

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDUARDO DELABIO AUER

ESTUDO GENÉTICO E EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇAS REUMÁTICAS
RELACIONADAS À SINTOMAS ARTICULARES E VARIANTES DO GENE *LBR* NA
POPULAÇÃO MENONITA BRASILEIRA

CURITIBA

2023

EDUARDO DELABIO AUER

ESTUDO GENÉTICO E EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇAS REUMÁTICAS
RELACIONADAS ÀS SINTOMAS ARTICULARES E VARIANTES DO GENE *LBR*
NA POPULAÇÃO MENONITA BRASILEIRA

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor das Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Angelica Beate Winter Boldt.

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Auer, Eduardo Delabio.

Estudo genético e epidemiológico de doenças reumáticas relacionadas à sintomas articulares e variantes do gene *LBR* na população menonita brasileira. / Eduardo Delabio Auer. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dra. Angelica Beate Winter Boldt.

1. Lúpus eritematoso sistêmico. 2. Artralgia. 3. Neutrófilos. 4. Efeito fundador. 5. RNA. 6. Obesidade. 7. Artrite reumatoide. I. Boldt, Angelica Beate Winter, 1973- . II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética. III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **EDUARDO DELABIO AUER** intitulada: **ESTUDO GENÉTICO E EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇAS REUMÁTICAS RELACIONADAS À SINTOMAS ARTICULARES E VARIANTES DO GENE *LBR* NA POPULAÇÃO MENONITA BRASILEIRA**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 19 de Maio de 2023.

Assinatura Eletrônica
24/05/2023 16:14:59.0
ANGELICA BEATE WINTER BOLDT
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
24/05/2023 12:28:33.0
DANIELA PARADA PAVONI
Avaliador Externo (INSTITUTO CARLOS CHAGAS)

Assinatura Eletrônica
25/05/2023 09:03:30.0
GABRIELA CANALLI KRETZSCHMAR
Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
02/06/2023 15:21:15.0
ROBERTO ROSATI
Avaliador Externo (null)

AGRADECIMENTOS

A Deus, o meu agradecimento por me sustentar, disponibilizar as forças necessárias nesta longa jornada desde o mestrado e pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

À minha família pelo apoio, suporte e incentivo para prosseguir nesta pesquisa.

A Fran, que sempre também esteve comigo, apoiou e incentivou a continuar.

A Professora Dra. Angelica B. W. Boldt, minha orientadora, que me acolheu, ensinou e aconselhou com paciência e amor. Também, gostaria de agradecer sobre as inúmeras explicações, correções e auxílios nas análises estatísticas e pelas muitas portas e oportunidades que disponibilizou nesta jornada.

Aos participantes da população menonita que se voluntariaram e tornaram possível este estudo.

Ao Dr. Roberto Rosati e a Dra. Thelma Larocca Skare pelos inúmeros ensinamentos realizados com paciência e clareza, os quais guardo com carinho.

Ao Dr. Renato Mitsunori Nisihara e Dra. Thelma Larocca Skare pela possibilidade de dosagem dos ELISA de anti-CCP nos soros dos menonitas.

A Professora Dra. Luciane Alarcão Dias-Melicio pela oportunidade e realização de dosagens das NETs nos soros dos pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e nos menonitas.

A Valéria Bumiller Bini Hoch, MSc. Yohan Ricci Zonta e Emiliano Borges da Silva pelo auxílio logístico, realização das alíquotas e participação nas dosagens das NETs nas amostras.

A Dra. Thelma Larocca Skare, Dra. Vanessa F. Picceli, Professora Dra. Iara J. T. Messias-Reason pela autorização de uso do soro e disponibilização de dados clínicos das amostras de pacientes brasileiros com LES, os quais foram dosados para NETs.

Aos meus amigos, Denisson de Carvalho Santos e Ismael Júnior Valério de Lima, a quem tive o prazer de coorientar e auxiliar no levantamento epidemiológico da artrite. Além disso, eu os agradeço pelo auxílio na publicação da revisão da influência dos ncRNAs na obesidade e artrite reumatoide.

A Dra. Gabriela Canalli Kretzschmar por ensinar as análises de predição *in silico* de variantes exônicas em lncRNAs, as quais foram vitais na revisão de ncRNAs na obesidade e AR.

A Professora Dra. Marcia Holsbach Beltrame, que também auxiliou em sugestões nos manuscritos iniciais de da revisão da influência ncRNAs na obesidade e AR.

A MSc. Caroline Grisbach, que me ensinou como realizar as análises de associação dos exomas.

A MSc. Caroline Grisbach, Dr. Roberto Rosati, Isabela Dall'Oglio Bucco e Professora Dra. Angelica B W Boldt que me auxiliaram na realização do controle de qualidade dos exomas da população menonita.

A todos no Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH), que em algum momento estiveram me incentivando ou me auxiliando nesta jornada desde o mestrado.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo suporte financeiro.

RESUMO

Artrite reumatoide (AR) e lúpus eritematoso sistêmico (LES) são doenças autoimunes, de etiologia incerta. Para identificar fatores de risco relacionados a estas doenças, utilizamos três abordagens: revisão sistemática, avaliação genético-epidemiológica de uma população isolada, e análise de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) associadas a variantes genéticas e a estas doenças. Em uma revisão de 1110 artigos e de estudos de associação de amplitude genômica, identificamos que a expressão dos micro-RNAs *miR-21*, *miR-23b*, *miR-27a*, *miR-143*, *miR-146a*, *miR-155* e dos RNAs longos não-codificantes (lncRNAs) *H19* e *HOTAIR* está associada à resposta inflamatória e metabólica, e a biomarcadores na obesidade e AR. Onze variantes (oito associadas com AR e três com obesidade) localizam-se em exons de lncRNAs, sete podem mudar sua ligação a miRNAs, duas, sua estrutura secundária, quatro, sua expressão. Para identificar fatores de risco em populações geneticamente isoladas, coletamos informações sobre sintomas articulares e familiares afetados, saúde, hábitos de vida e biometria em 776 menonitas, cuja população sofreu três efeitos de gargalo durante quase 500 anos de isolamento. Mensuramos anticorpos anti-peptídeo cíclico citrulinado (anti-CCP) por ensaio de imunoabsorção ligada a enzima (ELISA) em 142 menonitas sem, e 27 com artralgia. Comparamos os exomas de 120 menonitas sem artralgia e sem parentes de primeiro grau afetados e 18 com artralgia, por regressão logística multivariada. A prevalência de artralgia foi 7,8% (n=46, 36 mulheres), similar à do Brasil (7,6%). O sexo masculino e prática de exercício físico foram associados a proteção, e a presença de familiares afetados, idade e pior autopercepção de saúde, ao maior risco. Anti-CCP foi mais frequente nos indivíduos com artralgia ($p_{\text{corr}}=0,042$). Encontramos vinte alelos associados, de genes de inflamação, autoimunidade, injúria sinovial e danos articulares. Oito formaram três haplótipos. Não observamos alteração dos níveis de NETs, investigados por ELISA, em menonitas com *rs200180113*A* e *rs137852605*A* no gene *LBR*, associadas com hipossegmentação de núcleos de neutrófilos (anomalia Pelger-Huët). Houve um só menonita com LES. Há evidências de efeito fundador para variantes conhecidamente associadas a LES em menonitas, aumentando a frequência das protetoras e reduzindo a frequência das de suscetibilidade. Em 170 pacientes não menonitas, houve associação entre o fenômeno de Raynaud e maiores níveis de NETs (OR= 2,30; IC95%= 1,06–5,21 e $p= 0,039$). Pacientes com LES e com anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos ou glomerulonefrite apresentaram maiores médias séricas de NETs ($p=0,03$). Não houve diferenças em menonitas com artralgia. Logo, identificamos RNAs não-codificantes e variantes genéticas que podem apontar para possíveis alvos terapêuticos no tratamento de pacientes com AR e obesidade, e variantes que também modulam o risco para artralgia, que pode preceder a AR. Observamos uma baixa prevalência de LES na população menonita, associada com um efeito fundador na frequência de variantes genéticas predisponentes e protetoras. Além disso, observamos a associação de NETs com sintomas associados a LES, porém não com artralgia. Estes achados ainda necessitam ser validados em outras populações, coortes clínicos e modelos animais, no futuro próximo.

Palavras-chave: lúpus eritematoso sistêmico; artralgia; armadilhas extracelulares de neutrófilos; efeito fundador; RNAs longos não-codificantes; obesidade; artrite reumatoide.

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) are autoimmune diseases with uncertain etiology. To identify risk factors related to these diseases, we used three approaches: systematic review, genetic-epidemiological evaluation of an isolated population, and analysis of neutrophil extracellular networks (NETs) associated with genetic variants and these diseases. In a review of 1110 articles and genome-wide association studies, we identified that the expression of micro-RNAs *miR-21*, *miR-23b*, *miR-27a*, *miR-143*, *miR-146a*, *miR-155* and long RNAs non-coding RNAs (lncRNAs) *H19* and *HOTAIR* were associated with inflammatory and metabolic response, and biomarkers in obesity and RA. Eleven variants (eight associated with RA and three with obesity) are located in exons of lncRNAs; seven may change their binding sites to miRNAs, two their secondary structure, and four their expression. To identify risk factors in genetically isolated populations, we collected information on joint symptoms and affected family members, health, lifestyle habits, and biometrics in 776 Mennonites, whose populations suffered three bottleneck effects during nearly 500 years of isolation. We measured anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 152 Mennonites without arthralgia and 27 with arthralgia. In addition, we compared exomes of 120 Mennonites without arthralgia and without affected first-degree relatives and 18 with arthralgia by multivariate logistic regression. The prevalence of arthralgia was 7.8% (n=46, 36 women), similar to Brazil's (7.6%). Male sex and practice of physical exercise were associated with protection, and the presence of affected family members, age, and worse self-perception of health, with greater risk. Anti-CCP was more frequent in individuals with arthralgia ($p_{\text{corr}}=0.042$). We found twenty associated alleles of genes for inflammation, autoimmunity, synovial injury, and joint damage. Eight formed three haplotypes. We did not observe changes in NETs levels, investigated by ELISA, in Mennonites with *rs200180113*A* and *rs137852605*A* in the *LBR* gene, associated with hyposegmentation of neutrophil nuclei (Pelger-Huët anomaly). There was only one Mennonite with SLE. There is evidence of a founder effect for variants associated with SLE in Mennonites, increasing the frequency of protective and reducing the frequency of susceptibility ones. In 170 non-Mennonite patients, there was an association between Raynaud's phenomenon and higher levels of NETs (OR= 2.30; 95%CI= 1.06–5.21 e $p= 0.039$). Patients with SLE and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies or glomerulonephritis had higher mean serum NETs ($p=0.03$). There were no differences in Mennonites with arthralgia. Therefore, we identified non-coding RNAs and genetic variants that may point to possible therapeutic targets in treating patients with RA and obesity and variants that also modulate the risk for arthralgia, which can precede RA. We observed a low prevalence of SLE in the Mennonite population, associated with a founder effect in the frequency of predisposing and protective genetic variants. Furthermore, we observed the association of NETs with symptoms associated with SLE but not with arthralgia. These findings need to be validated in other populations, clinical cohorts, and animal models soon.

Keywords: Systemic lupus erythematosus; arthralgia; neutrophil extracellular traps; founder effect; long non-coding RNAs; obesity; rheumatoid arthritis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Curso clínico da artrite reumatoide	25
FIGURA 2 - Desenvolvimento da inflamação e artralgia ao longo do curso clínico da AR	27
FIGURA 3 – Resumo das vias patogênicas implicadas no início e na progressão da AR	29
FIGURA 4 -- Representação gráfica comparando as principais alterações patogênicas entre uma articulação sem e com AR	38
FIGURA 5 - Representação gráfica dos intervalos de prevalências da AR em escala global	44
FIGURA 6 – Heterogeneidade dos sintomas no LES.....	45
FIGURA 7 - Representação gráfica das principais vias imunopatogênicas no LES	48
FIGURA 8 - Representação gráfica das prevalências da LES em nível global	50
FIGURA 9 - Alterações nucleares em neutrófilos de portadores da anomalia de Pelger-Huët	59
FIGURA 10 - Representação gráfica das localizações das colônias menonitas brasileiras estudadas	63
FIGURA 11 - Comparação dos níveis séricos das NETs entre indivíduos que autorrelataram artralgia vs controles	151
FIGURA 12 - R^2 entres as variantes associadas nos exomas para o genes PTPRZ1, TNFSF14, C3 e PFKP	158
FIGURA 13 - D' entres as variantes associadas nos exomas para o genes PTPRZ1, TNFSF14, C3 e PFKP	159
FIGURA 14 - Análise de enriquecimento de genes no banco de dados Gene Ontology biological process (versão 2021).....	161
FIGURA 15 - Análise de enriquecimento de genes no banco de dados <i>Elsevier pathway collection</i>	162
FIGURA 16 - Análise de enriquecimento de genes no banco de dados Reactome (versão 2022)	163
FIGURA 17 - Análise de enriquecimento de genes no banco de dados <i>Wikipathways</i> (versão 2021)	164

FIGURA 18 - – Desequilíbrio de ligação representado pelos valores de R^2 entres SNPs associados em GWAS para SLE, em menonitas.	174
FIGURA 19 – Valores de D' entres os SNPs associados em GWAS com LES, em menonitas.....	175
FIGURA 20 - - Heredograma dos indivíduos portadores para a variante rs200180113*A.....	191
FIGURA 21 - Heredograma dos indivíduos portadores para a variante rs137852605*A.....	192
Figura 22 - Lâmina hematológica de uma portadora da variante rs137852605*A demonstrando os neutrófilos com hipossegmentação	193
FIGURA 23 - Comparação nos níveis séricos das NETs entre os em portadores vs não portadores de variantes do gene LBR.....	194
FIGURA 24 - Comparação dos níveis de colesterol total e HDL em portadores vs não portadores de variantes do gene LBR.....	195
FIGURA 25 - Comparação dos níveis de triglicerídeos e LDL em portadores vs não portadores de variantes do gene LBR.....	197

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Critérios para classificação da artrite reumatoide.....	43
TABELA 2 - Critérios para classificação do lúpus eritematoso sistêmico.....	52
TABELA 3 - Heterogeneidade de fenótipos associados a variantes deletérias do gene LBR	57
TABELA 4 - Variantes reportadas nas populações menonitas alemã-holandesas associadas a doenças mongênicas e multifatoriais.....	62
TABELA 5 - Distribuição demográfica da população menonita brasileira.	69
TABELA 6 - Distribuição demográfica dos grupos amostrais utilizados na dosagem de anti-CCP	71
TABELA 7 - Distribuição demográfica nos grupos controles e com artralgia da população menonita na dosagem das NETs séricas.	72
TABELA 8 - Distribuição demográfica nos grupos de indivíduos menonitas portadores e não portadores de variantes do gene <i>LBR</i>	72
TABELA 9 - Análise de regressões univariadas para a associação com a artralgia na população menonita	147
TABELA 10 - Variáveis independentemente associadas com a artralgia na população menonita	149
TABELA 11 - Variantes associadas com a artralgia encontradas nas análises de exomas.....	154
TABELA 12 - Avaliação das frequências alélicas das variantes associadas entre as populações europeias não-finlandesas, amish e brasileira	156
TABELA 13 - Análises de haplótipos das variantes associadas nos exomas e comparação das frequências entre as populações menonitas brasileiras e europeias não-finlandesas	160
TABELA 14 - Variantes associadas em GWAS com lúpus eritematoso sistêmico e doenças autoimunes encontradas na população Menonita brasileira	169
TABELA 15 - Comparação das frequências alélicas de variantes associadas em GWAS com LES nas populações menonitas brasileiras, europeias não-finlandesas e brasileira.....	171
TABELA 16 - Comparação das frequências haplotípicas das variantes associadas em GWAS com LES, nas populações menonitas brasileiras e europeias não-finlandesas e brasileira.....	176

TABELA 17 - Variantes no gene LBR encontradas na população menonita associadas à Anomalia de Pelger-Huët	199
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ACPAs - Anticorpos antiproteínas citrulinadas, do inglês *anti-citrullinated protein antibodies*

ACR/EULAR - *American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism*.

ANA - Anticorpos antinucleares.

ANCA - Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos, do inglês *antineutrophil cytoplasmic antibodies*.

anti-CCP - Anticorpos antipeptídeo cíclico citrulinado, do inglês *anti-cyclic citrullinated peptide*.

Anti-CCP hs - Anticorpos antiproteínas citrulinadas cíclicas altamente sensível.

anti-dsDNA - Anti-DNA de dupla hélice, do inglês *anti-doubled strand DNA*.

anti-MCV - Anticorpos contra vimentina citrulinada mutada, do inglês *anti-mutated citrullinated vimentin*.

anti-Smith - Anticorpos anti-smith.

Anti-β2GP1 - Anti-beta-2-glicoproteína I.

APCs - Células apresentadoras de antígenos, do inglês *Antigen-presenting cells*.

AR - Artrite reumatoide.

DCs – células dendríticas, do inglês *Dendritic cells*.

ceRNA - RNAs endógenos competidores, do inglês *Competing endogenous RNA*.

CD40L – ligante de CD40.

CON - Colônia Nova, em Aceguá – RS.

CWB - Curitiba – PR.

CWI - Colônia Witmarsum, em Palmeira – PR.

DAMP - Padrões moleculares associados a danos, do inglês *damage-associated molecular patterns*.

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*.

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*.

ELISA - Ensaio imunoenzimático, do inglês *Enzyme linked immuno sorbent assay*.

FAN - Fator antinuclear.

FAZ - Receptor de Morte Fas de Superfície Celular, do inglês *Fas cell surface death receptor*.

FDR - *False discovery rate*.

FLS - Sinoviócitos semelhantes aos fibroblastos, do inglês *Fibroblast-like synoviocytes*.

FR - Fator reumatoide.

GPIb - Glicoproteína Ib.

GWAS - estudos de associação genômica ampla, do inglês *Genome wide association studies*.

H3K4me3 - adição de três grupos metil (trimetilação) sobre a lisina 3 na histona 3.

H3K9me3 - adição de três grupos metil (trimetilação) sobre a lisina 9 na histona 3.

H3K27me3 - adição de três grupos metil (trimetilação) sobre a lisina 27 na histona.

HDL - Lipoproteínas de alta densidade, do inglês *High density lipoprotein*.

IFNs – Interferons.

IFN α – Interferon alfa.

IgG – Imunoglobulina G.

IgM - Imunoglobulina M.

IMC - Índice de massa corporal.

IL-1 - Interleucina 1.

IL-6 - Interleucina 6.

IQR - Intervalo interquartil, do inglês *interquartile range*.

LDL - Lipoproteínas de baixa densidade, do inglês *Low density lipoprotein*.

LES - Lúpus Eritematoso Sistêmico.

lncRNAs - RNAs longos não-codificantes, do inglês *Long non-coding RNAs*.

log10 - Logaritmo na base 10.

MASP-2 - Serina proteases associadas a proteína de ligação a manose 2, do inglês *mannose-binding protein-associated serine protease 2*.

miRNAs - micro-RNAs.

MMPs - Metaloproteinases

MMP-1 - Metaloproteinases 1.

MMP-3 - Metaloproteinases 3.

MMP-8 - Metaloproteinases 8.

mRNA - RNA mensageiro.

ncRNAs - RNAs não-codificantes, do inglês *Non-coding RNAs*.

NETs - Armadilhas extracelulares de neutrófilos, do inglês *Neutrophil extracellular traps*.

NF-κB - Fator nuclear kappa B, do inglês *Nuclear factor-kappa B*.

non-FIN EURO - Populações europeias não finlandesas, do inglês *European non-finish populations*.

PDCs - células dendríticas plasmocitoides, do inglês *Plasmacytoid dendritic cells*.

PAD - Enzimas peptidil-arginina deaminases.

*p*corr - Valor de *p* corrigido.

RA - Artrite reumatoide, do inglês *Rheumatoid Arthritis*.

Radiação UV - Radiação ultravioleta.

RAGE - receptor de produtos finais glicosilados, do inglês *Receptor for advanced glycation endproducts*.

RANK - Receptor ativador do fator nuclear kappa B, do inglês *Receptor activator of nuclear factor kappa B*.

RANKL - Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B, do inglês *Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*.

RF - Fator reumatoide, do inglês *Rheumatoid fator*.

RT-PCR - Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase, do inglês *Reverse transcription–polymerase chain reaction*.

SD - Desvio-padrão, do inglês *standard deviation*.

SLEDAI - *Systemic lupus erythematosus disease activity index*.

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido.

TLRs - Receptores Toll-Like, do inglês *Toll-Like receptors*.

TNF - Fator de necrose tumoral, do inglês *Tumor necrosis factor*.

TSL1 - *Transcript Support Level 1*.

UA - Artrite não-classificada, do inglês *Undifferentiated arthritis*.

