

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Maria Luísa Gasparini Vieira

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CISTATINAS DE *FASCIOLA HEPATICA*
RECOMBINANTES NA PERDA MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO**

Porto Alegre

2020

Maria Luísa Gasparini Vieira

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CISTATINAS DE *FASCIOLA HEPATICA*
RECOMBINANTES NA PERDA MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Machado Xavier
Coorientadora: Me. Mirian Farinon

Porto Alegre

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Gasparini Vieira , Maria Luisa
AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CISTATINAS DE FASCIOLA
HEPÁTICA RECOMBINANTES NA PERDA MUSCULAR EM MODELO
EXPERIMENTAL DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO / Maria
Luisa Gasparini Vieira . -- 2020.
61 f.
Orientador: Ricardo Machado Xavier.

Coorientadora: Mirian Farinon.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Artrite reumatoide. 2. Artrite-induzida por
colágeno. 3. Perda muscular . 4. Fasciola hepática. 5.
Cistatinas recombinantes. I. Machado Xavier, Ricardo,
orient. II. Farinon, Mirian, coorient. III. Título.

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

Maria Luísa Gasparini Vieira

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CISTATINAS DE *FASCIOLA HEPATICA*
RECOMBINANTES NA PERDA MUSCULAR EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 15 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Adriana Simon Coitinho - UFRGS

Dra. Lidiane Filippin – Universidade La Salle

Dr. Professor Ricardo Machado Xavier - UFRGS

RESUMO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença de cunho inflamatório, autoimune e erosivo, no qual acomete as articulações periféricas. O mecanismo inflamatório persistente na AR resulta em uma hiperplasia sinovial acompanhada de degradação da cartilagem e do osso com consequente perda de função, além de atrofia muscular. Sua prevalência é de cerca 0,46% no Brasil e 1% no mundo, sendo observada com maior frequência em mulheres. Sabe-se que a patologia da doença envolve produção e liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, algumas sendo chave para o desenvolvimento e progressão da doença. O desenvolvimento dessa inflamação é um importante contribuinte nas comorbidades que envolvem a disfunção do músculo esquelético, atuando sobre diversas vias intracelulares. Apesar dos avanços no tratamento da AR, ainda é escassa a discussão acerca desta atrofia muscular, salientando a necessidade da busca por novas estratégias terapêuticas. A *Fasciola hepatica* é um helminto causador da doença fasciolose em ruminantes e humanos. Foi identificado que a *F. hepatica* possui diferentes estratégias para regular a resposta imune de seus hospedeiros através de produtos excretores-secretores e antígenos do tegumento. Entre esses produtos estão as cistatinas, que são moléculas inibidoras de cisteíno-proteases, e seu papel imunomodulador vem sendo estudado através da regulação de citocinas inflamatórias e da apresentação de antígenos. Resultados preliminares demonstraram que cistatina recombinante 3 de *F. hepatica* apresentou um efeito protetor quanto ao dano articular em modelo CIA. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se o efeito positivo das cistatinas também se estende ao tecido muscular de camundongos com artrite induzida por colágeno. Os animais foram randomizados nos grupos: cistatina 1, cistatina 3 (100µg/dose) e controle. A massa muscular foi avaliada através do peso dos músculos (g) e a partir de análises histopatológicas de medidas do diâmetro de miofibras musculares dos murinos. As cistatinas recombinantes de *F. hepatica* não influenciaram na perda muscular de camundongos com CIA. As áreas transversais de miofibra dos músculos esqueléticos tibiais anteriores (TA) não apresentaram diferença quando comparado com os animais controle. O peso e as razões sarcoplasmáticas dos músculos TA e gastrocnêmico (GA) também não tiveram diferença entre os grupos. A partir destes resultados, é possível concluir que as cistatinas recombinantes de *F. hepatica* não influenciaram na perda muscular de camundongos artríticos induzidos por colágeno. Apesar das cistatinas não apresentarem um efeito protetor no dano muscular em CIA, o presente trabalho se torna elucidativo e importante na busca por novos tratamentos acerca do déficit muscular presente na artrite reumatoide.

Palavras-chave: Artrite reumatoide, artrite-induzida por colágeno, perda muscular, *Fasciola hepatica*, cistatinas recombinantes

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an inflammatory disease of unknown etiology, has an autoimmune character and, usually, affects peripheral joints. Any persistent inflammatory mechanism results in synovial hyperplasia accompanied by degradation of cartilage and bone with consequent loss of function, in addition to muscle atrophy. The prevalence of disease is around 0.46% in Brazil and 1% in the world, being observed more frequently in women. It is known that the disease pathology involves the production and exacerbated release of pro-inflammatory cytokines, some of which are key to the development and progression of the disease. The development of this inflammation is an important contributor to comorbidities involving skeletal muscle dysfunction, acting on several intracellular pathways. Despite advances in the treatment of RA, there is still little discussion about this muscular atrophy, emphasizing the need to search for new therapeutic strategies. *Fasciola hepatica* (*F. hepatica*) is a helminth that causes fasciolosis in ruminants and humans. It was identified that *F. hepatica* has different strategies to regulate the immune response of its hosts through excretory-secretory products and antigens of the integument. Among these products are cystatins, which are cysteine protease inhibitory molecules, and their immunomodulatory role has been studied through the regulation of inflammatory cytokines and the presentation of antigens. Preliminary results demonstrated that *F. hepatica* recombinant cystatin 3 had a protective effect against joint damage in a CIA model. Therefore, the objective of this study was to evaluate whether the positive effect of cystatins also extends to the muscle tissue of mice with collagen-induced arthritis. The animals were randomized into groups: cystatin 1, cystatin 3 (100µg / dose) and control. Muscle mass was assessed through the weight of the muscles and from histopathological analyzes of measurements of the muscle myofiber diameter of the murines. The recombinant cystatins of *F. hepatica* did not influence the muscle loss of mice induced by collagen. The transverse areas of myofiber of the tibialis anterior skeletal muscles (TA) showed no difference when compared with controls. The weight and sarcoplasmic ratios of the TA and gastrocnemius (GA) muscles also had no difference between groups. From these results, it is possible to conclude that the recombinant cystatins of *F. hepatica* did not influence the muscle loss of collagen-induced arthritic mice. Although cystatins do not have a protective effect on muscle damage in CIA, the present study becomes elucidative and important in the search for new treatments about the muscle deficit present in rheumatoid arthritis.

Keywords: Rheumatoid arthritis, collagen-induced arthritis, muscle loss, *Fasciola hepatica*, recombinant cystatins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações articulares na artrite reumatoide.....	13
Figura 2 – Linha do tempo experimento CIA.....	22
Figura 3 – Estágio adulto de <i>Fasciola hepatica</i>	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios 2010 ACR/EULAR para classificação de artrite reumatoide 15

LISTA DE ABREVIATURA

ACPA	Anticorpos Anti-proteínas/peptídeos Citrulinados
ACR	American College of Rheumatology
AR	Artrite Reumatoide
CFA	Adjuvante Completo de Freund (Complete Freund's Adjuvante)
CIA	Artrite Induzida por Colágeno
CII	Colágeno Bovino do Tipo II
CR	Caquexia reumatoide
CS	Células satélites
DMARDs	Drogas Modificadoras do Curso da Doença
ESPs	Produtos Excretores-Secretores
EULAR	Liga Europeia Contra Reumatismo
<i>F. hepática</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
FLS	Fibroblastos Sinoviais
FR	Fator Reumatoide
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-17	Interleucina-17
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MLS	Macrófago Sinovial
MMP	Metaloproteinases
MTX	Metotrexato
NF-K β	Fator nuclear kappa- β
PCR	Proteína C Reativa
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do fator Nuclear κ B
TGF- β	Fator de Crescimento β
TLRs	Receptor do Tipo Toll
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VSG	Velocidade de Sedimentação Globular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	ARTRITE REUMATOIDE	11
1.2	PERDA MUSCULAR.....	15
1.3	DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA AR	18
1.4	MODELO ANIMAL DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (AR)	21
1.5	FASCIOLA HEPATICA	23
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARTRITE REUMATOIDE

Artrite reumatoide (AR) é uma doença inflamatória que geralmente afeta várias articulações do corpo. Ela tem caráter autoimune, com presença de sinovite crônica, simétrica e erosiva, sendo principalmente caracterizada por dor, edema ou inchaço nas articulações, além de rigidez matinal e disfunção muscular (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Sendo assim, todo o mecanismo inflamatório resulta em uma hiperplasia sinovial acompanhada de degradação da cartilagem e erosão óssea, além de atrofia muscular e consequente perda de função (RADNER; SMOLEN; ALETAHA, 2010). A prevalência de AR é de 1% em todo o mundo e 0,46% no Brasil, tendo mais incidência em indivíduos na quarta e sexta década de vida e prevalência duas vezes maior em mulheres do que em homens (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010)(SENNA; FERRAZ, 2004). Como consequências da AR, pacientes apresentam diminuição da qualidade de vida, aumento da incapacidade funcional, e diminuição de produtividade laboral. Além disto, o tratamento de AR apresenta altos custos para a sociedade (KHURANA; BERNEY, 2005).

Na fisiologia normal, as articulações são revestidas por uma membrana sinovial, que produz o líquido sinovial, responsável pela manutenção da nutrição e da lubrificação da cartilagem e dos ossos articulares. Na patologia, em especial na AR, quando há presença de inflamação crônica da membrana, promove-se uma destruição destas articulações devido à erosão da cartilagem e do osso (CHOY, 2012). Projeções de tecido proliferativo – um tecido característico da AR e chamado de *pannus* – penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo (GOELDNER et al., 2011).

Entende-se que fatores ambientais e genéticos estariam envolvidos com a susceptibilidade e severidade da doença. Evidências apontam que na AR distúrbios em componentes do sistema imunológico levam ao desenvolvimento anormal de anticorpos que medeiam as reações inflamatórias, principalmente nas articulações (WATTS, 2010). No viés genético, a ideia de que existem genes que contribuem para o desdobramento de doenças autoimunes é estudada há muitos anos. Sabe-se que atualmente mais de 30 regiões gênicas estão envolvidas com o desenvolvimento da doença, como a região HLA (antígeno leucocitário humano) e o gene PTPN22, envolvido na regulação da sinalização do receptor da célula T (BARTON; WORTHINGTON, 2009; CASTRO-SANTOS; DÍAZ-PEÑA, 2016).

Na AR, a resposta imune gerada inicia uma mobilização de células mononucleares como os linfócitos B e T e macrófagos. Além disso, há presença de enzimas degradantes de matriz, as metaloproteinases (MMPs), autoanticorpos, colágeno tipo 2 (particularmente na forma

oxidada), glicose-6-fosfato isomerase, proteoglicanos, antígenos nucleares e outros autoantígenos articulares que expandem as vias pelas quais os autoanticorpos provavelmente contribuem para patogênese (SMOLEN et al., 2018). Sendo assim, um evento principal para o desenvolvimento da AR são as modificações pós-traducionais, que formam epítomos modificados, que serão reconhecidos pelo sistema imune, que irá apresentar esses antígenos às células T, gerando uma sinalização para estimular as células B produzirem anticorpos contra essas proteínas, que são do próprio organismo (SMOLEN et al., 2018).

Entre os principais autoanticorpos presentes na patologia estão o fator reumatoide (FR), que reage contra a porção Fc da imunoglobulina G, formando complexos imunes, e os anticorpos anti-proteínas citrulinadas (ACPA). O FR é um autoanticorpo clássico, usado como marcador da doença. Porém, nos últimos anos, uma série de trabalhos demonstrou que a família de autoanticorpos mais específica para AR são os ACPA (VAN BOEKEL et al., 2002). Esses anticorpos podem ser detectados em aproximadamente 80% dos soros de pacientes com AR com especificidade de 95% a 99% (ALARCON; ANDRADE, 2007). Além disso, aparecem precocemente durante a evolução da enfermidade, portanto a presença desses anticorpos, em conjunto com a de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, apresenta-se bastante útil para auxiliar no diagnóstico da doença, especialmente em suas fases iniciais.

