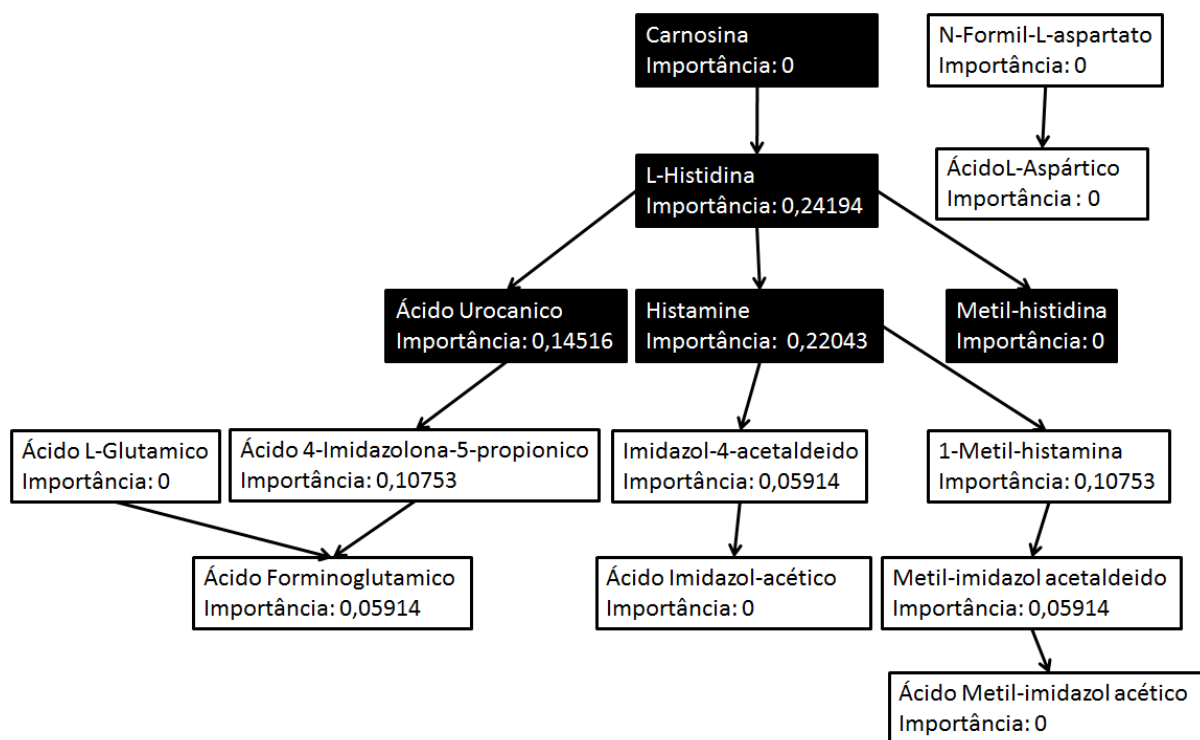


Figura 7. Representação da rota do metabolismo da histidina com os valores de importância do sítio www.metaboanalyst.ca. Os compostos grifados em cinza representam aqueles que foram identificados pelo ranqueamento através do modelo de PLSDA, por exemplo. Neste exemplo, a rota do metabolismo da histidina possuiria um total de 5 compostos que batem com a rota, de um total de 15, teria um valor p igual a $6,35 \times 10^{-11}$ e um impacto de 60,7%.

Em paralelo, muito recentemente foi desenvolvida uma técnica para se aplicar um modelo de regressão de múltiplas análises acoplado com o processamento estatístico do PLSDA, sendo chamado de PLSR [89]. Esta técnica utiliza um parâmetro externo aos metabólitos e relacionado a cada amostra para fazer a regressão. A partir deste parâmetro externo, o programa gera um modelo de quais metabólitos são importantes para o parâmetro em questão e faz-se o ranqueamento destes, incluindo um a um cada metabólito até o último identificado. A cada metabólito adicionado, há um acréscimo ou decréscimo no valor de R^2 no modelo, gerando uma curva do R^2 para todos os metabólitos, sua contribuição para este modelo e em relação ao parâmetro em questão. A limitação desta abordagem é o número de metabólitos que podem ser adicionados à análise para o tempo total de processamento de cada regressão, ou seja, para análise de regressão de aproximadamente 200 metabólitos, um intervalo total de tempo de 12h é o suficiente para a análise. Já um número superior, como 2000 metabólitos, haveria necessidade de cerca de 30 dias para terminar a análise.

Metabolômica e AR

A técnica de metabolômica parece ser muito bem proveitosa para estudos sobre com artrite reumatoide. Como uma resposta final ao ambiente da doença, os metabólitos podem indicar como os pacientes reumatológicos respondem ao ambiente, nutrição, progressão da doença, infecções, exposição a agentes xenobióticos, ao tratamento farmacológico e dentre outras influencias.

No contexto de AR, ou ainda caquexia reumatoide, ambas as situações são heterogêneas. Para exemplificar a complexidade, podemos citar simplesmente que a gravidade da doença é intimamente correlacionada com o tempo de diagnóstico, começo do tratamento, eficácia do tratamento e gênero do paciente. Quanto mais tarde o paciente leva para iniciar o tratamento, maior a chance de a doença acarretar outras complicações, como aterosclerose e perda muscular. Ademais, pode-se citar diferenças existentes entre os pacientes, que torna um grupo heterogêneo para avaliação do perfil metabólico, como: influências ambientais – tabagismo; hábitos culturais – alimentação; e diferença genética geral – descendência. Estes aspectos influenciam direta ou indiretamente no perfil metabólico, na doença e no seu desenvolvimento. Em se tratando de caquexia reumatoide, hábito alimentar baseada em uma dieta hipercalórica e de falta de atividade física, culminando em um quadro de obesidade, por exemplo, podem dificultar a suspeita de caquexia por haver um ganho de peso e assim mascarar a redução da massa muscular. Pensando na pesquisa de biomarcadores, com todas as variáveis apresentadas, seria necessário um estudo com um número muito elevado de pacientes e uma análise muito complexa para poder identificar algum potencial marcador de perda muscular que serviria como prognóstico, diagnóstico e/ou acompanhamento durante o tratamento.

Quando levamos em conta o tratamento do paciente com AR, o perfil metabólico se altera drasticamente, tornando a busca por um biomarcador ainda mais complexa. Por exemplo, o perfil metabólico de um paciente tratado com antagonista de TNF-alfa resulta em aumento dos níveis urinários de: glutamina, ácido fenilacético e histamina; já o tratamento com infliximabe apresenta um aumento no ácido hipúrico, citrato e ácido láctico; com o uso do etanercepte, observa-se o aumento de colina, ácido fenilacético, uréia, creatina e metilamina [90]. Isso sem citar a redução de diversas outras moléculas relacionadas com cada tratamento (vide [90]).

Estudos anteriores de perfil metabólico em pacientes com AR já mostraram as alterações em relação aos controles saudáveis, podendo ser citadas alterações nas rotas: do metabolismo do inositol fosfato; metabolismo de lipídeos, de ácidos graxos e de

carboidratos; metabolismo energético; metabolismo de ácidos nucléicos; metabolismo de espécies reativas de oxigênio; metilação; bem como na resposta macrofágica [71]. Destes estudos, destacam-se os amino ácidos essenciais, aqueles que não podemos produzir *de novo* no corpo humano, que são sugeridos como potenciais biomarcadores de degradação proteica [44]. Ainda, analisando amostras sorológicas de pacientes com AR e artrite psoriática, estudos metabolômicos são capazes de discriminar as amostras com uma sensibilidade de 90% e 94% de especificidade [91], por outro prisma, a técnica também possui capacidade de prever a resposta ao tratamento com agentes anti-TNF-alfa com sensibilidade de 88,9% e 85,7% de especificidade [90], ou seja, esta abordagem possui grande capacidade discriminatórias.

A literatura prevê avanços futuros via abordagem metabolômica, com interesse particular às doenças reumáticas, tanto na busca e identificação de novos biomarcadores como no acompanhamento de agentes terapêuticos [70]. Então, levando-se em conta todos os aspectos de complexidade da AR, da síndrome da caquexia reumatoide, das influências dos diferentes tratamentos e outros fatores levantados, um modelo animal que possa mimetizar a doença e suas complicações, mas com contexto controlável, ou seja, genética, ambiente e hábitos alimentares controlados, este modelo animal seria uma ferramenta muito útil na busca por biomarcadores através do estudo do perfil metabólico. Portanto, considerando também a gravidade da caquexia reumatoide e a ausência de marcadores que indiquem o desenvolvimento desta síndrome, o objetivo deste projeto é identificar biomarcadores relacionados ao início do processo de caquexia (prognóstico) e diagnóstico do mesmo.

Marco Teórico

Segue o marco teórico da problemática da pesquisa (Figura 8).

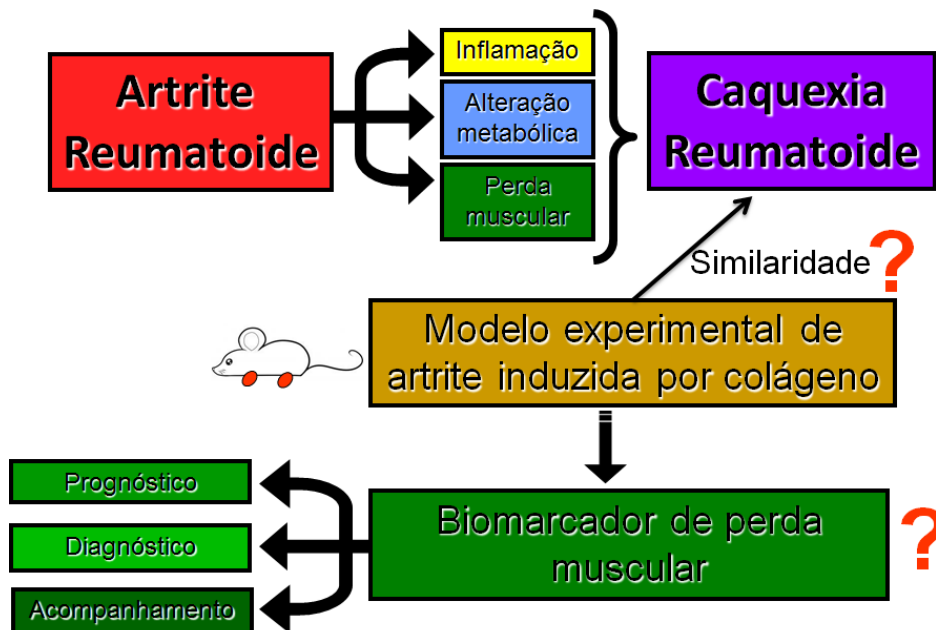


Figura 8. Marco teórico esquemático apresentando a problemática da pesquisa. Boa parte dos pacientes com AR apresentam inflamação, alteração metabólica e perda muscular, em um quadro que pode progredir para a chamada síndrome da caquexia (caquexia reumatoide). Para estudos científicos, não existe ainda um modelo experimental que apresente o mesmo quadro que o observado em pacientes com AR e caquexia. Ademais, pacientes com AR podem desenvolver caquexia e apenas ser diagnosticados por técnicas que, em sua maioria, são de alto custo ou baixa sensibilidade ou baixa especificidade, entretanto, atualmente não há método de análise para predição desenvolvimento da síndrome e acompanhamento para o caso de efeito de possíveis tratamentos.

Justificativa

Considerando a gravidade da caquexia reumatoide, a ausência de modelo experimental para pesquisa experimental e ausência de marcadores que indiquem o desenvolvimento desta síndrome, é de suma importância a identificação de um modelo experimental que possa ser utilizado para estudos da síndrome bem como identificar biomarcadores relacionados ao início do processo e ao prognóstico da mesma. Com a identificação de um modelo experimental que se comporte de forma similar ao paciente, oportunidades surgem para melhoria na pesquisa com benefícios diretos na área clínica e de pesquisa. Já com um estudo extensivo do perfil metabólico relacionado com o progresso da síndrome da caquexia reumatoide, há possibilidade de identificação de biomarcadores relacionados com prognóstico e diagnóstico.

Objetivos

Objetivos Gerais

Avaliar se o modelo de artrite induzida por colágeno também desenvolve características da caquexia reumatoide.

Estudar o perfil metabólito obtido via ressonância nuclear magnética para identificar diferenças metabólicas na urina de CIA que podem potencialmente ser usadas para prever e acompanhar o progresso da caquexia.

Objetivos Específicos

1. Estudar os parâmetros clínicos associados à síndrome de caquexia no modelo experimental de artrite, através das medidas de:

- Peso;
- Ingestão de alimento (Anorexia);
- Força;
- Locomoção espontânea;
- Teste de desempenho físico;
- Determinação da perda de massa magra (peso do músculo e relação sarcoplasmática).

2. Identificar potenciais biomarcadores de perda muscular encontrados no perfil metabólico da urina no modelo experimental de artrite;

3. Correlacionar os parâmetros clínicos associados à síndrome de caquexia reumatoide com o perfil metabólico da urina no modelo experimental de artrite.

Desenho experimental

O desenho experimental a seguir foi realizado neste trabalho para aquisição de todos os resultados (Figura 9).

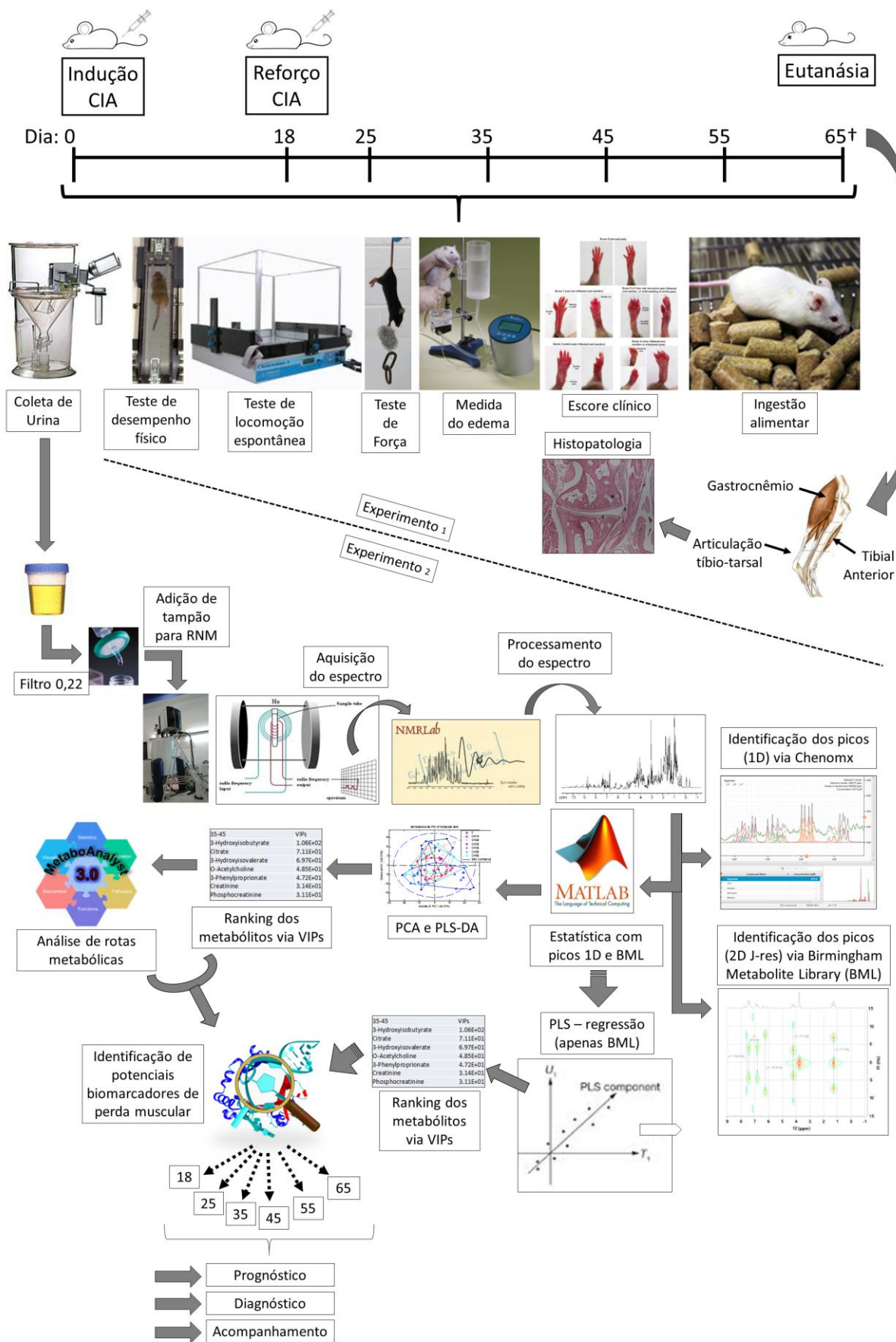


Figura 9. Desenho experimental esquemático apresentando todas as etapas experimentais para aquisição dos resultados. Os materiais e métodos necessários estão todos apresentados neste esquema, respeitando a ordem necessária para sua execução. O experimento 1 foi todo realizado no HCPA enquanto o experimento 2 foi todo realizado na University of Birmingham, Reino Unido. No experimento 1, os camundongos machos DBA/1J com 8 à 12 semanas de idade foram induzidos (CIA, n=13) com

(continuação Figura 9): colágeno bovino do tipo II (data estabelecida como dia zero), receberam reforço 18 dias após a primeira injeção ou mantidos saudáveis sem indução (CO, n=11). Os animais foram acompanhados nas datas de 0, 18, 25, 35, 45, 55 e 65 dias após a primeira injeção, foram: coletadas urinas por 6h em gaiolas metabólicas; realizado teste de desempenho físico; realizado teste de locomoção espontânea; realizado teste de força; medida do volume do edema da pata traseira com pletismômetro; acompanhado desenvolvimento da doença pela avaliação do escore clínico; foram pesados; e acompanhada a ingestão alimentar. Após 65 dias, os animais foram eutanasiados e foram coletados tecidos musculares (gastrocnêmio e tibial anterior) para pesagem e realização da razão sarcoplasmática, e a articulação tíbio-tarsal foi coletada para realização de histologia e confirmação da histopatologia. No experimento 2, a urina coletada dos animais CO e CIA foram filtrados, adicionado tampão para realização de ressonância nuclear magnética e aquisição do espectros (1D e 2D J-res). Os espectros adquiridos foram processados pelo NMRlab. Estes espectros processados foram utilizados para identificação pelo Chenomx (1D), e identificados e quantificados pelo Birmingham Metabolite Library (BML; 2D J-res). Foi realizada a estatística apropriada dos espectros processados e as quantificações obtidas pelo BML via Matlab, utilizando a técnica de PCA e PLSDA. O ranqueamento de metabólitos obtidos pelos modelos estatisticamente significantes foram analisadas as rotas metabólicas envolvidas via Metaboanalyst. Em paralelo, os dados obtidos pelo BML foram utilizados para as regressões (PLSR) envolvendo todos os parâmetros obtidos durante o experimento 1 in vivo. Por final, metabólitos obtidos pelos modelos de PCA, PLSDA e PLSR que apresentaram significância foram filtrados para rotas metabólicas que ocorrem no músculo para identificação de potenciais biomarcadores de perda muscular e distribuídos em relação ao tempo em que foram obtidas para uma análise tempo dependente, ou seja, para classificação de potencial biomarcador para prognóstico, diagnóstico e acompanhamento do processo de perda muscular.