VCF - *Variant Call Format*.

VDRL - *Venereal Disease Research Laboratory*.

VEP - *Variant effect predictor*.

VHS - Velocidade de hemossedimentação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 DOENÇAS REUMÁTICAS	22
2.2 ARTRITE REUMATOIDE	23
2.2.1 Curso natural na artrite reumatoide	23
2.2.1.1 Fatores de risco e fase pré-clínica	28
2.2.1.1.1 Fatores genéticos	31
2.2.1.1.2 Fatores epigenéticos	32
2.2.1.1.3 Fatores epidemiológicos, ambientais e sorológicos	34
2.2.1.2 Fase inicial e estabelecida	36
2.2.2 Classificação da artrite reumatoide	41
2.2.3 Epidemiologia da artrite reumatoide	41
2.3 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.....	42
2.4 PAPEL DAS NETS NAS DOENÇAS AUTOIMUNES: ARTRITE REUMATOIDE E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	53
2.5 GENE <i>LBR</i> E A ANOMALIA DE PELGER-HUËT.....	55
2.6 POPULAÇÃO MENONITA	59
3 JUSTIFICATIVA.....	63
4 OBJETIVOS.....	65
4.1 OBJETIVO GERAL	65
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
5 MATERIAIS E MÉTODOS	67
5.1 METODOLOGIA DA REVISÃO DOS RNAs NÃO-CODIFICANTES NA ARTRITE REUMATOIDE E NA OBESIDADE	67
5.2 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS POPULACIONAIS E DOS EXOMAS	68
5.3 REALIZAÇÃO DO LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE ANTI-CCP EM INDIVÍDUOS COM ARTRALGIA.....	71
5.4 QUANTIFICAÇÃO DAS NETS SÉRICAS	71
5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS A ARTRALGIA E NOS DADOS DE NETS SÉRICAS	73
5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DOS DADOS DE NETS SÉRICAS E DOS COMPONENTES DO LIPIDOGRAMA NA POPULAÇÃO MENONITA	73
5.7 ANÁLISES DOS EXOMAS PARA BUSCA DE VARIANTES ASSOCIADAS COM A ARTRALGIA	74

5.8 INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES PREVIAMENTE ASSOCIADAS EM ESTUDOS GWAS COM O LES NA POPULAÇÃO MENONITA	76
5.9 METODOLOGIA DA INVESTIGAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE <i>LBR</i> E SUA ASSOCIAÇÃO COM A ANOMALIA DE PELGER-HUËT	77
6 CAPÍTULO 1	78
6.1 NON-CODING RNA NETWORK ASSOCIATED WITH OBESITY AND RHEUMATOID ARTHRITIS	78
6.1.1 Graphical abstract	81
6.1.2 Abstract	82
6.1.3 Introduction	84
6.1.4 Methods	85
6.1.5 Results and discussion	87
6.1.5.1 Eligible articles	88
6.1.5.2 ncRNAs	88
6.1.5.2.1 <i>miR-21</i>	89
6.1.5.2.2 <i>miR-143</i>	90
6.1.5.2.3 <i>miR-146a</i>	91
6.1.5.2.4 <i>miR-155</i>	92
6.1.5.2.5 lncRNAs H19 and HOTAIR	94
6.1.5.3 Exonic SNVs in lncRNAs associated with RA or obesity	96
6.1.5.4 Limitations	101
6.1.6 Conclusions	102
6.1.7 References	104
6.2 ANÁLISE DE FATORES DE RISCO ASSOCIADOS COM ARTRALGIA E LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO	147
6.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS EXOMAS EM INDIVÍDUOS COM ARTRALGIA	152
7 CAPÍTULO 2	166
7.1 INVESTIGAÇÃO SOBRE VARIANTES PREVIAMENTE ASSOCIADAS EM GWAS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO NA POPULAÇÃO MENONITA	166
7.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE NETS EM PACIENTES BRASILEIROS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO	176
8 CAPÍTULO 3	190
8.1 INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES DO GENE <i>LBR</i> E SUA ASSOCIAÇÃO COM A ANOMALIA DE PELGÜER-HUET NA POPULAÇÃO MENONITA	190
9 CONCLUSÃO	200

REFERÊNCIAS..... 202

1 INTRODUÇÃO

As doenças reumáticas (DR) compreendem um grande espectro de distúrbios que afetam principalmente o sistema musculoesquelético (articulações, tendões, músculos, ligamentos, ossos e músculos). Além disso, estão associadas com artrite (inflamação articular), artralgia (dor articular) e causam problemas nas esferas da saúde pública, sociais e econômicos (ALMOALLIM; CHEIKH, 2021; CDC, 2022a, 2022b; ROSETI; GRIGOLO, 2022). A classificação das DR é difícil pela heterogeneidade dos sintomas e sobreposição de sintomas entre muitas doenças reumáticas. A classificação pode ser baseada em sua natureza: doenças autoimunes (LES, AR, esclerose sistêmica ou esclerodermia e síndrome antifosfolípide), autoinflamatórias (febre familiar do mediterrâneo, urticária induzida pelo frio, síndromes periódicas associadas ao receptor do fator de necrose tumoral), metabólicas (osteoporose, doença de Paget, deficiência de vitamina D e distúrbios das glândulas paratireoides) e degenerativas (osteoartrite) (CALLE; GÓMEZ-PUERTA, 2018; ROSETI; GRIGOLO, 2022).

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica, na qual há uma inflamação crônica nas articulações (sinovite) e presença de autoanticorpos fator reumatoide (FR) e anticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPAs, do inglês *Anti-citrullinated protein antibodies*). É uma doença multifatorial causada por gatilhos de fatores ambientais, em indivíduos com maior suscetibilidade genética (SMOLEN *et al.*, 2018). Além disso, a desregulação dos ncRNAs (RNAs não codificantes) também podem estar associadas com uma maior suscetibilidade para AR e a obesidade, que é um fator de risco e comorbidade associada com um o prognóstico em pacientes com AR (ABDUL-MAKSoud *et al.*, 2017; CROWSON *et al.*, 2013; GREMESE *et al.*, 2013; JAWAHEER *et al.*, 2010; KLAASEN *et al.*, 2011; LI, H. *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019; SCHULMAN *et al.*, 2018; STAVROPOULOS-KALINOGLU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2019; YANG, Jialiang *et al.*, 2020; YUE *et al.*, 2019). As consequências dessa doença não se estendem somente aos danos nas articulações, podendo causar problemas cardiometabólicos (metabolismo dos lipídeos, resistência à insulina juntamente com doenças cardiovasculares). Além disso, ela é uma doença de carácter contínuo com múltiplas etapas, sendo que a artralgia está presente antes do estabelecimento da fase clinicamente definida

(GERLAG *et al.*, 2012; SMOLEN *et al.*, 2018; VAN STEENBERGEN *et al.*, 2017, 2018).

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica e multisistêmica que afeta com maior prevalência os indivíduos do sexo feminino. A apresentação clínica heterogênea é decorrente de diferentes vias imunopatogênicas (FAURSCHOU *et al.*, 2006; KAUL *et al.*, 2016). A interação entre fatores ambientais e genéticos são importantes para o desenvolvimento do LES, pois os fatores genéticos não são capazes por si só de explicarem o fenótipo da doença (a concordância entre gêmeos monozigóticos é de 24% a 69% e gêmeos dizigóticos é de 2%) (BLOCK *et al.*, 1975; DEAFEN *et al.*, 1992; GRENNAN *et al.*, 1997). A patogênese da doença deve-se a uma desregulação da imunidade inata e adaptativa frente aos antígenos presentes no núcleo das células, como DNA dupla-fita e proteínas que interagem com ácidos nucleicos (CROW; OLFERIEV; KIROU, 2015; KAUL *et al.*, 2016).

A NETose é uma das vias de morte celular do neutrófilo que produz uma armadilha extracelular de neutrófilos ou NET (do inglês, *neutrophil extracellular trap*). As NETs são caracterizadas por filamentos de DNA e proteínas nucleares com enzimas e proteínas (mieloperoxidase, elastase neutrofílica, metaloproteinases, collagenases e ativadores do sistema complemento) dos grânulos citotóxicos dos neutrófilos que foram expulsos durante sua morte (GRAYSON; KAPLAN, 2016; NGUYEN; GREEN; MECSAS, 2017). Ademais, elas são um mecanismo de defesa da imunidade inata (neutrófilos) e estão relacionadas ao mecanismo de iniciação e patogênese na AR e no LES (CARMONA-RIVERA *et al.*, 2017; GESTERMANN *et al.*, 2018; O'NEIL *et al.*, 2019; VILLANUEVA *et al.*, 2011; WHITE *et al.*, 2016).

Em um levantamento epidemiológico feito por (OLIVEIRA *et al.*, 2019) nas populações menonitas brasileiras, as quais se localizam nas colônias de Curitiba e Witmarsum (estado do Paraná) e Colônia Nova no Rio Grande do Sul, foi estimada uma prevalência de 7,97% de indivíduos relatando artralgia. Esta prevalência era mais alta que a prevalência da população geral brasileira (6,4%), relatada na Pesquisa Nacional de Saúde de 2013 (DATASUS, 2013). As populações Menonitas foram originadas do movimento Anabatista durante a Reforma Protestante do século XVI na Suíça. Estas populações se separaram da população original e

realizaram diversas migrações para evitar perseguições devido às suas crenças e práticas. Esses eventos propiciaram a diminuição da heterozigosidade, por meio de “gargalos de garrafa” (redução do número de indivíduos da população em uma ou mais gerações consecutivas), efeito fundador (aumento da frequência de um determinado alelo, ocasionado quando um pequeno número de indivíduos fundadores origina uma subpopulação) e efeito Wahlund (aumento na frequência média de homozigotos em relação a população original, quando ela se subdivide, o que pode levar à perda de alelos por expor homozigotos deletérios) e endogamia (FREIRE-MAIA, 1974; GRIFFITHS *et al.*, 2016; HARTL; CLARK, 2010; ORTON *et al.*, 2008; STRACHAN; READ, 2013). A ação desses efeitos pode aumentar a frequência de indivíduos homozigotos com alelos recessivos causadores de doenças mendelianas, assim como a agregação familiar para doenças complexas (HARTL; CLARK, 2010). Ademais, o estudo dessas populações pode auxiliar a encontrar variantes raras que contribuem para suscetibilidade de doenças complexas, as quais não podem ser encontradas facilmente em populações não isoladas, por possuírem uma baixa frequência alélica (BOLDT *et al.*, 2009; BOSCHMANN *et al.*, 2016; CAMPBELL *et al.*, 2003; CRUZ-AGUILAR *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2016a; OLIVEIRA *et al.*, 2023; ORTON *et al.*, 2008; PAYNE *et al.*, 2011; S. E BOSCHMANN, 2012; SERFAS *et al.*, 1996; TELATAR *et al.*, 1998).

O gene *LBR* (do inglês, *Lamin B Receptor*) codifica uma proteína que faz parte da membrana nuclear (OOSTERWIJK, 2003). Ela também pode participar nos eventos epigenéticos de compactação da cromatina (SCHULER; LIN; WORMAN, 1994), desenvolvimento embrionário, metabolismo do colesterol (BEST *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*, 2002; HOLMER; PEZHMAN; WORMAN, 1998; SCHULER; LIN; WORMAN, 1994; TURNER; SCHLIEKER, 2016); estabilidade nuclear e cromossômica após a mitose (PATIL; DESHPANDE; SENGUPTA, 2023) e na inativação do cromossomo X (YOUNG *et al.*, 2021). As mutações no gene *LBR*, podem causar distúrbios no desenvolvimento esquelético, anomalia de Pelger-Hüet, predisposição à tumorigênese e à doenças autoimunes como o LES (AZNAR; VAYA, 1981; BEST *et al.*, 2003; BOROVNIK *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2020; GAUDY-MARQUESTE *et al.*, 2010; HAVERKAMP BEGEMANN; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, 1952; HOFFMANN *et al.*, 2002; KALFA *et al.*, 2006; OOSTERWIJK, 2003; PATIL; DESHPANDE; SENGUPTA, 2023; SHULTZ, 2003; SIEGERT; BEIER;

GRÄBNER, 1983; SINGH *et al.*, 2016; TÜYSÜZ *et al.*, 2023). A anomalia de Pelger-Huët é um distúrbio autossômico dominante associado a hipossegmentação (menor número de constrições no núcleo nos granulócitos (principalmente os neutrófilos) (AZNAR; VAYA, 1981; HOFFMANN *et al.*, 2002; OOSTERWIJK, 2003; SIEGERT; BEIER; GRÄBNER, 1983).

Neste estudo, foi investigada a relação dos ncRNAs com a susceptibilidade a obesidade e AR. Além disso, foi realizado um estudo epidemiológico da artralgia e do LES na população menonita brasileira. Em exomas desta mesma população, buscou-se por variantes associadas com suscetibilidade para a AR nos indivíduos com artralgia e por variantes previamente associadas em GWAS com LES. Além destas variantes, buscou-se especificamente por variantes possivelmente deletérias do gene *LBR*, avaliando a sua segregação em famílias afetadas pela anomalia de Pelger-Huët, para prover dados para auxiliar no aconselhamento genético. Por fim, também foi avaliada a associação de NETs séricas com estas doenças.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇAS REUMÁTICAS

As doenças reumáticas (DR) compreendem um amplo espectro de desordens que podem afetar diversos tecidos, com acometimento predominante do sistema musculoesquelético (articulações, tendões, músculos, ligamentos, ossos e músculos). As DR implicam em dor e incapacidade para os indivíduos de uma população, com ônus para a saúde e trazendo problemas sociais e econômicos. A patogênese é multifatorial, sendo que os imunocomplexos, autoanticorpos e respostas imunes desreguladas de linfócitos T desempenham um papel importante. Predisposições genéticas, fatores de risco ambientais ou estilos de vida (tabagismo, obesidade, consumo de álcool, lesões e atividades laborais) e hormônios sexuais também podem contribuir para os fatores de risco. A artrite (inflamação articular) e artralgia (dor articular) são características frequentemente encontradas nas DR (ALMOALLIM; CHEIKH, 2021; CDC, 2022a, 2022b; ROSETI; GRIGOLO, 2022).

A classificação das DR são difíceis pela falta de evidências etiológicas definidas, heterogeneidade dos sintomas e considerável sobreposição clínica e patológica entre muitas condições reumáticas. Uma classificação simples pode ser baseada em sua natureza, podendo abranger doenças autoimunes (LES, AR, esclerose sistêmica ou esclerodermia e síndrome antifosfolípide), autoinflamatórias (febre familiar do mediterrâneo, urticária induzida pelo frio, síndromes periódicas associadas ao receptor do fator de necrose tumoral), metabólicas (osteoporose, doença de Paget, deficiência de vitamina D e distúrbios das glândulas paratireoides) e degenerativas (osteoartrite). A DR autoimune prejudica o equilíbrio entre evitar a resposta imune contra autoantígenos e realizar contra patógenos, sendo que o sistema imunológico está continuamente ativo na ausência de infecção. As DR autoinflamatórias consiste em episódios inflamatórios não provocados (não há estímulo da resposta imune por células T antígeno-específicas ou autoanticorpos de alto título, os quais são causados por desregulação da imunidade inata). A DR degenerativa é a osteoartrite, uma doença crônica que danifica as articulações. Os distúrbios metabólicos nos ossos podem levar à osteoporose e aos depósitos articulares e periarticulares (estruturas ao redor das articulações) de pirofosfato de

cálcio, hidroxapatita e urato monossódico (CALLE; GÓMEZ-PUERTA, 2018; ROSETI; GRIGOLO, 2022).

2.2 ARTRITE REUMATOIDE

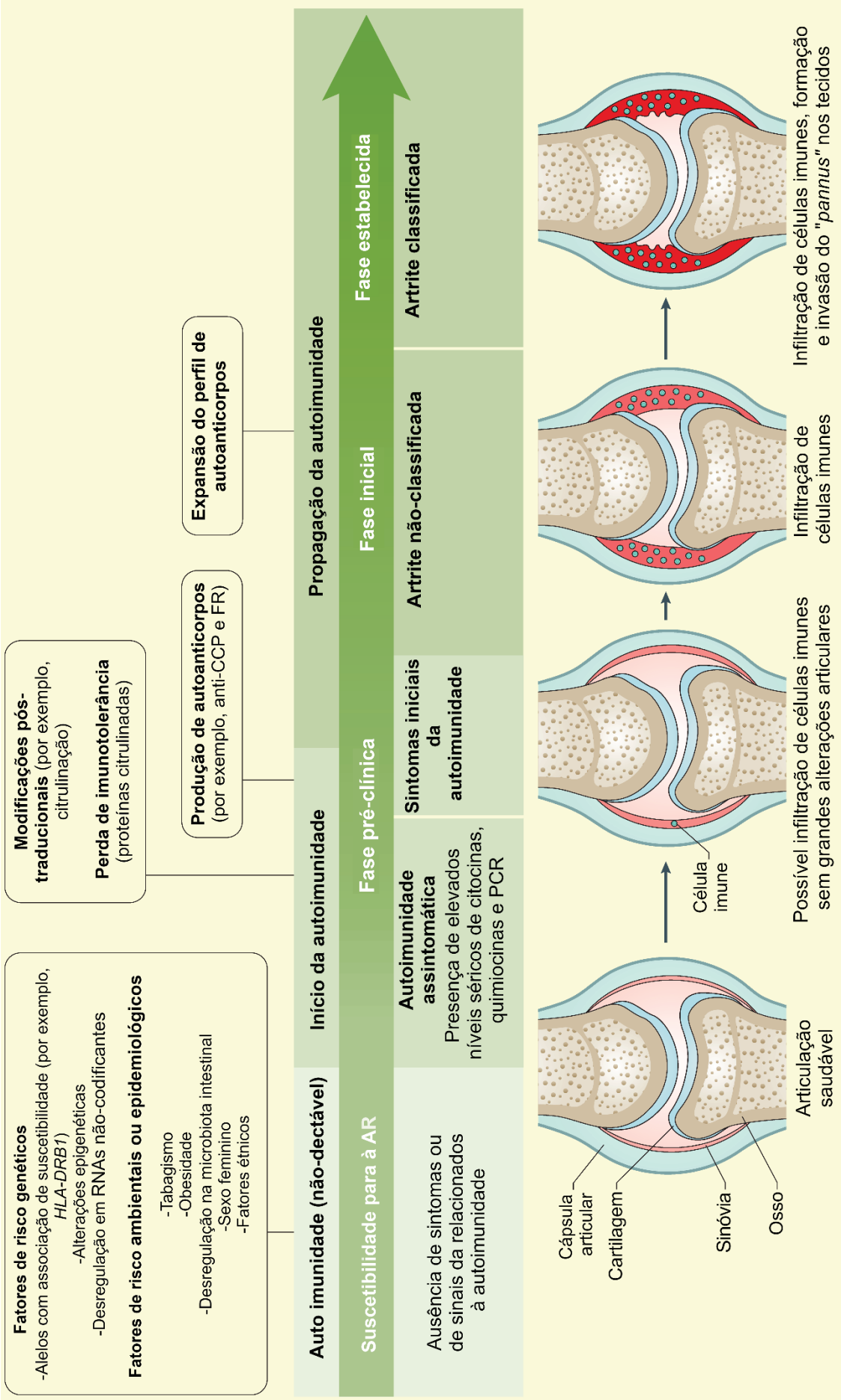
A artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune sistêmica caracterizada por uma inflamação crônica nas articulações e pela presença de autoanticorpos contra a porção Fc de imunoglobulinas G (FR ou fator reumatoide) e anticorpos antiproteínas citrulinadas (ACPAs - anticorpos antiproteínas citrulinadas, do inglês *Anti-citrullinated protein antibodies*), como *Anti-Cyclic Citrullinated Peptide* - anti-CCP e *Anti-Mutated Citrullinated Vimentin* - anti-MCV). Ela é uma doença com grande variabilidade de apresentação clínica e mecanismos patogênicos. Portanto, ela pode ser melhor vista como uma síndrome que engloba diferentes subconjuntos de doenças com vias inflamatórias e autoimunes diversas (por exemplo, grupo de indivíduos com AR soropositivos e soronegativos para os ACPAs), mas que ao final culminam na inflamação e danos crônicos nas articulações (VAN DER HELM-VAN MIL; HUIZINGA, 2008; VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2008). Ademais, sua origem é multifatorial e causada por gatilhos de fatores ambientais em indivíduos com maior suscetibilidade genética (GE; HOLMDAHL, 2019; SMOLEN *et al.*, 2018).