Com o desenvolvimento desta resposta imune, dá-se início ao processo inflamatório na sinóvia articular. As células imunes ativadas se acumulam no líquido sinovial, toda essa mobilização ocorre devido à ativação endotelial, que aumenta a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, atraindo os leucócitos e induzindo sua intensa proliferação. Esta hiperplasia sinovial também conta com a proliferação de macrófagos e fibroblastos sinoviais (FLS), que são uma das principais fontes de proteases e citocinas inflamatórias (MCINNES; SCHETT, 2011).

Sabe-se que o desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias podem causar o aparecimento de danos e inflamação crônica, e influenciar o desenvolvimento de autoimunidades. Logo, na patologia da AR, há o envolvimento da produção e liberação dessas proteínas inflamatórias e outros mediadores (MCINNES; SCHETT, 2007). Entre diversas citocinas que contribuem para a inflamação, encontra-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF) que é uma molécula chave no desenvolvimento da AR causando uma super produção e expressão de outros mediadores como interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6). Embora haja a participação de diversas citocinas, esta via acaba atuando como principal guia para a inflamação e destruição articular (CHOY, 2012; HOWE, 1998). A expressão e produção das citocinas tem várias fontes, entre elas a interação entre linfócitos T e B e macrófagos. Os

macrófagos produzem TNF, IL-1 β , IL-6, interleucina 8 (IL-8), MMPs, quimiocinas e, também, realizam fagocitose e apresentação de antígenos. As células B, produzem IL-6, TNF e são precursores de plasmócitos secretores de autoanticorpos, além de processarem e apresentarem antígenos, promovendo a ativação das células T (CHOY et al., 2002). Em pacientes com AR ativa, as concentrações séricas e sinoviais de TNF e IL-1 são altas; essas moléculas além de promover a inflamação, atuam estimulando a liberação de MMPs destruidoras de tecidos, e impedindo a produção de inibidores endógenos dessas metaloproteinases, cujo resultado é a destruição articular (CHOY EH, 2001).

Em suma, a hiperplasia sinovial acaba por ser o estopim do dano à cartilagem e ao osso, uma vez que macrófagos e fibroblastos sinoviais são ativados por TNF, IL-1 e IL-6 assumindo um fenótipo agressivo e resistente a apoptose e, conseqüentemente, passam a sintetizar substâncias nocivas à cartilagem - como as MMPs - dando origem à formação do *pannus* invasivo (CHOY, 2012; FIRESTEIN; MCINNES, 2017).

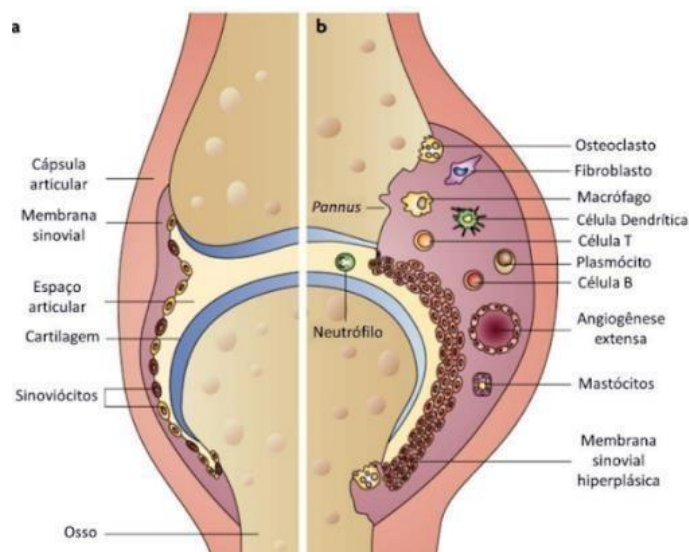


Figura1: Alterações articulares na artrite reumatoide. a) Articulação saudável; b) Articulação doente (Adaptado de SMOLEN; STEINER, 2003).

Além das manifestações articulares, a AR apresenta diversas manifestações de cunho sistêmico que impactam significativamente em sua morbimortalidade. Pacientes com AR possuem um risco maior de mortalidade, principalmente decorrente de problemas cardiovasculares e infecção (LEVY, 2008). Além disso, há uma grande gama de manifestações extra-articulares na AR como nódulos reumatóides, doenças de pele, manifestações oculares e vasculite, além de poder acometer rins, coração e sistema nervoso central e periférico (KHURANA; BERNEY, 2005). Ainda, dentre esses, pode-se citar fadiga, perda de peso, fraqueza e atrofia generalizada de fibras musculares que está associada com a intensidade da

sinovite (FUKUDA et al., 2010; TURESSON et al., 2008). Até 30% dos pacientes apresenta pelo menos uma desordem extra-articular (YOUNG; KODURI, 2007), e há piora conforme o aumento da atividade da doença. A maior parte destas manifestações extra-articulares da AR está associada com a atividade da doença (NYHÄLL-WÅHLIN et al., 2009). Essas manifestações agravam a doença, levando a um aumento da incapacidade funcional, diminuição da qualidade de vida e aumento da mortalidade (RADNER; SMOLEN; ALETAHA, 2010).

Geralmente, a patogênese da AR começa a se desenvolver anos antes do aparecimento dos sinais clínicos da doença, embora um episódio agudo possa ser possível. Logo, o seu diagnóstico em estágio pré-clínico se torna um episódio incomum. Atualmente, os critérios para a identificação da doença incluem manifestações clínicas e ensaios sorológicos. A orientação para o diagnóstico é baseada nos critérios de classificação do Colégio Americano de Reumatologia (American College of Rheumatology – ACR) e pela Liga Europeia Contra o Reumatismo (European League Against Rheumatism – EULAR) (NEOGI et al., 2010). Os critérios avaliam as articulações acometidas, a duração dos sintomas, marcadores sorológicos de autoanticorpos e de fase aguda de inflamação (níveis da proteína C reativa [PCR] e velocidade de sedimentação globular [VSG]), além de haver a possibilidade de exames por imagem; sendo atribuído uma pontuação para cada critério (NEOGI et al., 2010).

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

Tabela 1. Critérios 2010 ACR/EULAR para classificação de artrite reumatoide (ALETAHA et al., 2005).

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

Entretanto, os critérios anteriormente descritos equivalem apenas aos pacientes que já desenvolveram sinais clínicos da doença, como por exemplo, inchaço em pelo menos uma das articulações. Uma pontuação maior ou igual a 6 classifica um paciente como tendo AR, cabendo ressaltar que os novos critérios de 2010 não são diagnósticos, mas, sim, classificatórios. De início, estes critérios foram desenvolvidos afim de definir populações homogêneas para a finalidade de pesquisa, porém vieram a se tornar úteis para o diagnóstico clínico. Essa classificação aumenta a sensibilidade no reconhecimento da doença e permite a identificação de casos prematuros. O diagnóstico precoce e o início do tratamento imediato são fundamentais no controle da atividade da doença, prevenindo a incapacidade funcional e lesão extensiva das articulações do paciente (ALETAHA et al., 2005).

1.2 PERDA MUSCULAR

A perda muscular é uma condição comum na AR (FUKUDA et al., 2010). Estudos demonstram que a perda muscular está presente em 20% dos pacientes com AR, causando perda de peso, redução da atividade física e aumento da fadiga (VAN BOKHORST - DE VAN DER SCHUEREN et al., 2012). Esse quadro leva a uma perda significativa da qualidade de vida.

Além disso, a atrofia muscular e o baixo peso em pacientes com AR são importantes fatores prognósticos em relação à piora da atividade da doença, incapacitação e sobrevivência (VAN BOKHORST - DE VAN DER SCHUEREN et al., 2012).

A perda de massa, força e desempenho muscular é definida pelo termo sarcopenia. Esta perda pode ser decorrente de diversos fatores, como inatividade física, envelhecimento, distúrbios metabólicos e inflamatórios, além de alterações na ativação das *células satélite* (CS) (DA ROCHA et al., 2009; DOHERTY, 2003). Na AR, acredita-se que citocinas inflamatórias, déficits na regeneração muscular, redução da síntese proteica e incapacidade física estejam relacionadas com o desenvolvimento da sarcopenia reumatoide. Estudos recentes demonstraram que a prevalência de sarcopenia é de 17,1 % - 37,1 % em pacientes artríticos, mostrando que a sarcopenia se desenvolve em uma parcela significativa de indivíduos acometidos pela AR (TORII et al., 2019; VLIETSTRA et al., 2019). Apesar de ser um problema comum na artrite reumatoide, muito pouco se atenta para a perda muscular nos pacientes, e poucas medidas são tomadas para remediar essa comorbidade e melhorar a capacidade funcional e qualidade de vida dos pacientes.

A atrofia do músculo na AR é atribuída a diversos fatores, como a exposição crônica a citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 β e IL-6, alterações hormonais e inatividade física, além da ativação de distintas cascatas intracelulares que induzem à degradação proteica, porém, ainda se sabe muito pouco sobre essas sinalizações. A perda muscular causada pela AR já foi associada com a intensidade da inflamação e severidade da doença, o que enfatiza a inflamação como sendo um importante processo na perda muscular (FUKUDA et al., 2010).

Sabe-se que TNF e IL-1 estão envolvidos de maneira central na patogênese da doença e na lesão articular da AR, porém essas citocinas também possuem uma influência sobre o metabolismo energético de proteínas do corpo todo. Ambas citocinas são produzidas, principalmente, por monócitos e macrófagos, mas também são produzidas por uma variedade de outras células, incluindo linfócitos B, linfócitos T e células do músculo esquelético (BLÜML et al., 2012). Um estudo em pacientes com AR tratados com tocilizumabe (TCZ) - um anticorpo anti-receptor de IL-6 - relatou um ganho significativo de massa magra após um ano de tratamento, sugerindo que IL-6 também seria uma citocina importante envolvida na perda de músculo esquelético em artrite (TOURNADRE et al., 2017). Logo, a inflamação vem sendo discutida como importante contribuinte para a disfunção do músculo esquelético e há indícios de que citocinas pró-inflamatórias como o TNF, IL-1 e IL-6 atuam como mediadores centrais

da perda de massa muscular (JACKMAN; KANDARIAN, 2004)(LONDHE; GUTTRIDGE, 2015).

Porém não são apenas TNF e IL-1 que podem estar envolvidas no dano muscular, as chamadas citocinas sarcoativas – ativas nos músculos – também incluem IL-6, interferon- γ (IFN- γ), fator de crescimento transformador- β (TGF- β) e o fator de transcrição MyoD – que está associado diretamente com a atividade de IFN- γ e TGF- β e é uma molécula essencial na diferenciação muscular esquelética (RALL; ROUBENOFF, 2004). Estudos mostraram que a perda de proteína no músculo esquelético pode ser dependente das atividades de sinalização entre IFN- γ e TGF- β , e que a atividade de um terceiro componente, o fator nuclear kappa- β (NF- κ B), seria essencial para que essas moléculas induzissem danos musculares. Foi demonstrado que a ativação de NF- κ B, causada pelo TNF, suprime o mRNA de MyoD a nível pós-transcricional (DENIS et al., 2000). O MyoD é um excelente marcador de regeneração muscular, pois atua regulando a diferenciação do músculo esquelético e é essencial para a reparação de tecidos lesados (ZAMMIT, 2017).