Referências

- [1] M. Romanick, L.V. Thompson, H.M. Brown-Borg, Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1832(9) (2013) 1410-1420.
- [2] G.Y. Chen, G. Nunez, Sterile inflammation: sensing and reacting to damage, *Nature Reviews Immunology* 10(12) (2010) 826-837.
- [3] D. Okin, R. Medzhitov, Evolution of Inflammatory Diseases, *Current Biology* 22(17) (2012) R733-R740.
- [4] E.M. Palsson-McDermott, L.A.J. O'Neill, The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases, *Bioessays* 35(11) (2013) 965-973.
- [5] C.N. Serhan, N. Chiang, T.E. Van Dyke, Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators, *Nature Reviews Immunology* 8(5) (2008) 349-361.
- [6] G.S. Hotamisligil, E. Erbay, Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases, *Nature Reviews Immunology* 8(12) (2008) 923-934.
- [7] G.S. Firestein, **Evolving concepts of rheumatoid arthritis**, *Nature*, 2003, pp. 356–361.
- [8] J. Walsmith, R. Roubenoff, Cachexia in rheumatoid arthritis, *International Journal of Cardiology* 85(1) (2002) 89-99.
- [9] D.R. Thomas, Loss of skeletal muscle mass in aging: Examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia, *Clinical Nutrition* 26(4) (2007) 389-399.
- [10] W.J. Evans, J.E. Morley, J. Argiles, C. Bales, V. Baracos, D. Guttridge, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W.E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F.R. Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe, S.D. Anker, A. Boyce, G. Nuckolls, Cachexia: A new definition, *Clinical Nutrition* 27(6) (2008) 793-799.
- [11] M. Muscaritoli, S. Lucia, A. Molino, T. Cederholm, F. Rossi Fanelli, Muscle atrophy in aging and chronic diseases: is it sarcopenia or cachexia?, *Internal and Emergency Medicine* 8(7) (2013) 553-560.
- [12] C. Lok, THE LAST ILLNESS, *Nature* 528(7581) (2015) 182-183.
- [13] R. Roubenoff, R.A. Roubenoff, J.G. Cannon, J.J. Kehayias, H. Zhuang, B. Dawsonhughes, C.A. Dinarello, I.H. Rosenberg, RHEUMATOID CACHEXIA - CYTOKINE-DRIVEN HYPERMETABOLISM ACCOMPANYING REDUCED BODY CELL MASS IN CHRONIC INFLAMMATION, *Journal of Clinical Investigation* 93(6) (1994) 2379-2386.
- [14] L.C. Rall, R. Roubenoff, Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions, *Rheumatology* 43(10) (2004) 1219-1223.
- [15] R.W. Jackman, S.C. Kandarian, The molecular basis of skeletal muscle atrophy, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287(4) (2004) C834-C843.
- [16] N. Nishimoto, K. Yoshizaki, N. Miyasaka, K. Yamamoto, S. Kawai, T. Takeuchi, J. Hashimoto, J. Azuma, T. Kishimoto, Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial., *Arthritis Rheum* 50(6) (2004) 1761-9.
- [17] G. Kollias, P. Papadaki, F. Apparailly, M.J. Vervoordeldonk, R. Holmdahl, V. Baumans, C. Desaintes, J. Di Santo, J. Distler, P. Garside, M. Hegen, T.W.J. Huizinga, A. Juengel, L. Klareskog, I. McInnes, I. Ragoussis, G. Schett, B. t Hart, P.P. Tak, R. Toes, W. van den Berg, W. Wurst, S. Gay, Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment, *Annals of the Rheumatic Diseases* 70(8) (2011) 1357-1362.
- [18] D.L. Asquith, A.M. Miller, I.B. McInnes, F.Y. Liew, Animal models of rheumatoid arthritis, *European Journal of Immunology* 39(8) (2009) 2040-2044.
- [19] M.A. Abegg, R. Lucietto, P.V.G. Alabarse, M.F.A. Mendes, M.S. Benfato, Differential Resistance to Oxidants and Production of Hydrolytic Enzymes in *Candida albicans*, *Mycopathologia* 171(1) (2011) 35-41.
- [20] K.M. Maki-Petaja, J. Cheriyan, A.D. Booth, F.C. Hall, J. Brown, S.M.L. Wallace, M.J. Ashby, C.M. McEnery, I.B. Wilkinson, Inducible nitric oxide synthase activity is increased in patients with

rheumatoid arthritis and contributes to endothelial dysfunction, *International Journal of Cardiology* 129(3) (2008) 399-405.

[21] D.L. Scott, F. Wolfe, T.W.J. Huizinga, Rheumatoid arthritis, *Lancet* 376(9746) (2010) 1094-1108.

[22] I. Navarro-Millan, J.A. Singh, J.R. Curtis, Systematic Review of Tocilizumab for Rheumatoid Arthritis: A New Biologic Agent Targeting the Interleukin-6 Receptor, *Clinical Therapeutics* 34(4) (2012) 788-802.

[23] E.R. Senna, A.L. De Barros, E.O. Silva, I.F. Costa, L.V. Pereira, R.M. Ciconelli, M.B. Ferraz, Prevalence of rheumatic diseases in Brazil: a study using the COPCORD approach, *J Rheumatol* 31(3) (2004) 594-7.

[24] D.M. Lee, M.E. Weinblatt, Rheumatoid arthritis, *Lancet* 358(9285) (2001) 903-911.

[25] J.K. Pedersen, N.K. Kjaer, A.J. Svendsen, K. Horslev-Petersen, Incidence of rheumatoid arthritis from 1995 to 2001: impact of ascertainment from multiple sources, *Rheumatology International* 29(4) (2009) 411-415.

[26] D.D. Dunlop, L.M. Manheim, E.H. Yelin, J. Song, R.W. Chang, The costs of arthritis, *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research* 49(1) (2003) 101-113.

[27] J.d.O. Costa, A.M. Almeida, A.A. Guerra Junior, M.L. Cherchiglia, E.I. Gurgel Andrade, F.d.A. Acurcio, Treatment of rheumatoid arthritis in the Brazilian Unified National Health System: expenditures on infliximab compared to synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs, 2003-2006, *Cadernos De Saude Publica* 30(2) (2014) 283-295.

[28] G.O. Storey, M. Comer, D.L. Scott, CHRONIC ARTHRITIS BEFORE 1876 - EARLY BRITISH CASES SUGGESTING RHEUMATOID-ARTHRITIS, *Annals of the Rheumatic Diseases* 53(9) (1994) 557-560.

[29] F.C. Arnett, S.M. Edworthy, D.A. Bloch, D.J. McShane, J.F. Fries, N.S. Cooper, L.A. Healey, S.R. Kaplan, M.H. Liang, H.S. Luthra, T.A. Medsger, D.M. Mitchell, D.H. Neustadt, R.S. Pinals, J.G. Schaller, J.T. Sharp, R.L. Wilder, G.G. Hunder, THE AMERICAN-RHEUMATISM-ASSOCIATION 1987 REVISED CRITERIA FOR THE CLASSIFICATION OF RHEUMATOID-ARTHRITIS, *Arthritis and Rheumatism* 31(3) (1988) 315-324.

[30] T. Pincus, T. Sokka, F. Wolfe, Premature mortality in patients with rheumatoid arthritis: Evolving concepts, *Arthritis and Rheumatism* 44(6) (2001) 1234-1236.

[31] A.H.M. van der Helm-van Mil, T.W.J. Huizinga, Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets, *Arthritis Research & Therapy* 10(2) (2008).

[32] M. van Oosterhout, I. Bajema, E.W.N. Levarht, R.E.M. Toes, T.W.J. Huizinga, J.M. van Laar, Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 58(1) (2008) 53-60.

[33] D. van der Woude, J.J. Houwing-Duistermaat, R.E.M. Toes, T.W.J. Huizinga, W. Thomson, J. Worthington, A.H.M. van der Helm-van Mil, R.R.P. de Vries, Quantitative Heritability of Anti-Citrullinated Protein Antibody-Positive and Anti-Citrullinated Protein Antibody-Negative Rheumatoid Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 60(4) (2009) 916-923.

[34] E.A. Stahl, S. Raychaudhuri, E.F. Remmers, G. Xie, S. Eyre, B.P. Thomson, Y. Li, F.A.S. Kurreeman, A. Zernakova, A. Hinks, C. Guiducci, R. Chen, L. Alfredsson, C.I. Amos, K.G. Ardlie, A. Barton, J. Bowes, E. Brouwer, N.P. Burt, J.J. Catanese, J. Coblyn, M.J.H. Coenen, K.H. Costenbader, L.A. Criswell, J.B.A. Crusius, J. Cui, P.I.W. de Bakker, P.L. De Jager, B. Ding, P. Emery, E. Flynn, P. Harrison, L.J. Hocking, T.W.J. Huizinga, D.L. Kastner, X. Ke, A.T. Lee, X. Liu, P. Martin, A.W. Morgan, L. Padyukov, M.D. Posthumus, T.R.D.J. Radstake, D.M. Reid, M. Seielstad, M.F. Seldin, N.A. Shadick, S. Steer, P.P. Tak, W. Thomson, A.H.M. van der Helm-van Mil, I.E. van der Horst-Bruinsma, C.E. van der Schoot, P.L.C.M. van Riel, M.E. Weinblatt, A.G. Wilson, G.J. Wolbink, B.P. Wordsworth, C. Wijmenga, E.W. Karlson, R.E.M. Toes, N. de Vries, A.B. Begovich, J. Worthington, K.A. Siminovitch, P.K. Gregersen, L. Klareskog, R.M. Plenge, B. Consortium, Y. Consortium, Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci, *Nature Genetics* 42(6) (2010) 508-U56.

- [35] E. Stahl, S. Eyre, A. Hinks, A. Barton, E. Flynn, A. Lee, J. Coblyn, G. Xie, L. Padyukov, R. Chen, K. Siminovitch, L. Klareskog, S. Raychaudhuri, P. Gregersen, R. Plenge, J. Worthington, META-ANALYSIS OF SIX GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES IN > 25,000 CASE-CONTROL SAMPLES IDENTIFIES SEVEN NEW RHEUMATOID ARTHRITIS RISK LOCI, *Rheumatology* 49 (2010) 19-19.
- [36] C. Carlens, M.-P. Hergens, J. Grunewald, A. Ekblom, A. Eklund, C.O. Hoglund, J. Askling, Smoking, Use of Moist Snuff, and Risk of Chronic Inflammatory Diseases, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181(11) (2010) 1217-1222.
- [37] K.P. Liao, L. Alfredsson, E.W. Karlson, Environmental influences on risk for rheumatoid arthritis, *Current Opinion in Rheumatology* 21(3) (2009) 279-283.
- [38] K.N. Verpoort, C.M. Jol-van der Zijde, E.A.M. Papendrecht-van der Voort, A. Ioan-Facsinay, J.W. Drijfhout, M.J.D. van Tol, F.C. Breedveld, T.W.J. Huizinga, R.E.M. Toes, Isotype distribution of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis reflects an ongoing immune response, *Arthritis and Rheumatism* 54(12) (2006) 3799-3808.
- [39] M.P.M. van der Linden, D. van der Woude, A. Ioan-Facsinay, E.W.N. Levarht, G. Stoeken-Rijsbergen, T.W.J. Huizinga, R.E.M. Toes, A.H.M. van der Helm-van Mil, Value of Anti-Modified Citrullinated Vimentin and Third-Generation Anti-Cyclic Citrullinated Peptide Compared With Second-Generation Anti-Cyclic Citrullinated Peptide and Rheumatoid Factor in Predicting Disease Outcome in Undifferentiated Arthritis and Rheumatoid Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 60(8) (2009) 2232-2241.
- [40] H.K. Beard, R. Ryvar, J. Skingle, C.L. Greenbury, ANTI-COLLAGEN ANTIBODIES IN SERA FROM RHEUMATOID-ARTHRITIS PATIENTS, *Journal of Clinical Pathology* 33(11) (1980) 1077-1081.
- [41] M. Mullazehi, M.C. Wick, L. Klareskog, R. van Vollenhoven, J. Ronnelid, Anti-type II collagen antibodies are associated with early radiographic destruction in rheumatoid arthritis, *Arthritis Research & Therapy* 14(3) (2012).
- [42] G. Sindhu, M. Ratheesh, G.L. Shyni, B. Nambisan, A. Helen, Anti-inflammatory and antioxidative effects of mucilage of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) on adjuvant induced arthritic rats, *International Immunopharmacology* 12(1) (2012) 205-211.
- [43] G.D. Summers, C.M. Deighton, M.J. Rennie, A.H. Booth, Rheumatoid cachexia: a clinical perspective, *Rheumatology* 47(8) (2008) 1124-1131.
- [44] M.A. Fitzpatrick, S.P. Young, Metabolomics - a novel window into inflammatory disease, *Swiss Medical Weekly* 143 (2013).
- [45] R. Tierney, N. Pierson, Magnitude of body-cell-mass depletion death from wasting in AIDS13 and the timing, 1989, pp. 444-447.
- [46] W.D. Dewys, C. Begg, P.T. Lavin, P.R. Band, J.M. Bennett, J.R. Bertino, M.H. Cohen, H.O.J. Douglass, P.F. Engstrom, E.Z. Ezdinli, J. Horton, G.J. Johnson, C.G. Moertel, M.M. Oken, C. Perlia, C. Rosenbaum, M.N. Silverstein, R.T. Skeel, R.W. Sponzo, D.C. Tormey, Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients., *The American Journal of Medicine*, 1980, pp. 491-497.
- [47] L.C. Rall, C.J. Rosen, G. Dolnikowski, W.J. Hartman, N. Lundgren, L.W. Abad, C.A. Dinarello, R. Roubenoff, Protein metabolism in rheumatoid arthritis and aging - Effects of muscle strength training and tumor necrosis factor alpha, *Arthritis and Rheumatism* 39(7) (1996) 1115-1124.
- [48] R. Khurana, S.M. Berney, *Clinical aspects of rheumatoid arthritis*, Pathophysiology, 2005, pp. 153-165.
- [49] V.e.O. Teixeira, L.I. Filippin, R.M. Xavier, Mechanisms of muscle wasting in sarcopenia, *Rev Bras Reumatol* 52(2) (2012) 252-9.
- [50] T.-P. Lee, B.-L. Chiang, Sex differences in spontaneous versus induced animal models of autoimmunity, *Autoimmunity Reviews* 11(6-7) (2012) A422-A429.
- [51] E. Castellero, A.I. Martin, M. Lopez-Menduina, M. Granado, M.A. Villanua, A. Lopez-Calderon, IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting, *Molecular and Cellular Endocrinology* 309(1-2) (2009) 8-16.
- [52] S.M. Phillips, E.I. Glover, M.J. Rennie, Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle, *Journal of Applied Physiology* 107(3) (2009) 645-654.

- [53] P.G. Oliveira, R. Grespan, L.G. Pinto, L. Meurer, J.C.T. Brenol, R. Roesler, G. Schwartzmann, F.Q. Cunha, R.M. Xavier, Protective Effect of RC-3095, an Antagonist of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, in Experimental Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 63(10) (2011) 2956-2965.
- [54] E.-M. Choi, Ligularia fischeri leaf extract prevents the oxidative stress in DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis, *Journal of Applied Toxicology* 27(2) (2007) 176-182.
- [55] E.-M. Choi, Oxidative status of DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis, *Journal of Applied Toxicology* 27(5) (2007) 472-481.
- [56] E.-M. Choi, Suppressive effects of potato (*Solanum tuberosum*) on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice, *Food Science and Biotechnology* 16(1) (2007) 43-48.
- [57] K. Kalantar-Zadeh, C. Rhee, J.J. Sim, P. Stenvinkel, S.D. Anker, C.P. Kovesdy, Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(2) (2013) 89-94.
- [58] L.I. Filippin, V.N. Teixeira, P.R. Viacava, P.S. Lora, L.L. Xavier, R.M. Xavier, Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2013).
- [59] S. Ali, J.M. Garcia, Sarcopenia, Cachexia and Aging: Diagnosis, Mechanisms and Therapeutic Options - A Mini-Review, *Gerontology* 60(4) (2014) 294-305.
- [60] S. Palus, S. von Haehling, J. Springer, Muscle wasting: An overview of recent developments in basic research, *International Journal of Cardiology* 176(3) (2014) 640-644.
- [61] M. Cesari, R.A. Fielding, M. Pahor, B. Goodpaster, M. Hellerstein, G.A. Van Kan, S.D. Anker, S. Rutkove, J.W. Vrijbloed, M. Isaac, Y. Rolland, C. M'Rini, M. Aubertin-Leheudre, J.M. Cedarbaum, M. Zamboni, C.C. Sieber, D. Laurent, W.J. Evans, R. Roubenoff, J.E. Morley, B. Vellas, S. Int Working Grp, Biomarkers of sarcopenia in clinical trials-recommendations from the International Working Group on Sarcopenia, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 3(3) (2012) 181-190.
- [62] G. Scharf, J. Heineke, Finding good biomarkers for sarcopenia, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 3(3) (2012) 145-148.
- [63] A. Nedergaard, M.A. Karsdal, S. Sun, K. Henriksen, Serological muscle loss biomarkers: an overview of current concepts and future possibilities, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(1) (2013) 1-17.
- [64] L. Steinbeck, N. Ebner, M. Valentova, A. Sandek, T. Bekfani, W. Doehner, S.D. Anker, S. Von Haehling, C-terminal agrin-fragment as a novel diagnostic marker for muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure, *European Heart Journal* 34 (2013) 939-940.
- [65] S.S. Patel, M.Z. Molnar, J.A. Tayek, J.H. Ix, N. Noori, D. Benner, S. Heymsfield, J.D. Kopple, C.P. Kovesdy, K. Kalantar-Zadeh, Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: results of a cross-sectional study and review of literature, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(1) (2013) 19-29.
- [66] J.H. Ix, C.L. Wassel, L.A. Stevens, G.J. Beck, M. Froissart, G. Navis, R. Rodby, V.E. Torres, Y. Zhang, T. Greene, A.S. Levey, Equations to Estimate Creatinine Excretion Rate: The CKD Epidemiology Collaboration, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 6(1) (2011) 184-191.
- [67] P. Brancaccio, N. Maffulli, R. Buonauro, F.M. Limongelli, Serum enzyme monitoring in sports medicine, *Clinics in Sports Medicine* 27(1) (2008) 1-+.
- [68] Z.A. Puthuchery, J. Rawal, M. McPhail, B. Connolly, G. Ratnayake, P. Chan, N.S. Hopkinson, R. Padhke, T. Dew, P.S. Sidhu, C. Velloso, J. Seymour, C.C. Agley, A. Selby, M. Limb, L.M. Edwards, K. Smith, A. Rowleron, M.J. Rennie, J. Moxham, S.D.R. Harridge, N. Hart, H.E. Montgomery, Acute Skeletal Muscle Wasting in Critical Illness, *Jama-Journal of the American Medical Association* 310(15) (2013) 1591-1600.
- [69] M.A.E. van Bokhorst-de van der Schueren, N.P.C. Konijn, I.E.M. Bultink, W.F. Lems, C.P. Earthman, L.H.D. van Tuyl, Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis, *Clinical Nutrition* 31(6) (2012) 1008-1010.

- [70] L. Semerano, P.-H. Romeo, M.-C. Boissier, Metabolomics for rheumatic diseases: has the time come?, *Annals of the Rheumatic Diseases* 74(7) (2015) 1325-1326.
- [71] R. Priori, R. Scrivo, J. Brandt, M. Valerio, L. Casadei, G. Valesini, C. Manetti, Metabolomics in rheumatic diseases: The potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis, and treatment efficacy, *Autoimmunity Reviews* 12(10) (2013) 1022-1030.
- [72] D. Drohan, W.B. Dunn, W. Lin, B. Buijsse, M.B. Schulze, C. Langenberg, M. Brown, A. Floegel, S. Dietrich, O. Rolandsson, D.C. Wedge, R. Goodacre, N.G. Forouhi, S.J. Sharp, J. Spranger, N.J. Wareham, H. Boeing, Untargeted Metabolic Profiling Identifies Altered Serum Metabolites of Type 2 Diabetes Mellitus in a Prospective, Nested Case Control Study, *Clinical Chemistry* 61(3) (2015) 487-497.
- [73] D. Calligaris, D.R. Feldman, I. Norton, P.K. Brastianos, I.F. Dunn, S. Santagata, N.Y.R. Agar, Molecular typing of meningiomas by desorption electrospray ionization mass spectrometry imaging for surgical decision-making, *International Journal of Mass Spectrometry* 377 (2015) 690-698.
- [74] W.B. Dunn, W. Lin, D. Broadhurst, P. Begley, M. Brown, E. Zelena, A.A. Vaughan, A. Halsall, N. Harding, J.D. Knowles, S. Francis-McIntyre, A. Tseng, D.I. Ellis, S. O'Hagan, G. Aarons, B. Benjamin, S. Chew-Graham, C. Moseley, P. Potter, C.L. Winder, C. Potts, P. Thornton, C. McWhirter, M. Zubair, M. Pan, A. Burns, J.K. Cruickshank, G.C. Jayson, N. Purandare, F.C.W. Wu, J.D. Finn, J.N. Haselden, A.W. Nicholls, I.D. Wilson, R. Goodacre, D.B. Kell, Molecular phenotyping of a UK population: defining the human serum metabolome, *Metabolomics* 11(1) (2015) 9-26.
- [75] W.B. Dunn, D.I. Broadhurst, H.J. Atherton, R. Goodacre, J.L. Griffin, Systems level studies of mammalian metabolomes: the roles of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chemical Society Reviews* 40(1) (2011) 387-426.
- [76] C. Ludwig, M.R. Viant, Two-dimensional J-resolved NMR Spectroscopy: Review of a Key Methodology in the Metabolomics Toolbox, *Phytochemical Analysis* 21(1) (2010) 22-32.
- [77] H.M. Parsons, C. Ludwig, M.R. Viant, Line-shape analysis of J-resolved NMR spectra: application to metabolomics and quantification of intensity errors from signal processing and high signal congestion, *Magnetic Resonance in Chemistry* 47 (2009) S86-S95.
- [78] C. Ludwig, U.L. Guenther, MetaboLab - advanced NMR data processing and analysis for metabolomics, *Bmc Bioinformatics* 12 (2011).
- [79] S. Ravanbakhsh, P. Liu, T.C. Bjordahl, R. Mandal, J.R. Grant, M. Wilson, R. Eisner, I. Sinelnikov, X. Hu, C. Luchinat, R. Greiner, D.S. Wishart, Accurate, Fully-Automated NMR Spectral Profiling for Metabolomics, *Plos One* 10(5) (2015).
- [80] A.M. Weljie, J. Newton, P. Mercier, E. Carlson, C.M. Slupsky, Targeted profiling: Quantitative analysis of H-1 NMR metabolomics data, *Analytical Chemistry* 78(13) (2006) 4430-4442.
- [81] C. Ludwig, J.M. Easton, A. Lodi, S. Tiziani, S.E. Manzoor, A.D. Southam, J.J. Byrne, L.M. Bishop, S. He, T.N. Arvanitis, U.L. Guenther, M.R. Viant, Birmingham Metabolite Library: a publicly accessible database of 1-D H-1 and 2-D H-1 J-resolved NMR spectra of authentic metabolite standards (BML-NMR), *Metabolomics* 8(1) (2012) 8-18.
- [82] S.P. Young, S.R. Kapoor, M.R. Viant, J.J. Byrne, A. Filer, C.D. Buckley, G.D. Kitis, K. Raza, The Impact of Inflammation on Metabolomic Profiles in Patients With Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 65(8) (2013) 2015-2023.
- [83] M.R. Viant, Improved methods for the acquisition and interpretation of NMR metabolomic data, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310(3) (2003) 943-948.
- [84] S.P. Young, M. Nessim, F. Falciani, V. Trevino, S.P. Banerjee, R.A.H. Scott, P.I. Murray, G.R. Wallace, Metabolomic analysis of human vitreous humor differentiates ocular inflammatory disease, *Molecular Vision* 15(125-29) (2009) 1210-1217.
- [85] V. Trevino, F. Falciani, GALGO: an R package for multivariate variable selection using genetic algorithms, *Bioinformatics* 22(9) (2006) 1154-1156.
- [86] J. Xia, I.V. Sinelnikov, B. Han, D.S. Wishart, MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful, *Nucleic Acids Research* 43(W1) (2015) W251-W257.