2.2.1 Curso natural na artrite reumatoide

A progressão da AR pode ser dividida em até 5 fases, sendo (1) a presença de fatores de risco como os fatores ambientais, epigenéticos e genéticos; (2) iniciação da autoimunidade sistêmica, (3) presença de sintomas (anormalidades articulares normalmente detectáveis por exames de imagem como ressonância magnética e ultrassom) sem artrite clinicamente estabelecida, (4) artrite não classificada e (5) AR. A fase pré-clínica pode englobar as fases 1 a 3, a fase 4 pode estar na fase inicial da AR e a fase 5 como a fase estabelecida. Dessa forma, a AR é como um processo de várias fases, no qual os pacientes podem passar por fases nas quais não há sinais clínicos claros e sem inflamação detectável por eles (FIGURA 1). A cada fase o processo inflamatório intensifica com o consequente

dano sinovial e destruição óssea até o estabelecimento da AR crônica (GERLAG *et al.*, 2012; SMOLEN *et al.*, 2018; VAN STEENBERGEN *et al.*, 2017). Por fim, a identificação e o tratamento de indivíduos nas fases iniciais (pré-clínica e fase inicial) pode influenciar em um melhor controle clínico da inflamação e até evitar o desenvolvimento da fase estabelecida (FIGURA 2) (VAN STEENBERGEN *et al.*, 2018).

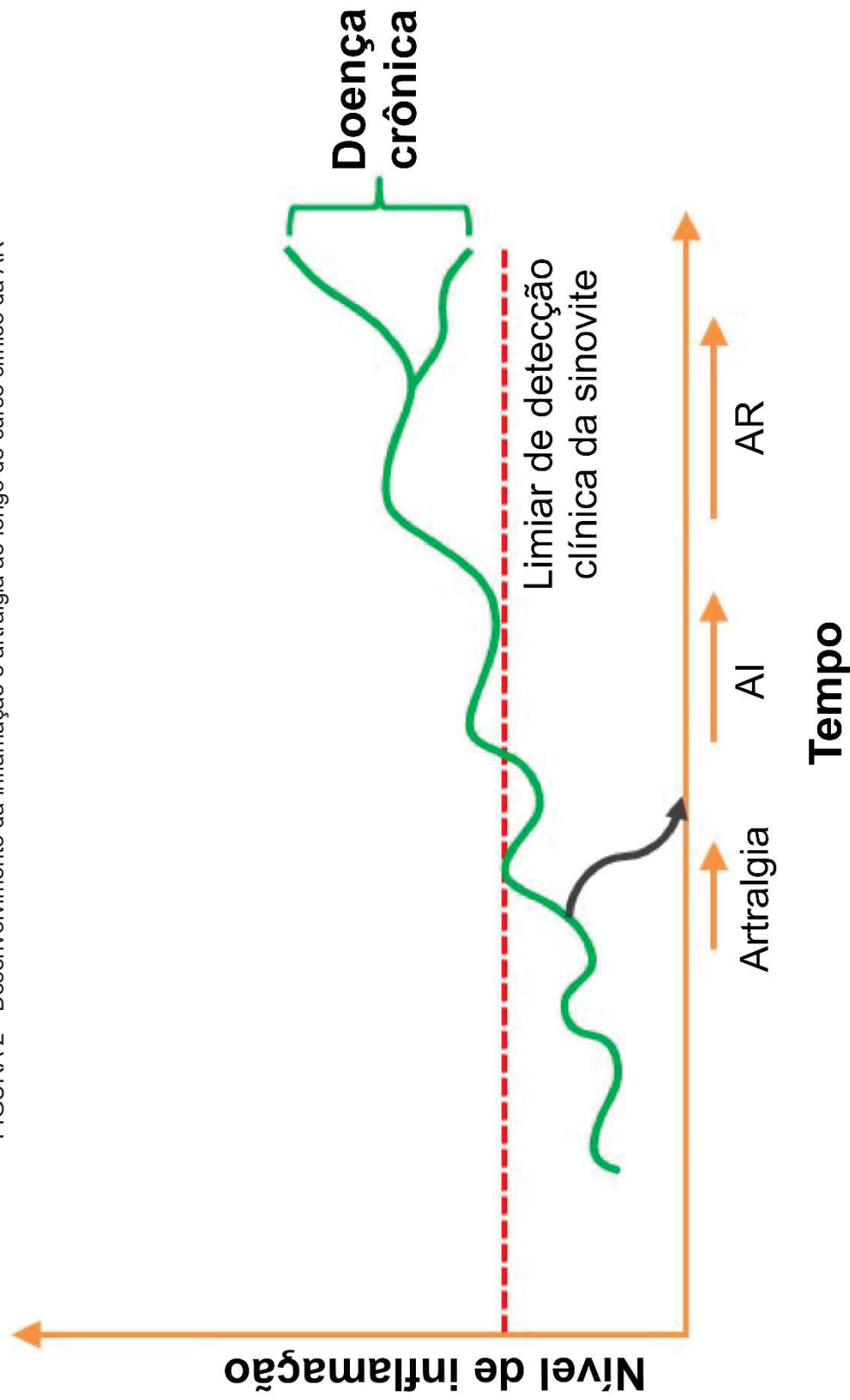
FIGURA 1 - Curso clínico da artrite reumatoide



FONTE: adaptado e modificado de SMOLEN et al., 2018.

LEGENDA: anti-CCP: anticorpos antiproteínas citrulinadas, FR: fator reumatoide, AR: artrite reumatoide.
Pannus: tecido granulomatoso com características tumorais, capaz de invadir e destruir os tecidos cartilaginoso e ósseo e responsável pela extensa destruição articular frequentemente observada na AR.

FIGURA 2 - Desenvolvimento da inflamação e artralgia ao longo do curso clínico da AR



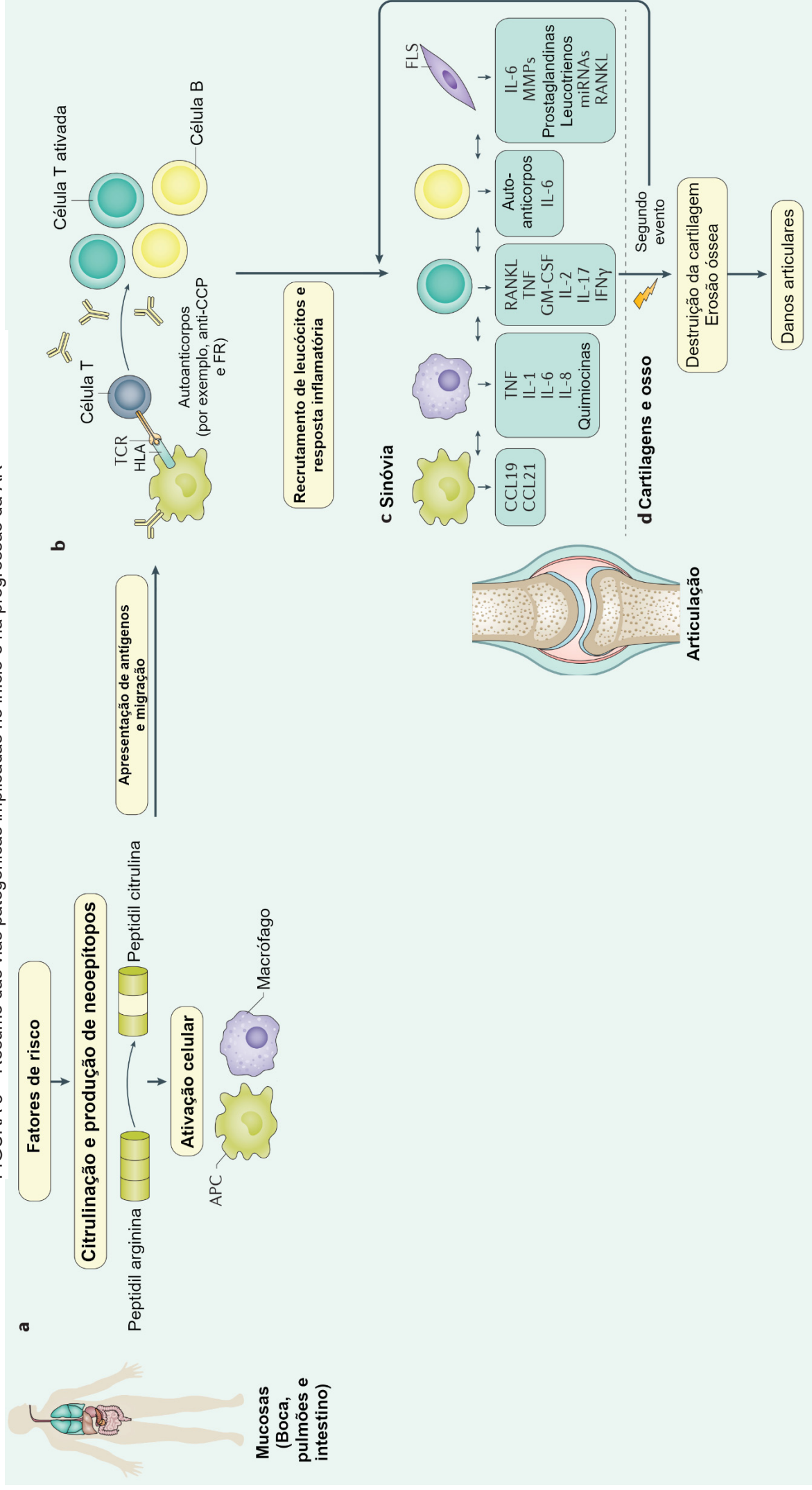
FONTE: adaptado e modificado de VAN STEENBERGEN et al. (2018).

LEGENDA: Artralgia: , IA: artrite não-classificada. AR: artrite reumatoide. Sinovite: inflamação ou processo inflamatório na membrana sinovial. A linha com pontilhado em vermelho representa o limiar de inflamação no qual há desenvolvimento de sinovite clinicamente detectável. A linha e seta vermelha, demonstra possível o efeito de um hipotético tratamento inicial em pacientes identificados nas fases iniciais de artralgia e artrite inespecífica (AI), podendo retardar ou evitar a evolução da doença para um estado crônico (AR).

2.2.1.1 Fatores de risco e fase pré-clínica

A fase pré-clínica ocorre muito antes do surgimento de sintomas evidentes, embora uma manifestação aguda também possa ocorrer (MASI, 1983). A doença é de evolução contínua, iniciada em indivíduos que possuem variantes genéticas associadas com maior predisposição à AR com a interação de fatores e gatilhos ambientais, e pode progredir até que a inflamação articular (AR inicial) se instale. A AR estabelecida se desenvolve naqueles que não resolvem a inflamação articular inicial (SMOLEN *et al.*, 2018). Em relação aos fatores de risco, há vários fatores que aumentam o risco ou a suscetibilidade para o desenvolvimento da AR (FIGURA 3a). Eles podem ser genéticos, epigenéticos, sexo do indivíduo, tabagismo, exposição ocupacional e até obesidade (SMOLEN *et al.*, 2018).

FIGURA 3 – Resumo das vias patogênicas implicadas no início e na progressão da AR



FONTE: adaptado e modificado de SMOLEN *et al.* (2018).

LEGENDA: a) Modificações pós-traducionais, como a citrulinização ou carbamilação, na mucosa podem criar neoantígenos que podem ser reconhecidos pelo sistema imune adaptativo. b) Esses peptídeos alterados são apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs), as quais ativam uma resposta imune adaptativa e induzem a formação de autoanticorpos. c) Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (FLS), APCs e macrófagos podem ser ativados localmente e produzir uma variedade de mediadores inflamatórios. A resposta autoimune induzida pelo sistema imunológico desencadeia a inflamação sinovial, mas pode exigir um segundo evento, como a formação de complexos imunes e a ativação do complemento, para induzir ou aumentar a produção de citocinas e a permeabilidade vascular sinovial. d) As ações parácrinas e autócrinas das citocinas, juntamente com respostas imunes adaptativas persistentes, podem cronificar a doença e, por fim, levar à destruição da cartilagem e do osso.

2.2.1.1.1 Fatores genéticos

Os fatores genéticos são fortes componentes da suscetibilidade à AR. A herdabilidade calculada para AR em gêmeos na Inglaterra e Finlândia foi de 53% e 65%, respectivamente (MACGREGOR *et al.*, 2000). Além disso, foi visto que indivíduos com familiares em primeiro grau afetados pela doença têm um risco relativo de aproximadamente 2 vezes mais chance para desenvolver a AR (HEMMINKI *et al.*, 2009; JONES *et al.*, 1996; JUNCO *et al.*, 1984). As moléculas HLA de classe II com epítomos compartilhados (sequência consenso da molécula codificada por *DRB1* nas posições 70-74 da fenda de ligação ao peptídeo, que é compartilhada por alguns alelos, por exemplo, *HLA-DRB1*01* e *HLA-DRB1*04*) são as associações mais conhecidas para a AR (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; GREGERSEN; SILVER; WINCHESTER, 1987). Os genes do sistema complemento também podem estar associados com a iniciação e desenvolvimento da AR, sendo que as proteínas C2, C3, C4, C5; as quais são codificadas pelos genes *C2*, *C3*, *C4A* *C5* respectivamente; já foram detectadas no líquido sinovial de pacientes com a doença (HOLERS *et al.*, 2018; HOLERS; BANDA, 2018). Ademais, já foi vista associação de uma menor concentração sérica da lecitina ligadora de manose (MBL) em indivíduos com AR em comparação aos controles ($p = 0,05$). O genótipo selvagem do polimorfismo do gene *MBL2* (A/A) estava associado com uma maior produção do ligante e um menor espessamento da camada íntima das carótidas (associação com aterosclerose) em relação aos heterozigotos (A/O, $p = 0,04$) e homozigotos (O/O, $p = 0,05$) (KAHLOW *et al.*, 2018). Outra indicação da associação do sistema complemento foi que os haplótipos **2A1* e **2B1-i* de MASP-2 (Serina proteases associadas a proteína de ligação a manose 2, do inglês *mannose-binding protein-associated serine protease 2*) apresentaram associação de suscetibilidade para o desenvolvimento da AR (OR = 3,32; $p = 0,004$). Além disso, a deficiência de MASP-2 (pelas substituições p.120G e p.439H) está associada com mais de cinco vezes o risco para sintomas articulares em parentes de 1º grau de pacientes com AR (OR = 5,13; $p = 0,02$) (GOELDNER *et al.*, 2014). Existem genes nos quais suas variantes estão associados com a doença de forma independente ou dependente da positividade sorológica dos autoanticorpos ACPAs (KARLSON *et al.*, 2010). Aqueles que estão associadas de maneira independente são: *HLA-DRB1*, *PTPN22*,

BLK, *ANKRD55* e *IL6ST* (VIATTE *et al.*, 2012). Os genes associados com a AR em indivíduos ACPAs positivos são *AFF3*, *CD28*, *TNFAIP3* e aqueles associados com a doença em indivíduos ACPAs negativos são *PRL* e *NFIA* (VIATTE *et al.*, 2012, 2016). Os genes associados com a gravidade da doença são *HLA-DRB1*, *IL2RA*, *DKK1*, *GRZB*, *MMP9*, *SPAG16* e *FOXO3* (KRABBEN; HUIZINGA; MIL, 2014). De um modo geral, as variantes genéticas associadas estão localizadas em genes com função nas vias imunológicas e inflamação (OKADA *et al.*, 2014; WEYAND, 1992), sendo que foi visto que frequentemente estavam em regiões de acentuadores da expressão gênica (TRYNKA *et al.*, 2013).

2.2.1.1.2 Fatores epigenéticos

As alterações na marcas epigenéticas da cromatina e nas caudas das histonas também possuem associação para o desenvolvimento da AR (SMOLEN *et al.*, 2018), sendo definidas (utilizando o conceito do campo da epigenética molecular) como: “*qualquer modificação na cromatina que influencie a expressão gênica, seja mitoticamente e/ou meioticamente estável ou não*” (HAIG, 2012; NICOGLOU; MERLIN, 2017).

A metilação no DNA ocorre nas citosinas e é a modificação epigenética mais conhecida, ocorrendo no dinucleotídeo CpG (acrônimo para sequências com citosina e guanina que estão ligadas por uma ligação fosfodiéster) em animais vertebrados (ARISTIZABAL *et al.*, 2020). Rollin Hotchkiss descobriu uma citosina modificada (metilcitosina) há 75 anos atrás, em uma amostra de timo de bezerro, usando cromatografia em papel (HOTCHKISS, 1948) Desde então surgiram muitos estudos sobre como essa modificação epigenética pode influenciar a expressão gênica, por exemplo, ela auxiliar nos mecanismos de repressão da expressão gênica (HARBERS *et al.*, 1981; JONES; TAYLOR, 1980; LI; BARBA; JAENISCH, 1993; MOHANDAS; FAÍSCAS; SHAPIRO, 1981; WOLF *et al.*, 1984). A maior parte dos CpGs se localizam em regiões de DNA chamadas ilhas ou sítios CpG. Sabe-se que a maioria das ilhas CpG estão nas regiões dos promotores e 5' dos genes. Além disso, 60% dos genes humanos têm ilhas CpG em promotores. O padrão de metilação nas ilhas CpG dos genes pode exercer um controle tecido-específico da expressão gênica e a hipermetilação pode ter um efeito na repressão da expressão

gênica (ECKHARDT *et al.*, 2006; ILLINGWORTH *et al.*, 2008; KAROUZAKIS *et al.*, 2018; LI; ZHANG, 2014; LIM *et al.*, 2019, 2019; SHIOTA *et al.*, 2002).

Há também outras alterações epigenéticas que estão relacionadas com alteração nas caudas das histonas, que são proteínas que compõem a cromatina. O polímero da cromatina é composto por um monômero de nucleossomos, que são um octâmero de histonas (um tetrâmero de H2A e H2B mais um tetrâmero de H3 e H4) envolto por uma cadeia polinucleotídica de DNA com cerca de 146 pares de bases (KORNBERG, 1977). Nas caudas N-terminais das histonas, que se estendem do núcleo das proteínas, podem ocorrer modificações químicas pela adição de radicais químicos (por exemplo, acetil, metil e fosfato) ou de uma proteína (ubiquitina). Existem vários tipos de modificações ou alterações químicas nas caudas de histonas: acetilação (adição do radical acetil), metilação (adição do radical metil), fosforilação (adição do radical fosfato) e ubiquitinação (ubiquitina) (ZHANG *et al.*, 2012). Essas modificações químicas podem alterar as interações entre o DNA e os aminoácidos das cadeias laterais das histonas (aminoácidos carregados positivamente são atraídos com DNA carregado negativamente) e causar uma estrutura mais relaxada ou apertada nos nucleossomos (BONASIO; TU; REINBERG, 2010; SHOGREN-KNAAK, 2006). A modificação da acetilação normalmente tem uma associação de nucleossomos mais relaxados e padrões ativos da cromatina, seja pela sinalização de remodelamento cromossômico ou por interações entre DNA e histonas (BROWNELL *et al.*, 1996; XU; ZHANG; GRUNSTEIN, 2005). O efeito da metilação depende da posição e a quantidade de grupos metil adicionados nas caudas de histonas (REA *et al.*, 2000, p. 200; SANTOS-ROSA *et al.*, 2002). Os efeitos repressivos da metilação estão associados com a adição de três grupos metil sobre a lisina 9 (H3K9me3) e lisina 27 (H3K27me3) na histona 3 (H3). Os mecanismos repressivos que operam na H3K9me3 são a ligação da proteína da heterocromatina 1 (HP1, do inglês *Heterochromatin protein-1*), responsável por iniciar o processo de heterocromatinização. Enquanto isso, H3K27me3 auxilia no recrutamento da maquinaria de silenciamento gênico do grupo Polycomb para atuar na repressão da expressão gênica (CAO *et al.*, 2002; HEINTZMAN *et al.*, 2007; JACOBS *et al.*, 2001) (CAO *et al.*, 2002; HEINTZMAN *et al.*, 2007; JACOBS *et al.*, 2001) A adição um grupo metil (monometilação) na lisina 4 na histona 3 (H3K4me1) está associada a

regiões acentuadoras da transcrição e a trimetilação (adição de três grupo metil) na lisina 4 na histona 3 (H3K4me3) está relacionada às regiões ativas (promotoras e a cromatina ativa) (HEINTZMAN *et al.*, 2007).

A desregulação nos mecanismos responsáveis pela adição ou retirada de marcas epigenéticas; como por exemplo, metilação no DNA, metilação ou acetilação nas caudas das histonas; já foram encontradas nas células envolvidas nos mecanismos patogênicos da AR: sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (HORIUCHI *et al.*, 2009; HUBER *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2021; MACIEJEWSKA-RODRIGUES *et al.*, 2010; MIAO, C. *et al.*, 2018; NAKANO *et al.*, 2013; WADA *et al.*, 2014) e os linfócitos T (AI *et al.*, 2021; DE ANDRES *et al.*, 2015; GLOSSOP *et al.*, 2016; GÖSCHL *et al.*, 2020; GUDERUD *et al.*, 2020; SHAO *et al.*, 2019) e B (DE ANDRES *et al.*, 2015; GLOSSOP *et al.*, 2016; OCSKÓ *et al.*, 2018).