Apesar do progresso nos estudos sobre os mecanismos moleculares que levam à atrofia muscular, essa consequência da doença ainda é muito pouco estudada. As diversas alterações que levam à perda de massa muscular envolvem distintas cascatas de sinalização intracelular que podem levar à morte celular programada (apoptose), ao aumento da degradação proteica ou a diminuição da ativação de *células satélite* (CS) que são responsáveis pela regeneração celular (DE OLIVEIRA et al., 2012). Enquanto o tecido muscular se mantém livre de agressões, as CS permanecem em estado de quiescência (repouso). Porém, em resposta a estímulos como crescimento, remodelação ou trauma, as CS são ativadas, proliferam-se e expressam marcadores tais como MyoD e miogenina, que são indicadores de proliferação e de diferenciação de CS, respectivamente. Neste estado, também são denominadas mioblastos. Essas células se fundem a fibras musculares já existentes ou se fundem a CS vizinhas para gerar novas fibras musculares. O padrão de expressão gênica das CS ainda é pouco conhecido, tanto no estado de repouso como no estado ativado. Porém, as CS quiescentes não expressam fatores reguladores da miogênese das famílias da MyoD, essa família controla a diferenciação de células da linhagem miogênica, logo CS MyoD negativas apresentam capacidade de diferenciação reduzida e retardada (BERKES; TAPSCOTT, 2005; YAMADA et al., 2008).

Ademais, as vias de degradação proteica também são estudadas, dentre essas vias as principais citadas são sistema de autofagia, através de proteases lisossomais, proteases ativadas

por cálcio, como a calpaína e as caspases, e o sistema proteossomo. Relatou-se que a inibição das vias enzimáticas da calpaína, lisossomo e proteossomo ocasionou em 20%, 40% e 62%, respectivamente, na redução da degradação de proteínas totais (PURINTRAPIBAN; WANG; FORSBERG, 2003). Entretanto, observa-se que a atuação desses sistemas não é uniforme, havendo uma variação na importância individual de cada uma, dependendo da situação clínica presente (HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002; POWERS; KAVAZIS; DERUISSEAU, 2005). Já foi observado que no viés de funcionalidade, os pacientes com AR apresentam redução na força muscular, mas a velocidade e contratilidade musculares se mantêm inalteradas (MATSCHE et al., 2010). Portanto, a real contribuição desses sistemas na perda muscular é ainda pouco conhecida.

Desta forma, ainda são escassos os estudos avaliando o impacto de tratamentos na perda de massa muscular. E apesar da atrofia muscular estar presente em uma grande parcela dos pacientes com AR, ocasionando em alto impacto econômico e funcional nesta população, ainda não há um tratamento padronizado para essa condição.

1.3 TRATAMENTO DA AR

Ao longo dos anos, muitos estudos foram desenvolvidos a fim de encontrar fármacos que fossem eficientes para o tratamento e até uma possível remissão da AR. Devido ao avanço da ciência, muitos trabalhos realizados possibilitaram que, atualmente, haja um melhor manejo com a doença, tanto no âmbito farmacológico quanto em estratégias terapêuticas. Entretanto, a cura é uma questão ainda não respondida. O tratamento da AR deve começar o mais cedo possível, sendo o objetivo principal minimizar os sintomas e, preferencialmente, ocasionar a remissão da doença (MONTI et al., 2015). Outros objetivos da doença incluem a redução da dor, controle das comorbidades e preservação de atividades cotidianas (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

São utilizadas cinco classes de medicamentos para o tratamento da AR: analgésicos, anti-inflamatórios não esteroides, corticosteroides e fármacos antirreumáticos modificadores da doença (*Disease Modifying Anti-rheumatoid Drugs – DMARD*) - sintéticos e biológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). O tratamento tem uma abordagem dinâmica, sendo baseado em metas (treat-to-target), tendo um monitoramento rigoroso do curso tomado pela doença, e havendo mudança do manejo caso a meta de tratamento não seja atingida (SMOLEN et al., 2016). Os medicamentos são empregados de maneira combinada de acordo com o estágio da doença e o estado do paciente. Logo, as medidas acabam sendo muito individuais a cada organismo, sendo necessário a observação intensiva para possível troca de tratamento.

As drogas anti-inflamatórias são utilizadas para tratar alguns dos sintomas da AR, como dor e rigidez articular (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010). Essa classe é incapaz de modificar o curso da doença a longo prazo, além disso ele apresenta toxicidade cardíaca e gastrointestinal, logo é recomendado o uso concomitante com inibidores da bomba de prótons para atenuar riscos (SCHAFFER et al., 2006; SCOTT et al., 2007). Essa classe geralmente é utilizada logo no início da doença, com o objetivo de reduzir a inflamação antes que o tratamento antirreumático se inicie. Os corticosteroides, assim como os anti-inflamatórios, são recomendados para reduzir o inchaço e a dor articular. Apesar de altas doses de glicocorticoides causarem múltiplos efeitos de toxicidade e apresentar um efeito limitado na doença, doses menores utilizadas por curtos períodos podem reduzir a inflamação sinovial e por longos períodos ter efeito benéfico contra o dano nas articulações (DA MOTA et al., 2018). Nestas menores doses, os glicocorticoides não apresentam efeitos adversos graves, porém todas as doses podem ser nocivas para o metabolismo, levando a uma redução da absorção óssea (TON et al., 2005). Por isso, para aqueles pacientes que estão em uso com corticosteroides é recomendada uma suplementação de vitamina D e cálcio (BIJLSMA, 2015).

Os DMARDs são utilizados como terapia de primeira linha para tratar, principalmente, casos de AR recentemente diagnosticados (GAFFO; SAAG; CURTIS, 2006). Muitos dos mecanismos de ação desse medicamento são desconhecidos, porém seus efeitos são bastante benéficos para uma parcela dos pacientes. Eles reduzem o inchaço articular, dor e marcadores de fase aguda, limitam o dano articular progressivo e melhoram a função. O principal DMARD é o metrotexato (MTX), um imunossupressor amplamente utilizado e considerado o fármaco padrão no tratamento da AR (LOPEZ-OLIVO et al., 2014). Foi o primeiro fármaco empregado com o intuito de impedir a progressão da doença, é usado como monoterapia ou em combinação e capaz de interferir no prognóstico da doença (CHOI et al., 2002; FEELY; ERICKSON; O'DELL, 2009). Assim como os demais DMARDs sintéticos (leflunomida, sulfasalazina e hidroxicloroquina), o medicamento possui efeitos adversos leves a graves, podendo ser náuseas até hepatotoxicidade, alterações sanguíneas e doenças pulmonares (LOPEZ-OLIVO et al., 2014).

Entre outras estratégias adotadas, estão os DMARDs biológicos que acabam por tentar modificar a resposta biológica da doença; são anticorpos ou proteínas recombinantes desenvolvidas com o intuito de bloquear a atividade de mediadores inflamatórios ou moléculas sinalizadoras incluídos no mecanismo da AR. A maioria desses agentes biológicos são inibidores do fator de necrose tumoral (TNF), devido a sua importância no processo inflamatório e na destruição das articulações (TRACEY et al., 2008).

Atualmente três estão disponíveis para o tratamento, infliximabe e o adalimumabe são anticorpos monoclonais anti- TNF, e o etanercepte que é um receptor solúvel do TNF (SMOLEN; STEINER, 2003). Agentes biológicos que não tem o TNF como alvo biológico também foram aprovados para tratamento, como rituximabe, um anticorpo monoclonal anti-CD20 (molécula de superfície encontrada na célula B), abatacepte, um inibidor de sinais coestimulatórios de células T e o tocilizumabe, bloqueador do receptor de IL-6 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; SMOLEN et al., 2017).

Contudo, apesar de ser um avanço na pesquisa para tratamento da AR, essas terapias ainda apresentam efeitos adversos, dentre eles o mais comum é risco de infecções (LISTING et al., 2005). Além disso, outros efeitos adversos descritos em relação ao anti-TNF é o desenvolvimento de doenças granulomatosas como a tuberculose, elevação de enzimas hepáticas, vasculites cutâneas e síndromes desmielinizantes (DESAI; FURST, 2006; DORAN et al., 2002). A formação de anticorpos contra os tratamentos também foi descrita e geralmente os agentes biológicos são utilizados concomitantemente com metotrexato ou outro DMARD sintético para reduzir essa resposta imunológica (SMOLEN; ALETAHA; MCINNES, 2016).

Apesar dos avanços com tratamento na AR, mesmo com tratamentos farmacológicos, danos extrarticulares e déficit musculares ainda podem persistir. Em um ensaio clínico de pacientes artríticos tratados com inibidores de TNF ou com hidroxicloroquina, não foi observada melhora na composição muscular, mesmo em conjunto com treinamento físico (ANDONIAN et al., 2018). Além disso, o tratamento com glicocorticoides em pacientes com AR apresentou uma contribuição para a caquexia reumatoide, mesmo havendo o controle da inflamação e da atividade da doença, essa perda de massa magra permaneceu (LEMMMEY et al., 2018). Geralmente, mesmo com o controle rígido e atenuação inflamatória e destrutiva da doença, a melhora na composição corporal ou melhora física não é observada em pacientes com artrite reumatoide (LEMMMEY et al., 2016).

Outro aspecto importante é o manejo das comorbidades associadas, como doenças cardíacas e renais, assim como a dor e a incapacidade de realizar as atividades cotidianas. Nesse interim, os efeitos adversos e a utilização de muitos medicamentos acabam sendo um impedimento para uma parcela dos pacientes persistirem com o tratamento. Além disso, dependendo do paciente muitos medicamentos não atingem o objetivo esperado, e tratamentos alternativos, como os agentes biológicos, acabam tendo um custo elevado. Estudos afim de encontrar alternativas que tratem a doença e que possuam desvantagens mínimas aos pacientes são de extrema importância para melhorar a qualidade de vida de pessoas com AR.

1.4 MODELO ANIMAL DE ARTRITE INDUZIDA POR COLÁGENO (CIA)

Muitos aspectos da AR podem ser estudados a partir de materiais coletados de humanos, como sangue periférico ou tecidos para biópsias. Contudo, a doença se manifesta de modo complexo, tendo em vista os múltiplos fatores que estão por trás do seu desenvolvimento – influências ambientais e genéticas. Tendo em vista que existem limitações e dificuldades na análise dos mecanismos da AR, modelos animais que mimetizam as doenças humanas acabam sendo uma importante alternativa para estudar a patogênese e os mecanismos envolvidos na doença.

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

A partir disso, alguns critérios para a escolha de um modelo são essenciais para selecionar o que melhor se encaixa com o que se deseja investigar. Modelos experimentais de artrite apresentam diversas semelhanças com a AR, porém possuem algumas particularidades entre si (HEGEN et al., 2008). Dentre algumas diferenças, pode-se citar a progressão da doença que pode ser de desenvolvimento rápido ou lento, podendo ter respostas inflamatórias diferentes. Logo, entre os critérios importantes para um bom modelo animal estão a capacidade de prever a eficácia em humanos dos agentes estudados, modelo de fácil realização, duração razoável do período da experimentação e patogênese similar à doença em humanos (ASQUITH et al., 2009).

Em geral, os modelos experimentais são divididos em artrite inflamatória aguda e crônica, e pode ser induzida em linhagens de camundongos, ratos e, em alguns casos, coelhos, porcos da Guinéia ou macacos (HU et al., 2013). Cada um dos modelos desenvolve características que lembram sintomas clínicos da AR em seres humanos. Os modelos mais utilizados são em roedores, pois possuem maior disponibilidade de linhagens geneticamente homogêneas. Dentre os modelos existentes, os mais comuns utilizados para análise da eficácia de possíveis tratamentos terapêuticos são artrite induzida por adjuvante (AIA) e artrite induzida por colágeno (CIA). O mais utilizado é artrite induzida por colágeno do tipo II (CIA) (HEGEN et al., 2008). Geralmente, a escolha deste modelo se deve por ser uma experimentação relativamente simples de realizar, de fácil reprodutibilidade e com mais opções de animais susceptíveis para o desenvolvimento. O modelo de CIA pode ser induzido em primatas não-humanos, ratos ((Wistar, Sprague-Dawley e Wistar-Lewis) e camundongos (DBA/1J e C57BL/6) (ROSLONIEC et al., 2010).

A CIA compartilha diversas semelhanças com a AR humana, como a hiperplasia sinovial, o infiltrado celular, a degradação da cartilagem e a suscetibilidade relacionada à expressão de genes específicos do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classe II (ASQUITH et al., 2009). Sendo também um bom modelo para estudo de perda muscular (FILIPPIN et al., 2013) e de caquexia reumatoide - perda de massa magra total (ALABARSE et al., 2018; FILIPPIN et al., 2013).