- [87] J. Xia, R. Mandal, I.V. Sinelnikov, D. Broadhurst, D.S. Wishart, MetaboAnalyst 2.0-a comprehensive server for metabolomic data analysis, *Nucleic Acids Research* 40(W1) (2012) W127-W133.
- [88] J. Xia, N. Psychogios, N. Young, D.S. Wishart, MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation, *Nucleic Acids Research* 37 (2009) W652-W660.
- [89] F. Chauchard, R. Cogdill, S. Roussel, J.M. Roger, V. Bellon-Maurel, Application of LS-SVM to non-linear phenomena in NIR spectroscopy: development of a robust and portable sensor for acidity prediction in grapes, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 71(2) (2004) 141-150.
- [90] S.R. Kapoor, A. Filer, M.A. Fitzpatrick, B.A. Fisher, P.C. Taylor, C.D. Buckley, I.B. McInnes, K. Raza, S.P. Young, Metabolic Profiling Predicts Response to Anti-Tumor Necrosis Factor alpha Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 65(6) (2013) 1448-1456.
- [91] R.K. Madsen, T. Lundstedt, J. Gabrielsson, C.-J. Sennbro, G.-M. Alenius, T. Moritz, S. Rantapaa-Dahlqvist, J. Trygg, Diagnostic properties of metabolic perturbations in rheumatoid arthritis, *Arthritis Research & Therapy* 13(1) (2011).
- [92] S. Thornton, L.E. Duwel, G.P. Boivin, Y.H. Ma, R. Hirsch, Association of the course of collagen-induced arthritis with distinct patterns of cytokine and chemokine messenger RNA expression, *Arthritis and Rheumatism* 42(6) (1999) 1109-1118.
- [93] S. Subramanian, M. Tovey, M. Afentoulis, A. Krogstad, A.A. Vandembark, H. Offner, Ethinyl estradiol treats collagen-induced arthritis in DBA/1LacJ mice by inhibiting the production of TNF-alpha and IL-1 beta, *Clinical Immunology* 115(2) (2005) 162-172.

Sítios citados

<https://www.charlifoundation.org/ketogenic-therapy/therapies-2/brain-tumor-cancer/item/1024-the-warburg-effect> (Visitado em 14/Março/2016).

<http://www.chenomx.com/software/> (Visitado em 14/Março/2016).

www.metaboanalyst.ca (Visitado em 14/Março/2016).

<http://www.genome.jp/kegg/> (Visitado em 14/Março/2016).

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Visitado em 14/Março/2016).

<http://www.hmdb.ca/> (Visitado em 14/Março/2016).

<http://www.springer.com/medicine/internal/journal/13539> (Visitado em 14/Março/2016).

Artigo

Artigo científico que a ser submetido no *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. As diretrizes podem ser obtidas na página <http://www.springer.com/medicine/internal/journal/13539> .

Este projeto foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental do HCPA e financiado pelo mesmo sob numeração: FIPE-HCPA 14-0297.

Rheumatoid cachexia biomarker

– a metabolomics approach in experimental arthritis

Paulo VG Alabarse^{1,2,3}, Priscila S Lora^{1,4}, Jordana MS Silva^{1,2}, Andrelise S Almeida^{1,5}, Mayara S de Oliveira^{1,5}, Mônica Immig^{1,5}, Rafaela CE Santo^{1,2}, Eduarda C Freitas^{1,2}, Vivian ON Teixeira^{1,2}, Camilla L Bathurst³, Lidiane I Filippin^{1,6}, Stephen P Young³, Ricardo M Xavier^{1,2}

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

²Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³Rheumatology Research Group, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom

⁴Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Brazil.

⁵Faculdade de Biomedicina, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Brazil.

⁶Centro Universitário La Salle, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: Ricardo M Xavier, e-mail: rxavier10@gmail.com , telephone: +55 51 3359 8837; fax number: +55 51 3359 8340.

Abstract.

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease in which impaired muscle function is observed in up to 66% of RA patient, it can progress into rheumatoid cachexia. Currently, there is no diagnose or treatment consensus. Collagen-induced arthritis (CIA) animal model may also cachexia similarly to patients and could be used to search for biomarkers through metabolomics. The focuses in this research is to confirm that CIA animal model develops cachexia and search for metabolites related to cachexia development.

Methods: CIA and healthy animals were tested for: physical performance test; free exploratory locomotion test; strength test; hindpaw edema volume measurement; follow up disease development; weighted; and food intake followed at 0, 18, 35, 45, 55, and 65 days after disease induction. After that, animals were euthanized and muscle (gastrocnemius – GA; and tibial anterior – TA) were dissected, and weighted. Urine was collected and used for nuclear magnetic resonance (NMR). Metabolites were identified by Chenomx and by the Birmingham Metabolite Library. Statistical model were performed using PCA, PLSDA, PLSR, followed by metabolic pathway analysis. Final list were filtered for muscle metabolism related pathways.

Results: CIA group has shown increased fatigue, strength and free locomotion reduction, and reduced relative muscle weight compared to CO group. A list of potential biomarkers for rheumatoid cachexia reached 28 metabolites.

Conclusions: CIA animal model is a feasible experimental model for rheumatoid cachexia regarding its similarities to RA patients. Concerning the metabolic profile from this model, a group of metabolites related to muscle loss can be suggested, which can be tested as biomarkers of rheumatoid cachexia, targeting prognosis, diagnosis, and follow up.

Key words: NMR, CIA, muscle loss, metabolomics, cachexia, biomarkers

Background:

Chronic inflammatory diseases decrease body weight and induce muscle wasting [1], and has been reported the association between muscle wasting and higher inflammatory status, emphasizing the importance of inflammation in muscle loss [2]. In this context, the term cachexia (from the Greek “cacos”: bad and “hexis”: having) have been defined as a complex metabolic shift towards to diseased state progression characterized by fast muscle mass loss in adults [3, 4]. Cachexia syndrome represent an anabolic resistance which makes the muscle fail to synthesize more proteins and it has currently gain more and more attention because of its increased death risk [5].

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease characterized by symmetric polyarthritis and systemic involvement. It affects 1% of people under 35 years and more than 2% of adults over 60 years in United States, and this prevalence have been reported worldwide [6]. RA is highly associated with long-term disability and premature mortality [7].

Muscle wasting is a common and important complication of RA, and it has been recently reported that low muscle mass is present in 20% of initial RA patients [8]. In established disease, 38% of RA patients presented low muscle mass [9], although previous studies described higher rates of up to 66% [10, 11]. Muscle wasting caused by RA has been associated with the intensity of inflammation and the severity of the disease [12].

Rheumatoid cachexia is a term first used by Roubenoff in 1992 related to the cachexia syndrome in RA patients [11]. Rheumatoid cachexia causes decreased physical activity, and increased fatigue and weakness, which lead to a significant loss of functional capacity and quality of life with an elevated socioeconomic effect [13, 14].

When attempting to diagnose and treat cachexia, the main problem relies on the precise assessment of skeletal muscle status and the its changes over time [15]. Currently, there are several ways to estimate muscle loss, as can be listed: anthropometrics (e.g. BMI), bioelectrical impedance analysis, imaging techniques (computer tomography, nuclear resonance image, dual x-ray absorptiometry, ultrasound), research (counting of total potassium-40), urinary creatinine amount, and different tests to quantify muscle function. However, they either lack in diagnostic value (sensitivity, specificity) or in cost [15-17]. In this context, the search for novel biomarkers related to cachexia syndrome is important to provide the attending physician with better ways to predict development, stage and progression of cachexia during the routine follow up of RA patients.

Recently there is an often used criteria to diagnose cachexia syndrome that was formulated by Evans and it is based on body weight loss of at least 5% in the least 12 months (or BMI of less than 20 kg.m^{-2}) and at least three of the following factors: decreased muscle strength; fatigue; anorexia; low fat mass index; abnormal biochemistry (increased inflammatory markers [CRP, IL-6], anemia [Hb under 12 g.dL^{-1}], low serum albumin [under 3.2 g.dL^{-1}]) [3]. However, no consensus has been reached to diagnose cachexia, and studies use varying weight loss cut-offs or symptoms [18].

Animal models of diseases can be very specific and sensitive way to identify biological changes because of the possibility to control for many factors, such as genetic background, food intake and environment influences. The collagen-induced arthritis (CIA) animal model share many similarities to RA, including clinical manifestations and histological and immunological features [19]. It has been widely used in search for therapeutic agents for RA and considered one of the most reliable and reproducible model [20-22].

Previous reports evaluating muscle alterations in arthritis mice models show that adjuvant-induced arthritis show weight loss and could be a model for cachexia [23]. Also, CIA mouse model had already been shown to reduce muscle strength [24], muscle loss and free locomotion [25], as well as progressive reduction of animal body weight, free locomotion accordingly to arthritis development, and strong correlation between muscle loss and severe stages of arthritis [26]. Finally, we have demonstrated also that CIA rat model muscle wasting is different from disuse muscle atrophy [27]. Considering all of the characteristic shown, CIA mice model seems to have the necessary features to be a candidate for rheumatoid cachexia animal model.

Metabolomics is a system biology technique that uses a 'top-down' approach in which data are gathered at systemic level [28]. The metabolome is defined as the complete set of metabolites from 100 to 1000 Da present in a given biological system and currently has shown a strong new tool for research [28]. Metabolic footprinting are the analysis of the metabolites extracellular by the organism and wherewith it can be used to discriminate differences between health and diseased state and to find out promising biomarkers for diseases [29]. As a comprehensive and sensible technique, it is reliable and reproducible and have been used in RA in a comprehensive way, e.g. for disease characterization and treatment response prediction [28, 30-32].

Therefore, the current study has two aims: i) to evaluate whether the CIA animal model also develops features characteristic of the rheumatoid cachexia syndrome; ii) to use nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to assess differences in metabolite footprints in urine from mice with CIA that could potentially be used to predict and/or follow up the progression of cachexia.

Material and methods:

Animals: Male DBA/1J mice from 8 to 12 weeks of age were used. The mice were reared alone at 20°C, with 12-h light–dark cycle, and free access to food and water. The animals were randomly divided into two experimental groups: (i) healthy animals (CO, n=11) (ii) collagen-induced arthritis animals (CIA, n=13). Animals were followed up for 65 days and all measurements were done prior to the arthritis induction and thereafter at the 18, 25, 35, 45, 55, and 65th days after. All experiments were performed accordingly to the Guiding Principles for Research Involving Animals and to the Ethics Committee of Research and Postgraduate Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (no. 14-0297).

Disease induction: Arthritis was induced with bovine type II collagen (CII, Chondrex, Inc.; 2 mg/ml) dissolved in 0.1 M acetic acid at 4 °C for 12 h, and Complete Freund's Adjuvant (CFA; Sigma, St Louis, MO, USA; 2 mg/ml) containing inactivated *Mycobacterium tuberculosis* [33]. Fifty microliters of emulsion (CII + CFA) was injected intradermal at the base of the tail to induce arthritis; it was set as the day zero in this experiment. Eighteen days after the first injection, the animals received a reinforcement of CII emulsified with incomplete Freund's adjuvant (IFA — without *Mycobacterium*

tuberculosis) in another site of the tail (booster injection) [26]. During the procedures, mice were anesthetized with isoflurane 10% (Abbott) and 90% of oxygen. Healthy controls were manipulated and anesthetized, however no injection were made. Animals were euthanatized at 65 days after the first injection.

Clinical severity score and measurement of oedema: Arthritis severity was clinically determined for each paw, three times a week, accordingly to the following scale of 0 to 4, where 0 - no evidence of erythema and swelling; 1 - erythema and mild swelling confined to the tarsals or metatarsals; 2, erythema and moderate swelling of tarsal and metatarsal or tarsal and ankle joints; 3 - erythema and severe swelling extending from the ankle to metatarsal joints; and 4 - erythema and severe swelling encompassing the ankle, foot and digits, or ankylosis of the limb [19, 33]. The highest sum score that a mouse could have reached was 16. Hindpaw edema volume was measured using a plethysmometer (Insight Ltda).

Animal Weight and food intake: Animals were weighted for total body mass. Animal food was weighted three times a week starting before the first injection. The remaining food was subtracted from the offered food to follow up the feed intake of each animal. The mean of food intake was calculated by the sum of total feed period between each time (0, 18, 25, 35, 45, 55, and 65th days after the first injection) and divided by the total sampling time of each period of time.

Free exploratory locomotion: Animals were put in an acrylic cage with motion sensors (Monitor de Atividades IR, Insight Equipamentos Ltda) [25]. After 30 seconds of adaptation, it is recorded all free exploratory locomotion for 5 minutes. All movements were sent to a computer that collect: the walking trajectory, covered distance, average speed, resting amount, rearing amount, and jumping amount. Only covered distance was used to this research.

Strength grip force: Animals were tested for maximum strength grip force. The test was adapted from Deacon (2013) [34]. Briefly, we used steel hank with a proper load to reach the total load of 5, 20, 35, 50, 65, 80, and 95g. Each mouse was hold by the first third of the tail and suspended until it get the lighter weight with all pawns. The animal need to hold the load for at least 3 recorded seconds. If the animal is succeeded, it rests for 30 seconds before it tries for the next weight. If the animal fails three attempts with 10 seconds of rest between each try, the longest time it has held was recorded. The following equation was used: $F_{max} = P_{3seg} + (5 * t_{<3seg})$, where F_{max} is the maximum calculated strength grip force, P_{3seg} is the heaviest load the animal had held for 3 seconds, and $t_{<3seg}$ is the longest time the animal has held the highest load. The final result was expressed in grams (g).

Endurance exercise performance: The endurance exercise performance test was performed at the beginning of the animal dark cycle, when animals are active. The endurance exercise performance test consists in inducing mice into exhaustion. The mice were separately set to run in treadmill developed by the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) engineers. Animals were left in the treadmill for 5 minutes to adapt prior the test. After that, the test started at a speed of 8.5 m.min⁻¹ for 9 minutes, in order to animals warm up, then, after every 3 minutes, the speed was increased in a constant ratio of 2.5 m.min⁻¹. Animals reach exhaustion when they are not able to run anymore to maintain the run march (it was set when animals stayed for 10 seconds at the first third of the rear part of the equipment). The exhausted animals were put back to their cages and the following measurements were recorded: fatigue maximum velocity, total experiment time, and total covered distance. Only total experiment time was used in this research.

Urine collection: Animals were caged individually in metabolic cages (Tecniplast S.p.A., Italy) for 6 hours to collect urine. Urine were filtered in 0.22 filters and stored in -80°C until the NMR preparation.

NMR preparation and analysis: Urine samples were defrosted on ice and centrifuged for 5 min, 13,000xg at 4°C. Supernatant were collected and Chenomx Buffer (final concentration: 100mM phosphate, 2mM difluorotrimethylsilanylphosphonic acid, 10% D₂O, 0.1% azide, 0.5mM 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) were add and vortex. Then, samples were centrifuged for 5 min, 13,000xg at 4°C, and supernatant were transferred for a champagne vial, capped and frozen at -80°C until the NMR analysis. These samples were transferred into NMR tubes and set to NMR spectroscopy (Bruker 600MHz Avance with a Txi 2.7mm cryoprobe) to acquire 1D and 2D-Jres spectrum.

NMR spectra metabolic identification and pathway analysis: Chenomx software (Chenomx Inc., Canada) was used to identify the compounds in 1D NMR spectra. Although more accurate, Chenomx results could not be used to quantify the results. 2D-Jres NMR spectra were sent to Birmingham Metabolome Library (BML) to identify and quantify their intensities. Metaboanalyst website (<http://www.metaboanalyst.ca/>) was used to elucidate which pathway the most relevant metabolites would be related to [35-37].

Euthanasia: At 65 days after the first injection, animals were killed by decapitation. The tibialis anterior and gastrocnemius muscle were dissected and weighted. Tibia-tarsal joint was collected to confirm the development of arthritis by histological analysis with Haematoxylin-Eosin stain.

Histological analysis: The following histological score system was used to evaluate individual joints and measure arthritis severity: synovial inflammation: five high-power magnification fields (HMF) were scored for the percentage of infiltrating mononuclear cells as follows: 0, absent; 1, mild (1–10 %); 2, moderate (11–50 %); 3, severe (51–100 %); synovial hyperplasia: 0, absent; 1, mild (5–10 layers); 2, moderate (11–50 layers); 3, severe (>20 layers); extension of pannus formation based on the reader's impression: 0, absent; 1, mild; 2, moderate; 3, severe; synovial fibrosis: 0, absent; 1, mild (1–10 %); 2, moderate (11–50 %); 3, severe (51–100 %); cartilage erosion: percentage of the cartilage surface that was eroded: 0, absent; 1, mild (1–10 %); 2, moderate (11– 50 %); 3, severe (51–100 %); bone erosion: 0, none; 1, minor erosion(s) observed only at HMF; 2, moderate erosion(s) observed at low magnification; 3, severe transcortical erosion(s) [38].

Statistics: Sample size was based in previous research of our group with CIA [39]. Quantitative data produced is described as mean ± standard error of the mean (SEM). Comparison between groups was performed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for variable with only one classification, two-way ANOVA followed by Bonferroni's test for variables with two classifications, or independent t-test of Pearson. All statistical tests were performed in GraphPad Prism v. 6. 1D NMR spectra were binned, normalized, glog transformed and subjected to Principal Component Analysis (PCA), Partial Least-Squares Discriminant Analysis (PLSDA) to group data. PCA and PLSDA were also used to analyse BML results. Partial least-squares regression analysis (PLSR) were performed using the BML metabolic profile with each clinical data, it was performed as previously described [30]. Briefly, PLSR is a regression method that identifies which metabolites can predict a continuous variable (in vivo analysis was used as continuous variable). This analysis yields R², a measure of the cross-validated goodness-of-fit of the linear regression, and each metabolite

contribution to the model, while permutation testing (multiple analyses using random data subsets) was used to assess the significance of this prediction. Pathway analysis was performed applying Fisher's Exact Test by the metaboanalyst website and to reach pathway impact [35-37]. Statistical significance was always set for p value under 0.05. The PLSDA model of the variable of importance in projection score critical limit was set for value higher than 1×10^0 , which means p value under 0.05. Metabolite list picking was manually done through KEGG (www.genome.jp/kegg), PUBCHEM (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), and HMDB (www.hmdb.ca) websites in which it was checked if there is a direct relationship with muscle metabolism.