Além disso, os ncRNAs também podem atuar no fator de risco epigenético. Eles incluem micro-RNAs (miRNAs), RNAs longos não codificantes (lncRNAs) e entre outros, os quais possuem um comprimento de 21 – 23 ou superior a 200 nucleotídeos respectivamente. miRNAs regulam a expressão gênica no nível pós-transcricional, bloqueando a tradução ou causando a degradação do RNA mensageiro (mRNA) com o qual apresentam complementariedade de base incompleta ou completa, respectivamente (GEBERT; MACRAE, 2019; MERCER; DINGER; MATTICK, 2009). lncRNAs podem regular vias biológicas por meio de vários mecanismos: como remodelagem de nucleossomos e da cromatina, regulação transcricional, processamento pós-transcricional (regulação de *splicing*, transporte, tradução e processos de degradação), RNAs competidores endógenos (ceRNA) ou sequestro de miRNA ("esponjas") (e, assim, bloqueando funções de miRNA). A suscetibilidade ao desenvolvimento da AR, correlação com biomarcadores, atividade da doença e influência nos seus mecanismos patogênicos já foram associados à expressão diferencial de ncRNAs: *miR-210*, *miR-155*, *miR-23b*, *lncRNA H19*; *miR-99b-5p* (ABDUL-MAKSOUND *et al.*, 2017; LI, H. *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; YANG, Jialiang *et al.*, 2020; YUE *et al.*, 2019).

2.2.1.1.3 Fatores epidemiológicos, ambientais e sorológicos

O sexo é um fator de susceptibilidade importante a AR, sendo que mulheres têm de 2 a 3 vezes mais chance de desenvolver a doença do que homens (NGO; STEYN; MCCOMBE, 2014). A influência do estrogênio em exacerbar ou estimular as respostas imunes é uma hipótese, porém esse mecanismo ainda é controverso (TRYNKA *et al.*, 2013). Além disso, foi vista a influência de genes presentes no cromossomo X implicados na regulação da resposta imune e associados com o aumento da suscetibilidade para a AR (BIANCHI *et al.*, 2012; LIBERT; DEJAGER; PINHEIRO, 2010). Por exemplo, foi encontrada a associação entre a variação do número de cópias e a expressão dos genes *TLR7* e *TLR8*, localizados no cromossomo X. Além disso, viu-se que um quarto à um terço do homens com AR apresentavam com mosaicismos cromossômicos (46, XX ou 47, XXY) em células do sangue periférico; as quais possuíam mais de um cromossomos X, maior número de cópias dos genes *TLR7* e *TLR8* e maior expressão destes genes (MARTIN *et al.*, 2019).

A obesidade (índice de massa corpórea de ≥ 30 kg/m²) foi vista associada com a AR e aumentando cerca de 1,45 vezes a chance no seu desenvolvimento, quando comparada a indivíduos com um índice menor que 25 kg/m² (TOO *et al.*, 2016a). Ela também foi associada com uma pior resposta ao tratamento (GREMESE *et al.*, 2013; KLAASEN *et al.*, 2011; SCHULMAN *et al.*, 2018) e maior atividade de doença na AR (JAWAHEER *et al.*, 2010; STAVROPOULOS-KALINOGLU *et al.*, 2009).

O tabagismo (indivíduos com histórico de 20 anos de hábito) aumenta cerca de duas vezes a chance de desenvolvimento da AR, em comparação a indivíduos não fumantes (SUGIYAMA *et al.*, 2010; VESPERINI *et al.*, 2013). O hábito de fumar está associado com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e com a severidade da doença. Contudo, nota-se que a associação entre o tabagismo e a AR ainda é controversa (NARANJO *et al.*, 2010; VESPERINI *et al.*, 2013). Embora, exista estudos que mostrem a falta da associação tabagismo e a AR (VESPERINI *et al.*, 2013), sabe-se que a fumaça do cigarro pode causar a citrulinização (conversão do aminoácido arginina em citrulina) em vários tipos de proteínas nas mucosas (proteínas intracelulares das células das mucosas e proteínas intercelulares) pela indução das enzimas peptidil-arginina deaminases (PAD) (MAKRYGIANNAKIS *et al.*, 2008). As enzimas PAD podem também ser produzidas por organismos como

Porphyromonas gingivalis, o qual é responsável por doenças periodontais (DISSICK *et al.*, 2010). Após o evento de citrulinização ou outras modificações (acetilação ou carbamilação), as proteínas que foram alteradas são processadas e seus antígenos se ligam às moléculas HLA, principalmente *HLA-DRB1*01* e *HLA-DRB1*04* que compartilham o mesmo epítipo), e são apresentadas como antígenos às células T e B. Após o reconhecimento dos antígenos, há a produção de autoanticorpos contra as proteínas próprias (fatores reumatoide e anticorpos antiproteínas citrulinadas) (HOLERS, 2013; MULLER; RADIC, 2015).

Em relação a exposição crônica ambiental ou ocupacional a poeiras já foi associada com maior suscetibilidade para à AR (STOLT, 2005; TOO *et al.*, 2016b; WEBBER *et al.*, 2015). Exemplificando, existe associações para à inalação de poeiras de sílica (STOLT, 2005), aquelas produzidas na construção civil ou na demolição de edifícios (cimento, sílica, amianto, fibras de vidro e entre outros) (WEBBER *et al.*, 2015) e na indústria têxtil (TOO *et al.*, 2016b).

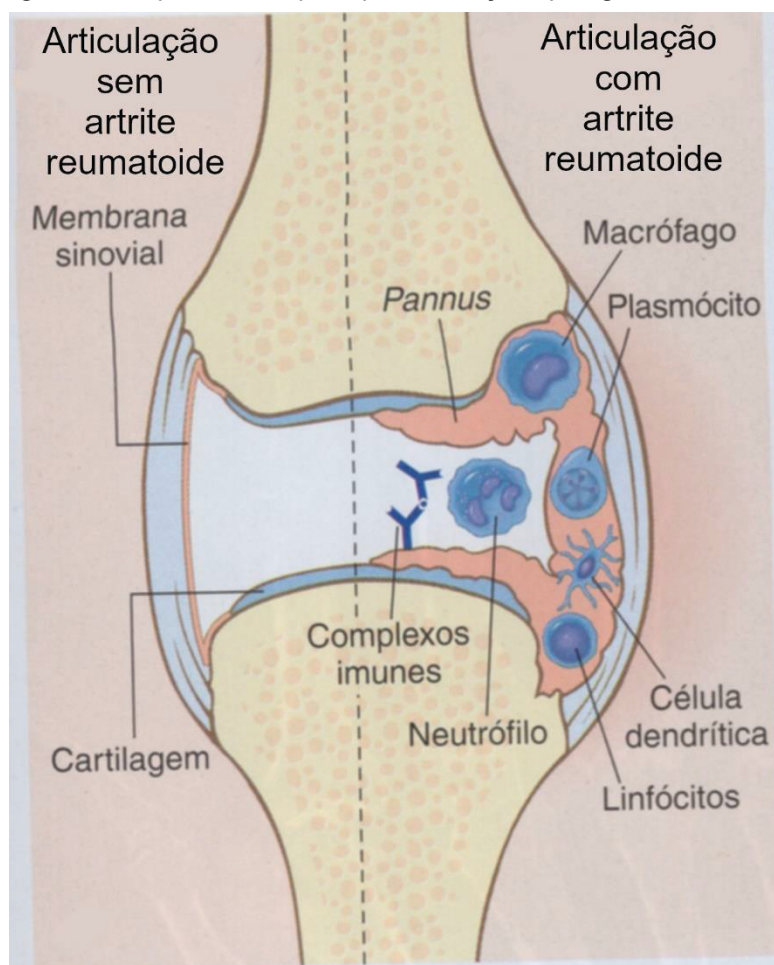
Até 10 anos antes do início dos sintomas clínicos, pode-se detectar a presença dos autoanticorpos (FR e ACPAs) e citocinas pró-inflamatórias circulantes. A presença de ambos FR e ACPA é associada com uma maior gravidade da doença e podem ser usados como marcadores prognósticos e diagnósticos (ALETAHA; ALASTI; SMOLEN, 2015; LAURENT *et al.*, 2015; MULLER; RADIC, 2015; NIELEN *et al.*, 2004; SOKOLOVE *et al.*, 2014). A prevalência da positividade ACPAs em indivíduos com AR, depende dos critérios utilizados na classificação e a população estudada, vista na fase inicial foi entre 50% – 60% e na fase estabelecida variou entre 60% a 90% (DEMORUELLE *et al.*, 2013; GOELDNER *et al.*, 2010; JORGENSEN *et al.*, 2008; MEYER, 2003; PRUIJN; WIIK; VAN VENROOIJ, 2010; VAN DER LINDEN *et al.*, 2009; VAN GAALEN *et al.*, 2004). A presença dos ACPA por si só não é capaz de causar a inflamação sinovial nas articulações. Para ocorrer inflamação na membrana sinovial, é necessário um outro evento (formação de imunocomplexos, ativação do complemento ou lesão microvascular) para desencadear a inflamação caracterizada por permeabilidade vascular aumentada e influxo de células inflamatórias (SOKOLOVE *et al.*, 2014).

2.2.1.2 Fase inicial e estabelecida

A membrana sinovial tem dois papéis importantes nas articulações, as quais são produzir lubrificantes para criar um ambiente de baixa fricção entre as cartilagens e fornecimento de oxigênio e nutrientes. A membrana sinovial saudável possui um revestimento da camada íntima feito de sinoviócitos semelhantes a macrófagos e fibroblastos (FLS), adipócitos, vasos sanguíneos e células imunes dispersas. O revestimento da camada íntima (membrana sinovial) não é uma barreira porque não há uma membrana basal e junções, ou seja, permite o tráfego de células e proteínas para o líquido sinovial (CASTOR, 1960).

A fase inicial da doença é caracterizada por um infiltrado mononuclear na membrana sinovial, o qual é principalmente constituído por células T CD4⁺, macrófagos e células estromais ativadas (sinoviócitos semelhantes a fibroblastos). Após uma semana do início dos sintomas, há alta expressão de enzimas que degradam a matriz extracelular (como as metaloproteinases) no revestimento íntimo da membrana sinovial. A FIGURA 4 ilustra a diferença entre uma articulação sem AR e uma com AR.

FIGURA 4 -- Representação gráfica comparando as principais alterações patológicas entre uma articulação sem e com AR



FONTE: adaptado e modificado de KUMAR *et al.* (2016)

Exemplificando melhor as alterações patológicas citadas no parágrafo acima, durante a fase inicial da AR existem duas alterações patológicas evidentes que ocorrem na membrana sinovial (FIGURA 3c). Primeiro, o revestimento íntimo se expande devido à maior proliferação e ativação dos sinoviócitos (semelhantes a macrófagos e fibroblastos) (MCINNIS; SCHETT, 2011), os quais serão uma fonte importante para a produção e liberação de citocinas e proteases. Os sinoviócitos semelhantes a macrófagos quando ativados produzem uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, IL-1 (Interleucina 1), IL-6 (Interleucina 6) e TNF (Fator de necrose tumoral). Embora FLS possam produzir IL-6, a sua característica mais marcante é a produção de grandes quantidades de metaloproteínas, e mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e leucotrienos (BARTOK; FIRESTEIN, 2010). Os FLS também podem apresentar maior expressão de micro-RNAs (por exemplo, *miR-21-5p* e *miR-155-5p*) que podem contribuir para seu fenótipo ativado (CHEN *et al.*, 2016; LI, H. *et al.*, 2019; SU *et al.*, 2017; XIONG *et*

al., 2016). Além disso, os FLS podem assumir um fenótipo invasivo, que é responsável por danos à cartilagem, e pode potencialmente migrar de uma articulação para outra aumentando o número de articulações afetadas (BARTOK; FIRESTEIN, 2010).

A segunda alteração é a infiltração de células do sistema imune adaptativo na membrana sinovial (ZIFF, 1974). Esta alteração está relacionada com a formação e invasão de um tecido chamado *pannus*, tecido granulomatoso composto por células inflamatórias capaz de invadir e destruir os tecidos cartilaginoso e ósseo (KEYSZER *et al.*, 1998). Cerca de metade das células na membrana sinovial que podem se infiltrar difusamente nos tecidos são células T de memória CD4⁺, em 15 a 20% dos pacientes, formar centros germinativos ectópicos nos quais células B maduras proliferam, diferenciam-se e produzem autoanticorpos. Células B, plasmoblastos e plasmócitos também estão presentes, muitos dos quais produzem FR ou ACPAs. Células dendríticas foliculares apresentadoras de antígeno, macrófagos e mastócitos também são distribuídos através da membrana sinovial (HUMBY *et al.*, 2009). Os Macrófagos, neutrófilos (particularmente no espaço do líquido sinovial) e mastócitos contribuem para o dano articular por meio da liberação de citocinas e MMPs. No entanto, o tipo de célula com o maior potencial destrutivo e para a cartilagem são os FLS positivo para caderina-11 (KIENER *et al.*, 2009), que produzem proteases e principalmente MMPs, como collagenases e estromelisinases (KEYSZER *et al.*, 1998). Em relação a perda óssea, elas podem estar associadas à maturação e ativação de osteoclastos (células responsáveis pela reabsorção óssea) (FIGURA 3c) ocasionados pela ativação da via dos receptores RANK (Receptor ativador do fator nuclear kappa B, do inglês *Receptor activator of nuclear factor kappa B*). A ativação desta via se deve pela maior secreção do seu ligante, RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B, do inglês *Receptor activator of nuclear factor kappa B*), o qual pode ser produzido e liberado por células T e FLS na membrana sinovial (SCHETT; GRAVALLESE, 2012). Os osteoclastos podem degradar a matriz óssea mineralizada produzindo proteases, incluindo a catepsina K, que funciona em um microambiente acidificado (REDLICH; SMOLEN, 2012). Também foi sugerido que ACPAs podem interagir com peptídeos citrulinados (por exemplo, vimentina citrulinada) expressos por osteoclastos e precursores de osteoclastos (osteoblastos), levando à maturação e ativação dos

osteoclastos e, portanto, com um potencial de iniciar danos articulares. As interações entre o autoanticorpo e o osteoclasto podem preceder o início da inflamação sinovial e fornece novos mecanismos pelos quais os autoanticorpos, particularmente ACPAs, contribuem para a inflamação e remodelação tecidual além da ativação do sistema complemento (HARRE *et al.*, 2012; KRISHNAMURTHY *et al.*, 2016). No entanto, a ativação precoce e excessiva de osteoclastos e dano articular grave também ocorrem em animais com artrite causada por TNF na ausência de autoanticorpos (HAYER *et al.*, 2007).

Por fim, nota-se que as vias patogênicas na membrana sinovial se mantêm estáveis conforme o passar do tempo, após serem estabelecidas na fase inicial (KINSLOW *et al.*, 2016). Outros autoanticorpos podem surgir, como anticorpos contra proteínas carbamiladas. Após o tratamento, os níveis dos autoanticorpos diminuem, mas o fator reumatoide diminui ainda mais que os ACPA (SHI *et al.*, 2014). Na doença já estabelecida, os macrófagos e FLS exercem um importante papel para a persistência da inflamação na membrana sinovial e da doença (AI *et al.*, 2015; SMOLEN *et al.*, 2018).

2.2.2 Classificação da artrite reumatoide

Segundo ALETAHA *et al.* (2010), o critério de classificação da doença necessita incluir critérios clínicos e exames complementares. Para haver o diagnóstico de AR, o indivíduo deve possuir uma pontuação maior ou igual a seis em um sistema de pontuação com um escore de soma direta, de acordo com a tabela de ACR/EULAR (*American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism*) de 2010. Para incluir os indivíduos a serem classificados nestes critérios, há a necessidade de atender dois requisitos, os quais são a presença de sinovite clínica ativa em pelo menos uma articulação e exclusão de outras doenças que possam causar a inflamação na membrana sinovial (TABELA 1).

2.2.3 Epidemiologia da artrite reumatoide

A prevalência da AR mundial estimada por uma metanálise de 67 estudos em 41 países é de 0,46% (ALMUTAIRI *et al.*, 2021). Segundo uma metanálise realizada por (SAFIRI *et al.*, 2019), nota-se principalmente que as prevalências de AR ajustadas por idade foram maiores na América do Norte (0,38%) Europa Ocidental (0,35%) e Caribe (0,34%). As menores foram vistas na Oceania (0,14%), oeste da África subsaariana (0,13%) e sudeste da Ásia (0,10%). Ademais, em relação ao Brasil, foi visto que a prevalência ajustada para idade da AR foi de aproximadamente 0,29% (INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION, 2021; PAPADIMITROPOULOS *et al.*, 2022). A FIGURA 5 reporta graficamente a distribuição global da prevalência, ajustada pela idade, de indivíduos com AR a cada 100.000 habitantes.

Além disso, (MOURA *et al.*, 2012) relatou em uma amostra de 262 pacientes com AR em Curitiba, Paraná, Brasil, o desenvolvimento de manifestações extra-articulares foi visto que 45,8%, sendo as principais: pulmonares (54,2%), nódulos reumatoides (21%) e vasculites (10%). A presença concomitante com síndrome de Sjögren foi de 18,1% e amiloidose foi 12,5%. Em relação aos pacientes com AR no Sul do Brasil, a presença do FR era de 69,2% nos indivíduos com manifestações extra-articulares, o que pode ser esperado, dado que o FR pode ser um preditor para as manifestações extra-articulares. A presença de ACPA dentre aqueles que

foram pesquisados foi 77%. Pacientes com manifestações extra-articulares e seus parentes com queixas de artralgia apresentam maior positividade para diferentes autoanticorpos (NASS *et al.*, 2017).

2.3 LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica e multisistêmica com a maior prevalência no sexo feminino. A apresentação clínica heterogênea da doença (FIGURA 6) decorre da diversidade de diferentes vias imunopatogênicas implicadas na doença (FAURSCHOU *et al.*, 2006; KAUL *et al.*, 2016). A interação entre fatores ambientais e genéticos são importantes para o desenvolvimento do LES, pois os fatores genéticos não são capazes por si só de explicarem o fenótipo da doença, visto que a concordância entre gêmeos monozigóticos varia de 24% a 69% e entre gêmeos dizigóticos é de 2%. Além disso, o risco de parentes de primeiro grau dos indivíduos afetados desenvolver o LES é cerca de 1% a 3% (BLOCK *et al.*, 1975; DEAFEN *et al.*, 1992; GRENNAN *et al.*, 1997).