O modelo de CIA é induzido em cepas de camundongos geneticamente suscetíveis, sendo a mais utilizada a de camundongos DBA/1J. A indução é realizada em roedores de 8 a 12 semanas de vida através de uma emulsão de adjuvante de Freund e colágeno bovino dotipo II (CII). A primeira imunização intradérmica na cauda ocorre no dia 0 e é composta de CII (2 mg/ml) e adjuvante completo de Freund (CFA – com adição de 2 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*) em iguais volumes. Isso resulta em uma reação inflamatória moderada no local da injeção que dura de 1-2 semanas. No 18º dia após a imunização, realiza-se uma injeção de reforço (booster) com uma emulsão de adjuvante incompleto de Freund (IFA – sem *M. tuberculosis*) em um ponto diferente da cauda. Para a maioria das linhagens CIA-sensíveis, o primeiro sinal clínico do desenvolvimento da artrite se torna visíveis entre os dias 21 e 35 após a imunização. A incidência de artrite em linhagens de camundongos suscetíveis é geralmente muito elevada, chegando a 80-100%, em sua maioria (BRAND; LATHAM; ROSLONIEC, 2007).

A resposta imune do modelo é caracterizada por uma resposta autoimune inflamatória contra o colágeno do tipo II (CII), mediada por células T e B, o que desencadeia uma artrite experimental autoimune que apresenta características clínicas, histológicas e imunológicas semelhantes à AR (ROSLONIEC et al., 2010). Além disso, assim como na AR humana, diversas citocinas pró-inflamatórias são expressas na cartilagem de camundongos com CIA, como TNF, IL-1 β , IL-6 e fator de crescimento tumoral (TGF) β (BEVAART; VERVOORDELDONK; TAK, 2010).



Figura 2: Linha do tempo experimento CIA

Apesar de haver similaridades do modelo com a AR, a CIA não é simétrica e inexistente uma combinação de patas/articulações afetadas, diferentemente da AR humana que é simétrica. Sendo as características clínicas similares, o desenvolvimento de eritema e edema articular. Outra diferença entre esse modelo experimental e AR é a ausência do fator reumatoide (ROSLONIEC et al., 2010). Contudo, esses modelos experimentais são amplamente utilizados para estudar os aspectos fisiopatológicos da doença e para testar novas terapias.

Apesar de ainda ser escasso na literatura estudos focados no viés muscular destes modelos e as vias envolvidas, alguns modelos experimentais já foram descritos como eficientes no desenvolvimento da caquexia reumatoide. Estudos em ratos submetidos a artrite induzida por adjuvante, um modelo experimental de artrite reumatoide, identificaram presença de alterações musculares, entre elas perda de peso, perda muscular e alteração de algumas proteínas importantes, como exemplo aumento de miostatina (miocina que inibe o crescimento muscular) e aumento de MyoD e miogenina (marcadores de regeneração muscular e atividade de células satélites) (CASTILLERO et al., 2009, 2011). Outros trabalhos também descreveram em modelo de CIA uma perda muscular progressiva conforme o desenvolvimento da artrite, demonstrando características clínicas semelhantes às de pacientes acometidos pela caquexia reumatoide (ALABARSE et al., 2018; FILIPPIN et al., 2013). Logo, considerando dados apresentados por estudos anteriores, o modelo de CIA parece apresentar características necessárias para o estudo e observação da perda muscular na AR.

1.5 *FASCIOLA HEPATICA* E IMUNOMODULAÇÃO

Infecções parasitárias em humanos se tornaram menos frequentes por conta da melhora da higiene ao longo dos anos. Consequentemente, a erradicação do contato humano com agentes parasitas deu espaço a um aumento na suscetibilidade a doenças alérgicas, diminuindo o desenvolvimento natural do sistema imunitário. Esta ideia, baseia-se no conceito da “Hipótese da Higiene” que evidencia a presença de um papel imunomodulatório que esses vermes causam quando parasitam o organismo. As doenças causadas por infecções helmínticas em humanos estão associadas a uma resposta imune Th2, que possui um papel imunomodulatório importante (JACKSON et al., 2009). Respostas imunes mediadas por células Th1 ativam macrófagos e promovem uma resposta imunológica mais inflamatória, ao contrário da resposta Th2 que ativa células B, levando para um perfil mais anti-inflamatório. Em doenças que são causadas por linfócitos Th1, as citocinas Th2 têm sido consideradas protetoras, portanto, a busca pela alteração no padrão de resposta imune de Th1 para Th2 tem sido muito estudada, visando a melhora ou o restabelecimento da tolerância imunológica (MESQUITA JÚNIOR et al., 2010).

Com base nessa hipótese, alguns estudos mostram evidências que a modulação do sistema imune por parasitas pode ser benéfica em diversas doenças autoimunes como: doença de Crohn (SUMMERS et al., 2005), Colite (SUMMERS et al., 2005), Diabetes tipo 1 (SAUNDERS et al., 2007) e Esclerose Múltipla (CORREALE; FAREZ,2007).

Além disso, outros estudos elucidam que moléculas secretadas por helmintos possuem propriedades anti-inflamatórias (HAMILTON et al., 2009; WANG et al., 2016), sendo a *Fasciola hepatica* um desses helmintos que vem sendo estudados para finalidades terapêuticas. Este parasita é um helminto trematódeo pertencente ao Filo Platyhelminthes que utiliza como hospedeiro diversos mamíferos, deposita-se nas vias biliares, alvéolos pulmonares e esporadicamente em outros locais; podendo causar a fasciolose, uma parasitose que afeta em torno de 17 milhões de pessoas no mundo (MAS-COMA, 2005). É uma infecção crônica e silenciosa, podendo permanecer por vários anos no hospedeiro sem ser descoberta, o que resulta em um risco de transmissão desses patógenos (MAS-COMA; BARGUES; VALERO, 2005).



Figura 3: Estágio adulto de *Fasciola hepatica* (TOLEDO; FRIED, 2019).

A *F. hepatica* utiliza diversos mecanismos para modular o sistema imune do hospedeiro. Em estudos *in vitro*, foi capaz de induzir apoptose de duas células importantes da resposta imune inata, os eosinófilos e os macrófagos (GUASCONI; SERRADELL; MASIH, 2012). Estas células possuem papéis importantes na resposta imune desenvolvida durante as infecções por helmintos. A indução de apoptose dessas células pode ser importante na modulação do sistema imune, apresentando-se como uma estratégia para evadir da resposta imune do hospedeiro (GUASCONI; SERRADELL; MASIH, 2012). Ainda, mostrou-se que a administração de componentes presentes no tegumento de *F. hepatica* em camundongos levou a uma supressão de células Th1 e redução de níveis séricos de IFN- γ (RAVIDA et al., 2016).

Há indícios que produtos excretadores-secretadores (ESPs) de *F. hepatica* também possuem efeitos imunomodulatórios. Os ESPs, os quais têm os mesmos efeitos imunomoduladores presentes na infecção pelo verme, também demonstraram ser capazes de suprimir a resposta imune via Th1, o que pode reduzir a inflamação (DONNELLY et al., 2005). Em estudos *in vitro* e em modelo de fasciolose em camundongos, ambos trabalhos demonstraram que tanto antígenos do tegumento como ESPs apresentaram a capacidade de prejudicar a ativação de células dendríticas por ligantes de receptores do tipo Toll (TLRs - Toll like receptors). Dados que corroboram para a hipótese de que a ESPs pode modular a maturação e função de células dendríticas, gerando um mecanismo imunossupressor (FALCÓN et al., 2010, 2012).

Durante a infecção, a *F. hepatica* secreta moléculas como as cistatinas, que são moléculas inibidoras de cisteíno-protease, e seu papel na modulação da resposta imune vem sendo estudado, visto sua capacidade da regulação de citocinas inflamatórias e de apresentação de antígenos (KLOTZ et al., 2011; VRAY; HARTMANN; HOEBEKE, 2002). As cisteíno-protease desempenham papéis indispensáveis na biologia de organismos parasitas e tendem ser a chave para a imunoevasão do parasita no organismo do hospedeiro (SAJID; MCKERROW, 2002), o que torna interessante estudos acerca dessa supressão na resposta imune. Estudos com a cistatina recombinante de *Schistosoma japonicum* em modelo de CIA em camundongos, demonstrou que ela foi capaz de aliviar os efeitos deletérios no modelo quando administrada de forma profilática. Esta administração preveniu a destruição e a inflamação das articulações, com diminuição das citocinas pró-inflamatórias, IL-6, IL-17 e TNF- α (LIU et al., 2016).

Em estudo prévio de nosso grupo de pesquisa, foi analisada a eficácia das cistatinas 1 e 3 recombinantes de *F. hepatica* em modelo de CIA e, a partir desse estudo, verificou-se que a cistatina recombinante 3 atenuou a gravidade da artrite reduzindo o escore clínico em 32%, diminuindo também a nocicepção e o edema da pata dos animais, sem afetar peso corporal. Ainda, cistatina 3 reduziu o escore histológico de inflamação sinovial, dano da cartilagem e do osso nas patas dos animais (PALOMÄKI et al., 2020).

Tendo em vista as evidências de um fator protetor da cistatina 3 de *F. hepatica* quanto ao dano articular em modelo de CIA é interessante analisar se esse efeito positivo também se estende ao tecido muscular, a fim de tornar o estudo mais completo e esclarecedor em todo o âmbito da artrite reumatoide e seu papel nos diferentes desfechos clínicos.

2 JUSTIFICATIVA

Apesar do desenvolvimento de novos manejos no tratamento da AR, muitas comorbidades ainda persistem, como a perda de massa muscular, presente em uma parcela importante dos pacientes. Dessa forma, a perda de massa muscular muitas vezes é um grande acometimento para o paciente, deteriorando sua capacidade funcional e qualidade de vida. Visto que as cistatinas de *Fasciola hepatica* apresentam resultados promissores acerca de efeitos imunomodulatórios e antiartríticos, é importante analisar sua ação também no viés muscular. Sendo assim, faz-se necessário estudos acerca do assunto afim de elucidar os efeitos terapêuticos e mecanismos envolvidos, possibilitando a descoberta de possível tratamento e progressão para fases de estudos posteriores, o que pode trazer importantes benefícios, como melhor qualidade de vida aos pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento das cistatinas 1 e 3 recombinantes de *F. Hepatica* na perda muscular em camundongos com artrite induzida por colágeno.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar a perda muscular a partir das análises de:

1. Peso dos músculos tibial-anterior e gastrocnêmio;
2. Diâmetro das fibras musculares do músculo tibial-anterior;

4 ARTIGO CIENTÍFICO

O presente trabalho foi escrito em forma de artigo científico de acordo com as normas de publicação da revista intitulada - Rheumatology International

Effect of *Fasciola hepatica* recombinant cystatins on muscle loss in mice with collagen-induced arthritis

Maria Luísa Gasparini^{1,3}, Mirian Farinon^{1,4}, Rafaela Cavalheiro do Espírito Santo^{1,4}, Renata Ternus Pedó^{1,4}, Thales Hein da Rosa^{1,4}, Martín Pablo Cancela Sehabiague⁵, Ricardo Machado Xavier^{1,2}

¹ Serviço de Reumatologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350- CEP 90035-903
Bairro Rio Branco- Porto Alegre/RS-Brasil

² Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2400- CEP 90035-003
Bairro Santa Cecília- Porto Alegre/RS-Brasil

³ Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Sarmento Leite, 500- CEP 90010-170
Bairro Centro- Porto Alegre/RS-Brasil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas
Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Rua Ramiro Barcelos, 2400- CEP 90035-003
Bairro Santa Cecília- Porto Alegre/RS-Brasil

⁵ Laboratório de Biologia Molecular de Cestódeos
Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43421e31
Porto Alegre/RS-Brasil

Corresponding Author:

Maria Luísa Gasparini, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Laboratório de Doenças Autoimunes, Rua Ramiro Barcelos, 2350

Zip code 90035-003- Porto Alegre-Brasil

Telephone: +51-51-981466820

E-mail: malu.gasparini@gmail.com

Abstract

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, inflammatory and autoimmune disease. The persistent inflammatory mechanism results in the degradation of cartilage and bone with the consequent loss of function. RA patients generally present muscle weakness and atrophy, and its mechanisms and management are still poorly studied. *Fasciola hepatica* is a helminth that has different strategies to regulate the immune response of its hosts through excretory-secretory products (ESPs), such as cystatins. In a previous study, recombinant cystatins from *F. hepatica* showed therapeutic effect in both acute and chronic models of arthritis. To observe whether this protective effect also extends to muscle tissue, the present study evaluated the effect of recombinant cystatins 1 and 3 on muscle loss in mice with collagen-induced arthritis (CIA). After arthritis induction, DBA / 1J mice were randomly divided into three groups: control ($n = 9$), cystatin 1 ($n = 9$) and cystatin 3 ($n = 9$), with a daily treatment regimen of 100 ug/dose of recombinant cystatins or 100 μ l of PBS. Muscle mass was assessed by weighing the tibialis anterior and (TA) gastrocnemius muscles (GA) in micrograms, and structural evaluation was performed by the histopathological analysis of the measurements of the diameter of the muscle myofiber. The weight and sarcoplasmic ratios of the TA and gastrocnemius muscles (GA) also had no difference between groups. The cross-sectional area of myofiber from the tibialis anterior skeletal muscles (TA) showed no difference when compared with controls. In conclusion, despite improving clinical and histological aspects of arthritis, recombinant cystatins from *F. hepatica* did not influence the muscle loss of collagen-induced arthritic mice.