Results:

In order to confirm that CIA animals develop cachexia with similarities to RA patients, we have followed up CIA animals for 65 days after the disease induction. After this time, the animals should have already developed strong muscle loss similar to RA patients with cachexia syndrome [26].

Arthritis score, Oedema, arthritis histopathology:

Firstly, we would like to confirm if collagen-induced animals developed arthritis. As expected, CIA animals had significantly higher arthritis scores and hindpaw edema volumes than CO, observed from the 35th day after immunization until the end of the experiment ($p < 0.05$; Fig. 1A and B). Incidence of arthritis was 100% at the 25th day after the immunization (Fig. 1A).

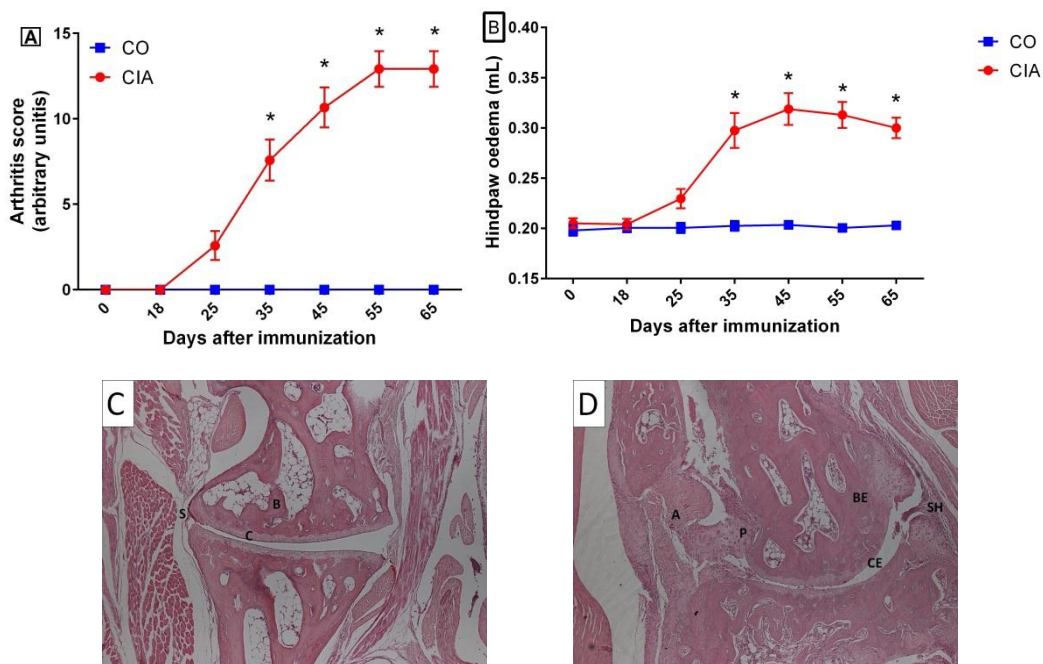


Fig. 1 – Arthritis score (A) and hindpaw edema volume (B) of mice from CO (square) and CIA (circle) animal groups at the experimental period. Representative histopathology of ankle joint of mice animals from CO (C) and CIA (D). Legend: A – Angiogenesis; B – Bone; BE – bone erosion; C – Cartilage; CE – cartilage erosion; P – invasive pannus formation; S – synovial layer; SH – synovial hyperplasia. *Statistical difference for a $p < 0.05$ between CO vs CIA.

The histopathology confirmed the disease in all CIA animals (Fig. 1D), while all CO animals showed healthy ankle joints (Fig. 1C). Cartilage and bone erosions, synovial hyperplasia, invasive pannus

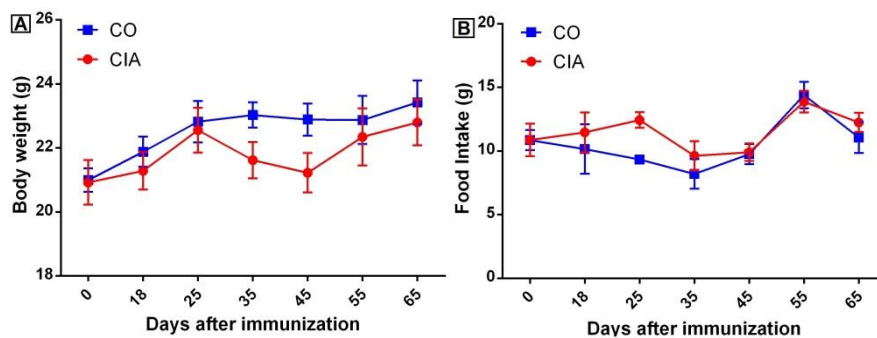
formation and inflammatory cells infiltrate were observed in the CIA animals ankle joint histology (Fig. 1C, Supplementary Table 1).

Supplementary Table 1: Histopathology parameters of ankle joints of mice from CO and CIA groups. It was measured cartilage and bone erosion, synovial hyperplasia, invasive pannus formation, and inflammatory cells infiltrate.

	CIA	CO
Inflammatory infiltration	3 (2,3)	0 (0,0)
Synovial hyperplasia	2 (2,3)	0 (0,1)
Pannus Extension	3 (2,3)	0 (0,0)
Cartilage erosion	3 (2,3)	0 (0,0)
Bone erosion	2 (2,2)	0 (0,0)
Synovial fibrosis	2 (2,3)	0 (0,0)

Animal weight and food intake:

There was no statistical difference in body weight and food intake between CO and CIA animal groups during the experimental period (Supplementary Fig. 1A and 1B). Therefore, CIA animals had no weight loss or decreased appetite.



Supplementary Fig. 1 – Animal body weight (A) and food intake (B) of mice from CO (square) and CIA (circle) animal groups at the experimental period.

Free exploratory locomotion, strength grip force, and endurance exercise performance:

We challenged the animals with mobility, strength and endurance performance tests. The CIA animal group had statistically decreased free exploratory locomotion (23, 22, 24 and 21% at 35, 45, 55 and 65 days, respectively) and endurance exercise performance total time (23, 22, 24 and 21% at 35, 45, 55 and 65 days, respectively) than CO group from 35 days after immunization until the end of the experiment ($p < 0.05$; Fig. 2A and C), and also CIA animal group had statistically decreased strength grip force (27, 55, 63, 60 and 66% at 25, 35, 45, 55 and 65 days, respectively) than CO group from 25 days after immunization until the end of the experiment ($p < 0.05$; Fig. 2B), indicating that these animals had decreased muscle-related activities, strength, and increased fatigue, and these are two of the cachexia criteria [3].

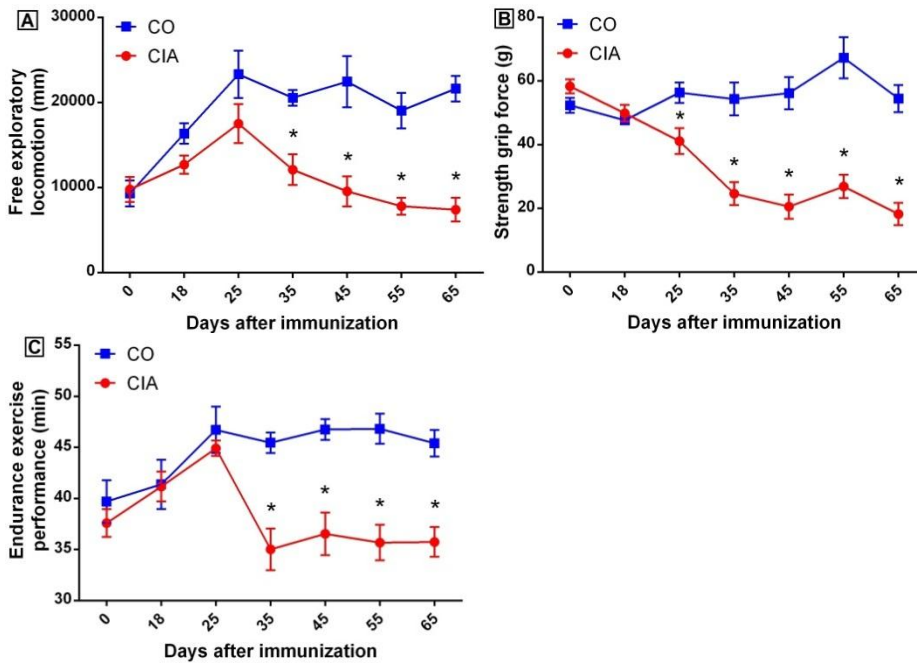


Fig. 2 – Free exploratory locomotion (A), strength grip force (B), and endurance exercise performance total time (C) of mice from CO (square) and CIA (circle) animal groups at the experimental period. *Statistical difference for a $p < 0.05$ between CO vs CIA.

Muscle weight and sarcoplasmic ratio:

We would need to confirm that animals would present muscle loss even if they had not had weight loss. Dissected tibialis anterior and gastrocnemius muscle weights were lighter in CIA than CO group (25 and 24%, respectively; $p < 0.05$). Sarcoplasmic ratios were also smaller in CIA, confirming that there is less muscle mass in these animals than in CO (23 and 22% less sarcoplasmic ratio, respectively; $p < 0.05$; Fig. 3).

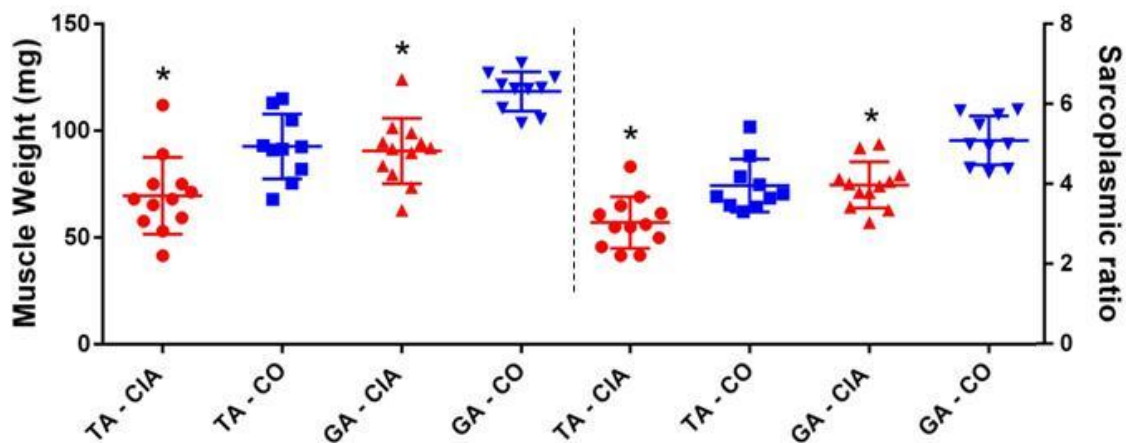


Fig. 3 – Muscle weight of tibialis anterior (TA) and gastrocnemius (GA), and sarcoplasmic ratio of mice from CO (square and inverted triangle, respectively) and CIA (circle and triangle, respectively) animal groups at the experimental period. *Statistical difference for a $p < 0.05$ between CO vs CIA.

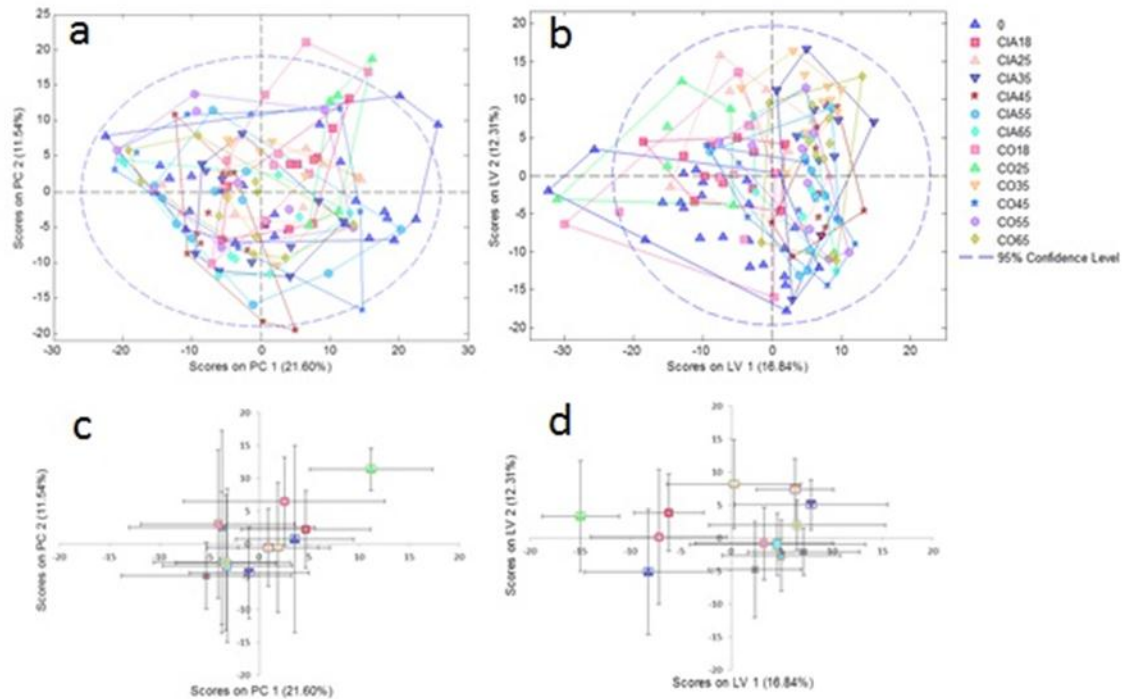
With these initial set of experiments, we could demonstrate that the animals develop many features that characterize the cachexia syndrome observed in RA patients, namely, relative preservation of total body mass and food intake, with decreased muscle mass (sarcoplasmic ratio) and function (mobility, physical resistance and force).

Experiment 2:

In order to search for potential biomarkers of muscle loss in cachectic mice, samples for urinary metabolic profiling were collected in seven time points (0, 18, 25, 35, 45, 55 and 65 days) during the 65 days of disease. Comparisons of the profiles between CIA and CO and between each time point within the CIA group were performed focused to identify metabolic profiles characteristic of the diseased animals and their changes over time.

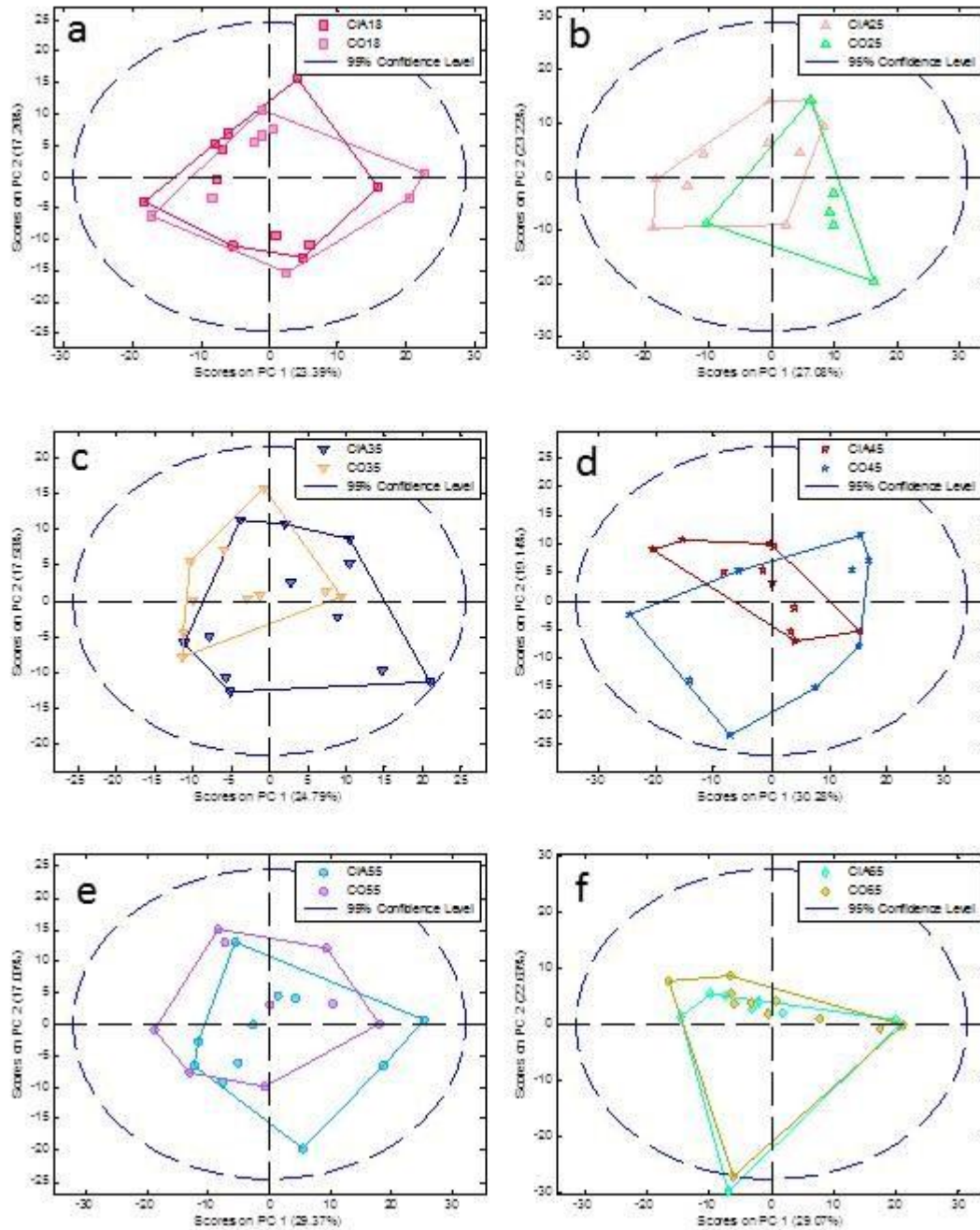
PCA and PLSDA models:

Firstly, we applied all NMR processed spectra into PCA model to group them into clusters according to their original groups to check for group homogeneity (supplementary Fig. 2A). Afterwards, we applied all results to PLSDA model to split them in relation to the most different metabolite pattern (supplementary Fig. 2B). In order to make these comprehensive analyses clearer, principal component and latent variable of each sample was plotted with mean \pm standard deviation of the mean (supplementary Fig. 2C and 2D, PCA and PLSDA respectively). All groups together could be classified by 21.60% at principal component 1 and 11.54% at principal component 2; and all groups could be well discriminated by 16.84% at latent variable 1 and 12.31% at latent variable 2. Metabolic profile has overlay between groups; in other words, they have close similarities; however differences in time dependent manner can be clearly observed in each group.