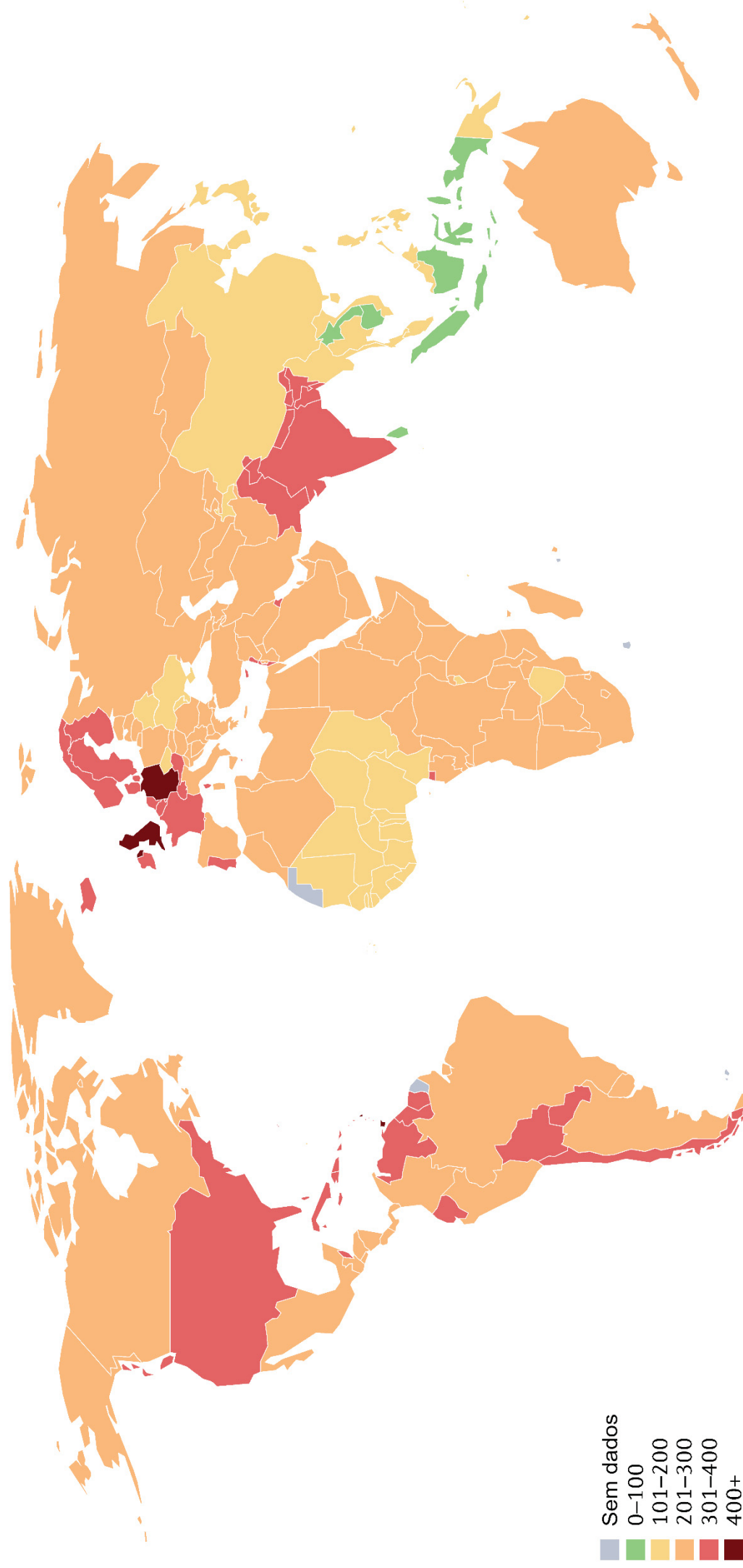
TABELA 1 - Critérios para classificação da artrite reumatoide

População-alvo (quem deve ser testado?)					
Paciente com pelo menos uma articulação com sinovite clínica definida (edema).* Sinovite que não seja mais bem-explicada por outra doença. *Os diagnósticos diferenciais podem incluir condições como lúpus eritematoso sistêmico, artrite psoriásica e gota. Se houver dúvidas quanto aos diagnósticos diferenciais relevantes, um reumatologista deve ser consultado.					
Acometimento articular (0–5)	Sorologia (0–3)		Duração dos sintomas (0–1)		Provas de atividades inflamatórias (0–1)
1 grande articulação	0	FR negativo E ACPA negativo	0	< 6 semanas	PCR normal E VHS normal
2–10 grandes articulações	1	FR positivo OU ACPA positivo em baixos títulos	2	≥ 6 semanas	PCR anormal OU VHS anormal
1–3 pequenas articulações (grandes não contadas)	2	FR positivo OU ACPA positivo em altos títulos	3		
4–10 pequenas articulações (grandes não contadas)	3				
> 10 articulações (pelo menos uma pequena)	5				

FONTE: Modificado de MOTA *et al.* (2013).

LEGENDA: FR - fator reumatoide, ACPA - autoanticorpos contra proteínas citrulinadas, PCR - proteína C reativa, VHS: velocidade de hemossedimentação. Número de pontos para diagnóstico estão indicados à direita dos critérios de pontuação. Grandes articulações - ombros, cotovelos, quadris, joelhos e tornozelos. Pequenas articulações - articulações metacarpofalangeanas, articulações interfalangeanas proximais, segunda a quinta articulações metacarpofalangeanas, articulações interfalangeanas do polegar e punhos. Baixos títulos – níveis que são superiores ao valor de referência, mas ≤ 3 vezes o valor de referência estabelecido pelo ensaio ou laboratório. Altos títulos – níveis que são superiores ao valor de referência mais de 3 vezes que o estabelecido pelo ensaio ou laboratório.

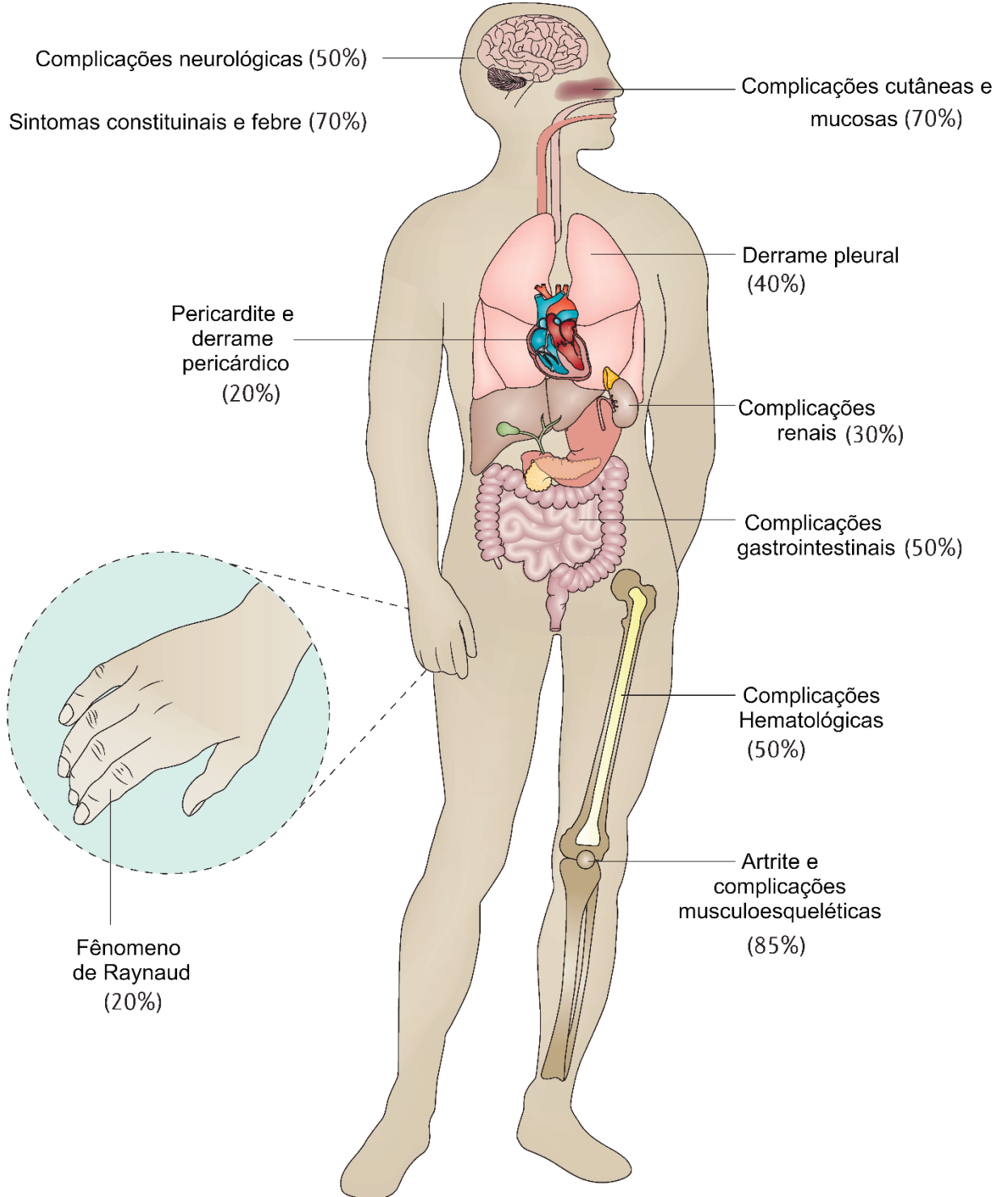
FIGURA 5 - Representação gráfica dos intervalos de prevalências da AR em escala global



FONTE: Modificado de FINCKH *et al.* (2022).

LEGENDA: A figura apresenta os intervalos das prevalências da AR para cada 100.000 habitantes em cada país.

FIGURA 6 – Heterogeneidade dos sintomas no LES



FONTE: adaptado e modificado de KAUL et al. (2016).

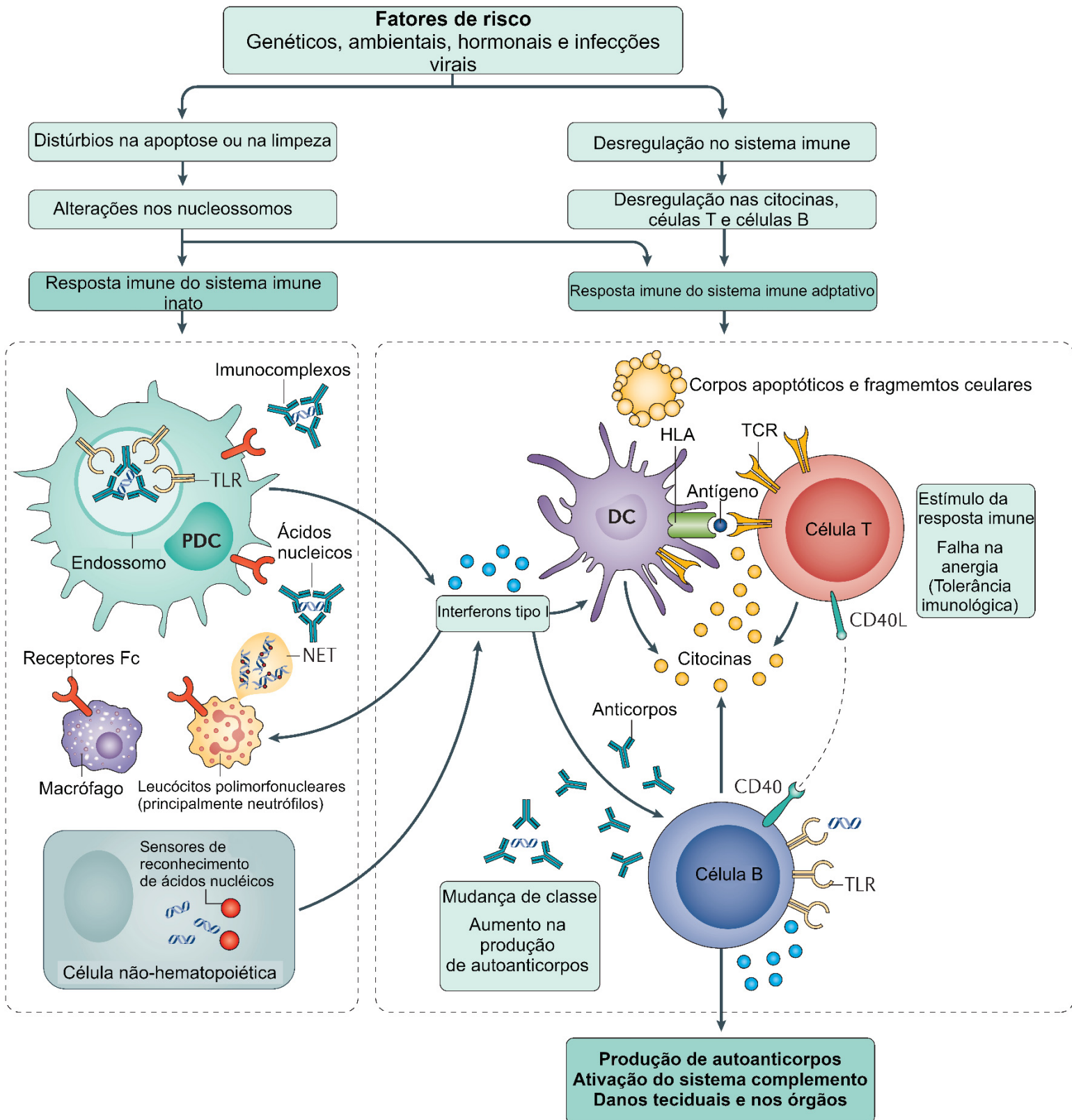
NOTA: O fenômeno de Raynaud é uma vasoconstrição acompanhada de isquemia nas extremidades com episódios transitórios ou persistentes.

A patogênese da doença principalmente se deve a uma desregulação da imunidade inata e adaptativa frente aos antígenos presentes no núcleo das células (DNA dupla-fita e proteínas que interagem com ácidos nucleicos). Esta observação pode ser vista pela presença dos auto anticorpos: ANCA (Anticorpo anticitoplasmático de neutrófilo), anti-Smith ou anti-Sm (anticorpos que reconhecem componentes do espliceossomo como antígenos) e anti-dsDNA (anticorpo que reconhece DNA dupla-fita) (CROW; OLFERIEV; KIROU, 2015; KAUL *et al.*, 2016). Além do mais, a disponibilização e o reconhecimento dos antígenos nucleares pelo sistema imune inato e adaptativo pode ocorrer pela ineficiente remoção dos produtos e antígenos celulares das NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos), apoptose ou necrose (CROW; OLFERIEV; KIROU, 2015; GARCIA-ROMO *et al.*, 2011; GESTERMANN *et al.*, 2018; STETSON, 2012; VILLANUEVA *et al.*, 2011). Por fim, todos estes eventos irão culminar na produção dos autoanticorpos, ativação do sistema complemento, deposição de imunocomplexos e o dano tecidual nos órgãos (KAUL *et al.*, 2016).

A interação dos fatores ambientais juntamente com fatores de risco genéticos pode aumentar o risco no desenvolvimento do LES. Os gatilhos para a ativação do sistema imunológico inato podem incluir ácidos nucleicos, que ativam sensores citoplasmáticos ou para infecção microbiana, ou restos celulares apoptóticos ou necróticos. Esses gatilhos podem interagir com receptores TLRs em células dendríticas plasmocitoides (PDCs). Além disso, a desregulação nos mecanismos de reconhecimento de ácido nucleicos citoplasmáticos em outras células, possivelmente células epiteliais, podem estimular a produção e do sistema imune liberação de interferon (IFN) tipo I, permitindo a estimulação imune e maior das NETs, as quais também têm um papel na patogênese. Os IFNs do tipo I são fundamentais para a ativação das respostas imunes (vias patogênicas) do sistema inato em muitos pacientes com LES. A ativação de células dendríticas (DCs) apresentadoras de antígeno pelos IFNs do tipo I que aumentam a sua capacidade apresentar antígenos (autoantígenos) às células T. A geração de células T efetoras resulta na maior produção de citocinas e na expressão de moléculas de superfície celular, as quais amplificam a resposta imune dirigida contra aos autoantígenos e a inflamação. A constante exposição dos materiais apoptóticos e das NETs, os quais possuem vários autoantígenos nucleares e citoplasmáticos, estimulam as células B a produzirem autoanticorpos pelas interações com o ligante CD40 (CD40L),

presente nos linfócitos T ativados. As interações com as células T são importantes para estimular a diferenciação das células B e a produção de autoanticorpos, assim como os ligantes TLR e o fator de necrose tumoral (TNF) secretado pelas DCs. A anergia (isto é, processo que suprime respostas imunes contra autoantígenos) é perdida, interferindo na eliminação de clones autorreativos de células T e B. A produção dos imunocomplexos (complexos contendo ácidos nucleicos, proteínas de ligação a ácidos nucleicos e autoanticorpos que se ligam a essas moléculas componentes) auxilia no início da inflamação e danos aos tecidos/órgãos. A perpetuação das vias patogênicas ocorre quando os imunocomplexos são depositados no tecido-alvo, amplificando a resposta imune após a ligação com os TLRs endossomais e estimulando a retroalimentação positiva nas vias patogênicas anteriores (induzem a secreção de IFN α – Interferon alfa e outros mediadores pró-inflamatórios) (KAUL *et al.*, 2016) (FIGURA 7).

FIGURA 7 - Representação gráfica das principais vias imunopatogênicas no LES



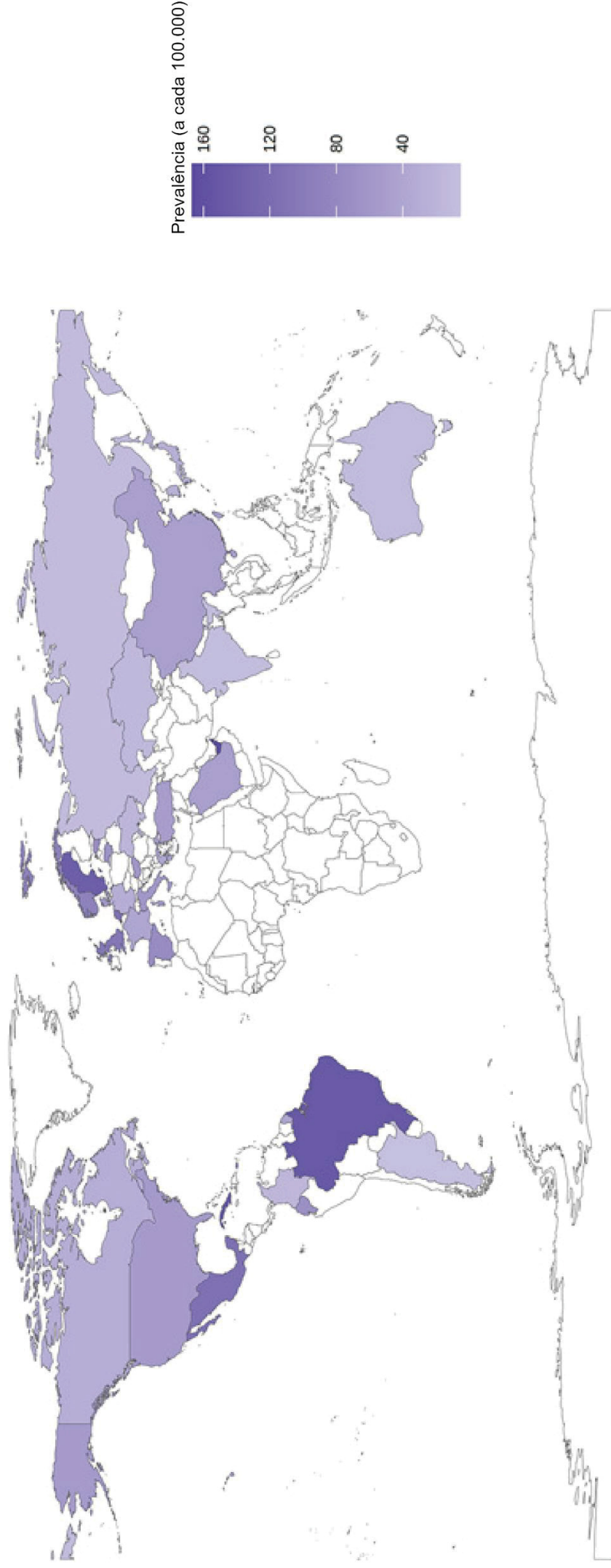
FONTE: adaptado e modificado de KAUL et al. (2016).

LEGENDA: PDC: célula dendrítica plasmocitoide. DC: célula dendrítica. TLR: receptor *toll-like*. NET: armadilhas extracelulares de neutrófilos.

Os principais fatores de risco para o LES são os fatores genéticos, ambientais e ser do sexo feminino (KAUL *et al.*, 2016). Mais de 100 loci foram identificados em estudos de GWAS com pequenos efeitos individuais, mas aditivos para o desenvolvimento do LES. Por exemplo, as variantes nos genes que codificam as moléculas do sistema complemento (*rs1270942**C – gene *CFB*, *rs558702**A – gene *C2*, *rs11085192**T – gene *C3*, *rs200283861**A – gene *C4B*, *rs6677604* – gene *CFH* e *rs9888739**T – gene *ITGAM*) e haplótipos dos genes *HLA* (*DRB1**1501/*DQB1**0602 e *DRB1**0301/*DQB1**0201), as quais estão associadas com uma menor eficiência na remoção fragmentos de células apoptóticas e uma maior apresentação de autoantígenos nucleares (ARMSTRONG *et al.*, 2014; BENTHAM *et al.*, 2015; CHUNG *et al.*, 2011; GRAHAM *et al.*, 2007; JAMES, 2014; LANGEFELD *et al.*, 2017; TRUEDSSON; BENGTSSON; STURFELT, 2007; YIN *et al.*, 2021). Nos fatores ambientais, por exemplo a infecção pelo vírus Epstein-Barr, a exposição à radiação UV e a certos fármacos (como a Hidralazina) podem: estimular anticorpos com reação cruzada a autoantígenos (incluindo fragmentos de DNA dupla-fita), causar a liberação e quebras de ácidos nucleicos (apoptose e necrose celular) e alteração/disfunção na regulação epigenética (alteração nos padrões de metilação) respectivamente (DU *et al.*, 2015; GORELIK *et al.*, 2007; YADAV *et al.*, 2011). Por fim; as evidências de que o sexo femininos é um fator de risco para o LES são: a regulação na ativação do linfócitos ser em parte regulada pelo estrogênio; mulheres com LES e em tratamento de reposição hormonal (estrogênio e progesterona) tem 1,34 vezes mais risco da piora do quadro clínico que controles (placebo); possível efeito na dosagem gênica de genes presentes no cromossomo X, pois homens com a síndrome de Klinefelter (XXY) também tem 14 vezes mais chance de desenvolver o SLE em comparação aos homens com apenas um cromossomo X (BUYON *et al.*, 2005; SCOFIELD *et al.*, 2008).