Keywords: Rheumatoid arthritis, collagen-induced arthritis, muscle loss, *Fasciola hepatica*, recombinant cystatins

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, autoimmune and systemic disease that affects 1% of the population [1]. It is an inflammatory condition characterized by synovial hyperplasia that causes the degradation of cartilage and bone [2]. About 40% of RA patients may have extra-articular manifestations [3]. Muscle loss is reported to be present in 20% of RA patients, causing weight loss, reduced physical activity and increased fatigue [4]. Muscle atrophy and low weight in RA patients are important prognostic factors related to worse disease activity, disability and survival [5].

The decrease in muscle mass seems to be linked to a decrease in physical activity, due to the exacerbated pain that affects patients, caused by chronic exposure to inflammatory mediators, such as cytokines and prostaglandins [6]. Moreover, muscle atrophy has been associated with the intensity of inflammation and severity of the disease, which emphasizes inflammation as being an important process in muscle loss [7,8]. Despite advances in RA treatment, even with pharmacological treatments, extra-articular damage and muscle deficit may still persist. Since muscle loss in RA is one of the disabling symptoms for most patients, it is important to investigate compounds with possible therapeutic effects.

Fasciola hepatica is a trematode helminth that uses as host several mammals, which can cause fasciolosis [9]. During the infection, *F. hepatica* uses strategies to modulate the host immune system through excretory-secretory products (ESPs) and integument antigens [10]. ESPs are able to suppress the immune response via Th1, activating M2 macrophages capable of increasing the differentiation of Th2 cells, leading to immunosuppression of the immune response, leaning for a more anti-inflammatory response [11]. Among these molecules are cystatins, which are cysteine protease inhibitory molecules with ability to modulate the immune response by regulating inflammatory cytokines release and the mechanism of antigen presentation [12,13].

In a previous study, we found that recombinant cystatin 3 from *F. hepatica* attenuated the severity of arthritis by reducing the clinical score by 32%, as well as decreasing nociception and paw edema, without affecting the body weight. Furthermore, cystatin 3 reduced the histological score of synovial inflammation, cartilage and bone damage in the animals paws [14]. In the present study, we evaluated the effect of recombinant cystatins 1 and 3 on muscle loss in collagen-induced arthritic mice in order to elucidate whether their effect also extends to muscle.

Materials and methods

Animals

Male DBA / 1J mice, between 8 and 12 weeks of age, were randomly divided into three experimental groups: control (CO) (n = 9), cystatin 1 (C1) (n = 9) and cystatin 3 (C3) (n = 9). The treatment was performed intraperitoneally, starting on the 18th day and consisted of a daily dose of 100 µg of cystatins 1 and 3 recombinant for the treated groups and 100 µg of PBS for the control group. The mice were reared at 20 ± 2°C, with a 12h light–dark cycle, food and water were provided *ad libitum*. This study was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocol n° 2017-0310).

Expression and purification of recombinant F. hepatica cystatins

Recombinants cystatins were obtained by cloning and expressing the *F. hepatica* cystatin genes in BL21 Escherichia coli RIL strain ((GE Healthcare, LT, UK) as previously described [32]. The coding DNA sequences of cystatins were amplified by PCR, then the amplicons were attached to plasmid vectors pGEX-4T2 and were inserted in the bacterial genome using EcoRI restriction enzyme. Proteins were expressed with glutathione-S-transferase (GST) tags, and purification was made by affinity chromatography in glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare) following cleavage of the tags with thrombin. Detoxi-gel Endotoxin Removing (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to remove endotoxin contaminations and protein concentrations were determined by using Qubit fluorometric quantification kit (Thermo Fisher Scientific). At first, cystatins 1,2 and 3 were coded. For purification and technical performance reasons, only 1 and 3 were used in the study. The entire procedure was carried out at the Biologia Molecular de Cestódeos laboratory at the UFRGS Biotechnology Center.

Collagen-induced arthritis

The first intradermal immunization on the tail occurred on day 0 and was composed of bovine type II collagen (CII) (CII; Chondrex, Inc., Redmond, WA, USA; 2 g·mL) and complete Freund's adjuvant (CFA; Sigma, St Louis, USA; 2 mg·mL) with the addition of 2 mg / ml of *Mycobacterium tuberculosis* (Difco Laboratories, Lawrence, KS, USA). Eighteen days after the first injection, the animals received a reinforcement of CII emulsified with incomplete Freund's adjuvant (CFA; Sigma, St Louis, USA; 2 mg/mL) (without *M. tuberculosis*) in another site of the tail (*booster* injection).

After booster, animals were monitored for clinical signs of arthritis and body weight three days per week. Forty-five days after arthritis induction, the tibialis anterior and gastrocnemius muscles were dissected immediately after euthanasia, weighed and collected. The tibialis anterior muscles were used to measure the diameter of myofiber by histological analysis.

Animal weight and muscle weight

The animals were weighed for total body mass three times a week, starting before the first CII injection. On the 45th day after the induction of the disease, the tibialis anterior was dissected immediately after euthanasia, weighed and collected to measure the sectional area of the myofiber by the Image-Pro Express software program for staining histological slides with hematoxylin-eosin (HE). Muscle weight calculations were also performed in relation to the body weight of each animal, to determine the sarcoplasmic ratio.

Histological analysis

Tibialis anterior stained with HE were used for myofiber diameter measurement. A cross-section of each muscle was stained with hematoxylin-eosin and analyzed under an optical microscope (400 \times , Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan). Two straight perpendicular lines, in the direction of the longest and shortest fiber length, were drawn on each myofiber. The average of these diameters (in micrometer) was used to calculate the area of the cross section, based on the formula of the area of the circle (in square micrometer). To measure the cross-sectional area of the myofiber (CSA) of the entire muscle, 10 images of each histological slide were captured with QImaging Digital Camera (Media Cybernetics). Measurements of 20 miofibers were performed with the aid of the Image- Pro Express software (version 5.1.0.12, Media Cybernetics, Rockville, MD, USA).

Statistical Analysis

The distribution of data was assessed by the Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. In data with non-normal distribution, comparisons were performed using the Kruskal Wallis test and the quantitative data is described as medians and interquartile range. Data with normal distribution were compared using one or two-way ANOVA followed by the Tukey's test and the quantitative data is described as data is presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Significance was accepted when $p < 0.05$ using Graph Pad Prism 8 (La Jolla, CA, USA).

Results

Arthritis score and body weight

First, it was necessary to confirm the development of the disease by analyzing the arthritis clinical score. According to the results, the animals showed the first clinical signs of arthritis 24 days after induction, with the disease progressively developing until the last day of the experiment (figure 1A). It was observed that daily treatment with 100 micrograms of cystatin 3 attenuated the severity of collagen-induced arthritis, reducing the clinical score by 32% ($9,00 \pm 3,50$ vs $13,56 \pm 2,18$). Additionally, bodyweight was analyzed. It was observed that the animals in the control group showed weight loss during the experiment, and although the animals treated with cystatin 3 showed a reversal in that loss of body weight from day 33, this data was not statistically significant (figure 1B).

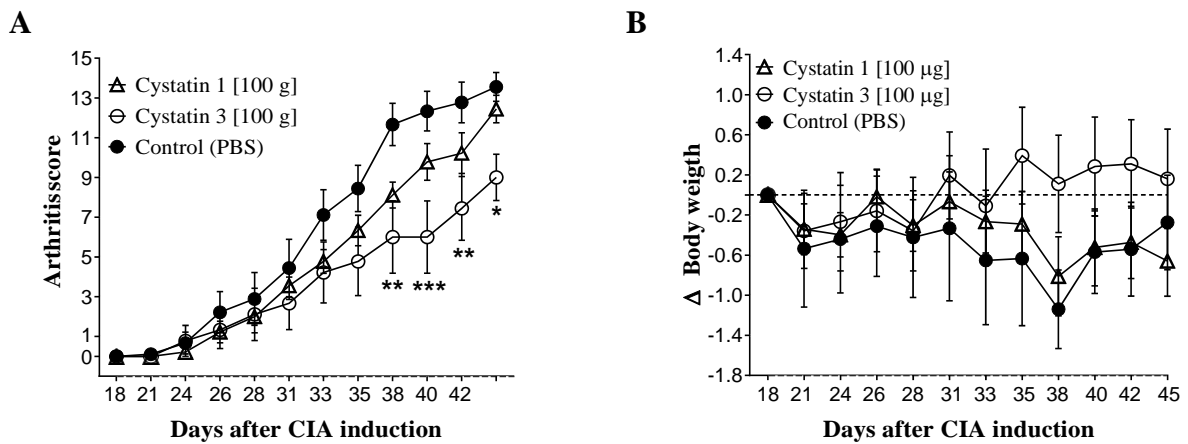


Fig. 1: (A) Arthritis clinical score progression and (B) body weight were evaluated three times a week initiating from booster injection. Data are presented as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ rFhcystatin 3 vs control, by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

Muscle weight and sarcoplasmic ratio

It was also necessary to confirm that the animals would present muscle loss. The tibialis anterior (C1: 21.5 mg (19.5-30.0); C3: 20.5 mg (19.5-29.75); CO: 21.0 mg (19.75-27.25); $p=0.967$) and gastrocnemius (C1: 84.3 ± 17.63 mg; C3: 102.8 ± 26.13 mg; CO: 91.36 ± 6.68 mg) muscles did not show any difference in weight between the treatment groups and control. To assess muscle mass in relation to the total bodyweight, the sarcoplasmic ratio was calculated. Accordingly, the sarcoplasmic proportions of TA (C1: 1.17 ± 0.261 ; C3: 1.097 ± 0.209 ; CO: 1.082 ± 0.173) and GA (C1: 4.360 (3.83-4.68); C3: 4.85 (4.145-5.7); CO: 4.63 (3.875-4.655); $p=0.260$) also presented similar measures between treated and untreated mice.