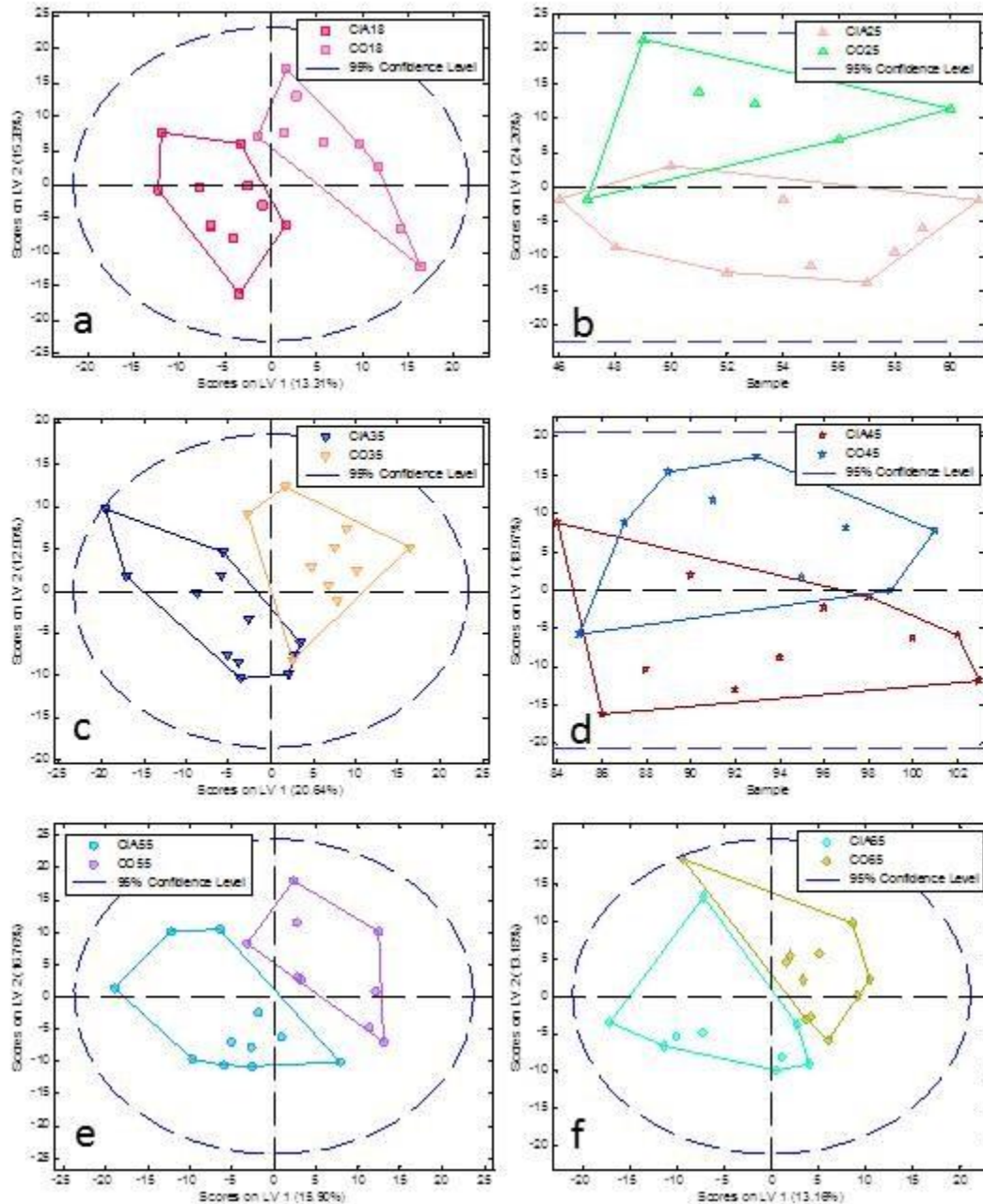


Supplementary Fig. 2. PCA (a) and PLSDA (b) analysis from CIA and CO groups with all time points. (c) and (d) represents the plotted data in mean \pm standard deviation of the mean from PCA and PLSDA analysis, respectively. 0: all animals before the experiment (blue triangle); CIA18: CIA group 18 days after induction (pink square); CIA25: CIA group 25 days after induction (light pink triangle); CIA35: CIA group 35 days after induction (dark blue inverted triangle); CIA45: CIA group 45 days after induction (red star); CIA55: CIA group 55 days after induction (light blue circle); CIA65: CIA group 65 days after induction (light blue diamond); CO18: CO group 18 days after begin of the experiment (light pink square); CO25: CO group 25 days after begin of the experiment (green triangle); CO35: CO group 35 days after begin of the experiment (orange inverted triangle); CO45: CO group 45 days after begin of the experiment (blue star); CO55: CO group 55 days after begin of the experiment (purple circle); CO65: CO group 65 days after begin of the experiment (yellow diamond). PC: principal component; LV: latent variable.

To reduce the complexity from the analysis of all groups together, we performed the PCA and PLSDA analysis at each time point between CIA and CO (pair analysis) to seek time dependent changes related to the disease (supplementary Fig. 3 A-F and supplementary Fig. 4 A-F, PCA and PLSDA respectively). PLSDA results show a very good segregation between groups at the same time-point, in other words the model generated could elucidate differences in metabolic profile from CIA vs CO at each time. Latent variable 1 and 2 sum from PLSDA model was 28.59, 24.26, 33.63, 18.97, 32.66, and 26.34% at 18, 25, 35, 45, 55, and 65 days, respectively.

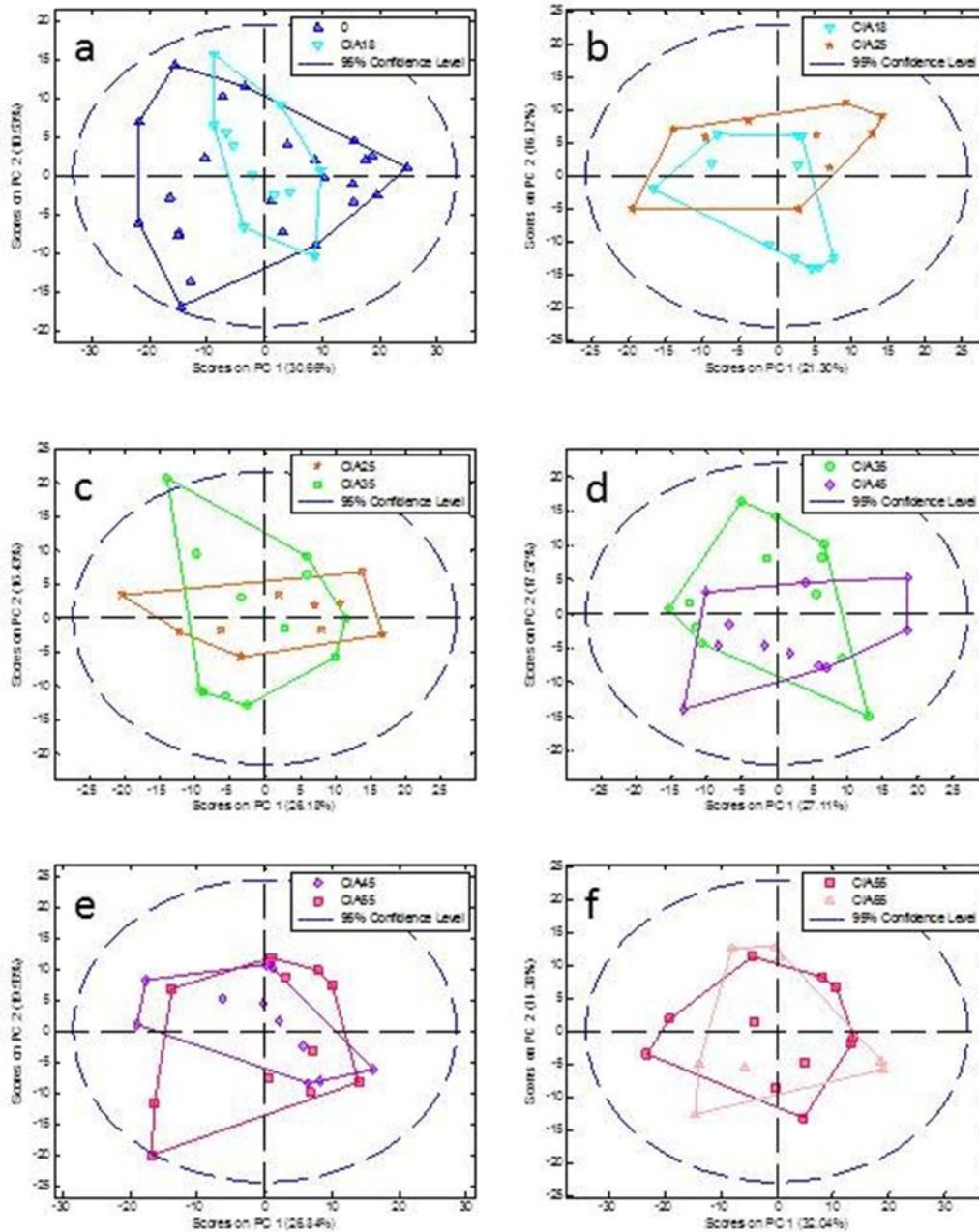


Supplementary Fig. 3. PCA analysis at each time point between CIA and CO (pair analysis). Graphics from (a) to (f) are from comparison from 18, 25, 35, 45, 55, and 65 days, respectively. CIA18: CIA group 18 days after induction (pink square); CIA25: CIA group 25 days after induction (light pink triangle); CIA35: CIA group 35 days after induction (dark blue inverted triangle); CIA45: CIA group 45 days after induction (red star); CIA55: CIA group 55 days after induction (light blue circle); CIA65: CIA group 65 days after induction (light blue diamond); CO18: CO group 18 days after begin of the experiment (light pink square); CO25: CO group 25 days after begin of the experiment (green triangle); CO35: CO group 35 days after begin of the experiment (orange inverted triangle); CO45: CO group 45 days after begin of the experiment (blue star); CO55: CO group 55 days after begin of the experiment (purple circle); CO65: CO group 65 days after begin of the experiment (yellow diamond). PC: principal component.

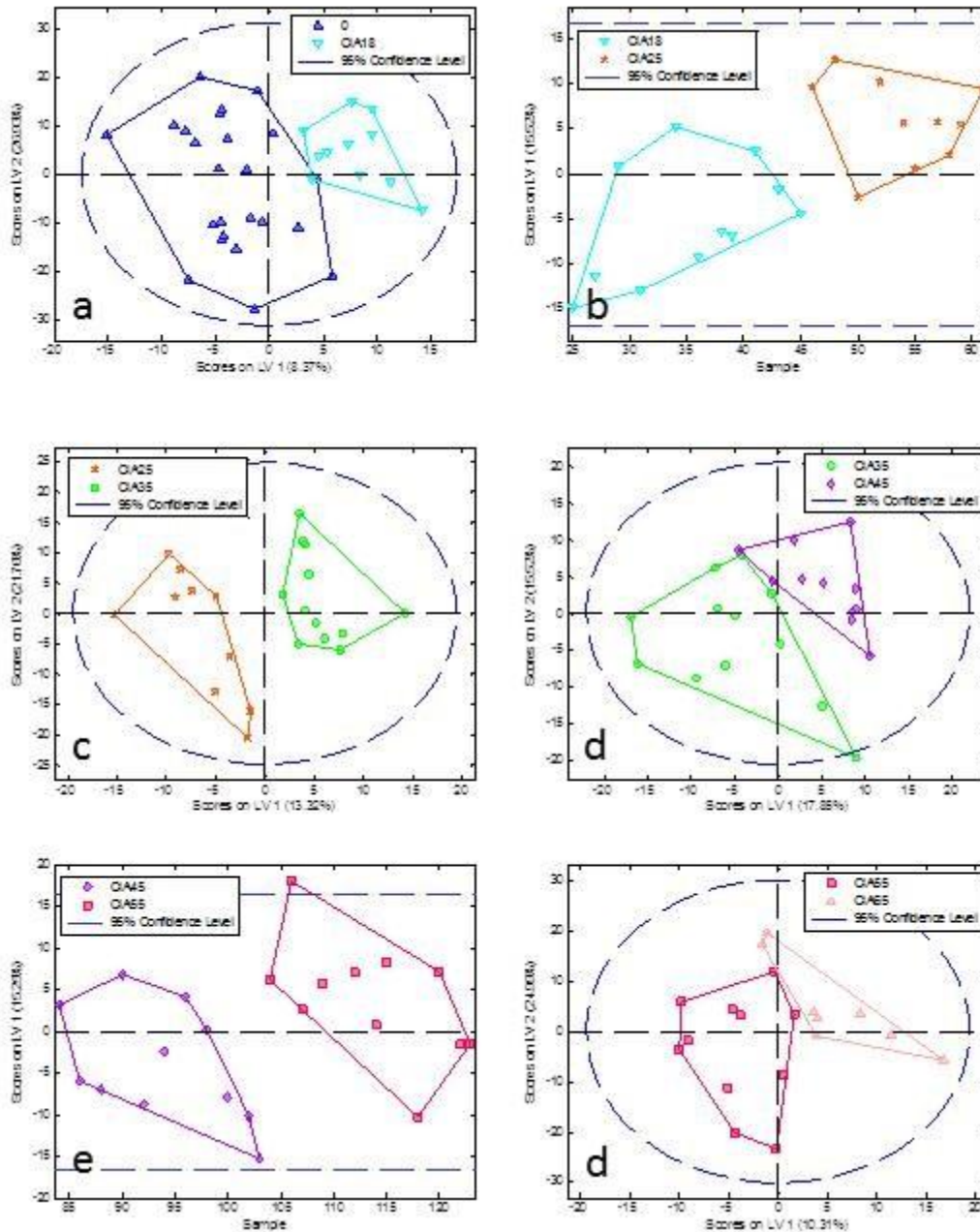


Supplementary Fig. 4. PLSDA analysis at each time point between CIA and CO (pair analysis). Graphics from (a) to (f) are from comparison from 18, 25, 35, 45, 55, and 65 days, respectively. CIA18: CIA group 18 days after induction (pink square); CIA25: CIA group 25 days after induction (light pink triangle); CIA35: CIA group 35 days after induction (dark blue inverted triangle); CIA45: CIA group 45 days after induction (red star); CIA55: CIA group 55 days after induction (light blue circle); CIA65: CIA group 65 days after induction (light blue diamond); CO18: CO group 18 days after begin of the experiment (light pink square); CO25: CO group 25 days after begin of the experiment (green triangle); CO35: CO group 35 days after begin of the experiment (orange inverted triangle); CO45: CO group 45 days after begin of the experiment (blue star); CO55: CO group 55 days after begin of the experiment (purple circle); CO65: CO group 65 days after begin of the experiment (yellow diamond). LV: Latent variable.

In order to elucidate the alterations in the metabolite profile of the CIA animals during the disease evolution, including progression from an acute phase to a chronic phase, we have conducted pair analyses between the different time points (supplementary Fig. 5 A-F, Fig. 6 A-F). As can be seen, these models could segregate CIA group in a time dependent manner, in other words, the model could elucidate a metabolic profile difference during disease development. Latent variable 1 and 2 sum from PLSDA model was 35.30, 15.52, 34.08, 33.37, 15.25, and 35.30% between 0×18, 18×25, 25×35, 35×45, 45×55, 55×65 days, respectively.



Supplementary Fig. 5. PCA pair analysis with only CIA group from one-time point to the next one. Graphics from (a) to (f) are from comparison from 0 vs CIA 18, CIA 18 vs CIA 25, CIA 25 vs CIA 35, CIA 35 vs CIA 45, CIA 45 vs CIA 55, and CIA 55 vs CIA 65 days, respectively. 0: all animals before the experiment (blue triangle); CIA18: CIA group 18 days after induction (light blue inverted triangle); CIA25: CIA group 25 days after induction (red star); CIA35: CIA group 35 days after induction (green circle); CIA45: CIA group 45 days after induction (purple diamond); CIA55: CIA group 55 days after induction (pink square); CIA65: CIA group 65 days after induction (light pink triangle). PC: principal component.



Supplementary Fig. 6. PLSDA pair analysis with only CIA group from one-time point to the next one. Graphics from (a) to (f) are from comparison from 0 vs CIA 18, CIA 18 vs CIA 25, CIA 25 vs CIA 35, CIA 35 vs CIA 45, CIA 45 vs CIA 55, and CIA 55 vs CIA 65 days, respectively. 0: all animals before the experiment (blue triangle); CIA18: CIA group 18 days after induction (light blue inverted triangle); CIA25: CIA group 25 days after induction (red star); CIA35: CIA group 35 days after induction (green circle); CIA45: CIA group 45 days after induction (purple diamond); CIA55: CIA group 55 days after induction (pink square); CIA65: CIA group 65 days after induction (light pink triangle). LV: Latent variable.

All the previously mentioned models from PLSDA have provided sensitivity and specificity values to be considered that can be seen at the supplementary Table 2. Briefly, higher cross validated sensitivity and specificity can be seen between CO and CIA groups at same time-point and related to disease development (sensitivity of 0.92, 0.90, 0.75 and 0.73 and specificity of 0.67, 0.67, 0.70 and

0.56 at 18, 25, 35 and 45 days after disease induction, respectively), however, as disease became established after 55 days of disease, CIA group metabolic profile become similar to CO (sensitivity of 0.55 and 0.44, and specificity of 0.33 and 0.64 at 55 and 65 days after disease induction). CIA group has also high cross validated sensitivity and specificity up to 45 days after the induction, when the animals are in far different stages of disease development, and very similar after that (sensitivity of 0.79, 0.64, 0.90, 0.67, 0.28 and 0.55, and specificity of 0.73, 0.80, 0.92, 0.73, 0.09 and 0.25 comparing time point 0×18, 18×25, 25×35, 35×45, 45×55, 55×65, respectively).

Supplementary Table 2: Specificity and sensibility for NMR PLSDA data.

Group	Calibration		Cross validation	
	Sensitivity	Specificity	Sensitivity	Specificity
CO vs CIA same time point				
CO 18 and CIA 18	1.00	1.00	0.92	0.67
CO 25 and CIA 25	0.90	0.83	0.90	0.67
CO 35 and CIA 35	1.00	0.90	0.75	0.70
CO 45 and CIA 45	0.82	0.78	0.73	0.56
CO 55 and CIA 55	1.00	1.00	0.55	0.33
CO 65 and CIA 65	1.00	1.00	0.44	0.64
Pair analysis				
0 and CIA 18	1.00	1.00	0.79	0.73
CIA 18 and CIA 25	0.73	0.90	0.64	0.80
CIA 25 and CIA 35	1.00	1.00	0.90	0.92
CIA 35 and CIA 45	1.00	1.00	0.67	0.73
CIA 45 and CIA 55	0.73	0.73	0.28	0.09
CIA 55 and CIA 65	1.00	1.00	0.55	0.25
All groups				
0	0.88	0.80	0.79	0.77
CIA 18	0.83	0.66	0.75	0.66
CIA 25	0.70	0.57	0.60	0.62
CIA 35	0.83	0.62	0.83	0.64
CIA 45	1.00	0.56	0.82	0.55
CIA 55	0.91	0.44	0.64	0.49
CIA 65	0.67	0.40	0.67	0.43
CO 18	0.44	0.78	0.33	0.78
CO 25	0.83	0.79	0.67	0.78
CO 35	0.90	0.75	0.80	0.79
CO 45	0.67	0.66	0.56	0.66
CO 55	0.78	0.38	0.67	0.37
CO 65	0.91	0.52	0.64	0.53
CIA only				
CIA 18	0.92	0.93	0.67	0.89
CIA 25	0.60	0.73	0.50	0.75
CIA 35	0.92	0.76	0.75	0.70
CIA 45	0.91	0.52	0.73	0.56
CIA 55	0.82	0.54	0.64	0.52
CIA 65	0.67	0.55	0.56	0.54

Metabolic profile:

Next, we have identified several statistical significant metabolites related to CIA vs CO, and CIA vs CIA time dependent analysis comparisons. From the list of all statistical significant metabolites (data not shown), we assume that this different importance was related to the arthritis disease, its development process, influence to tissues, as well as muscle loss process.

With the focus on muscle loss process, we have selected a list of the metabolites that are originated from muscle catabolism or anabolism processes based on information from KEGG, PUBCHEM and HMDB websites (Table 1). The following metabolites have shown outstanding importance in the models: carnosine (2.8×10^2) from CIA vs CO at 65 days; histidine (1.2×10^2) from CIA pair analysis 55×65; histamine (1.1×10^2) from CIA pair analysis 55×65; L-methionine (1.1×10^2) from CIA pair analysis 0×18; and succinylacetone (1.0×10^2) from CIA vs CO at 65 days. As expected, there were also several amino acids with high statistical significance, i.e. high variable importance in projection score.

Table 1: Selected metabolites ranking from 1D NMR spectrum PLSDA and identified by Chenomx or 2D-Jres NMR spectrum PLSDA identified by BML.