A FIGURA 8 resume de forma gráfica os dados da prevalência a cada 100.000 habitantes da LES nos países em uma escala global, as quais variam consideravelmente entre países (TIAN *et al.*, 2023). Os países que as maiores prevalência são Emirados árabes unidos (166,92 casos a cada 100.000 habitantes), Barbados (163,31 casos a cada 100.000 habitantes), Cuba (149,9 casos a cada 100.000 habitantes) e Brasil (147,37 casos a cada 100.000 habitantes). Por fim, o país com menor prevalência é a Argentina com 6,06 casos a casa 100.000 habitantes (TIAN *et al.*, 2023).

FIGURA 8 - Representação gráfica das prevalências da LES em nível global



FONTE: Adaptado e modificado de TIAN *et al.* (2023).

NOTA: os países com a cor branca não possuem dados da prevalência de LES reportados.

A classificação do LES pode utilizar os critérios do EULAR/ACR (2019), o qual necessita que os indivíduos a serem incluídos tenham um resultado de ANA (anticorpos antinucleares) ou FAN (fator antinuclear) positivo (título maior ou igual a 1:80). Em seguida, os critérios com escores serão utilizados em um sistema de pontuação com um escore de soma direta para a obtenção de um escore final classificatório. Os critérios possuem um escore de 2 a 10, além disso, eles estão agrupados em 7 domínios clínicos (constitucionais, hematológicos, neuropsiquiátricos, mucocutâneos, serosais, musculoesqueléticos, renais) e 3 imunológicos (presença de anticorpos antifosfolípidos, dosagens de proteínas do sistema complemento, autoanticorpos específicos do LES). Além disso, apenas o critério com maior escore em cada domínio (clínico e imunológico) deverá ser utilizado na somatória do escore total (não pode haver utilização de mais de um critério por domínio). A classificação para o LES ocorre quando o paciente possui pelo menos um critério do domínio clínico juntamente com o escore total maior ou igual a dez (TABELA 2) (ARINGER *et al.*, 2019).

TABELA 2 - Critérios para classificação do lúpus eritematoso sistêmico

Critério de entrada obrigatório			
Fator antinuclear (FAN) maior ou igual a 1:80 nas células HEp-2 ou teste equivalente positivo.			
↓			
Se ausente, não classifique como LES. Se presente, aplique os critérios adicionais.			
↓			
Critérios adicionais			
Não considerar um critério se existir uma explicação mais plausível ou provável que o LES. A ocorrência de um critério em apenas um evento é suficiente. A classificação do LES requer pelo menos um critério clínico e escore total maior ou igual à 10. Os critérios não precisam ocorrer simultaneamente. Dentro de cada domínio, somente o critério com maior escore será utilizado na pontuação total.			
Domínios e critérios clínicos	Escore	Domínios e critérios imunológicos	Escore
Constitucional		Anticorpos antifosfolípidos	
Febre	2	Anticardiolipina ou Anti-β2GP1 ou anticoagulante lúpico	2
Hematológico		Proteínas do sistema complemento	
Leucopenia	3	C3 ou C4 baixos	3
Trombocitopenia	4	C3 e C4 baixos	4
Hemólise autoimune	4	Anticorpos específicos para o LES	
Neuropsiquiátrico		Anti-dsDNA* ou anti-Smith (anti-Sm)	6
<i>Delirium</i>	2		
Psicose	3		
Crise epiléptica	5		
Mucocutâneo			
Alopécia não-cicatricial	2		
Úlceras orais	2		
Lúpus cutâneo subagudo ou discoide	4		
Lúpus cutâneo agudo	6		
Serosite			
Derrame pleural ou pericárdico	5		
Pericardite aguda	6		
Musculoesquelético			
Envolvimento articular	6		
Renal			
Proteinúria > 0,5 g/24 h	4		
Biópsia renal classe II ou nefrite lúpica classe V	8		
Biópsia renal classe III ou nefrite lúpica classe IV	10		
Pontuação total:			
↓			
Classificar como Lúpus eritematoso sistêmico se a pontuação total for mais ou igual a 10.			

FONTE: adaptado e modificado de ARINGER *et al.* (2019)

NOTA: * - utilizar um ensaio com 90% de especificidade para a SLE em relação a outras doenças relevantes. Anti-β2GP1 - anti-beta-2-glicoproteína I. Anti-dsDNA – anti-DNA dupla-fita.

2.4 PAPEL DAS NETS NAS DOENÇAS AUTOIMUNES: ARTRITE REUMATOIDE E LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

Os neutrófilos são leucócitos polimorfonucleares (núcleo segmentado com 3 a 5 lóbulos conectados) fagocíticos pertencentes ao sistema imune inato. A sua principal função é a eliminação de tecidos danificados e microrganismos principalmente pela fagocitose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

As armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs do inglês *neutrophil extracellular traps*) são um mecanismo de defesa da imunidade inata (O'NEIL *et al.*, 2019). A NETose é uma das vias de morte celular do neutrófilo que produz uma NET. No entanto, existe uma outra que não é e a cromatina expelida normalmente procede da mitocôndria (DE BONT; BOELEN; PRUIJN, 2019; PILSCZEK *et al.*, 2010; YOUSEFI *et al.*, 2009), portanto, aumentando o tempo de vida desta célula nos tecidos. As NETs são caracterizadas por filamentos de DNA e proteínas nucleares com enzimas e proteínas (Mieloperoxidase, elastase neutrofílica, metaloproteinases, collagenases e ativadores do sistema complemento) dos grânulos citotóxicos dos neutrófilos que foram expulsos durante sua morte (GRAYSON; KAPLAN, 2016; NGUYEN; GREEN; MECSAS, 2017).

Um aumento anormal na formação das NETs pode estar relacionado com o dano tecidual, trombose e ativação anormal do sistema imune inato e adaptativo (APEL; ZYCHLINSKY; KENNY, 2018). A desregulação na produção e degradação das NETs pode auxiliar no aumento da suscetibilidade para desenvolver doenças autoimunes como: LES, síndrome antifosfolípide, vasculites associadas aos anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA), psoríase e AR (APEL; ZYCHLINSKY; KENNY, 2018; VILLANUEVA *et al.*, 2011).

As NETs podem estar associadas aos eventos de iniciação e desenvolvimento da AR. Por exemplo, foi relatado uma associação de aumento na quantidade de complexos de NETs e anticorpos IgA e IgG em parentes de primeiro grau de pacientes com AR (DEMORUELLE *et al.*, 2017). Além disso, os complexos das NETs podem ser correlacionados com a produção, das classes IgA e IgG, de ACPAs nas mucosa das vias aéreas de indivíduos em risco para desenvolvimento da AR. A doença periodontal, a qual também é associada ao desenvolvimento da AR, tem uma associação com a infiltrados neutrofílicos em

tecidos mais profundos da gengival profunda com maior formação de NET (DEMORUELLE *et al.*, 2017; WHITE *et al.*, 2016). Desta maneira, há a possibilidade que um estímulo na produção de NETs nos tecidos anteriormente citados possam ser um evento inicial na AR, onde as enzimas PADs sejam ativadas e promovam a geração e a externalização de antígenos próprios citrulinados (O'NEIL *et al.*, 2019).

Já foi visto que a variante *rs2476601*A* no gene *PTPN22*, que codifica para uma tirosina fosfatase, está associado a suscetibilidade para a AR. Os neutrófilos de pacientes com AR que possuem esse SNP mostram uma migração precoce para as articulações, produção aumentada de espécies reativas do oxigênio (ERO) (BAYLEY *et al.*, 2015) e aumento da citrulinação de proteínas mediada pela enzima PAD4 com maior propensão para formar NETs (CHANG, H.-H. *et al.*, 2015). Desta forma, polimorfismos genéticos associados com o desenvolvimento da AR podem estar relacionados com o aumento anormal da citrulinação de proteínas próprias e formação de NETs (O'NEIL *et al.*, 2019).

O ambiente da membrana sinovial em pacientes com AR pode permitir ou facilitar que os neutrófilos produzam as NETs (BARTOK; FIRESTEIN, 2010; KHANDPUR *et al.*, 2013; WRIGHT *et al.*, 2021). Além disso, os autoanticorpos (ACPAs e FR) e várias citocinas pró-inflamatórias podem induzir neutrófilos a liberarem NETs (KHANDPUR *et al.*, 2013). As NETs dentro da articulação sinovial podem estar envolvidas nas vias patogênicas da doença. As NETs liberadas na membrana sinovial podem ser internalizadas por FLS por meio da ligação do eixo de receptor de produtos finais glicosilados (RAGE, do inglês *receptor for advanced glycation endproducts*) (CARMONA-RIVERA *et al.*, 2017). O receptor TLR9 se liga ao complexo NET - RAGE e media o tráfico intracelular endossomal. As NETs internalizadas por FLS são processadas e seus antígenos (proteínas, principalmente histonas, citrulinadas) são acoplados no MHC de classe II e apresentadas para as células T CD4⁺ para sua ativação (CARMONA-RIVERA *et al.*, 2017; O'NEIL *et al.*, 2019). A capacidade das células FLS para se tornarem células apresentadoras de antígenos se deve ao estímulo da síntese de MHC de classe II, o qual é devido pelo aumento da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias destas células durante a internalização das NETs (CARMONA-RIVERA *et al.*, 2017; TRAN *et al.*, 2007). A inibição da formação das NETs pode ser um alvo terapêutico na AR, por exemplo, viu-se que os

antimaláricos podem inibir a formação de NETs e a sua internalização por FLS (BOONE *et al.*, 2015; CARMONA-RIVERA *et al.*, 2017; EDWARDS *et al.*, 2020; KANG *et al.*, 2021; MURTHY *et al.*, 2019; PÉREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2014; YANG, L.-Y. *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020).

Em relação ao LES, os eventos de netose podem facilitar a entrada de complexos imunes contendo DNA e proteínas nucleares através de endossomos contendo receptores Toll-Like (TLRs) (VILLANUEVA *et al.*, 2011). Desta maneira, isto auxilia na apresentação de autoantígenos e na perda da autotolerância a estes autoantígenos. Ademais, estes eventos podem induzir a liberação de IFNs tipo I (por exemplo, Interferon-alfa) e expressão de receptores TLR-9 em células dendríticas plasmocitoides (FRESNEDA ALARCON; MCLAREN; WRIGHT, 2021; GARCIA-ROMO *et al.*, 2011; KAPLAN, 2011; LANDE *et al.*, 2011; VILLANUEVA *et al.*, 2011). Portanto, a produção anormal ou desregulada das NETs pode ajudar a iniciar e amplificar a resposta autoimune no LES, fornecendo autoantígenos para apresentação aos Linfócitos T e B autorreativos (FRESNEDA ALARCON; MCLAREN; WRIGHT, 2021; GESTERMANN *et al.*, 2018; VILLANUEVA *et al.*, 2011).

2.5 GENE *LBR* E A ANOMALIA DE PELGER-HUËT

A proteína codificada pelo gene *LBR* (do inglês, *Lamin B Receptor*) pode participar de várias funções biológicas: faz parte da membrana nuclear (OOSTERWIJK, 2003); liga-se a lâmina B, ao DNA dupla-fita e a proteínas HP-1 (proteínas implicadas na compactação da cromatina e repressão transcricional epigenética) (SCHULER; LIN; WORMAN, 1994); atua no desenvolvimento embrionário e no metabolismo do colesterol (BEST *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*, 2002; HOLMER; PEZHMANN; WORMAN, 1998; SCHULER; LIN; WORMAN, 1994; TURNER; SCHLIEKER, 2016); remontagem do núcleo após a mitose (PATIL; DESHPANDE; SENGUPTA, 2023); participa no evento da inativação do cromossomo X por meio da interação com o lncRNA *XIST* (YOUNG *et al.*, 2021).

As mutações no gene *LBR*, com efeitos funcionais deletérios em sua proteína, podem causar malformações esqueléticas, deficiência no desenvolvimento psicomotor, macrocefalia, epilepsia, anomalia de Pelger-Huët, instabilidade cromossômica e associação com a tumorigênese, predisposição

ao desenvolvimento de doenças autoimunes como o LES e a Síndrome de Reynolds (caracterizada pela presença cirrose biliar primária com esclerose sistêmica cutânea limitada) (AZNAR; VAYA, 1981; BEST *et al.*, 2003; BOROVIK *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2020; GAUDY-MARQUESTE *et al.*, 2010; HAVERKAMP BEGEMANN; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, 1952; HOFFMANN *et al.*, 2002; KALFA *et al.*, 2006; OOSTERWIJK, 2003; PATIL; DESHPANDE; SENGUPTA, 2023; SHULTZ, 2003; SIEGERT; BEIER; GRÄBNER, 1983; SINGH *et al.*, 2016; TÜYSÜZ *et al.*, 2023). Portanto, as várias funções biológicas desempenhadas pela proteína codificada pelo gene *LBR* poderiam justificar os efeitos pleiotrópicos e a diversidade de fenótipos ocasionados pelas mutações em *LBR* (TABELA 3).

TABELA 3 - Heterogeneidade de fenótipos associados a variantes deletérias do gene *LBR*

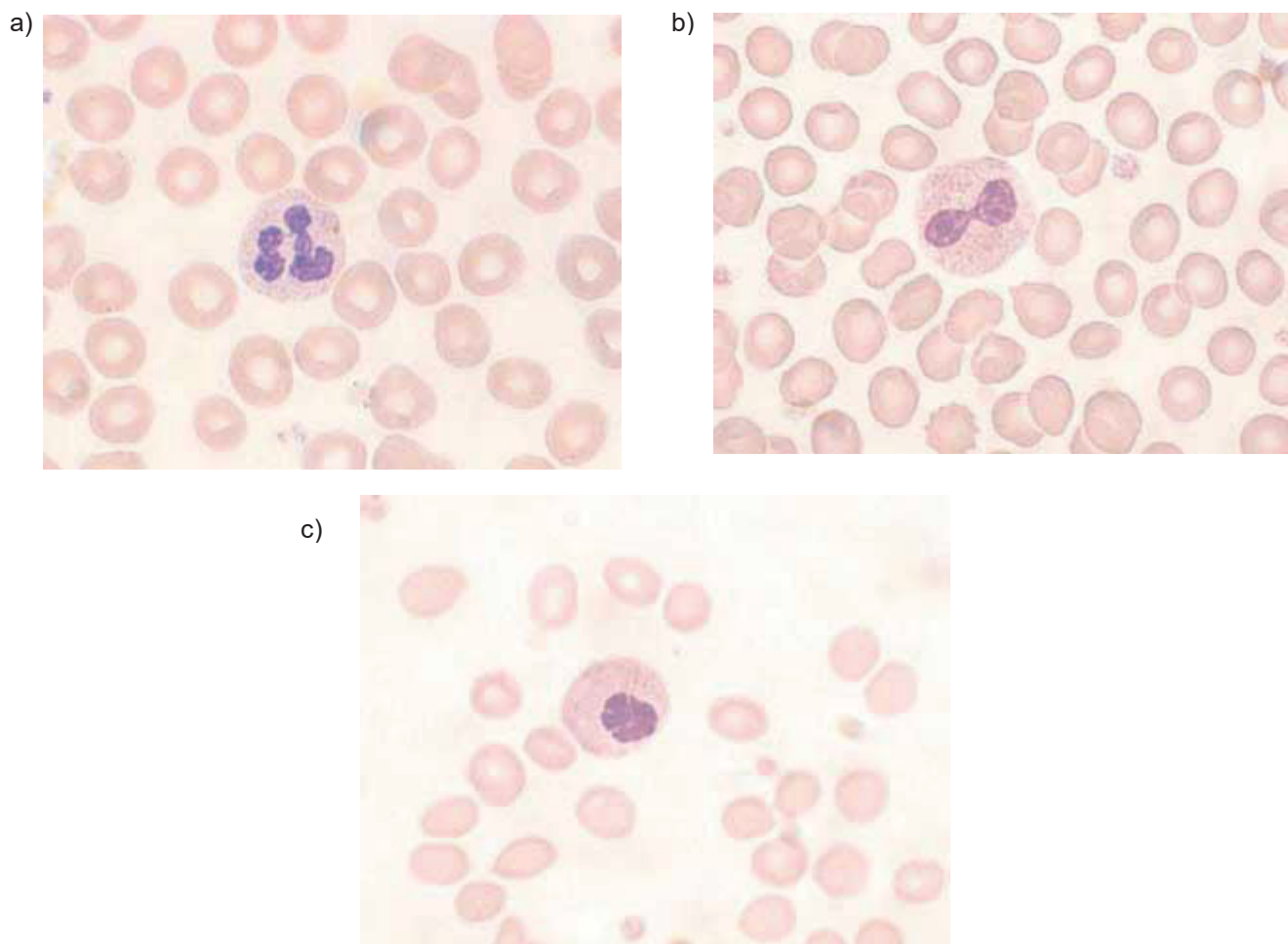
HGVS cDNA (HGVS proteína)	dbSNP ID	Consequência	Genótipo	Doença	Referência
<i>c.651_653 delinsTGATGAGAAA</i> (p.Ile218Aspfs*19) e <i>c.1757G>A</i> (p.Arg586His)	rs1558655670 (<i>c.651_653 delinsTGATGAGAAA</i>) <i>delinsTGATGAGAAA</i>) e rs573510559 (<i>c.1757G>A</i>)	INDEL (<i>c.651_653 delinsTGATGAGAAA</i>) e não-sinônima (<i>c.1757G>A</i>)	Heterozigose composta	Má formação esquelética (grau leve) e anomalia de Pelger-Hüet	(BOROVİK <i>et al.</i> , 2013)
<i>c.1114C>T</i>	rs200180113	não-sinônima	Heterozigoto	Síndrome de Reynolds	(GAUDY- MARQUESTE <i>et al.</i> , 2010)
<i>c.356C>T</i> (p.Pro119Leu)	rs137852605	não-sinônima	Heterozigoto	Anomalia de Pelger- Hüet	(BEST <i>et al.</i> , 2003)
<i>c.1366C>G</i> (p.Leu456Val)	rs377110126	não-sinônima	Homozigoto	Má formação esquelética e anomalia de Pelger-Hüet	(COLLINS <i>et al.</i> , 2020)
<i>c.1534C>T</i> (p.Gly936Ser)	rs373561199	não-sinônima	Homozigoto	Má formação esquelética e anomalia de Pelger-Hüet	(TÜYSÜZ <i>et al.</i> , 2023)
<i>c.1379A>G</i> (p.Asp460Gly)	-	não-sinônima	Homozigoto	Displasia de Greenberg (Má formação esquelética grave)	(GIORGIO <i>et al.</i> , 2019)

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: HGVS cDNA (HGVS proteína): nomenclatura HGVS para a variante no cDNA e na proteína (em parênteses). Genótipo: genótipo reportado para a variante. Doença: doença a qual foi associada a presença da variante. dbSNP: dbSNP ID da variante.

A anomalia de Pelger-Huët (OMIM: 169400) também é causada por variantes ou deleções (por exemplo, a deleção em 1q42.3-44), que afetam funcionalmente a proteína, do gene *LBR* e possui o modo de herança autossômica dominante (BEST *et al.*, 2003; BOROVİK *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2020; GIORGIO *et al.*, 2019; KALFA *et al.*, 2006; TÜYSÜZ *et al.*, 2023). Ela se caracteriza em grande parte pela visualização dos núcleos de neutrófilos hipolobulados (nenhum ou poucos lóbulos vistos pela menor constrição/compactação na cromatina) e com cromatina grosseira. O núcleo dos granulócitos foi relatado como hipossegmentado ou hipolobulado, em forma de bastonete, haltere ou amendoim, ou semelhante a um óculos (FIGURA 9). A frequência mundial estimada de indivíduos afetados está entre 0,01 e 0,1% (CONSTANTINO, 2005; HOFFMANN *et al.*, 2002, 2007). *In vitro*, os granulócitos afetados pela anomalia apresentam atividades bioquímicas, metabólicas, fagocíticas, bactericidas, níveis de enzimas granulares citoplasmáticas que aparentemente não são significativamente diferentes de indivíduos não afetados (CONSTANTINO, 2005; HOFFMANN *et al.*, 2007). Além disso, as células afetadas Pelger-Huët mostram um tempo de sobrevivência normal na circulação. Contudo, até o presente momento, existem relatos controversos sobre os efeitos funcionais deste distúrbio nos granulócitos, principalmente, neutrófilos. Por fim, já foi visto que os granulócitos de indivíduos afetados possuem problemas na quimiotaxia (CONSTANTINO, 2005; JOHNSON *et al.*, 1980; PARK; DOLEN; SNYDER, 1977; REPO *et al.*, 1979).

FIGURA 9 - Alterações nucleares em neutrófilos de portadores da anomalia de Pelger-Huët



FONTE: adaptado e modificado de HOFFMANN *et al.* (2002).