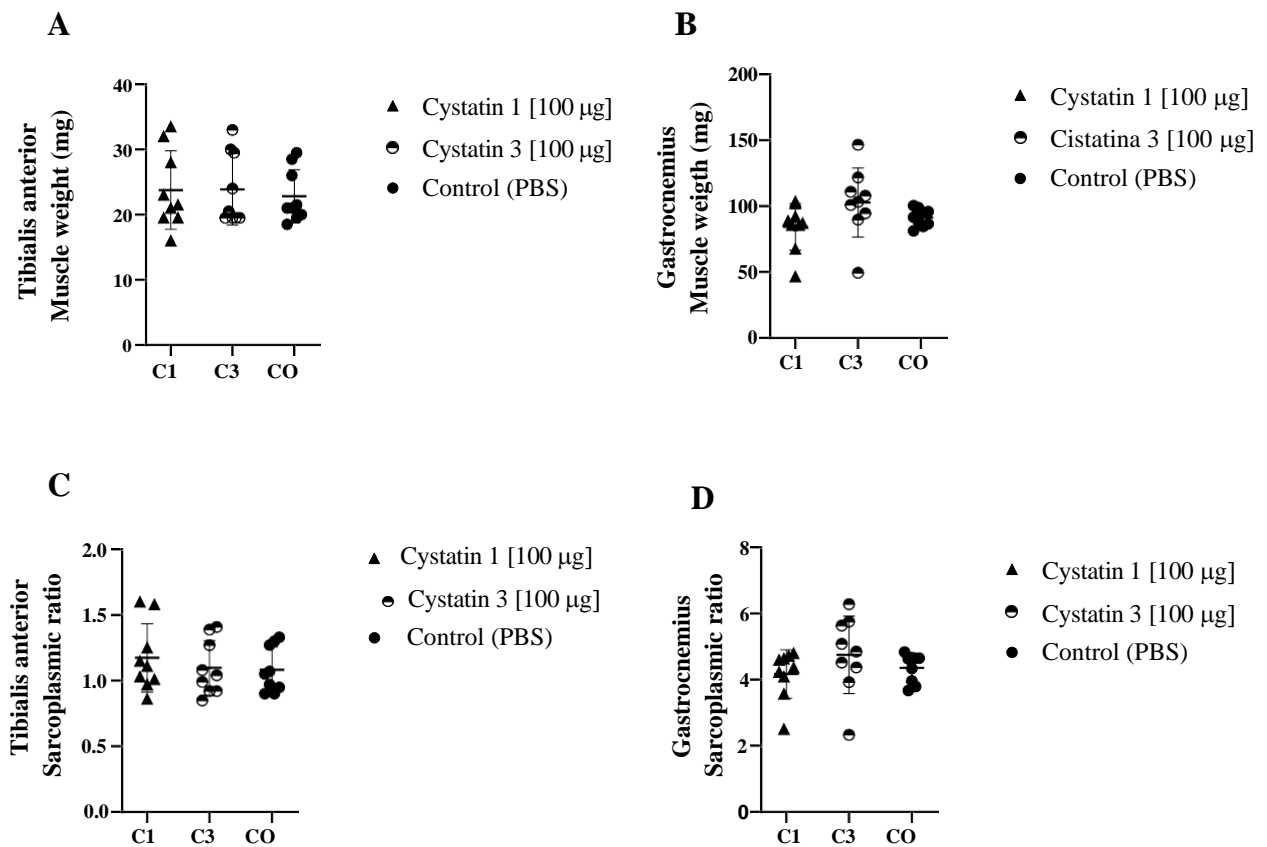


Fig. 2: Treatment with recombinant cystatins from *Fasciola hepatica* did not alter muscle weight and sarcoplasmic ratio. Weight of the tibialis anterior (A) and gastrocnemius (B) muscles. Sarcoplasmic ratio of tibialis anterior (C) and gastrocnemius (D) muscles. Data are presented as medians and interquartile range (muscle weight TA and sarcoplasmic ratio GA) data with non-normal distribution and as mean \pm standard error (muscle weight GA and sarcoplasmic ratio TA) for data with normal distribution. Statistical analysis between groups was performed using the Kruskal-Wallis test or ANOVA followed by the Tukey test, respectively.

Myofiber cross-section area

The myofiber area of the tibialis anterior muscle was similar in the treated and control groups, with no statistical significance (C1: 194,4 μm (165,1- 359,3); C3: 196,9 μm (171.5-321.8); CO: 208,8 μm (162,8-363,5); $p = 0.944$).

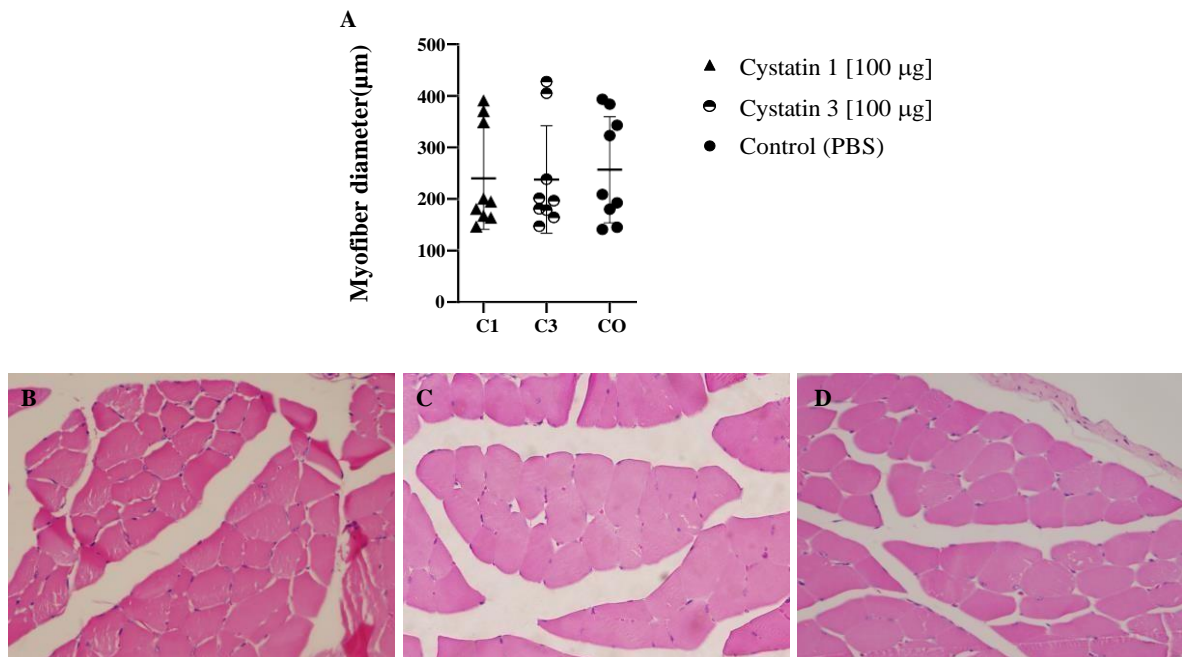


Fig. 3: Treatment with recombinant cystatins from *Fasciola hepatica* did not affect cross-sectional area of myofiber. (A) Myofiber cross-sectional area of the tibialis anterior muscle of controls and mice treated with cystatin 1 and cystatin 3. Representative histology of TA muscle of (B) Cystatin 1 (C) Cystatin 3 and (D) Control. The statistical analysis between groups was performed using one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis test.

Discussion

In this present study, recombinant cystatins from *F. hepatica* did not influence the muscle loss of collagen-induced arthritic mice. To the best of our knowledge, this was the first study to evaluate the effect of recombinant cystatins on muscle loss in mice with collagen-induced arthritis (CIA). The hypothesis of the present study was that the protective joint effect observed in the treatment with recombinant cystatins from *Fasciola hepatica* could extend to the muscle tissue.

A significant part of RA patients have deficits in their muscle area, weight and muscle strength compared to healthy individuals, which directly impacts their functionality, impacting their daily work, quality of life and socioeconomic status [15,16]. Despite the development of new approaches for the treatment of RA, the loss of muscle mass remains present in an important portion of patients. Because of this problem, we investigated whether proteins with immunomodulatory capabilities would have an effect on muscle loss in a murine model of CIA.

The development of arthritis was confirmed through the clinical score of the disease, and while cystatin 1 had no effects against clinical parameters of arthritis, cystatin 3 decreased the clinical score of the disease in CIA by 32% [14]. Since there is an inverse relationship

between clinical arthritis score and muscle loss [17,18] we analyzed a possible extended therapeutic effect of cystatin 3 from joint to muscle.

Experimental collagen-induced arthritis has been widely used to study the pathophysiological aspects of the disease, including muscle involvement, and to test new therapies. Fillipin *et al* described a progressive development of muscle loss in CIA, observing a smaller area of myofiber and weight of the anterior tibial (TA) and gastrocnemius (GA) muscles of sick animals compared to healthy animals [17]. In addition, another study have identified these features and have brought this model as an efficient tool to investigate muscle loss in arthritis; Alabarse *et al* showed that CIA is a valid experimental model for rheumatoid cachexia, since the clinical changes observed in this model are similar to those seen in humans [18].

We evaluated the muscle weight and the sarcoplasmic proportion of the tibialis anterior and gastrocnemius as both muscles are widely used in studies of musculoskeletal changes and those that most present muscle deficits in models of chronic diseases. Nevertheless, the treatment with recombinant cystatins did not show any changes compared to control animals. However, according to the analyzed parameters, they also did not indicate any deleterious effect of recombinant cystatins in the muscle.

In addition to muscle weight, observations of structure were also made through histological analysis, with the measurement of the cross-sectional area of the myofiber (CSA) of the tibialis anterior muscles. The evaluation of myofiber CSA demonstrated that the treatment with cystatins did not alter the area of the muscular cross-section of mice, which presented CSA similar to that observed in untreated animals. These results lead us to assume that recombinant cystatins have no influence on the structural dynamics of muscle tissue.

Cystatins are molecules that have been extensively studied in the scope of immunomodulation, their inhibitory action is vital for the regulation of physiological processes, and sometimes they can limit their inhibitory action to their target-specific proteases, which include cathepsins [19]. It is known that these proteases are present in several tissues and its concentration is higher in the joints of animals and patients with arthritis, contributing to the destruction of the joint [20]. High levels of cathepsin expression are found in tissues that have high protein turnover rates, while low levels are observed where this rate is lower, as in skeletal muscle [21]. Which may be an indication that cystatin does not interfere with muscle protein breakdown. This generates one of the hypotheses as to why cystatins developed a protective joint effect and have no structural effect at the level of muscle tissue.

Muscle loss caused by RA has also been associated with the intensity of inflammation and severity of the disease, which emphasizes inflammation as an important regulatory process in muscle loss [22]. In muscle loss caused by chronic disease, such as RA, there is evidence of the involvement of pathways responsible for protein catabolism [24, 25], and negative regulation of growth factors. These effects are probably mediated by pro-inflammatory cytokines, such as TNF and IL-6. Systemic administration of cytokines - IFN- γ and TNF - also resulted in muscle catabolism in an experimental model of cachexia [26]. In addition, genetic [27] or pharmacological [28,29] blockade of inflammatory TNF pathways attenuates experimental cachexia.

Since, in infection, recombinant cystatins induce the immune response to an anti-inflammatory profile [12], these cytokine pathways would be expected to be attenuated systematically, to the point of also influencing muscle loss. Previous analyzes confirmed that cystatin 3 treatment reduced IFN- γ levels in the animals serum and decreased Th17 population in the spleen. However, our results did not bring the expected outcome, ruling out in this study the hypothesis that cystatins could develop an indirect action on muscle tissue by decreasing the systemic inflammation of the disease. However, further analysis would be needed to investigate the effect of cystatins on these parameters.

Understandably, the loss of muscle mass seems to be related to physical inactivity, given the pain and functional disability generated by the disease [4]. In this sense, we can highlight the lack of assessment of the functionality of the mice as a weakness of the present study. With analyzes of spontaneous locomotion and strength, we could have observed the functional impact of the treatments on the muscle in addition to the structural effects. Although in a model of CIA, the total mass of the skeletal muscles of the hind legs was found to be correlated with locomotion, suggesting a direct relationship between movement and muscle mass [23], in studies with arthritic animals without any intervention, it was observed that the effect of the disease on the functionality of the animals was greater than the effect on muscle weight and myofiber area [17,18]. In addition, in both animals and humans, there was clearly an association between reduced mobility of the ankle as a factor of locomotor abnormalities [30,31]. Based on these observations, the locomotion of the animals in the study could provide a positive effect. Given the anti-inflammatory capacity of recombinant cystatins, attenuating joint damage and reducing the clinical score in animals, it could affect the functional capacity of muscle in a deeper level than the structure.