Metabolite	Statistics comparison origin (NMR or BML) ^a	Variable Importance in Projection score
	CIA pair analysis 45×55 (NMR)	1.0×10 ¹
3-Methylhistidine	CIA vs CO at 18, 25, 45, 55, and 65 (BML)	6.6×10 ⁰ , 4.8×10 ⁰ , 2.7×10 ⁰ , 1.9×10 ⁰ , 2.0×10 ⁰
	CIA pair analysis 25×35, 35×45 (BML)	2.0×10 ⁰ , 1.3×10 ⁰
4-Aminobutyrate	CIA vs CO at 18, 25, 35, 45, and 55 days (BML)	1.3×10 ⁰ , 3.6×10 ¹ , 1.7×10 ¹ , 1.4×10 ⁰ , 1.5×10 ⁰
	CIA pair analysis 18×25, 25×35, 35×45 (BML)	1.8×10 ⁰ , 3.5×10 ⁰ , 4.9×10 ⁰
Acetylcholine	CIA vs CO at 45, and 65 days (BML)	1.6×10 ⁰ , 1.4×10 ⁰
	CIA pair analysis 35×45, and 45×55 (NMR)	4.9×10 ¹ , 3.8×10 ¹
Arginine	CIA vs CO at 18, 35, and 65 days (BML)	1.9×10 ⁰ , 2.4×10 ⁰ , 1.8×10 ⁰
Aspartate	CIA vs CO at 18 days (BML)	2.0×10 ⁰
	CIA vs CO at 65 days (NMR)	2.8×10 ²
	CIA pair analysis 25×35 (NMR)	3.6×10 ⁰
Carnosine	CIA vs CO at 18, 25, 35, 45, 55, and 65 days (BML)	2.1×10 ⁰ , 1.7×10 ¹ , 4.6×10 ¹ , 1.2×10 ¹ , 2.9×10 ¹ , 5.0×10 ⁰
	CIA pair analysis 25×35, 35×45, 45×55, 55×65 (BML)	5.9×10 ⁰ , 1.6×10 ¹ , 3.1×10 ⁰ , 4.4×10 ¹
Creatine	CIA pair analysis 35×45, 45×55 (NMR)	2.3×10 ⁰ , 8.4×10 ¹
	CIA vs CO at 18, 35, 55, and 65 days (BML)	1.8×10 ⁰ , 1.4×10 ⁰ , 3.3×10 ⁰ , 1.4×10 ⁰
	CIA vs CO at 45 days (NMR)	3.4×10 ¹
Creatinine	CIA pair analysis 35×45 (NMR)	3.1×10 ¹
	CIA vs CO at 25, 35, 45, and 65 days (BML)	3.3×10 ⁰ , 9.2×10 ⁰ , 1.6×10 ⁰ , 4.0×10 ⁰ , 3.7×10 ⁰
	CIA pair analysis 25×35	3.7×10 ⁰
Glutamine	CIA vs CO at 18, 25, 45, 55, and 65 (BML)	3.1×10 ⁰ , 1.8×10 ⁰ , 3.2×10 ⁰ , 3.4×10 ⁰ , 2.4×10 ⁰
	CIA pair analysis 25×35, 45×55 (BML)	5.7×10 ⁰ , 1.2×10 ⁰
	CIA vs CO at 35, 45, 55, and 65 days (NMR)	2.8×10 ¹ , 3.7×10 ¹ , 6.2×10 ¹ , 5.2×10 ¹
Histamine	CIA pair analysis 0×18, 18×25, 25×35, 35×45, 45×55, 55×65 (NMR)	8.7×10 ⁰ , 8.5×10 ⁰ , 4.9×10 ⁰ , 1.3×10 ¹ , 1.9×10 ¹ , 1.1×10 ²
	CIA vs CO at 35, 45, and 65 days (BML)	3.9×10 ⁰ , 3.7×10 ⁰ , 4.9×10 ⁰
	CIA pair analysis 25×35 (BML)	4.2×10 ⁰
Histidine	CIA vs CO at 18 days (NMR)	2.6×10 ¹
	CIA pair analysis 55×65 (NMR)	1.2×10 ²
	CIA vs CO at 35, 55, and 65 days (BML)	2.5×10 ⁰ , 1.2×10 ⁰ , 2.5×10 ⁰
	CIA vs CO at 45 days (NMR)	2.1×10 ¹
Isoleucine	CIA vs CO at 18, 25, 35, 45, and 65 days (BML)	5.3×10 ⁰ , 1.1×10 ⁰ , 1.5×10 ⁰ , 1.7×10 ⁰ , 1.7×10 ⁰ ,
Leucine	CIA vs CO at 18, 25, 35, 45, 55, and 65 days (BML)	1.0×10 ⁰ , 2.7×10 ⁰ , 3.5×10 ⁰ , 1.1×10 ⁰ , 1.5×10 ⁰ , 2.2×10 ⁰
	CIA pair analysis 25×35, 35×45 (BML)	1.8×10 ⁰ , 1.6×10 ⁰

	CIA vs CO at 18 days (NMR)	5.4×10^1
L-Methionine	CIA pair analysis 0×18, 18×25 (NMR)	1.1×10^2 , 2.1×10^0
	CIA vs CO at 25, and 55 days (BML)	1.2×10^0 , 5.1×10^0
Lysine	CIA pair analysis 0×18, 25×35, 45×55, 55×65 (NMR)	2.8×10^1 , 5.3×10^0 , 3.1×10^0 , 6.1×10^0 , 2.5×10^0
	CIA vs CO at 18, and 45 days (BML)	5.4×10^0 , 3.2×10^0
myo-Inositol	CIA vs CO at 18, 35, 45, 55, and 65 days (BML)	1.7×10^0 , 4.9×10^0 , 1.1×10^0 , 1.6×10^0 , 1.2×10^0
	CIA pair analysis 25×35 (BML)	2.1×10^1
N,N-Dimethylglycine	CIA vs CO at 18, 25, 55, and 65 days (BML)	3.5×10^0 , 2.4×10^0 , 2.6×10^0 , 1.3×10^0
	CIA pair analysis 25×35 (BML)	4.1×10^0
N-Acetylalanine	CIA vs CO at 18, 25, 45, and 55 days (BML)	1.5×10^0 , 2.8×10^0 , 1.7×10^0 , 5.4×10^0
N-Acetylmethionine	CIA vs CO at 18, 25, and 65 days (BML)	3.1×10^0 , 8.7×10^0 , 3.4×10^0
	CIA vs CO at 35 days (NMR)	2.1×10^1
Pantothenate	CIA pair analysis 35×45, 45×55, 55×65 (NMR)	1.4×10^1 , 3.3×10^1 , 8.8×10^0
	CIA vs CO at 18, 25, 35, and 55 days (BML)	2.7×10^0 , 1.8×10^0 , 1.0×10^0 , 1.8×10^0
Phenylalanine	CIA vs CO at 18 days (BML)	1.8×10^0
Phosphocholine	CIA vs CO at 25, 35, and 55 days (BML)	4.3×10^0 , 1.6×10^0 , 1.7×10^0
	CIA vs CO at 45 days (NMR)	3.4×10^1
Phosphocreatine	CIA pair analysis 35×45, 45×55 (NMR)	3.1×10^1 , 8.4×10^1
	CIA vs CO 25, 35, 55, and 65 days (BML)	1.9×10^0 , 2.9×10^0 , 6.2×10^0 , 3.3×10^0
Pyridoxine	CIA vs CO at 35, and 55 days (NMR)	4.6×10^1 , 5.2×10^1
Sarcosine	CIA vs CO at 25, 35, 45, and 65 days (BML)	1.0×10^0 , 3.3×10^0 , 2.3×10^0 , 1.9×10^0
	CIA vs CO at 18, 25, 55, and 65 days (NMR)	7.0×10^1 , 4.7×10^1 , 6.8×10^1 , 3.7×10^1 , 1.0×10^2
Succinylacetone	CIA pair analysis 55×65 (NMR)	5.2×10^1
Thiamine	CIA pair analysis 25×35 (BML)	2.8×10^0
Urocanate	CIA pair analysis 55×65 (NMR)	5.0×10^0

^a NMR: 1D Nuclear Magnetic Resonance; BML: 2D J-res Nuclear Magnetic Resonance identified by the Birmingham Metabolome Library.

Biomarker time-dependent identification:

After all statistical significant metabolites were selected from pathway known to occur within the muscle tissue, we have displayed them in a timeline according to the results of the analyses of the different time points in order to facilitate interpretation (Fig. 4). Setting a cut-off point of 45 days for muscle loss become caquexia [26], we suggest the following list as prospective biomarkers of muscle loss prognosis: 3-methylhistidine, 4-aminobutyric acid, acetylcholine, arginine, aspartate, carnosine, creatine, creatinine, glutamine, histamine, histidine, isoleucine, leucine, l-methionine, lysine, myo-inositol, n,n-dimethylglycine, n-acetylalanine, n-acetylmethionine, pantothenate, phenylalanine, phosphocholine, phosphocreatine, pyridoxine, sarcosine, succinylacetone and thiamine. After 45 days, we suggest the following list as prospective biomarkers of cachexia diagnosis: 3-methylhistidine, 4-aminobutyric acid, acetylcholine, arginine, carnosine, creatine, creatinine, glutamine, histamine, histidine, isoleucine, leucine, l-methionine, lysine, myo-inositol, n,n-

dimethylglycine, n-acetylalanine, n-acetylmethionine, pantothenate, phosphocholine, phosphocreatine, pyridoxine, sarcosine, succinylacetone and urocanate.

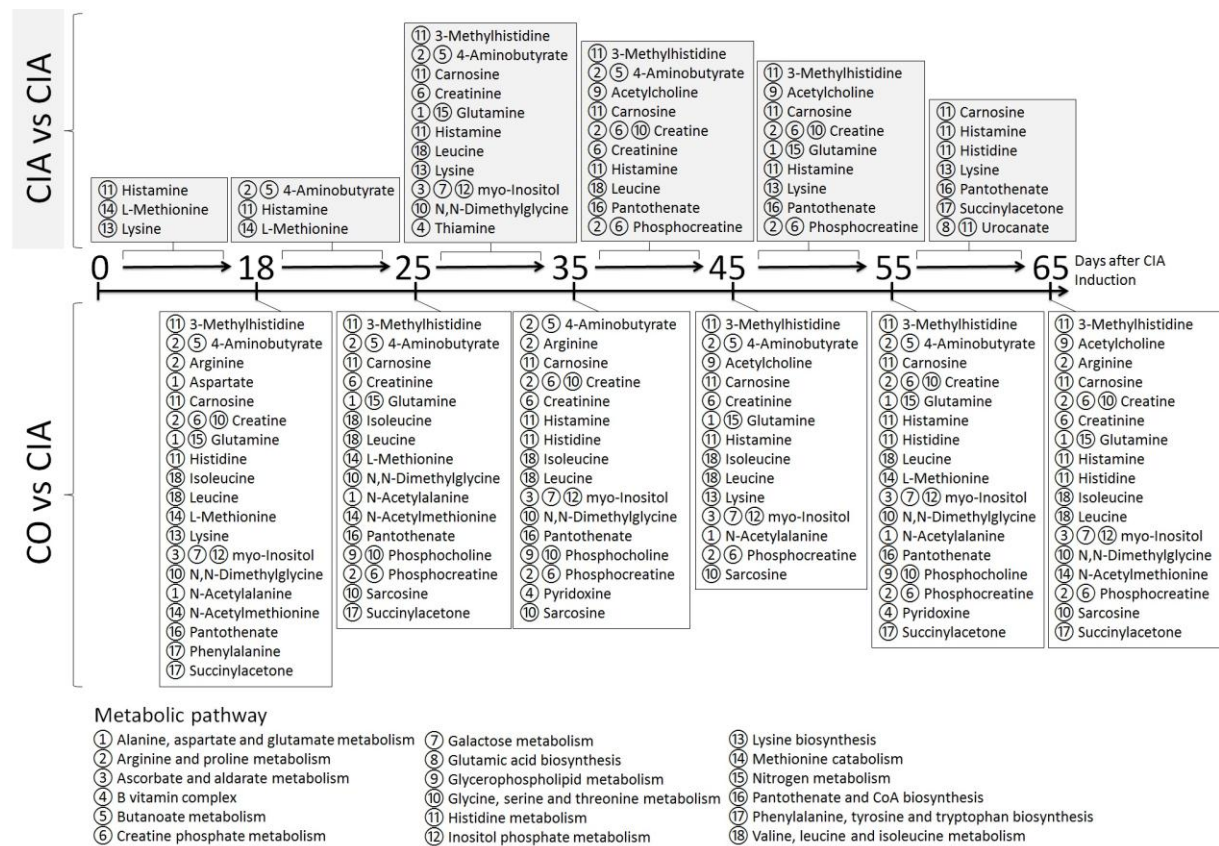


Fig. 4. Metabolic profile related to muscle loss in urine of CIA vs health animals along 65 days after CIA induction. Circled numbers before each metabolite represents metabolic pathway.

Pathway analysis:

As can be seen at Fig. 4, several metabolites are related to the same 18 pathways that occur within the muscle tissue, from those pathways, 11 were related to amino acid metabolism. Furthermore, the top four most frequently pathways were: histidine metabolism (e.g. metabolites: 3-methylhistidine, carnosine, histamine, histidine and urocanate); arginine and proline metabolism (arginine, 4-aminobutyrate, creatine and phosphocreatine); glycine, serine and threonine metabolism (N,N-dimethylglycine, sarcosine, phosphocholine); creatine phosphate metabolism (creatine, creatinine, phosphocreatine).

Some of these pathways also presented statistical difference between several time points, as can be seen on supplementary table 3. Briefly, histidine metabolism is the most frequent pathway altered during disease development compared with controls. Concerning metabolite frequency within the same metabolic pathway, it has the highest impact of 0.60 comparing CIA between 55 and 65 days after disease induction. Arginine and proline metabolisms also appear often with an impact of up to 0.28; valine, leucine and isoleucine metabolisms appear in almost every time point comparing CIA and CO, and have an impact of up to 0.33.

Supplementary Table 3: Metabolic pathway analysis of metabolite ranking data from PLSDA models comparing CIA vs CO at each time-point and CIA pair analysis at each time period. Data expressed as “% of metabolic pathway impact (p value)”.

BML	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	Arginine and proline metabolism	Ascorbate and aldarate metabolism	B vitamin complex	Butanoate metabolism	Glycerophospholipid metabolism	Glycine, serine and threonine metabolism	Histidine metabolism	Lysine metabolism	Nitrogen metabolism	Pantothenate and CoA biosynthesis	Valine, leucine and isoleucine degradation
CIA pair analysis 0×18								22 (0.002)	0 (0.066)			
CIA pair analysis 18×25		14 (0.040)			3 (0.326)			22 (0.027)				
CIA pair analysis 25×35	26 (0.070)	28 (p<0.001)	0 (0.154)		3 (0.337)		3 (0.109)	22 (0.029)		0 (0.154)		33 (0.185)
CIA pair analysis 35×45		22 (0.007)			3 (0.337)	11 (0.103)	2 (0.109)	0 (0.244)				33 (0.185)
CIA pair analysis 45×55	15 (0.074)	21 (0.001)				11 (0.110)	0 (0.453)	22 (0.032)	0 (0.074)	0 (0.159)		
CIA pair analysis 55×65									0 (0.002)			
NMR												
CIA pair analysis 0×18								22 (0.166)	0 (0.030)			
CIA pair analysis 18×25								22 (0.130)				
CIA pair analysis 25×35							0 (0.284)	22 (0.010)	0 (0.023)			2 (0.336)
CIA pair analysis 35×45		1 (0.487)				0 (0.364)	0 (0.374)	22 (0.202)			2 (0.202)	2 (0.437)
CIA pair analysis 45×55		1 (0.503)				0 (0.378)		22 (0.210)	0 (0.001)		2 (0.021)	
CIA pair analysis 55×65								61 (0.001)	0 (0.001)		2 (0.184)	
CIA vs CO at 18 days	6 (0.113)				0 (0.104)		0 (0.144)	24 (0.072)	0 (0.020)	0 (0.044)		
CIA vs CO at 25 days	0 (0.113)				0 (0.104)		0 (0.009)					0 (0.053)
CIA vs CO at 35 days					0 (0.010)		0 (0.199)	22 (0.101)			2 (0.101)	0 (0.075)
CIA vs CO at 45 days	0 (0.227)	0 (0.378)			0 (0.021)		0 (0.284)	22 (0.148)	0 (0.042)			0 (0.111)
CIA vs CO at 55 days	0 (0.157)			8 (0.062)	0 (0.145)	4 (0.193)	0 (0.199)	22 (0.101)				0 (0.075)
CIA vs CO at 65 days							0 (0.144)	22 (0.002)				2 (0.174)

Regression analysis:

Finally, we have made a regression analysis between the clinical data and metabolites from urine sample and identified by BML (Table 2). Although the regressions models generated with these data has statistical significance, the highest R^2 found in the models where always weak, i.e. from 0.04 to 0.3. PLSR for grip strength show that with 24 metabolites (including N,N-dimethylglycine, thiamine and arginine) the model reached to a maximum contribution R^2 of 0.30 ($p < 0.01$); endurance exercise performance show that with 50 metabolites (including N-acetylalanine, sarcosine, N-acetylmethionine, phosphocholine, carnosine and glutamine) the model reached to a maximum contribution R^2 of 0.11 ($p < 0.17$); free locomotion needed 40 metabolites (including thiamine, N-acetylalanine, sarcosine, arginine and carnosine) to reach a maximum contribution R^2 of 0.04 ($p < 0.03$); clinical score needed 26 metabolites (including creatinine, methionine, carnosine, leucine and glutamine) to reach maximum contribution R^2 of 0.05 ($p < 0.03$); hindpaw edema show that with 12 metabolites (including carnosine, leucine, creatinine and 4-aminobutyrate) the model reached to a maximum contribution R^2 of 0.084 ($p < 0.08$); food intake needed 15 metabolites (including N-acetylalanine, creatinine and 3-methylhistidine) to reach a maximum contribution R^2 of 0.30 ($p < 0.08$); and body weight needed 10 metabolites (including creatinine) to reach maximum contribution R^2 of 0.06 ($p < 0.01$). Table 2 show the R^2 contribution value from the PLSR model for the statistical significant 22 muscle-related metabolites and the clinical data, metabolites R^2 not related to muscle metabolism were not shown.

Table 2: Regression analysis between the clinical data and metabolic profile found in urine and identified by BML. Metabolites shown are solely the ones related to muscle loss process. Value expresses the metabolite contribution to the model.

	Strength	Fatigue	Locomotion	Score	Edema	Intake	Weight
3-Methylhistidine	0.044	-0.033	-0.020	-0.020	-0.051	0.130	-0.048
4-Aminobutyate	-0.073	-0.071	-0.016	0.056	0.097	0.022	0.001
Acetylcholine	0.063	0.015	0.015	-0.024	-0.036	0.068	-0.018
Arginine	0.083	-0.004	0.031	-0.093	-0.035	0.004	0.029
Carnosine	-0.039	0.039	0.031	0.093	0.125	-0.051	-0.026
Creatine	-0.063	-0.014	-0.051	0.050	0.026	-0.177	-0.039
Creatinine	-0.056	-0.061	-0.062	0.153	0.107	0.142	0.058
Glutamine	-0.019	0.024	0.003	0.058	0.066	0.066	0.024
Histamine	-0.029	-0.035	-0.007	0.001	0.036	-0.004	0.019
Histidine	-0.048	-0.040	0.022	0.033	0.059	0.036	-0.050
Isoleucine	-0.046	-0.028	-0.018	0.052	0.049	0.000	-0.030
L-Methionine	-0.082	0.003	-0.006	0.109	0.048	-0.020	0.024
Leucine	-0.101	-0.069	-0.028	0.083	0.121	0.041	-0.022
Lysine	0.020	-0.006	-0.020	-0.033	-0.070	-0.180	-0.080
myo-Inositol	-0.011	-0.026	-0.044	0.039	0.008	0.050	-0.012
N-Acetylalanine	0.028	0.093	0.063	0.031	-0.008	0.214	0.032
N-Acetylmethionine	0.014	0.056	0.021	-0.060	-0.001	0.035	0.014
N,N-Dimethylglycine	0.107	-0.022	-0.014	-0.044	-0.070	-0.006	-0.020
Phosphocholine	0.016	0.041	0.005	0.022	-0.025	0.022	0.000
Phosphocreatine	0.033	0.023	-0.010	0.037	0.060	0.000	-0.007
Sarcosine	0.037	0.066	0.053	-0.017	-0.023	0.083	0.028
Thiamine	0.084	0.012	0.126	-0.047	-0.156	0.025	0.000

Discussion:

Our results demonstrate that collagen-induced arthritis has a great potential to be used as an experimental model for rheumatoid cachexia, since it shows similar clinical aspects as RA patients and are congruent to several aspects from the defining findings of cachexia [3]. Moreover, we have identified in these mice alterations in several metabolites and pathways that are strongly related to muscle catabolism or anabolism. These altered profiles could be useful to clinical assessment of cachexia syndrome development process, i.e. muscle loss process begin; follow it up, and cachexia diagnosis. This list of metabolites will be validated in patients with RA in an on-going project of our group.

The recent criteria to diagnose cachexia syndrome proposed by Evans [3] was formulated based on many diseases, however it is still not clear how applicable these criteria are to the so called rheumatoid cachexia, since RA patients, despite significant loss of muscle mass, usually show normal weight and BMI ($>20 \text{ kg.m}^{-2}$) [40], and stable or even increased fat mass (obese cachexia) [13]. Despite its known impact in function capacity and quality of life, rheumatoid cachexia is largely under-recognized in clinical practice in comparison with other causes of

cachexia, stressing the importance of finding convenient and reliable biomarkers for diagnosis and monitoring of muscle wasting.

Muscle alterations and cachexia have also been described in different animal models, including arthritis animal models [41]. However, the number of studies is limited and the correlation of the animal model with human rheumatoid cachexia is unclear.