NOTA: a) Fotografia de uma lâmina hematológica contendo um neutrófilo com um número segmentações normais. b) Fotografia de uma lâmina hematológica contendo um neutrófilo bilobulado encontrado em um heterozigoto (portador) para a variante em *LBR*. c) Fotografia de uma lâmina hematológica contendo um neutrófilo bilobulado encontrado em um homozigoto para a variante em *LBR*.

2.6 POPULAÇÃO MENONITA

As populações Menonita serão alvo de nosso estudo e foram originadas do movimento Europeu Anabatista na Suíça após a Reforma Protestante no século XVI. Eles preservaram a cultura, tradições e a língua (alemão oficial e variantes do baixo alemão) (ORTON *et al.*, 2008; PENNER; GERLACH; QUIRING, 1984). A perseguição religiosa que sofreram os forçou a viver isolados em colônias separados da população geral. Por isto, eles tiveram de realizar vários movimentos migratórios em massa em busca de terras e liberdade religiosa. Por mais de dois séculos (1567 até ao fim do século XVIII), os menonitas dividiram-se em dois grupos: “frísios” e “flamengos”. Esta divisão foi de causa cultural e

eclesiástica e não por diferenças étnicas. Os grupos se mantiveram separados, mas não de forma geográfica. Esta subdivisão caracteriza o efeito Wahlund, o qual favorece um aumento da consanguinidade e da homozigosidade (com exposição de alelos recessivos, deletérios) dentro de cada grupo, com consequente perda da variabilidade genética (FREIRE-MAIA, 1974; WEIGLE, 2006). Os menonitas podem ser divididos em dois grupos ancestrais: holandês-germânico e suíço-germânico. O primeiro sofreu pelo menos três eventos de “gargalo de garrafa” e estão presentes hoje em várias localidades como Meio-Oeste Americano, México, Belize e América do Sul. O segundo grupo ancestral está mais concentrado atualmente no hemisfério norte, no Canadá e Estados Unidos (SCHROEDER; HUEBERT, 1996).

No século XVI, os Menonitas do norte da Europa fugiram da sua terra ancestral para o norte da Alemanha (Frísia) e Países Baixos (Groeningen) (BENDER; OYER, 1989; DYCK, 1993; FRIESEN; EPP, 1976). De lá, migraram para o delta do rio Vístula na Prússia, região que atualmente pertence à Gdansk, na Polônia. Depois de cerca de 200 anos, emigraram em 1789 para a Ucrânia, fundando o primeiro assentamento menonita no Império Russo, denominado Chortitza (BERGMANN; KRAHN, 1955). A morte de vários menonitas antes da chegada e durante a migração para a Prússia em busca de melhores condições de vida, foi o primeiro evento do efeito “gargalo de garrafa” (WEIGLE, 2006). Na segunda metade do século XIX, a migração para a Ucrânia causou nova redução da população, caracterizando o segundo evento de “gargalo de garrafa”. Porém, após o seu estabelecimento, ela se expandiu novamente com muito sucesso (DYCK, 1967). Neste período, houve também imigração de menonitas para o Canadá (ORTON *et al.*, 2008).

Em 1917, com a Revolução Russa, houve fome, epidemia de tifo e a perseguição pela sua religião e estilo de vida, o que ocasionou a morte de muitos menonitas, o terceiro “gargalo de garrafa”. Muitos conseguiram emigrar para o Canadá (BERGMANN; KRAHN, 1955). Alguns não tiveram permissão para entrar neste país e foram recebidos pelo Paraguai e pelo Brasil (PAULS JR, 1980). Durante a Segunda Guerra Mundial, mais especificamente em 1941, muitos menonitas foram forçados a se dirigir da Rússia para a Alemanha e o número de indivíduos das colônias na Rússia foram reduzidos. Do grupo que migrou, apenas dois terços voltaram à Rússia (forçosamente) e o restante foi

para a América (BERGMANN; KRAHN, 1955). A primeira imigração para o Brasil ocorreu com a chegada de 33 famílias em Santa Catarina em 1930, na região onde atualmente é o município de Witmarsum, sendo chamada de colônia Krauel, a qual é dividida por três núcleos: Waldheim, Gnadental e Witmarsum. Em 1949, famílias principalmente da Colônia de Krauel foram para o estado do Rio Grande do Sul, onde fundaram a Colônia Nova, nas proximidades da cidade de Bagé (município atual de Aceguá). Anos antes, também, no Paraná, algumas famílias se estabeleceram na região de Curitiba, onde atualmente estão localizados os bairros do Xaxim (1936), Boqueirão (1935), Vila Guaíra e Água Verde (1934) (BENDER; ENS; PETER PAULS, 2013). Em Curitiba há o maior grupo de Menonitas no Brasil. Em 1951, 74 famílias Menonitas adquiriram a Fazenda Cancela no município de Palmeira, próximo a Curitiba e fundaram a Colônia Witmarsum (PAULS JR, 1980). A FIGURA 10 mostra as localizações geográficas das colônias menonitas brasileiras.

Considerando-se todos estes eventos que podem alterar as frequências alélicas e de heterozigotos nesta população. O grupo ancestral holandês-germânico, que é o foco de nosso estudo, já foi reportado com maior frequência de variantes associadas com doenças monogênicas ou multifatoriais (TABELA 4), em comparação às populações não-isoladas (BOLDT *et al.*, 2009; BOSCHMANN *et al.*, 2016; CAMPBELL *et al.*, 2003; CRUZ-AGUILAR *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2016a; OLIVEIRA *et al.*, 2023; ORTON *et al.*, 2008; PAYNE *et al.*, 2011; S. E BOSCHMANN, 2012; SERFAS *et al.*, 1996; TELATAR *et al.*, 1998).

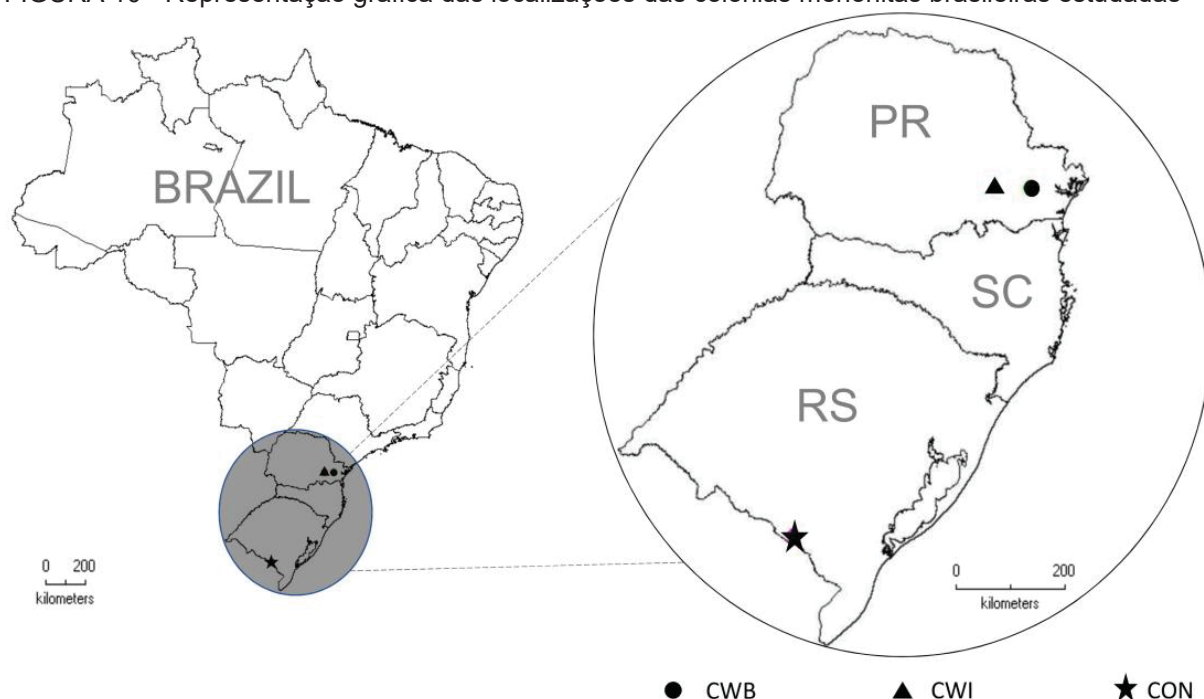
TABELA 4 - Variantes reportadas nas populações menonitas alemã-holandesas associadas a doenças mongênicas e multifatoriais

Doença	Gene	dbSNP	HGVS cDNA (HGVS proteína)	Consequência	Observações	Referências
Síndrome Alström (OMIM 203800)	ALMS1	rs772624348	c.10480C>T (p.Gln3494Ter)	Ganho de códon de parada	Agregação familiar	(CRUZ-AGUILAR <i>et al.</i> , 2017; ORTON <i>et al.</i> , 2008)
Suscetibilidade à Hipertermia Maligna (OMIM 145600)	RYR1	rs118192172	c.1840C>T (p.Arg614Cys)	Não-sinônima	Agregação familiar	(ORTON <i>et al.</i> , 2008; SERFAS <i>et al.</i> , 1996)
Ataxia-teleangiectasia (OMIM 208900)	ATM	rs587779852	c.5932G>T (p.Glu1978Ter)	Ganho de códon de parada	Agregação familiar	(CAMPBELL <i>et al.</i> , 2003; ORTON <i>et al.</i> , 2008; TELATAR <i>et al.</i> , 1998)
Deficiência de biotinidase (OMIM 253260)	BTD	rs575787457	c.380C>T (p.Pro127Leu)	Não-sinônima	Agregação familiar	(LOPES <i>et al.</i> , 2016b; PAYNE <i>et al.</i> , 2011)
Imunodeficiência Combinada Severa devido Deficiência de Adenosina Deaminase (OMIM 102700)	ADA	rs780014431	c.424C>T (p.Arg142Ter)	Ganho de códon de parada	Agregação familiar	(LOPES <i>et al.</i> , 2016b; PAYNE <i>et al.</i> , 2011)
Síndrome da Imunodeficiência Adquirida - SIDA (Fase avançada da infecção pelo vírus HIV)	CCR5	rs333	c.554_585del (p.Ser185fs)	Deleção	Maior frequência da deleção na população menonita. Proteção para infecção do HIV e SIDA. Suscetibilidade para doenças autoimunes (AR, esclerose múltipla e diabetes do tipo I)	(BOLDT <i>et al.</i> , 2009)
Persistência da lactase	LCT	rs4988235	MCM6:c.1917+326C>T	Variante <i>upstream</i>	Alelo “T” com maior frequência na população menonita e associado com maior expressão do gene <i>LCT</i> .	(BOSCHMANN <i>et al.</i> , 2016)

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Doença: doença em a presença da variante foi associada. dbSNP: dbSNP ID da variante. HGVS cDNA (HGVS proteína): nomenclatura HGVS para a variante no cDNA e na proteína em parênteses. Consequência: consequência(s) funcional(is) da variante associada. Herança: modelo de herança que a variante está associada com a doença.

FIGURA 10 - Representação gráfica das localizações das colônias menonitas brasileiras estudadas



FONTE: Adaptado e modificado de OLIVEIRA *et al.* (2023).

LEGENDA: CON: Colônia Nova, CWB: colônia na região de Curitiba, CWI: Colônia Witmarsum

3 JUSTIFICATIVA

As doenças reumáticas (DR) compreendem várias doenças que tem como sintomas a artrite e artalgia (ALMOALLIM; CHEIKH, 2021; CDC, 2022a, 2022b; ROSETI; GRIGOLO, 2022), sendo que um levantamento epidemiológico feito por OLIVEIRA *et al.* (2019), nas populações menonitas brasileiras, viu-se uma prevalência de 7,97% de autorrelato para artalgia. Esta prevalência era mais maior que a prevalência da população geral brasileira (6,4%) em 2013 (DATASUS, 2013). Além disso, o estudo de populações isoladas como a menonita pode auxiliar na busca variantes raras que podem estar associadas a doenças complexas, que podem não podem ser facilmente encontradas em populações não isoladas devido à baixa frequência alélica (BOLDT *et al.*, 2009; BOSCHMANN *et al.*, 2016; CAMPBELL *et al.*, 2003; CRUZ-AGUILAR *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2016a; OLIVEIRA *et al.*, 2023; ORTON *et al.*, 2008; PAYNE *et al.*, 2011; S. E BOSCHMANN, 2012; SERFAS *et al.*, 1996; TELATAR *et al.*, 1998). Portanto, este estudo buscou avaliar se esta população teria maiores

fatores de risco genético, epidemiológicos e até sorológicos para doenças reumáticas autoimunes (principalmente AR e LES).

O levantamento de dados sobre a prevalência da artralgia, LES e possivelmente a artrite Reumatoide auxiliará na conscientização e a prevenção da Artrite Reumatoide e LES na população menonita. Pois, os estudos que buscam em indivíduos com artralgia, variantes genéticas e fatores de risco associadas com a AR auxiliam na compreensão dos mecanismos patogênicos, identificação de indivíduos em risco para desenvolvimento e evitar danos articulares irreversíveis pelo tratamento nas fases iniciais (MASI, 1983; SMOLEN *et al.*, 2018; VAN STEENBERGEN *et al.*, 2017).

Os pacientes com AR e obesidade têm pior um prognóstico de tratamento e capacidade de remissão da doença (GREMESE *et al.*, 2013; JAWAHEER *et al.*, 2010; KLAASEN *et al.*, 2011; SCHULMAN *et al.*, 2018). Logo, o artigo de revisão buscou trazer a discussão da influência dos ncRNAs e sua interrelação com AR e obesidade, a qual é pouco avaliada (AUER *et al.*, 2022). Ademais, ele também avaliou o potencial *in silico* de variantes, localizadas em ncRNAs, associadas em GWAS com AR e/ou obesidade têm um potencial de causar desregulação em ncRNAs.

Ela também foi associada com uma pior resposta ao tratamento (GREMESE *et al.*, 2013; KLAASEN *et al.*, 2011; SCHULMAN *et al.*, 2018) e maior atividade de doença na AR (JAWAHEER *et al.*, 2010; STAVROPOULOS-KALINOGLU *et al.*, 2009)

As mutações no gene *LBR* podem causar vários distúrbios como problemas no desenvolvimento esquelético, anomalia de Pelger-Huët, predisposição à tumorigênese e à doenças autoimunes como o LES por atuar em várias vias biológicas (AZNAR; VAYA, 1981; BEST *et al.*, 2003; BOROVIK *et al.*, 2013; COLLINS *et al.*, 2020; GAUDY-MARQUESTE *et al.*, 2010; HAVERKAMP BEGEMANN; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, 1952; HOFFMANN *et al.*, 2002; KALFA *et al.*, 2006; OOSTERWIJK, 2003; PATIL; DESHPANDE; SENGUPTA, 2023; SHULTZ, 2003; SIEGERT; BEIER; GRÄBNER, 1983; SINGH *et al.*, 2016; TÜYSÜZ *et al.*, 2023). A anomalia de Pelger-Huët, que foi vista segregando em várias famílias menonitas, é um distúrbio autossômico dominante associado a hipossegmentação (menor número de constrições no núcleo) principalmente dos neutrófilos (AZNAR; VAYA, 1981; HOFFMANN *et al.*,

2002; OOSTERWIJK, 2003; SIEGERT; BEIER; GRÄBNER, 1983). Desta forma, a análise e identificação de variantes do gene *LBR* provavelmente deletérias, que estejam segregando nestas famílias, podem auxiliar esclarecimento genético destas famílias.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência dos ncRNAs em indivíduos com obesidade e AR; avaliar os fatores de risco epidemiológicos e genéticos para desenvolvimento do LES, AR em indivíduos com artralgia, e variantes do gene *LBR* possivelmente deletérias que possam estar associadas à anomalia de Pelger-Huët na população menonita.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o *status quo* da influência de ncRNAs na AR e sua relação com a obesidade resultando na escrita de um artigo de revisão;
- Avaliar as prevalências de artralgia e LES na população menonita;
- Identificar os fatores de risco ambientais para o desenvolvimento da AR em indivíduos com artralgia na população menonita;
- Investigar se a quantidade de NETs séricas está associada a artralgia nos menonitas.
- Identificar associações de variantes encontradas nos exomas de indivíduos com artralgia da população menonita para a suscetibilidade ou desenvolvimento da AR;
- Avaliar funcionalmente *in silico* as variantes associadas nas análises de exoma;
- Investigar na população menonita a frequência e possíveis associações de polimorfismos de nucleotídeo único previamente associados em outros estudos GWAS ao LES.

- Investigar a associação e correlação das quantidades das NETs séricas com os dados clínicos de pacientes não menonitas com LES.
- Investigar a segregação das variantes no gene *LBR* possivelmente associados a anomalia de Pelger-Huët nas famílias dos indivíduos afetados, para um melhor aconselhamento genético das famílias.
- Investigar se as variantes no gene *LBR* alteram as quantidades séricas de NETs e o lipidograma de indivíduos portadores.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 METODOLOGIA DA REVISÃO DOS RNAS NÃO-CODIFICANTES NA ARTRITE REUMATOIDE E NA OBESIDADE

A busca para examinar possíveis influências de ncRNAs na obesidade e AR foram realizadas por três investigadores. Os bancos de dados utilizados na busca para documentos foram o PubMed, Web of Science e Scopus usando as seguintes palavras-chave e operadores booleanos: ("obesity" OR "overweight" OR "obese" OR "bmi" OR "body mass index" OR "adiposity" OR "adipose" AND "rheumatoid arthritis" OR "RA") AND ("epigenetic" OR "miRNA" OR "microRNA" OR "long non coding rna" OR "lncrna" OR "small interfering RNA" OR "siRNA") AND ("mortality" OR "das28" OR "clinical outcome" OR "cdai" OR "Clinical Disease Activity Index" OR "crp" OR "c protein reactive" OR "esr" OR "sed rate" OR "erythrocyte sedimentation rate" OR "cytokine" OR "inflammation" OR "inflammation marker" OR "inflammation biomarker" OR "abdominal waist"). Apenas artigos publicados em inglês de setembro de 2003 até Janeiro de 2021 foram incluídos na revisão. Critérios de exclusão: Documentos duplicados, artigos de revisão, documentos que não incluem ncRNAs associados a e/ou desregulados em obesidade e/ou AR, problemas metodológicos (metodologia pouco clara ou ausência de comparações entre grupos, que de outra forma, permitiriam resultados melhores ou com menor viés), patentes, publicações retratadas, livros, capítulos de livros. Nós também avaliamos publicações, que foram citadas em artigos selecionados e revisões encontradas na busca.

Em seguida, as vias biológicas nas quais esses ncRNAs estiveram desregulados na AR e Obesidade foram avaliadas nos seguintes banco de dados: miRPathDB v2.0, GeneTrail2 v1.6, DIANA-miRPath v3.0 e LncSEA (BACKES *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2021; KEHL *et al.*, 2020; STÖCKEL *et al.*, 2016; VLACHOS *et al.*, 2015). A correção de múltipla testagem pelo método do False Discovery Rate (Benjamini-Hochberg) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) foi utilizada nas análises de vias biológicas potencialmente reguladas por miRNAs. A correção de múltipla testagem por Bonferroni só estava disponível no miRPathDB v2.0. Genes-alvo potencialmente regulados por miRNAs e simultaneamente associados com AR e obesidade foram identificados no GSEA

(MOOTHA *et al.*, 2003; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). Sua possível implicação na AR e/ou obesidade foi posteriormente avaliada por associações gênicas no GWAS catalog (banco de dados com resultados de estudos GWAS ou estudos de associação genômica ampla). Também pesquisamos genes de ncRNA cujos polimorfismos foram encontrados associados no GWAS com AR e/ou obesidade, verificando os resultados no mesmo catálogo (BUNIELLO *et al.*, 2019). O banco de dados LncSEA foi usado para análise de enriquecimento e para avaliar a regulação do lncRNA e sua interação com miRNAs (CHEN *et al.*, 2021). Possíveis consequências estruturais e alterações no sítio de ligação do miRNA-lncRNA causadas por SNVs exônicos foram avaliadas no banco de dados lncRNASNP2 (MIAO, Y.-R. *et al.*, 2018). A avaliação de possíveis consequências estruturais por SNVs exônicos foi avaliada pelo valor de p empírico, sendo que valores menores que 0,2 indicam uma alta probabilidade de alteração na estrutura secundária do transcrito do lncRNA. Além disso, o RNAfold WebServer, que usa o pacote de RNA de Viena, avaliou possíveis alterações estruturais visuais em lncRNAs para cada alelo usando principalmente modelos “*minimum free energy*” (MFE) e entropia posicional (LORENZ *et al.*, 2011). Por fim, as associações de eQTL para SNVs localizados em éxons de lncRNA foram avaliadas usando Qtlizer (MUNZ *et al.*, 2015).