In conclusion, according to these preliminary results, despite having improved arthritis and presenting an anti-inflammatory effect, the treatment with recombinant cystatins from *Fasciola hepatica* has no protective effect, nor does it a deleterious effect, on the muscle of mice with chronic arthritis.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval

All experimental procedures were performed following the National Institute of Health Guide for Care and Use of Animals and with the approval of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre Ethics Committee under number 2017-0310.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

References

- [1] Scott, D. L.; Wolfe, F.; Huizinga, T. W. J. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 2010.
- [2] Choy, E. Understanding the dynamics: Pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (United Kingdom)*, v. 51, n. SUPPL.5, p. 3–11, 2012.
- [3] Muravyen, Y. V. Extra-articular manifestations of rheumatoid arthritis. *Nauchno-Prakticheskaya Revmatologiya*, v. 56, n. 3, p. 356–362, 2018.
- [4] Van Bokhorst- De Van Der Schueren, M. A. E. et al. Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis. *Clinical Nutrition*, v. 31, n. 6, p. 1008–1010, 2012.
- [5] Andrews, J. S. et al. Frailty and reduced physical function go hand in hand in adults with rheumatoid arthritis: a US observational cohort study. *Clinical Rheumatology*, v. 36, n. 5, p. 1031–1039, 2017.
- [6] Schaible, H. G. et al. Joint pain. *Experimental Brain Research*, v. 196, n. 1, p. 153–162, 2009.
- [7] Londhe, P.; Guttridge, D. C. Inflammation induced loss of skeletal muscleBone. *Elsevier Inc.*, , 1 nov. 2015.
- [8] Glass, D. J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 37, n. 10 SPEC. ISS., p. 1974–1984, 2005.
- [9] Mas-Coma, S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. *Journal of*

Helminthology, v. 79, n. 3, p. 207–216, set. 2005

- [10] C. Falcón, F. Carranza, F.F. Martínez, C.P. Knubel, D.T. Masih, C.C. Motrán, L. Cervi, Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 137 (2010) 36–46. doi:10.1016/J.VETIMM.2010.04.007.
- [11] Donnelly, S. et al. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 1, p. 166–173, 2005.
- [12] Vray, B.; Hartmann, S.; Hoebeke, Immunomodulatory properties of cystatins. *J. Cellular and Molecular Life Sciences*. Amino Acids, v. 59, p. 1503–1512, 2002
- [13] Zavasnik-Bergant, T. [Frontiers in Bioscience 4625-4637, May 1, 2008] Cystatin protease inhibitors and immune functions Tina Zavasnik-Bergant. *BioScience*, p. 1–13, 2008.
- [14] Palomaki, A. et al. Validity of rheumatoid arthritis diagnoses in Finnish biobank patients (Congress Abstract). *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 79, n. Supplement 1, 2020
- [15] Khurana R, Berney SM. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. *Pathophysiology* 2005; 12:153–165.
- [16] Young A, Koduri G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2007; 21:907–27
- [17] Filippin, L. I. et al. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 4, n. 3, p. 231–238, 2013
- [18] Alabarse, P. V. G. et al. Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, v. 9, n. 3, p. 603–612, 2018.
- [19] Turk, V.; Stoka, V.; Turk, D. [Frontiers in Bioscience 5406-5420, May 1, 2008] Cystatins: Biochemical and structural properties, and medical relevance Vito Turk, Veronika Stoka, Dušan Turk. *BioScience*, v. 13, p. 5406–5420, 2008.
- [20] Schurigt, U. et al. Local expression of matrix metalloproteinases, cathepsins, and their inhibitors during the development of murine antigen-induced arthritis. *Arthritis research & therapy*, v. 7, n. 1, 2005.
- [21] Bechet, D. et al. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 37, n. 10 SPEC. ISS., p. 2098–2114, 2005.
- [22] Londhe, P.; Guttridge, D. C. Inflammation induced loss of skeletal muscle Bone. *Elsevier Inc.*, , 1 nov. 2015.
- [23] Hartog, A.; Hulsman, J.; Garssen, J. Locomotion and muscle mass measures in a murine model of collagen-induced arthritis. *BMC Musculoskeletal Disorders*, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2009.

- [24] Granado M, et al. Anti-inflammatory effect of the ghrelin agonist growth hormone-releasing peptide-2 (GHRP-2) in arthritic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288: E486–92. doi: 10.1152/ajpendo.00196.2004.
- [25] Castellero E, et al. Fenofibrate, a PPAR {alpha} agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300: E790–9. doi: 10.1152/ajpendo.00590.2010.
- [26] Acharyya S, et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest.* 2004; 114:370–8.
- [27] Llovera M, et al. Role of TNF receptor 1 in protein turnover during cancer cachexia using gene knockout mice. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 142:183–9. doi: 10.1016/S0303-7207(98)00105-1.
- [28] Setoguchi C, et al. Combined effects of bucillamine and etanercept on a rat type II collagen-induced arthritis model. *Mod Rheumatol.* 2010; 20:381–8. doi: 10.1007/s10165-010-0292-8.
- [29] Lon HK, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic disease progression model for effect of etanercept in Lewis rats with collagen-induced arthritis. *Pharm Res.* 2011; 28:1622–30. doi: 10.1007/s11095-011-0396-7.
- [30] Mossiat, C. et al. Association between arthritis score at the onset of the disease and long-term locomotor outcome in adjuvant-induced arthritis in rats. *Arthritis Research and Therapy*, v. 17, n. 1, p. 1–12, 2015.
- [31] Mellblom Bengtsson, M. et al. Lower extremity function in patients with early rheumatoid arthritis during the first five years, and relation to other disease parameters. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, v. 48, n. 5, p. 367–374, 2019.
- [32] Cancela M, Corvo I, DA Silva E, Teichmann A, Roche L, Díaz A, et al. Functional characterization of single-domain cystatin-like cysteine proteinase inhibitors expressed by the trematode *Fasciola hepatica*. *Parasitology.* 2017;144(13):1695-707

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados demonstraram que o tratamento com as cistatinas 1 e 3 recombinantes de *Fasciola hepatica* não teve efeito sobre as massas dos músculos tibial anterior e gastrocnêmio e em sobre a estruturas do músculo tibial anterior de camundongos com artrite-induzida por colágeno.

O cronograma e plano de atividades do trabalho foi modificado devido à pandemia do coronavírus SARS-CoV-2. Dessa forma, o trabalho tem como perspectivas realizar as análises moleculares de expressão dos marcadores de regeneração e degradação muscular, como MyoD, miogenina e miostatina, através de western blot, a quantificação dos níveis musculares de TNF e IL-6 através de ELISA, assim como parâmetros de locomoção e força em animais com CIA e tratados com cistatinas recombinantes 1 e 3 de *Fasciola hepatica*.

REFERÊNCIAS

- ALABARSE, P. V. G. et al. Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 9, n. 3, p. 603–612, 2018.
- ALARCON, R. T.; ANDRADE, L. E. C. Anticorpos antiproteínas citrulinadas e a artrite reumatóide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 3, p. 180–187, 2007.
- ALETAHA, D. et al. Remission and active disease in rheumatoid arthritis: Defining criteria for disease activity states. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 9, p. 2625–2636, 2005.
- ANDONIAN, B. J. et al. Effect of high-intensity interval training on muscle remodeling in rheumatoid arthritis compared to prediabetes. **Arthritis Research and Therapy**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2018.
- ASQUITH, D. L. et al. Animal models of rheumatoid arthritis. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2040–2044, 2009.
- BARTON, A.; WORTHINGTON, J. Genetic susceptibility to rheumatoid arthritis: An emerging picture. **Arthritis Care and Research**, v. 61, n. 10, p. 1441–1446, 2009.
- BERKES, C. A.; TAPSCOTT, S. J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 16, n. 4–5, p. 585–595, 2005.
- BEVAART, L.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. Collagen-induced arthritis in mice. **Methods in Molecular Biology**, v. 602, p. 181–192, 2010.
- BLÜML, S. et al. Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis. **International Immunology**, v. 24, n. 5, p. 275–281, 2012.
- BRAND, D. D.; LATHAM, K. A.; ROSLONIEC, E. F. Collagen-induced arthritis. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1269–1275, 2007.
- CASTILLERO, E. et al. IGF-I system, atrogenes and myogenic regulatory factors in arthritis induced muscle wasting. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 309, n. 1–2, p. 8–16, 2009.
- CASTILLERO, E. et al. Fenofibrate, a PPAR α agonist, decreases atrogenes and myostatin expression and improves arthritis-induced skeletal muscle atrophy. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 5, 2011.
- CASTRO-SANTOS, P.; DÍAZ-PEÑA, R. Genética da artrite reumatoide: é necessário um novo impulso em populações latino-americanas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 171–177, 2016.
- CHOI, H. K. et al. *choi2002 mortalidad MTX*. v. 359, 2002.
- CHOY, E. Understanding the dynamics: Pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid

- arthritis. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 51, n. SUPPL.5, p. 3–11, 2012.
- CHOY, E. H. S. et al. Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 12, p. 3143–3150, 2002.
- CHOY EH, P. G. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine* 344: 907-916. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 12, p. 907–916, 2001.
- CORREALE, J.; FAREZ, M. Association Between Parasite Infection and Immune Responses in Multiple Sclerosis. 2007.
- DA MOTA, L. M. H. et al. 2017 recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. **Advances in Rheumatology**, v. 58, n. 1, p. 1–17, 2018.
- DA ROCHA, O. M. et al. Sarcopenia in rheumatoid cachexia: Definition, mechanisms, clinical consequences and potential therapies. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 3, p. 294–301, 2009.
- DE OLIVEIRA, V. et al. **Mecanismos de perda muscular da sarcopenia** *Rev Bras Reumatol.* [s.l: s.n.].
- DENIS, C. et al. NF- κ B Induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. v. 289, n. September, 2000.
- DESAI, S. B.; FURST, D. E. Problems encountered during anti-tumour necrosis factor therapy. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 4, p. 757–790, 2006.
- DOHERTY, T. J. Invited review: Aging and sarcopenia. **Journal of Applied Physiology**, v. 95, n. 4, p. 1717–1727, 2003.
- DONNELLY, S. et al. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 166–173, 2005.
- DORAN, M. F. et al. Predictors of infection in rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 46, n. 9, p. 2294–2300, 2002.
- FALCÓN, C. et al. Excretory-secretory products (ESP) from *Fasciola hepatica* induce tolerogenic properties in myeloid dendritic cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 137, n. 1–2, p. 36–46, 2010.
- FALCÓN, C. R. et al. Adoptive transfer of dendritic cells pulsed with *Fasciola hepatica* antigens and lipopolysaccharides confers protection against fasciolosis in mice. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 3, p. 506–514, 2012.
- FEELY, M. G.; ERICKSON, A.; O'DELL, J. R. Therapeutic options for rheumatoid arthritis.

Expert Opinion on Pharmacotherapy, v. 10, n. 13, p. 2095–2106, 2009.

FILIPPIN, L. I. et al. Temporal development of muscle atrophy in murine model of arthritis is related to disease severity. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 4, n. 3, p. 231–238, 2013.

FIRESTEIN, G. S.; MCINNES, I. B. Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Immunity**, v. 46, n. 2, p. 183–196, 2017.

FUKUDA, W. et al. Contribution of rheumatoid arthritis disease activity and disability to rheumatoid cachexia. **Modern Rheumatology**, v. 20, n. 5, p. 439–443, 2010.

GAFFO, A.; SAAG, K. G.; CURTIS, J. R. Treatment of rheumatoid arthritis. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 63, n. 24, p. 2451–2465, 2006.