In 1997, Roubenoff et. al. had suggested that adjuvant-induced arthritis (AIA) could be an animal model of rheumatoid cachexia [23]. They identified 6% of weight loss in AIA rats and a strong correlation of weight loss with serum TNF levels. Later, Yamada et. al. [24] demonstrated a reduction of muscle strength in CIA mice model, probably related to compromised myofibrillar function caused by oxidative and nitrosative stress [24]. Hartog et. al. reported muscle loss in CIA, reduction of spontaneous locomotion and an inverse correlation between locomotion and muscle weight [25]. In this same animal model, Filippin et. al. described progressive reduction of animal body weight and spontaneous locomotion accordingly to arthritis development, and a strong correlation between muscle loss and severe stages of arthritis [26]. At last, Teixeira et. al. demonstrated in CIA rat model that the molecular mechanism of muscle wasting of arthritis is different from disuse muscle atrophy, confirming that the observed alterations are not due to only reduction of animal locomotion and immobility [27]. Others models related to cachexia and other disease have strong disease factors [41-43], thereafter it could not be used as rheumatoid cachexia animal model. Considering all of the above characteristics, CIA model seems to have the necessary features to be a good rheumatoid cachexia animal model.

As an initial step to use a metabolomics approach to discover novel biomarkers, we first attempted to validate the CIA in DBA/1J mouse as a model for rheumatoid cachexia. Our previous research has demonstrated that these animals present up to 30% decrease in myofiber cross-sectional area after 45 days of disease induction [26]. Now we have evaluated the functional impact of muscle wasting, demonstrating decreased of up to 24% in free exploratory locomotion, 66% in strength grip force, and 24% in endurance exercise performance total time from 35 to 65 days after immunization, in a way fulfilling the clinical criteria for cachexia as proposed by Evans [3], with the exception of a clear weight loss and anorexia. However, muscle mass wasting without weight loss is also observed in RA patients. These observations suggest that these animals are reproducing similar mechanisms of muscle wasting as RA patients, and may be considered as a useful animal model to study this complication.

Next, we used metabolomics analysis looking for potential biomarkers in the urine of these mice. Using an animal model has the main advantage of circumventing the great heterogeneity implicit in human studies, increasing the power to prospect useful biomarkers. Previous metabolomics studies in RA have addressed profiles for disease activity, drug exposure and prognosis in early disease, demonstrating the feasibility of this approach [30-32], but any study focusing on muscle. Several pathways were found to be altered in RA patients, such as inositol phosphate metabolism; lipid, fatty acid, and carbohydrate metabolism; amino acid metabolism; glucose metabolism; ascorbate metabolism; glycolate metabolism; dicarboxylate metabolism; energy metabolism; nucleic acid metabolism; reactive oxygen

species metabolism; methylation; and macrophage response [29]. Essential amino acids, those that cannot be synthesised *de novo* in the human body, also offer a useful general marker for protein degradation [32].

From all of those metabolites and pathways found in our analyses, histidine metabolism was the most frequent pathway altered in CIA animals. Furthermore, all metabolites related to this pathway (3-methylhistidine, carnosine, histamine, histidine and urocanate) had high statistical significance in the PLSDA model analysis. 3-methyl-histidine has already been used as a marker of muscle degradation process in wasting disease, and monitoring athletic condition [44-47]. 3-methylhistidine was a metabolite from the best regression model of food intake with a contribution of 0.130. Carnosine have been suggested to be used as a marker of muscle loss process [48]. Also, supplementation with carnosine has shown better outcomes to experimental arthritis animal model and RA patients [49, 50]. Furthermore, lower levels of carnosine dipeptidase 1, the enzyme that converts carnosine into histidine, are associated to worse prognosis of gastrointestinal cancer and lower enzyme levels are related with cancer cachexia compared with weight stable patients [51]. Concerning regression analysis, carnosine was related to fatigue, free locomotion, clinical score, and hindpaw edema best models, contributing with 0.039, 0.031, 0.093 and 0.125, respectively. Histidine low plasma concentration has been shown to be associated with inflammation, oxidative stress, protein-energy wasting and mortality in chronic kidney disease (CKD) patients [52]. In addition, oral administration of histidine to CKD patients was reported to improve grip strength and walking speed and to reduce the rate of erythrocyte sedimentation [52, 53]. The literature had already reported that high amount of amino acids end products are excreted from RA patients, including histidine [31]. Histamine is a well know vasodilator of precapillary arterioles and stimulator of capillary permeability, as well as it has a role in the production of pain [54]. Furthermore, it has already been show histamine is one of discriminatory metabolite for RA treatment prediction [31]. Therefore, histidine metabolism has a strong relationship to muscle wasting and at least one metabolite certainly will be validate as a biomarker of rheumatoid cachexia.

Arginine and proline metabolism was another pathway that was affected by CIA in our study as well as the metabolites arginine, 4-aminobutyrate, creatine and phosphocreatine had high statistical significance in PLSDA models. The semi-essential amino acid arginine is related to the production of creatine, urea and nitric oxide (NO) and to the synthesis of new proteins [55]. Through its vasodilatory function, NO may play a role in nutrient delivery to the muscle and can impact nutrient transport into the muscle fibre [56, 57], and also to muscle healing or fibrosis fate [39, 58, 59]. Arginine had appeared in the best regression models of grip strength and free locomotion, and it has contributed with 0.083 and 0.031. The metabolite 4-aminobutyrate, also known as GABA, is suggested to be able also to regulate inflammation and it was suggested to have influence to rheumatoid arthritis disease [60]. Corroborating with it, GABA contributed with 0.097 in the best regression model for hindpaw edema. We can suggest that arginine and proline metabolism has a role to RA, but also to muscle wasting process in RA.

Glycine, serine and threonine metabolism are also metabolic rotes related to amino acids and found in PLDA models with the frequent presence of N,N-dimethylglycine, sarcosine and

phosphocholine metabolites. N,N-dimethylglycine is a metabolite that had already been described to positively correlate with fat-free mass in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients [46]. Another study has suggested its potential role related to fatigue [61]. Corroborating to this information, N,N-dimethylglycine contributed with 0.107 to the best model of grip strength. Phosphocholine increased level has an apparently indirect effect on muscle loss; it has been shown that phosphocholine levels is increased in cachexia inducing tumor cell line MAC16 vs non-cachectic inducing tumor cell line MAC13 grown in severe combined immunodeficient male mice [43]. Also, it has contributed with 0.041 to endurance exercise performance best regression model. Even if it would be directly or indirectly, this pathway also seems a good candidate to validate a metabolite as a biomarker of rheumatoid cachexia.

Creatine phosphate metabolism is deeply important for muscle function; it was expected to find out several times the metabolites related to this pathway as it was observed. Creatinine levels are close associated to muscle wasting, energetic muscle metabolism and increase in patients with muscle loss [62]. Creatinine is the degradation product of creatine when it is properly phosphorylated to be used in muscle energy process [62]. Creatinine levels has also correlated positively with fat-free mass for COPD [46]. This metabolite has appeared in the best regression models for clinical score, hindpaw edema, food intake and body weight, contributing with 0.153, 0.107, 0.142 and 0.058, respectively. Although creatine supplementation in RA patients has shown to increased muscle mass, it does not change strength or physical function; however it seems to be a good perspective to treat rheumatoid cachectic patients [63]. For COPD patients, this supplementation can increase muscle creatine phosphate levels, and improve patients phosphocreatine muscle levels after training [64]. Additionally, It has been suggested that it could attenuate pro-inflammatory cytokines levels, stimulate satellite cells proliferation and positive feedback for genes responsible to protein synthesis (see Sakkas [65] for a review) [65]. This pathway had already been used to follow up muscle mass change, being a strong candidate in human validation process as a biomarker.

As it was shown, others amino acids have been shown to have strong influence within muscle metabolism. Glutamine muscle levels are important to provide this amino acid for the body [66]. Also, low muscle glutamine concentration has a relationship with decreased protein synthesis in acute disease states [67]. In addition, inactivity has been shown to reduce glutamine availability [66]. Related to it, glutamine appeared in both endurance exercise performance and clinical score best regression models contributing with 0.024 and 0.058, respectively. Lysine amino acid has an important role in muscle cell protein metabolism regulation seen in C2C12 myoblast [68]. Another amino acid, leucine, is suggested as a stimulator for protein synthesis by signalling through the mammalian target of rapamycin complex 1 [69]. Furthermore, leucine supplementation has shown to reduce muscle loss in adenocarcinoma tumor-bearing CD2F1 mice [70] as well as it can oppose the catabolic effect of low pH in L6-G8C5 rat skeletal muscle cell [71]. Leucine was found to contribute with 0.121 to the best PLSR model for edema. Also, leucine and isoleucine blood levels were increased in patients with hepatocellular carcinoma compared patients with cirrhosis [72], suggesting a protein catabolism. Moreover, phenylalanine has been used as a marker of muscle metabolism, because large majority of peripheral metabolism of phenylalanine occurs in skeletal muscle [73]. Precisely, an isotope of phenylalanine is often used to assess anabolic or

catabolic balance in skeletal muscle [74]. With regard to methionine, it is the primary amino acid needed to initiate protein synthesis, it is needed for synthesis of acute phase proteins, also correlated with the loss of body mass in patients with lung and gastrointestinal cancers, and it has been shown that low plasma levels of leucine and methionine is observed in serum of weight-losing mice bearing the MAC16 tumor [75]. Methionine has appeared in the best regression model for clinical score with a contribution of 0.109.

Notwithstanding, the metabolites not related to amino acid metabolism have also importance in skeletal muscle. It is known that thiamine, also known as B1 vitamin, deficiency can induce high-output cardiac failure due to the accumulation of pyruvate and lactate, leading to intense vasodilation [76]. Thiamine were tested in C57BL6 mice and it was shown that these animals lose body weight as well lose appetite in 21-23 days after feeding a diet deficient in thiamine, also it was shown that fat and fat-free mass was decreased in the group with deficient thiamine diet [77]. This vitamin was related to the best regression models for grip strength and free locomotion, with a contribution of 0.084 and 0.126, respectively. Another B vitamin, pantothenate, B5 vitamin, is an essential nutrient, required to synthesize and metabolize proteins. Supplementation with B5 vitamin has shown to provide relief of muscular and joint pain in arthritis [78]. Also, it has a role in muscle energetic metabolism observed in Duchene muscular dystrophy mdx-mice skeletal muscle [79]. Pyridoxine, vitamin B6, is also used in composition with others from B vitamin complex to prevent or limit muscle loss [80]. Cancer cachexia NMRI mice supplemented with D-myo-inositol-1,2,6-triphosphate (a similar compound to myo-inositol) attenuated loss of body weight due to an increase in protein synthesis and decrease in protein degradation in skeletal muscle [81] as well as to attenuate both the induction of protein degradation and depression of protein synthesis in C2C12 myotubes [82].

Some statistical significant metabolites found in PLSDA model were not properly mentioned because of the paucity of literature regarding muscle metabolism process and/or related to chronic inflammation process. These metabolites are listed here as follow: uroconate (histidine metabolism), succinylacetone (tyrosine metabolite), N-acetylmethionine (methionine derivative; contributed with 0.056 to the best regression model of endurance exercise performance), N-acetylalanine (substrate from a variety of cellular reactions; contributed with 0.093, 0.063 and 0.214 to the best regression models of endurance exercise performance, free locomotion and food intake, respectively), acetylcholine (a neurotransmitter at neuromuscular junction), sarcosine (a derivative of glycine; contributed with 0.066 and 0.053 to the best regression models of endurance exercise performance and free locomotion, respectively) and aspartate (a non-essential proteinogenic amino acid).

Based on the time dependente list of metabolites (Fig. 4), if we set a cut-off time point of cachexia development to CIA model concerning our previous research , we can suggest to be validate the following list of metabolites to be used as prognosis of muscle loss process: 3-methylhistidine, 4-aminobutyric acid, acetylcholine, arginine, aspartate, carnosine, creatine, creatinine, glutamine, histamine, histidine, isoleucine, leucine, l-methionine, lysine, myo-inositol, n,n-dimethylglycine, n-acetylalanine, n-acetylmethionine, pantothenate, phenylalanine, phosphocholine, phosphocreatine, pyridoxine, sarcosine, succinylacetone and thiamine. Thereafter 45 days, we suggest the following list as potential biomarkers of cachexia

diagnosis: 3-methylhistidine, 4-aminobutyric acid, acetylcholine, arginine, carnosine, creatine, creatinine, glutamine, histamine, histidine, isoleucine, leucine, l-methionine, lysine, myo-inositol, n,n-dimethylglycine, n-acetylalanine, n-acetylmethionine, pantothenate, phosphocholine, phosphocreatine, pyridoxine, sarcosine, succinylacetone and urocanate.

In conclusion, collagen-induced arthritis animal model with DBA/1J male mouse seem to be an animal model of rheumatoid cachexia. In addition, several metabolites were found in mice urine related to muscle metabolism that can be validated in urine of RA patients with muscle loss. It would be very useful to identify and quantify not just one, though, several metabolites in RA patients to predict and follow up such complex disease as cachexia is. Muscle loss and cachexia are not limited to RA, but also to several chronic inflammatory diseases as well as sarcopenia in aging process; thereafter those metabolites could be also tested for these diseases as well.

Perspectives

The next step of this research will be validating these metabolite list with RA patients. There is an on-going research of our group to reach this goal.

Author contribution:

Paulo VG Alabarse has contributed to planning, cachexia model follow up and metabolomics experiments, statistics analysis, scientific discussion, and writing; Priscila S Lora has contributed to planning, cachexia model follow up, statistics from cachexia model, scientific discussion, and writing; Jordana MS Silva has contributed to planning, cachexia model follow up, statistics from cachexia model, scientific discussion, and writing; Andreise S Almeida has contributed to cachexia model follow up and writing; Mayara S de Oliveira has contributed to cachexia model follow up and writing; Monica Immig has contributed to cachexia model follow up; Rafaela CE Santo has contributed to planning, cachexia model follow up, and scientific discussion; Eduarda C Freitas has contributed to planning, cachexia model follow up, and scientific discussion; Vivian ON Teixeira has contributed to planning, statistics from cachexia model, scientific discussion, and writing; Camilla L Bathurst has contributed to metabolomics, and statistics from metabolomics; Lidiane I Filippin has the original idea of cachexia model; Stephen P Young was the supervisor for all metabolomics steps, and has contributed to planning, scientific discussion, and paper corrections; Ricardo M Xavier was the supervisor for all cachexia model experiments, and has contributed to planning, scientific discussion, and paper corrections.

Acknowledgements:

We thank the Unidade de Experimentação Animal (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) for their help during animal experimentation, University of Birmingham for supporting experimental procedures with NMR. The Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), the program Science without Borders and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) granted scholarships for students that helped develop this study. This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e

Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre and by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interest:

No conflict of interest.

References:

- [1] R. Roubenoff, R.A. Roubenoff, J.G. Cannon, J.J. Kehayias, H. Zhuang, B. Dawsonhughes, C.A. Dinarello, I.H. Rosenberg, RHEUMATOID CACHEXIA - CYTOKINE-DRIVEN HYPERMETABOLISM ACCOMPANYING REDUCED BODY CELL MASS IN CHRONIC INFLAMMATION, *Journal of Clinical Investigation* 93(6) (1994) 2379-2386.
- [2] K. Sakuma, A. Yamaguchi, Sarcopenia and cachexia: the adaptations of negative regulators of skeletal muscle mass, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 3(2) (2012) 77-94.
- [3] W.J. Evans, J.E. Morley, J. Argiles, C. Bales, V. Baracos, D. Guttridge, A. Jatoi, K. Kalantar-Zadeh, H. Lochs, G. Mantovani, D. Marks, W.E. Mitch, M. Muscaritoli, A. Najand, P. Ponikowski, F.R. Fanelli, M. Schambelan, A. Schols, M. Schuster, D. Thomas, R. Wolfe, S.D. Anker, A. Boyce, G. Nuckolls, Cachexia: A new definition, *Clinical Nutrition* 27(6) (2008) 793-799.
- [4] M. Muscaritoli, S. Lucia, A. Molino, T. Cederholm, F. Rossi Fanelli, Muscle atrophy in aging and chronic diseases: is it sarcopenia or cachexia?, *Internal and Emergency Medicine* 8(7) (2013) 553-560.
- [5] C. Lok, THE LAST ILLNESS, *Nature* 528(7581) (2015) 182-183.
- [6] I. Navarro-Millan, J.A. Singh, J.R. Curtis, Systematic Review of Tocilizumab for Rheumatoid Arthritis: A New Biologic Agent Targeting the Interleukin-6 Receptor, *Clinical Therapeutics* 34(4) (2012) 788-802.
- [7] G. Sindhu, M. Ratheesh, G.L. Shyni, B. Nambisan, A. Helen, Anti-inflammatory and antioxidative effects of mucilage of *Trigonella foenum graecum* (Fenugreek) on adjuvant induced arthritic rats, *International Immunopharmacology* 12(1) (2012) 205-211.
- [8] M.A.E. van Bokhorst-de van der Schueren, N.P.C. Konijn, I.E.M. Bultink, W.F. Lems, C.P. Earthman, L.H.D. van Tuyl, Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis, *Clinical Nutrition* 31(6) (2012) 1008-1010.
- [9] A.-C. Elkan, N. Hakansson, J. Frostegard, T. Cederholm, I. Hafstrom, Rheumatoid cachexia is associated with dyslipidemia and low levels of atheroprotective natural antibodies against phosphorylcholine but not with dietary fat in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional study, *Arthritis Research & Therapy* 11(2) (2009).
- [10] R. Munro, H. Capell, Prevalence of low body mass in rheumatoid arthritis: Association with the acute phase response, *Annals of the Rheumatic Diseases* 56(5) (1997) 326-329.
- [11] R. Roubenoff, R.A. Roubenoff, L.M. Ward, S.M. Holland, D.B. Hellmann, RHEUMATOID CACHEXIA - DEPLETION OF LEAN BODY-MASS IN RHEUMATOID-ARTHRITIS - POSSIBLE ASSOCIATION WITH TUMOR-NECROSIS-FACTOR, *Journal of Rheumatology* 19(10) (1992) 1505-1510.
- [12] W. Fukuda, A. Omoto, S. Oku, T. Tanaka, Y. Tsubouchi, M. Kohno, Y. Kawahito, Contribution of rheumatoid arthritis disease activity and disability to rheumatoid cachexia, *Modern Rheumatology* 20(5) (2010) 439-443.
- [13] G.D. Summers, C.M. Deighton, M.J. Rennie, A.H. Booth, Rheumatoid cachexia: a clinical perspective, *Rheumatology* 47(8) (2008) 1124-1131.
- [14] D.D. Dunlop, L.M. Manheim, E.H. Yelin, J. Song, R.W. Chang, The costs of arthritis, *Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research* 49(1) (2003) 101-113.
- [15] S. Palus, S. von Haehling, J. Springer, Muscle wasting: An overview of recent developments in basic research, *International Journal of Cardiology* 176(3) (2014) 640-644.