GOELDNER, I. et al. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 495–503, 2011.

GUASCONI, L.; SERRADELL, M. C.; MASIH, D. T. Fasciola hepatica products induce apoptosis of peritoneal macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 148, n. 3–4, p. 359–363, 2012.

HAMILTON, C. M. et al. The Fasciola hepatica tegumental antigen suppresses dendritic cell maturation and function. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 6, p. 2488–2498, 2009.

HASSELGREN, P. O.; WRAY, C.; MAMMEN, J. Molecular regulation of muscle cachexia: It may be more than the proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 1, p. 1–10, 2002.

HEGEN, M. et al. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 67, n. 11, p. 1505–1515, 2008.

HOWE, H. S. Rheumatoid arthritis - A review. **Annals of the Academy of Medicine Singapore**, v. 27, n. 1, p. 83–88, 1998.

HU, Y. et al. Advances in research on animal models of rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 161–165, 2013.

JACKMAN, R. W.; KANDARIAN, S. C. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 287, n. 4, p. 834–843, 2004.

JACKSON, J. A. et al. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? **Immunology**, v. 126, n. 1, p. 18–27, jan. 2009.

KHURANA, R.; BERNEY, S. M. Clinical aspects of rheumatoid arthritis. **Pathophysiology**, v. 12, n. 3, p. 153–165, 2005.

KLOTZ, C. et al. Cystatins of parasitic organisms. **Advances in Experimental Medicine and**

Biology, v. 712, p. 208–221, 2011.

LEMMEY, A. B. et al. Tight control of disease activity fails to improve body composition or physical function in rheumatoid arthritis patients. **Rheumatology (United Kingdom)**, v. 55, n. 10, p. 1736–1745, 2016.

LEMMEY, A. B. et al. Muscle loss following a single high-dose intramuscular injection of corticosteroids to treat disease flare in patients with rheumatoid arthritis. **European Journal of Rheumatology**, v. 5, n. 3, p. 160–164, 2018.

LISTING, J. et al. Infections in patients with rheumatoid arthritis treated with biologic agents. **Arthritis and Rheumatism**, v. 52, n. 11, p. 3403–3412, 2005.

LIU, F. et al. Schistosoma japonicum cystatin attenuates murine collagen-induced arthritis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 10, p. 3795–3806, 2016.

LONDHE, P.; GUTTRIDGE, D. C. **Inflammation induced loss of skeletal muscle** BoneElsevier Inc., , 1 nov. 2015.

LOPEZ-OLIVO, M. A. et al. Methotrexate for treating rheumatoid arthritis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2014, n. 6, 2014.

MAS-COMA, S. Epidemiology of fascioliasis in human endemic areas. **Journal of Helminthology**, v. 79, n. 3, p. 207–216, set. 2005.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1255–1278, 2005.

MATSCHKE, V. et al. Skeletal muscle properties in Rheumatoid arthritis patients. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 12, p. 2149–2155, 2010.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 6, p. 429–442, 2007.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. Mechanism of Disease The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 23, p. 2205–2219, 2011.

MESQUITA JÚNIOR, D. et al. Immune system - part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Revista Brasileira De Reumatologia**, v. 50, n. 5, p. 552–580, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide. p. 1–120, 2019.

MONTI, S. et al. Rheumatoid arthritis treatment: The earlier the better to prevent joint damage. **RMD Open**, v. 1, n. Suppl 1, p. 1–5, 2015.

NEOGI, T. et al. The 2010 American College of Rheumatology/European League Against

- Rheumatism classification criteria for rheumatoid arthritis: Phase 2 methodological report. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2582–2591, 2010.
- NYHÄLL-WÄHLIN, B. M. et al. High disease activity disability burden and smoking predict severe extra-articular manifestations in early rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 48, n. 4, p. 416–420, 2009.
- POWERS, S. K.; KAVAZIS, A. N.; DERUISSEAU, K. C. Mechanisms of disuse muscle atrophy: Role of oxidative stress. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2 57-2, 2005.
- PURINTRAPIBAN, J.; WANG, M. C.; FORSBERG, N. E. Degradation of sarcomeric and cytoskeletal proteins in cultured skeletal muscle cells. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 136, n. 3, p. 393–401, 2003.
- RADNER, H.; SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D. Impact of comorbidity on physical function in patients with rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 3, p. 536–541, 2010.
- RALL, L. C.; ROUBENOFF, R. Rheumatoid cachexia: Metabolic abnormalities, mechanisms and interventions. **Rheumatology**, v. 43, n. 10, p. 1219–1223, 2004.
- RAVIDA, A. et al. **Fasciola hepatica surface tegument: Glycoproteins at the interface of parasite and host**. [s.l.: s.n.]. v. 15
- ROSLONIEC, E. F. et al. Collagen-Induced Arthritis. n. April, p. 1–25, 2010.
- SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1–21, 2002.
- SAUNDERS, K. A. et al. Inhibition of Autoimmune Type 1 Diabetes by Gastrointestinal Helminth Infection. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 75, n. 1, p. 397–407, 2007.
- SCHAFFER, D. et al. Risk of serious NSAID-related gastrointestinal events during long-term exposure: A systematic review. **Medical Journal of Australia**, v. 185, n. 9, p. 501–506, 2006.
- SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. J. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, 2010.
- SCOTT, P. A. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and myocardial infarctions: Comparative systematic review of evidence from observational studies and randomised controlled trials. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 66, n. 10, p. 1296–1304, 2007.
- SENNA, E. R.; FERRAZ, M. B. **Prevalence of Rheumatic Diseases in Brazil: A Study Using the COPCORD Approach**The Journal of Rheumatology. [s.l.: s.n.].
- SMOLEN, J. S. et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n.

1, p. 3–15, 2016.

SMOLEN, J. S. et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 6, p. 960–977, 2017.

SMOLEN, J. S. et al. Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 1–23, 2018.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 388, n. 10055, p. 2023–2038, 2016.

SMOLEN, J. S.; STEINER, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 6, p. 473–488, 2003.

SUMMERS, R. W. et al. Trichuris suis therapy in Crohn's disease. [s.d.].

SUMMERS, R. W. et al. Trichuris suis therapy for active ulcerative colitis: A randomized controlled trial. **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. 825–832, 2005.

TON, F. N. et al. Effects of low-dose prednisone on bone metabolism. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 20, n. 3, p. 464–470, 2005.

TORII, M. et al. Prevalence and factors associated with sarcopenia in patients with rheumatoid arthritis. **Modern Rheumatology**, v. 29, n. 4, p. 589–595, 2019.

TOURNADRE, A. et al. Changes in body composition and metabolic profile during interleukin 6 inhibition in rheumatoid arthritis. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 8, n. 4, p. 639–646, 2017.

TRACEY, D. et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 117, n. 2, p. 244–279, 2008.

VAN BOEKEL, M. A. M. et al. Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: Specificity, sensitivity and diagnostic value. **Arthritis Research**, v. 4, n. 2, p. 87–93, 2002.

VAN BOKHORST - DE VAN DER SCHUEREN, M. A. E. et al. Relevance of the new pre-cachexia and cachexia definitions for patients with rheumatoid arthritis. **Clinical Nutrition**, v. 31, n. 6, p. 1008–1010, 2012.

VLIETSTRA, L. et al. Sarcopenia in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: The association with self-reported fatigue, physical function and obesity. **PLoS ONE**, v. 14, n. 6, p. 1–13, 2019.

VRAY, B.; HARTMANN, S.; HOEBEKE, J. Cellular and Molecular Life Sciences Immunomodulatory properties of cystatins. **Amino Acids**, v. 59, p. 1503–1512, 2002.

WANG, S. et al. Therapeutic potential of recombinant cystatin from *Schistosoma japonicum* in TNBS-induced experimental colitis of mice. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2016.

WATTS, R. A. Rheumatoid Arthritis National Clinical Guideline. **Rheumatology**, v. 49, n. 2,

p. 399–399, 2010.

YAMADA, M. et al. Matrix metalloproteinase-2 mediates stretch-induced activation of skeletal muscle satellite cells in a nitric oxide-dependent manner. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 40, n. 10, p. 2183–2191, 2008.

YOUNG, A.; KODURI, G. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 5, p. 907–927, 2007.

ZAMMIT, P. S. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 72, p. 19–32, 2017.

ANEXO A - GUIDELINES PARA SUBMISSÃO DE ARTIGO NA REVISTA RHEUMATOLOGY INTERNACIONAL

Author Guidelines

Aims and scope

RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL is an independent journal reflecting world-wide progress in the research, diagnosis and treatment of the various rheumatic diseases. It is designed to serve researchers and clinicians in the field of rheumatology.

RHEUMATOLOGY INTERNATIONAL will cover all modern trends in clinical research as well as in the management of rheumatic diseases. Special emphasis will be given to public health issues related to rheumatic diseases, applying rheumatology research to clinical practice, epidemiology of rheumatic diseases, diagnostic tests for rheumatic diseases, patient reported outcomes (PROs) in rheumatology and evidence on education of rheumatology. Contributions to these topics will appear in the form of original publications, short communications, editorials, and reviews. "Letters to the editor" will be welcome as an enhancement to discussion. Basic science research, including in vitro or animal studies, is discouraged to submit, as we will only review studies on humans with an epidemiological or clinical perspective. Case reports without a proper review of the literatura (Case-based Reviews) will not be published. Every effort will be made to ensure speed of publication while maintaining a high standard of contents and production.

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human studies have been reviewed by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in an appropriate version of the 1964 Declaration of Helsinki. It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

The editor reserves the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or for failure to fulfil the above-mentioned requirements.

Rheumatology International aims to publish the latest research on:

Public health issues related to rheumatic diseases

- o Rheumatology in underserved populations
- o Health indicators, standards of care, health care indicators and standards
- o Strategies for improvement
 - Health policies
 - How to change practice
- o How to change the vision of rheumatology worldwide
- o Classification of diseases
 - New diseases
 - New definitions
 - New criteria
- o International efforts related to public health matters
- o Patient empowerment

Applying research to clinical practice

- o Methodology of research with registers and clinical databases
- o Results of registers and clinical databases
- o Audit studies on guidelines compliance
- o Systematic reviews on effectiveness
- o Recommendations, guidelines
- o Appraisal of guidelines

Epidemiology of rheumatic diseases

- o Prevalence and incidence studies
- o Natural course of diseases
- o Risk factors for rheumatic diseases
- o Prognostic factors

Diagnostic tests in rheumatic diseases

- o Validation studies
- o Feasibility studies
- o Systematic reviews of diagnostic tests
- o Biomarkers
- o Screening tests

Patient reported outcomes (PROs) in rheumatology

- o Generation studies
- o Validation studies, with special emphasis on transcultural validation
- o Behavior of PROs in different populations
- o Issues with general PROs in rheumatic patients

Evidence on Education of rheumatology

- o Improving methodology to train the best students
- o Recruitment of new rheumatologists
- o Improving methodology to train the best residents
- o Training the less young rheumatologists

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

Title Page

Please use this **template title page** for providing the following information.

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country
- A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author
- If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

To be used for non-life science journals

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

To be used for life science journals + articles with biological applications

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a referencelist.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- Figures should be submitted separately from the text, if possible.
- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
- For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form. Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Aspect ratio: 16:9 or 4:3
- Maximum file size: 25 GB
- Minimum video duration: 1 sec
- Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".
- Name the files consecutively, e.g. "ESM_3.mpg", "ESM_4.pdf".

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

* Based on/adapted from:

[ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,](#)

[Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018](#)

Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

- ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;
- managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;*

- providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;
- making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For **review articles** where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the **student's dissertation or thesis**, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

[A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006](#)

Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are **not** accepted **after acceptance** of a manuscript.

- **Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!**

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change

during revision is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals. Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

- Disclosure of potential conflicts of interest
- Research involving Human Participants and/or Animals
- Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

The corresponding author will include a summary statement **on the title page that is separate from their manuscript**, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: Author A, Author B, and Author C declare that they have no conflict of interest.