- [16] M. Cesari, R.A. Fielding, M. Pahor, B. Goodpaster, M. Hellerstein, G.A. Van Kan, S.D. Anker, S. Rutkove, J.W. Vrijbloed, M. Isaac, Y. Rolland, C. M'Rini, M. Aubertin-Leheudre, J.M. Cedarbaum, M. Zamboni, C.C. Sieber, D. Laurent, W.J. Evans, R. Roubenoff, J.E. Morley, B. Vellas, S. Int Working Grp, Biomarkers of sarcopenia in clinical trials-recommendations from the International Working Group on Sarcopenia, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 3(3) (2012) 181-190.
- [17] G. Scharf, J. Heineke, Finding good biomarkers for sarcopenia, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 3(3) (2012) 145-148.
- [18] S. Ali, J.M. Garcia, Sarcopenia, Cachexia and Aging: Diagnosis, Mechanisms and Therapeutic Options - A Mini-Review, *Gerontology* 60(4) (2014) 294-305.
- [19] P.G. Oliveira, R. Grespan, L.G. Pinto, L. Meurer, J.C.T. Brenol, R. Roesler, G. Schwartzmann, F.Q. Cunha, R.M. Xavier, Protective Effect of RC-3095, an Antagonist of the Gastrin-Releasing Peptide Receptor, in Experimental Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 63(10) (2011) 2956-2965.
- [20] E.-M. Choi, Ligularia fischeri leaf extract prevents the oxidative stress in DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis, *Journal of Applied Toxicology* 27(2) (2007) 176-182.
- [21] E.-M. Choi, Oxidative status of DBA/1J mice with type II collagen-induced arthritis, *Journal of Applied Toxicology* 27(5) (2007) 472-481.
- [22] E.-M. Choi, Suppressive effects of potato (*Solanum tuberosum*) on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice, *Food Science and Biotechnology* 16(1) (2007) 43-48.
- [23] R. Roubenoff, L.M. Freeman, D.E. Smith, L.W. Abad, C.A. Dinarello, J.J. Kehayias, Adjuvant arthritis as a model of inflammatory cachexia, *Arthritis and Rheumatism* 40(3) (1997) 534-539.
- [24] T. Yamada, N. Place, N. Kosterina, T. Ostberg, S.J. Zhang, C. Grundtman, H. Erlandsson-Harris, I.E. Lundberg, B. Glenmark, J.D. Bruton, H. Westerblad, Impaired Myofibrillar Function in the Soleus Muscle of Mice With Collagen-Induced Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 60(11) (2009) 3280-3289.
- [25] A. Hartog, J. Hulsman, J. Garssen, Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis, *Bmc Musculoskeletal Disorders* 10 (2009).
- [26] L.I. Filippin, V.N. Teixeira, P.R. Viacava, P.S. Lora, L.L. Xavier, R.M. Xavier, Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity, *J Cachexia Sarcopenia Muscle* (2013).
- [27] V.d.O. Nunes Teixeira, L.I. Filippin, P.R. Viacava, P.G. de Oliveira, R.M. Xavier, Muscle wasting in collagen-induced arthritis and disuse atrophy, *Experimental Biology and Medicine* 238(12) (2013) 1421-1430.
- [28] L. Semerano, P.-H. Romeo, M.-C. Boissier, Metabolomics for rheumatic diseases: has the time come?, *Annals of the Rheumatic Diseases* 74(7) (2015) 1325-1326.
- [29] R. Priori, R. Scivo, J. Brandt, M. Valerio, L. Casadei, G. Valesini, C. Manetti, Metabolomics in rheumatic diseases: The potential of an emerging methodology for improved patient diagnosis, prognosis, and treatment efficacy, *Autoimmunity Reviews* 12(10) (2013) 1022-1030.
- [30] S.P. Young, S.R. Kapoor, M.R. Viant, J.J. Byrne, A. Filer, C.D. Buckley, G.D. Kitas, K. Raza, The Impact of Inflammation on Metabolomic Profiles in Patients With Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 65(8) (2013) 2015-2023.
- [31] S.R. Kapoor, A. Filer, M.A. Fitzpatrick, B.A. Fisher, P.C. Taylor, C.D. Buckley, I.B. McInnes, K. Raza, S.P. Young, Metabolic Profiling Predicts Response to Anti-Tumor Necrosis Factor alpha Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis, *Arthritis and Rheumatism* 65(6) (2013) 1448-1456.
- [32] M.A. Fitzpatrick, S.P. Young, Metabolomics - a novel window into inflammatory disease, *Swiss Medical Weekly* 143 (2013).
- [33] E.F. Rosloniec, M. Cremer, A.H. Kang, L.K. Myers, D.D. Brand, Collagen-induced arthritis., *Curr Protoc Immunol Chapter 15* (2010) Unit 15.5.1-25.
- [34] R.M.J. Deacon, Measuring the strength of mice, *Journal of visualized experiments*, 2013, p. 2610.

- [35] J. Xia, N. Psychogios, N. Young, D.S. Wishart, MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation, *Nucleic Acids Research* 37 (2009) W652-W660.
- [36] J. Xia, R. Mandal, I.V. Sinelnikov, D. Broadhurst, D.S. Wishart, MetaboAnalyst 2.0-a comprehensive server for metabolomic data analysis, *Nucleic Acids Research* 40(W1) (2012) W127-W133.
- [37] J. Xia, I.V. Sinelnikov, B. Han, D.S. Wishart, MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful, *Nucleic Acids Research* 43(W1) (2015) W251-W257.
- [38] M. Brenner, H.C. Meng, N.C. Yarlett, M.M. Griffiths, E.F. Remmers, R.L. Wilder, N.S. Gulko, The non-major histocompatibility complex quantitative trait locus Cia10 contains a major arthritis gene and regulates disease severity, pannus formation, and joint damage, *Arthritis and Rheumatism* 52(1) (2005) 322-332.
- [39] L.I. Filippin, A.J. Moreira, N.P. Marroni, R.M. Xavier, Nitric oxide and repair of skeletal muscle injury, *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 21(3-4) (2009) 157-163.
- [40] L.C. Rall, R. Roubenoff, Rheumatoid cachexia: metabolic abnormalities, mechanisms and interventions, *Rheumatology* 43(10) (2004) 1219-1223.
- [41] M. Romanick, L.V. Thompson, H.M. Brown-Borg, Murine models of atrophy, cachexia, and sarcopenia in skeletal muscle, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1832(9) (2013) 1410-1420.
- [42] K. Kalantar-Zadeh, C. Rhee, J.J. Sim, P. Stenvinkel, S.D. Anker, C.P. Kovesdy, Why cachexia kills: examining the causality of poor outcomes in wasting conditions, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(2) (2013) 89-94.
- [43] M.-F. Penet, M.M. Gadiya, B. Krishnamachary, S. Nimmagadda, M.G. Pomper, D. Artemov, Z.M. Bhujwala, Metabolic Signatures Imaged in Cancer-Induced Cachexia, *Cancer Research* 71(22) (2011) 6948-6956.
- [44] M.A. McNurlan, P.J. Garlick, R.T. Steigbigel, K.A. DeCristofaro, R.A. Frost, C.H. Lang, R.W. Johnson, A.M. Santasier, C.J. Cabahug, J. Fuhrer, M.C. Gelato, Responsiveness of muscle protein synthesis to growth hormone administration in HIV-infected individuals declines with severity of disease, *Journal of Clinical Investigation* 100(8) (1997) 2125-2132.
- [45] J.A. Tayek, J.A. Brasel, EFFECTS OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA ON SKELETAL-MUSCLE AND WALKER 256 CARCINOSARCOMA PROTEIN-METABOLISM STUDIED INVIVO, *Cancer Research* 50(9) (1990) 2765-2768.
- [46] B.K. Ubhi, J.H. Riley, P.A. Shaw, D.A. Lomas, R. Tal-Singer, W. MacNee, J.L. Griffin, S.C. Connor, Metabolic profiling detects biomarkers of protein degradation in COPD patients, *European Respiratory Journal* 40(2) (2012) 345-355.
- [47] P.J. Flakoll, S.L. Nissen, J.A. Rathmacher, Determination of human muscle mass | using metabolic marker for 3-methyl-histidine for e.g. monitoring athletic condition or wasting diseases, Univ Vanderbilt; Univ Iowa State Res Found Inc.
- [48] S.S. Patel, M.Z. Molnar, J.A. Tayek, J.H. Ix, N. Noori, D. Benner, S. Heymsfield, J.D. Kopple, C.P. Kovesdy, K. Kalantar-Zadeh, Serum creatinine as a marker of muscle mass in chronic kidney disease: results of a cross-sectional study and review of literature, *Journal of Cachexia Sarcopenia and Muscle* 4(1) (2013) 19-29.
- [49] K. Bauerová, S. Poništ, D. Mihalová, F. Dráfi, V. Kuncírová, Utilization of adjuvant arthritis model for evaluation of new approaches in rheumatoid arthritis therapy focused on regulation of immune processes and oxidative stress, *Interdiscip Toxicol*, 2011.
- [50] F. Drafi, K. Bauerova, V. Kuncirova, S. Ponist, D. Mihalova, T. Fedorova, J. Harmatha, R. Nosal, Pharmacological influence on processes of adjuvant arthritis: Effect of the combination of an antioxidant active substance with methotrexate, *Interdiscip Toxicol* 5(2) (2012) 84-91.
- [51] P. Arner, F. Henjes, J.M. Schwenk, S. Darmanis, I. Dahlman, B.-M. Iresjo, P. Naredi, T. Agustsson, K. Lundholm, P. Nilsson, M. Ryden, Circulating Carnosine Dipeptidase 1 Associates with Weight Loss and Poor Prognosis in Gastrointestinal Cancer, *Plos One* 10(4) (2015).
- [52] M. Watanabe, M.E. Suliman, A.R. Qureshi, E. Garcia-Lopez, P. Barany, O. Heimbürger, P. Stenvinkel, B. Lindholm, Consequences of low plasma histidine in chronic kidney disease

- patients: associations with inflammation, oxidative stress, and mortality, *American Journal of Clinical Nutrition* 87(6) (2008) 1860-1866.
- [53] F.B. Stifel, R.H. Herman, IS HISTIDINE AN ESSENTIAL AMINO-ACID IN MAN, *American Journal of Clinical Nutrition* 25(2) (1972) 182-&.
- [54] Y. Endo, T. Tabata, H. Kuroda, T. Tadano, K. Matsushima, M. Watanabe, Induction of histidine decarboxylase in skeletal muscle in mice by electrical stimulation, prolonged walking and interleukin-1, *Journal of Physiology-London* 509(2) (1998) 587-598.
- [55] D.J. Ham, M.K. Caldow, G.S. Lynch, R. Koopman, Arginine protects muscle cells from wasting in vitro in an mTORC1-dependent and NO-independent manner, *Amino Acids* 46(12) (2014) 2643-2652.
- [56] C. Goto, K. Nishioka, T. Umemura, D. Jitsuiki, A. Sakaguchi, M. Kawamura, K. Chayama, M. Yoshizumi, Y. Higashi, Acute moderate-intensity exercise induces vasodilation through oxide bioavailability an increase in nitric in humans, *American Journal of Hypertension* 20(8) (2007) 825-830.
- [57] T.L. Merry, G.R. Steinberg, G.S. Lynch, G.K. McConell, Skeletal muscle glucose uptake during contraction is regulated by nitric oxide and ROS independently of AMPK, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 298(3) (2010) E577-E585.
- [58] L.I. Filippin, M. Jose Cuevas, E. Lima, N.P. Marroni, J. Gonzalez-Gallego, R.M. Xavier, The role of nitric oxide during healing of trauma to the skeletal muscle, *Inflammation Research* 60(4) (2011) 347-356.
- [59] L.I. Filippin, M. Jose Cuevas, E. Lima, N.P. Marroni, J. Gonzalez-Gallego, R.M. Xavier, Nitric oxide regulates the repair of injured skeletal muscle, *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 24(1) (2011) 43-49.
- [60] J.M. Kelley, L.B. Hughes, S.L. Bridges, Jr., Does gamma-aminobutyric acid (GABA) influence the development of chronic inflammation in rheumatoid arthritis?, *Journal of Neuroinflammation* 5 (2008).
- [61] H. Ma, X. Liu, Y. Wu, N. Zhang, The Intervention Effects of Acupuncture on Fatigue Induced by Exhaustive Physical Exercises: A Metabolomics Investigation, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2015).
- [62] R. Eisner, C. Stretch, T. Eastman, J. Xia, D. Hau, S. Damaraju, R. Greiner, D.S. Wishart, V.E. Baracos, Learning to predict cancer-associated skeletal muscle wasting from H-1-NMR profiles of urinary metabolites, *Metabolomics* 7(1) (2011) 25-34.
- [63] T.J. Wilkinson, A.B. Lemmey, F. Sheikh, Y. Ahmad, S. Chitale, J. Jones, P. Maddison, T.D. O'Brien, CAN CREATINE SUPPLEMENTATION IMPROVE BODY COMPOSITION AND OBJECTIVE PHYSICAL FUNCTION IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS? A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL, *Rheumatology* 54 (2015) 82-82.
- [64] P.D. Wagner, Skeletal muscles in chronic obstructive pulmonary disease: Deconditioning, or myopathy?, *Respirology* 11(6) (2006) 681-686.
- [65] G.K. Sakkas, M. Schambelan, K. Mulligan, Can the use of creatine supplementation attenuate muscle loss in cachexia and wasting?, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 12(6) (2009) 623-627.
- [66] G. Biolo, T. Cederholm, M. Muscaritoli, Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: From sarcopenic obesity to cachexia, *Clinical Nutrition* 33(5) (2014) 737-748.
- [67] M.J. Rennie, P.A. MacLennan, H.S. Hundal, B. Weryk, K. Smith, P.M. Taylor, C. Egan, P.W. Watt, SKELETAL-MUSCLE GLUTAMINE TRANSPORT, INTRAMUSCULAR GLUTAMINE CONCENTRATION, AND MUSCLE-PROTEIN TURNOVER, *Metabolism-Clinical and Experimental* 38(8) (1989) 47-51.
- [68] T. Sato, Y. Ito, T. Nagasawa, Lysine suppresses myofibrillar protein degradation by regulating the autophagic-lysosomal system through phosphorylation of Akt in C2C12 cells, *Springerplus* 3 (2014).

- [69] S. Chevalier, A. Winter, Do patients with advanced cancer have any potential for protein anabolism in response to amino acid therapy?, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 17(3) (2014) 213-218.
- [70] S.J. Peters, A. Van Helvoort, D. Kegler, J.M. Argiles, Y.C. Luiking, A. Laviano, J. Van Bergenhenegouwen, N.E.P. Deutz, H.P. Haagsman, M. Gorselink, K. Van Norren, Dose-dependent effects of leucine supplementation on preservation of muscle mass in cancer cachectic mice, *Oncology Reports* 26(1) (2011) 247-254.
- [71] A. Bevington, J. Brown, J. Walls, Leucine suppresses acid-induced protein wasting in L6 rat muscle cells, *European Journal of Clinical Investigation* 31(6) (2001) 497-503.
- [72] M.R.N. Ranjbar, Y. Luo, C. Di Poto, R.S. Varghese, A. Ferrarini, C. Zhang, N.I. Sarhan, H. Soliman, M.G. Tadesse, D.H. Ziada, R. Roy, H.W. Ransom, GC-MS Based Plasma Metabolomics for Identification of Candidate Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Cohort, *Plos One* 10(6) (2015).
- [73] M.J. Toth, M.M. LeWinter, P.A. Ades, D.E. Matthews, Impaired muscle protein anabolic response to insulin and amino acids in heart failure patients: relationship with markers of immune activation, *Clinical Science* 119(11-12) (2010) 467-476.
- [74] Z.A. Puthuchery, J. Rawal, M. McPhail, B. Connolly, G. Ratnayake, P. Chan, N.S. Hopkinson, R. Padhke, T. Dew, P.S. Sidhu, C. Velloso, J. Seymour, C.C. Agley, A. Selby, M. Limb, L.M. Edwards, K. Smith, A. Rowlerson, M.J. Rennie, J. Moxham, S.D.R. Harridge, N. Hart, H.E. Montgomery, Acute Skeletal Muscle Wasting in Critical Illness, *Jama-Journal of the American Medical Association* 310(15) (2013) 1591-1600.
- [75] H.J. Smith, N.A. Greenberg, M.J. Tisdale, Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice, *British Journal of Cancer* 91(2) (2004) 408-412.
- [76] K.K.A. Witte, A.L. Clark, J.G.F. Cleland, Chronic heart failure and micronutrients, *Journal of the American College of Cardiology* 37(7) (2001) 1765-1774.
- [77] M. Liu, A.P. Alimov, H. Wang, J.A. Frank, W. Katz, M. Xu, Z.J. Ke, J. Luo, THIAMINE DEFICIENCY INDUCES ANOREXIA BY INHIBITING HYPOTHALAMIC AMPK, *Neuroscience* 267 (2014) 102-113.
- [78] R.J. Woodward, Synergistic dietary supplement for treating e.g. arthritis - contains D-phenylalanine, a vitamin B and glucosamine sulphate, WOODWARD R J (WOOD-Individual) WOODWARD R J (WOOD-Individual).
- [79] P.C. Even, A. Decrouy, A. Chinet, DEFECTIVE REGULATION OF ENERGY-METABOLISM IN MDX-MOUSE SKELETAL-MUSCLES, *Biochemical Journal* 304 (1994) 649-654.
- [80] J.F. Lescuyer, Food composition, useful to prevent/limit loss of muscle mass, loss of bone mineral density and cognitive decline, comprises pea/milk protein, potassium, calcium, selenium, vitamins D3, E, C, B2, B6, B9, and B12, choline and polyphenol, HOLYMARK (HOLY-Non-standard).
- [81] S.T. Russell, P.M.A. Siren, M.J. Siren, M.J. Tisdale, Attenuation of skeletal muscle atrophy in cancer cachexia by d-myo-inositol 1,2,6-triphosphate, *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 64(3) (2009) 517-527.
- [82] S.T. Russell, P.M.A. Siren, M.J. Siren, M.J. Tisdale, Mechanism of attenuation of protein loss in murine C2C12 myotubes by D-myo-inositol 1,2,6-triphosphate, *Experimental Cell Research* 316(2) (2010) 286-295.

“Algumas vezes o esperado simplesmente perde importância comparado ao inesperado”. Meredith Grey

Conclusão

Com base nos achados, pode-se concluir que o modelo experimental de artrite induzida por colágeno representa um modelo com semelhanças muito próximas aos sintomas, comportamento e alterações morfológicas encontrados em pacientes com artrite reumatoide e síndrome de caquexia reumatoide. Os animais CIA apresentaram uma redução de 25% de massa muscular do gastrocnemio e 24% para o tibial anterior comparado ao CO e, quando normalizado pelo peso do animal, a diferença se mantém para 23 e 22% para estes mesmos músculos, a atrofia muscular já havia sido observado anteriormente em nosso grupo [58], sugerindo que estes animais também poderiam apresentar perda muscular similar ao processo de caquexia reumatoide.

Os testes físicos e funcionais no grupo CIA apresentaram uma redução de >20% na locomoção espontânea e de >20% no tempo total do teste de desempenho físico a partir dos 35 dias da indução da doença, bem como uma redução crescente de 25 à 66% da força muscular a partir dos 25 dias da indução da doença comparado com o grupo CO. Então, este modelo experimental também apresenta alteração muscular, funcional e comportamental em relação com os pacientes com AR, que possuem aumento de fraqueza, redução na atividade física diária e fadiga aumentada. Os animais CIA não apresentaram alteração no peso e nem na ingestão alimentar comparado com o CO, novamente, estes achados são similares aos pacientes com caquexia reumatoide e distintos dos da síndrome da caquexia causada por outras doenças, em que há redução do peso e recorrentes casos de anorexia.

Adicionalmente, a literatura já apresentou aumento das citocinas inflamatórias nos animais CIA [58, 92, 93]. Reunindo todos estes achados e confrontando-os com os critérios de Evans [10], os animais CIA apresentam: redução de força muscular (e atividade física diária), aumento na fadiga, alteração nos marcadores sanguíneos (aumento de citocinas inflamatórias); em ressonância com os pacientes com AR e caquexia reumatoide, o modelo de CIA não condiz com os critérios de Evans [10], mas acompanham os pacientes, nos seguintes aspectos: normalidade no peso e ausência de anorexia. Portanto, apresentamos esse modelo para ser utilizado futuramente como modelo experimental de caquexia reumatoide.

Empregando esse modelo, tornou-se possível a análise do perfil metabólico ao longo do desenvolvimento da artrite, bem como correlacionar este perfil com o desenvolvimento da perda muscular concomitante. Realizando a técnica de metabolômica, filtrando os resultados para os metabólitos que participam de rotas

metabólicas no tecido muscular, obteve-se um perfil tempo dependente de quase 30 metabólitos e que participam de quase 20 rotas metabólicas que ocorrem no tecido muscular. Determinando-se um ponto de corte em 45 dias para o modelo como desenvolvimento de caquexia reumatoide, baseado em estudo anterior de nosso grupo [58], pode-se observar que, antes deste período, os seguintes metabólitos deverão ser validados em pacientes para prognóstico, em ordem alfabética: 3-metilhistidina, 4-aminobutirato, acetilcolina, arginina, aspartato, carnosina, creatina, creatinina, glutamina, histamina, histidina, isoleucina, leucina, L-metionina, lisine, mio-inositol, N,N-dimetilglicina, N-acetilalanina, N-acetilmethionina, pantotenato, fenilalanine, fosfocolina, fosfocreatina, piridoxina, sarcosina, succinilacetona e tiamina. Já para diagnóstico, sugere-se a validação dos metabólitos, em ordem alfabética: 3-metilhistidina, 4-aminobutirato, acetilcolina, arginina, carnosina, creatina, creatinina, glutamina, histamina, histidina, isoleucina, leucina, L-metionina, lisina, mio-inositol, N,N-dimetilglicina, N-acetilalanina, N-acetilmethionina, pantotenato, fosfocolina, fosfocreatina, piridoxina, sarcosina, succinilacetona e urocanato. Com os achados desta pesquisa, sugere-se esta gama de metabólitos que serão validados em um estudo envolvendo pacientes com artrite reumatoide bem como o acompanhamento do processo de perda muscular, análise dessas moléculas e, por fim, estabelecendo um ou mais metabólitos como biomarcadores de caquexia reumatoide, objetivando prognóstico, diagnóstico e acompanhamento da síndrome.

Perspectivas Futuras

→ Analisar resultados do metaboloma de camundongos com os de cultura celular de músculo incubados com mediadores inflamatórios (e.g. TNF-alfa) que sabidamente induzem o processo de perda muscular.

→ Realizar a validação dos resultados obtidos nos camundongos em pacientes com artrite reumatoide concomitantemente acometidos com a síndrome de caquexia.