Os gráficos foram realizados na Linguagem R 4.1.3 (R CORE TEAM, 2022) com os seguintes pacotes: dplyr (WICKHAM *et al.*, 2020a), ggplot2 (WICKHAM *et al.*, 2020b), ggthemes (ARNOLD, 2021) e openxlsx (SCHAUBERGER; WALKER, 2020).

5.2 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS POPULACIONAIS E DOS EXOMAS

Desde outubro de 2016, foram coletados os dados antropométricos e clínicos de 776 indivíduos residentes nas comunidades da menonita, sendo 286 indivíduos de CON (Colônia Nova, Aceguá – RS), 264 de CWI (Colônia Witmarsum, Palmeira – PR) e 226 de CWB (Curitiba – PR) (TABELA 5).

TABELA 5 - Distribuição demográfica da população menonita brasileira.

Origem Geográfica (Colônia menonita)						
Variável	n	Colônia Nova (Aceguá - RS) n = 286	Curitiba (PR) n = 264	Witmarsum (Palmeira - PR) n = 226	p	pcorr
Idade (Anos) ¹	555				1,0 x 10 ⁻⁴	1,7 x 10⁻⁴
Amplitude		17,0 - 92,0	18,0 - 99,0	19,0 - 98,0		
Mediana (IQR)		61,0 (44,0 - 70,0)	49,0 (35,0 - 66,0)	52,0 (35,0 - 64,0)		
Sexo ²	759				0,33	0,34
Feminino		168 / 286 (59%)	155 / 264 (59%)	135 / 209 (65%)		
Índice de massa corporal (IMC) ¹	549				2,8 x 10 ⁻⁶	8,5 x 10⁻⁶
Amplitude		16,0 - 50,0	15,0 - 41,0	16,0 - 48,0		
Mediana (IQR)		28,0 (24,0 - 31,0)	25,0 (23,0 - 29,0)	25,0 (22,0 - 28,0)		

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Mediana (IQR): mediana com intervalo interquartil. Amplitude: valores mínimos - valores máximos. IQR: intervalo interquartil. ¹Teste de Kruskal-Wallis; ²Teste qui-quadrado de independência. p: valor de p. pcorr: valor de p corrigido pelo método do “False discovery rate”. pcorr < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Em negrito estão os valores de p considerados estatisticamente significantes.

A coleta de informações de participantes das comunidades da população menonita foi previamente autorizada mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) do projeto “Levantamento Epidemiológico dos Fenótipos e Doenças Complexas Existentes nas Comunidades Menonitas” (aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná – CEP SCS-UFPR sob o protocolo 1.669.241, em 09.08.2016). Além disso, houve uma segunda aprovação deste estudo no projeto “Projeto MedEpiGen: Medicina Preventiva para a Síndrome Metabólica” (CAAE 55528222.9.0000.0102, parecer 5.321.335 em 30.02.2023). Estas se deram por meio de um questionário baseado na Pesquisa Nacional de Saúde de 2013, tanto presencialmente quanto por participação online, com questões sobre rota migratória dos ancestrais, hábitos alimentares e de vida, exposição a agentes tóxicos, diagnóstico e histórico familiar de doenças complexas. Dentre as doenças questionadas, perguntou-se especificamente sobre o diagnóstico de doenças reumáticas e osteomusculares. Nas entrevistas presenciais ou no momento da coleta das amostras de sangue, também foi possível coletar dados antropométricos, dentre os quais: altura, peso, IMC e circunferência abdominal e os indivíduos adicionados recentemente obtiveram dados por meio de balança de impedância. Os indivíduos foram classificados em menonitas e não menonitas de acordo com a origem e as rotas migratórias de seus ancestrais (autorrelatado). Os registros genealógicos estão sendo obtidos

por meio do banco de genealogias Grandma, o qual permite a detecção de casamentos consanguíneos.

A coleta de amostras biológicas dos participantes residentes nas comunidades da população menonita foi autorizada mediante a assinatura dos TCLEs referentes a pelo menos um, dos seguintes projetos: (1) “Transtornos mentais hereditários em adultos” (aprovado pelo CONEP em 05.09.2015 no protocolo 1.215.264, e realizado em colaboração com o National Institute of Mental Health - NIMH, Bethesda, USA), e (2) “Susceptibilidade à Doença Celíaca na População Menonita” (aprovado pelo CEP SCS-UFPR sob o protocolo 2.204.113, em 07.08.2017). O consentimento dos participantes foi obtido e houve autorização para a utilização dos dados de sequenciamento realizado no projeto (1), no presente estudo (CAAE: 55297916.6.0000.0102/Emenda:2.247.952). Por fim, houve também outra aprovação deste estudo no projeto “Projeto MedEpiGen: Medicina Preventiva para a Síndrome Metabólica” (CAAE 55528222.9.0000.0102, parecer 5.321.335 em 30.02.2023).

Amostras de sangue periférico foram obtidas pela punção do membro superior dos participantes e cerca de 8 mL foram coletados em tubos com e sem EDTA, após assepsia local. Cada participante foi identificado com um código, visando manter o sigilo dos dados pessoais. A extração de DNA das amostras foi realizada da camada leuco-plaquetária, utilizando-se o kit comercial Wizard Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA). Atualmente, dispõe-se de DNA, soro e/ou plasma de 697 indivíduos menonitas, sendo 230 indivíduos de CON (Colônia Nova, em Aceguá – RS), 226 de CWI (Colônia Witmarsum, em Palmeira – PR) e 241 de CWB (Curitiba – PR).

Os exomas de 325 indivíduos menonitas residentes em Colônia Nova – RS (n = 194), Witmarsum/Palmeira (n = 1) e de Curitiba - PR (n = 130) foram sequenciados na plataforma Illumina HiSeq 2500 com cobertura de 30x. O sequenciamento foi feito em parceria com os pesquisadores Fabiana L. Lopes e Francis McMahon do *National Institute of Mental Health* e Alan Shuldiner da empresa Regeneron (Estados Unidos da América). Foi mantido o sigilo em relação à identidade dos indivíduos. Os dados brutos foram alinhados ao genoma de referência GRCh38/hg38 e convertidos ao formato VCF (*Variant Call Format*) populacional pelo software GLnexus (YUN *et al.*, 2021), filtrando

somente variante com boa qualidade por meio do software ForestQC (LI, J. *et al.*, 2019).

5.3 REALIZAÇÃO DO LEVANTAMENTO SOROLÓGICO DE ANTI-CCP EM INDIVÍDUOS COM ARTRALGIA

A dosagem de anti-CCP (autoanticorpos contra o peptídeo cíclico citrulinado) por ELISA (ensaio de imunoabsorbância ligado à enzima) foi feita em colaboração com o Laboratório de Imunopatologia do HC-UFPR na população menonita (n=169), no soro de pacientes com autorrelato artralgia (n=27) e controles (indivíduos sem relatos de dores articulares e n=142). A TABELA 6 demonstra a distribuição demográfica dos grupos analisados. Os Kits (nº do catálogo: ORG 601) utilizados foram o Anti-CCP *hs* (*high sensitive*)® (ORGENTEC).

TABELA 6 - Distribuição demográfica dos grupos amostrais utilizados na dosagem de anti-CCP

Variáveis	n	Grupos		p	pcorr
		Controle n = 142	Artralgia n = 27		
Origem geográfica (Colônia Menonita) ¹	169			0,50	0,50
Colônia Nova (Aceguá - RS)		114 / 142 (80,3%)	21 / 27 (77,8%)		
Curitiba (PR)		17 / 142 (12,0%)	5 / 27 (18,5%)		
Witmarsum (Palmeira - PR)		11 / 142 (7,7%)	1 / 27 (3,7%)		
Sexo feminino ¹	169	77 / 142 (54,2%)	21 / 27 (77,8%)	0,032	0,064
Idade (anos) ²	169			1,0 x 10 ⁻³	4,0 x 10⁻³
Amplitude		21,0 - 86,00	38,0 - 90,00		
Mediana (IQR)		54,5 (41,00 - 66,8)	67,0 (59,50 - 73,0)		
Índice de massa corporal (IMC) ²	151			0,40	0,50
Amplitude		16,0 - 45,00	18,0 - 40,00		
Mediana (IQR)		27,0 (24,00 - 30,0)	28,5 (24,75 - 31,0)		

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Mediana (IQR): mediana com intervalo interquartil. Amplitude: valores mínimos - valores máximos. IQR: intervalo interquartil. ¹Teste exato de Fisher. ²Teste de Mann-Whitney. *p*: valor de *p*. *pcorr*: valor de *p* corrigido pelo método do “*False discovery rate*”. *pcorr* < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Em negrito estão os valores de *p* considerados estatisticamente significantes. Artralgia: autorrelataram artralgia. Controle: não autorrelataram artralgia.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DAS NETS SÉRICAS

O imunoensaio foi feito em colaboração com a Profa. Dra. Luciane Alarcão Dias Melício e com o Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu. O protocolo utilizado no imunoensaio adaptado de NETs

segue a mesma metodologia descrita nos estudos realizado por KRETZSCHMAR *et al.* (2021) e ZONTA *et al.* (2021).

Duzentos e doze amostras de soro dos indivíduos que autorrelataram artralgia e aqueles que não relataram (controles) foram dosadas para o imunoensaio de NETs (TABELA 7). Além disso, estas amostras também foram utilizadas nas análises dos níveis séricos das NETs entre o grupo de portadores das variantes do gene *LBR* vs não portadores. A TABELA 8 descreve a distribuição demográfica nos grupos de indivíduos menonitas portadores e não portadores de variantes do gene *LBR*.

TABELA 7 - Distribuição demográfica nos grupos controles e com artralgia da população menonita na dosagem das NETs séricas.

Variável	n	Grupos		p	pcorr
		Controle n = 167	Artralgia n = 28		
Origem geográfica (Colônia Menonita) ¹	195			0,73	0,92
Colônia Nova (Aceguá - RS)		114 / 167 (68,3%)	21 / 28 (75,0%)		
Curitiba (PR)		31 / 167 (18,6%)	5 / 28 (17,9%)		
Witmarsum (Palmeira - PR)		22 / 167 (13,2%)	2 / 28 (7,1%)		
Sexo feminino ¹	195	92 / 167 (55,1%)	21 / 28 (75,0%)	0,062	0,16
Idade (anos) ²	195			1,8 x 10 ⁻⁴	9,4x 10⁻⁴
Amplitude		19,0 - 86,0	38,0 - 90,0		
Mediana (IQR)		54,0 (39,5 - 66,0)	66,5 (59,8 - 73,0)		
Índice de massa corporal (IMC) ²	176			0,16	0,26
Amplitude		15,0 - 45,0	18,0 - 40,0		
Mediana (IQR)		26,0 (23,5 - 29,5)	29,0 (25,0 - 31,0)		

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Mediana (IQR): mediana com intervalo interquartil. Amplitude: valores mínimos - valores máximos. IQR: intervalo interquartil. ¹Teste exato de Fisher. ²Teste de Mann-Whitney. *p*: valor de *p*. *pcorr*: valor de *p* corrigido pelo método do "False discovery rate". *pcorr* < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Em negrito estão os valores de *p* considerados estatisticamente significantes. Artralgia: autorrelataram artralgia. Controle: não autorrelataram artralgia.

TABELA 8 - Distribuição demográfica nos grupos de indivíduos menonitas portadores e não portadores de variantes do gene *LBR*

Variável	n	Variantes do gene <i>LBR</i>		p	pcorr
		Portadores n = 19	Não portadores n = 321		
Origem geográfica (Colônia Menonita) ¹	340			0,083	0,19
Colônia Nova (Aceguá - RS)		16 / 19 (84,2%)	186 / 321 (57,9%)		
Curitiba (PR)		3 / 19 (15,8%)	134 / 321 (41,7%)		
Witmarsum (Palmeira - PR)		0 / 19 (0,0%)	1 / 321 (0,3%)		
Sexo masculino ¹	340	9 / 19 (47,4%)	181 / 321 (56,4%)	0,48	0,48
Idade (anos) ²	299			0,11	0,19
Amplitude		32,3 - 81,0	15,0 - 99,4		
Mediana (IQR)		67,4 (49,3 - 73,0)	56,5 (41,9 - 68,1)		
Índice de massa corporal (IMC) ²	275			0,056	0,19
Amplitude		21,1 - 45,8	14,4 - 44,5		
Mediana (IQR)		29,4 (25,8 - 30,5)	26,5 (23,4 - 29,7)		

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Mediana (IQR): mediana com intervalo interquartil. Amplitude: valores mínimos - valores máximos. IQR: intervalo interquartil. ¹Teste exato de Fisher. ²Teste de Mann-Whitney. *p*: valor de *p*. *pcorr*: valor de *p* corrigido pelo método do “*False discovery rate*”. *pcorr* < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Em negrito estão os valores de *p* considerados estatisticamente significantes.

5.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS A ARTRALGIA E NOS DADOS DE NETS SÉRICAS

A análise dos fatores de risco associados com a artralgia utilizaram os modelos univariados e modelos multivariados da regressão logística binária. Para a criação de modelos multivariados, foram apenas utilizadas associações univariadas com um valor de *pcorr* < 0,20 e o método manual de “*stepwise*” (direções: “*Backward*” e “*Forward*”), o qual gerou o melhor modelo de regressão multivariada. Os valores de *p* corrigidos (*pcorr*) para a múltipla testagem foram ajustados pelo método de “*False discovery rate*” ou FDR (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995) usando o pacote stats na linguagem R® 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022). Valores de *pcorr* < 0,05 foram considerados significativos. Por fim, as análises foram realizadas na linguagem R 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022) usando os seguintes pacotes: dplyr (WICKMAN *et al.*, 2021), nortest (GROSS; LIGGES, 2015), ggplot2 (WICKHAM, 2016), ggstatsplot (PATIL, 2021), gtsummary (SJOBERG *et al.*, 2021) e readxl (WICKHAM; BRYAN, 2019).

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS UTILIZADAS NA AVALIAÇÃO DOS DADOS DE NETS SÉRICAS E DOS COMPONENTES DO LIPIDOGRAMA NA POPULAÇÃO MENONITA

As análises dos níveis séricos das NETs dos indivíduos utilizaram dados de autorrelato de artralgia e foram criados dois grupos: artralgia (autorrelato de artralgia positivo) e negativo (autorrelato de artralgia negativo). Além disso, os seguintes procedimentos foram utilizados na análise: exclusão de indivíduos no grupo controle com histórico de parentes próximos que relataram ter AR ou artralgia, os dados séricos das NETs foram transformados em logaritmo na base 10 (log10), pareamento dos indivíduos do grupo controle com o grupo artralgia e remoção de outliers. Ao final, o número amostral total utilizado nas análises no grupo controle era de 68 indivíduos e o grupo com artralgia 13 indivíduos. O teste paramétrico (teste t de Student) foi utilizado para a comparação de dados

quantitativos entre os grupos foram utilizados conforme a normalidade. A hipótese da distribuição normal e homogeneidade de variâncias entre os grupos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e teste F respectivamente.

A avaliação dos níveis séricos dos componentes do lipidograma (colesterol total, triglicerídeos, LDL e HDL) e das NETs, foram realizadas na comparação dos grupos de indivíduos portadores de variantes do gene *LBR* vs indivíduos não portadores. Os dados séricos das NETs foram transformados em logaritmo na base 10 ($\log_{10}$). Além disso, foram excluídos indivíduos que relataram ter AR ou artralgia juntamente com a remoção de outliers. Estas análises utilizaram testes que compararam médias (teste paramétricos - teste t de Student ou teste t de Welch) ou medianas (testes não-paramétrico - Mann-Whitney) entre os grupos, os quais foram utilizados de acordo com a normalidade nos grupos analisados. A hipótese da distribuição normal e homogeneidade de variâncias entre os grupos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e teste F respectivamente.

Todas as análises foram realizadas na linguagem R 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022) usando os seguintes pacotes: dplyr (WICKMAN *et al.*, 2021), nortest (GROSS; LIGGES, 2015), ggplot2 (WICKHAM, 2016), ggstatsplot (PATIL, 2021), gtsummary (SJOBERG *et al.*, 2021) e readxl (WICKHAM; BRYAN, 2019). Os valores de p corrigidos (p_{corr}) para a múltipla testagem foram ajustados pelo método de “*False discovery rate*” ou FDR (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995). Valores de $p_{corr} < 0,05$ foram considerados significativos.

5.7 ANÁLISES DOS EXOMAS PARA BUSCA DE VARIANTES ASSOCIADAS COM A ARTRALGIA

As análises de associação genética caso-controle utilizaram a regressão multivariada com os modelos dominante, recessivo e aditivo para cada variante associada. Estas análises contaram com cerca de dezoito indivíduos menonitas (incluindo os miscigenados e excluindo os não-menonitas) com autorrelato de artralgia e 120 controles menonitas (indivíduos sem autorrelato de artralgia e sem parentes em 1º grau com autorrelato de artralgia). As covariáveis utilizadas na regressão multivariada para correção foram aquelas independentemente associadas com à artralgia. As análises caso-controle, cálculos das frequências

alélicas dos alelos associados e do equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos casos e controle foram realizadas no programa PLINK 1.9 (CHANG, C. C. *et al.*, 2015; PURCELL; CHANG, [s. d.]). O valor de p foi corrigido utilizando o método de permutação de Monte Carlo também foi realizada por este programa. Nesta análise exploratória, o valor de p corrigido (p_{corr}) $< 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A seleção inicial das variantes foi baseada nas dez primeiras variantes com menor valor de p para cada modelo (dominante, recessivo e aditivo). Os únicos critérios de exclusão das variantes foram: não estavam no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$) nos controles e não estavam localizados em pelo menos um transcrito TSL1 ("*Transcript Support Level 1*").

A análise de haplótipos foi realizada na linguagem R 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022) com as variantes encontradas associadas anteriormente. A seleção para a construção dos haplótipos foi baseada na inspeção das estatísticas de desequilíbrio de ligação (R^2 e D') entre as variantes, selecionando blocos com alto desequilíbrio de ligação (principalmente aquelas com $D' > 0,8$ e presentes no mesmo cromossomo), com gráficos "*heat map*". Os gráficos "*heat map*" foram construídos utilizando o pacote "LDheatmap" (SHIN *et al.*, 2006). Após a seleção das variantes, a construção e obtenção das frequências haplotípicas foram feitas através do pacote "haplo.stats" (SINNELL; SCHAID, 2022). Após a seleção das variantes, a construção e análise dos haplótipos por regressão logística binária para os modelos aditivos e dominantes. As análises foram corrigidas para sexo, idade, prática de exercício físico vigoroso ou moderado e autopercepção da saúde ruim. Os pacotes "haplo.stats" e "SNPassoc" (GONZALEZ *et al.*, 2007) foram para estas as análises. Finalmente, os valores foram corrigidos para múltipla testagem usando método do FDR para cada modelo (aditivo e dominante), sendo que valores menores que 0,05 considerados estatisticamente significativos.

As análises de enriquecimento de genes foram realizadas nos genes, os quais as variantes associadas nos exomas se localizavam, para investigar associações em vias biológicas potencialmente reguladas. O ranking das 10 primeiras vias associadas utilizando o "*combined score*" foi aplicado nesta análise exploratória em cada banco de dados (*Wikipathways Human* – versão 2021, *Reactome* – versão 2022, *Elsevier Pathway Collection*, *Gene Ontology*

Biological Process - versão 2021). Ademais, estas análises utilizaram o pacote “enrichR” (JAWAID, 2021) na linguagem R 4.2.2.

As análises de comparação de frequências alélicas e haplotípicas da população menonita, em relação às de diferentes populações, pelo teste exato de Fisher ou teste do qui-quadrado bicaudais utilizaram a linguagem R 4.2.2. As populações menonita e europeia não-finlandesa foram comparadas para identificar variantes cujas frequências sofreram um possível efeito fundador, em relação a população ancestral. Já a comparação entre as populações menonita e Amish permite identificar efeitos da deriva genética, resultantes dos 300 anos de separação, a partir da população anabatista original. As frequências alélicas das populações europeias não finlandesas (non-FIN EURO) e Amish foram obtidas a partir do site (versão 3.1.2): <https://gnomad.broadinstitute.org/> (KARCZEWSKI *et al.*, 2020). Já as frequências alélicas da população brasileira foram extraídas do site: <http://abraom.ib.usp.br> (NASLAVSKY *et al.*, 2022). Além disso, para identificar haplótipos com evidências de possível efeito fundador em relação a população ancestral, as frequências foram comparadas entre as populações menonita e europeia não-finlandesa utilizando o pacote LDlinkR na linguagem R 4.2.2 (MACHIELA; CHANOCK, 2015; MYERS; CHANOCK; MACHIELA, 2020). Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.8 INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES PREVIAMENTE ASSOCIADAS EM ESTUDOS GWAS COM O LES NA POPULAÇÃO MENONITA

A seleção das variantes que foram escrutinadas nos exomas foram aquelas presentes no banco de dado de variantes do GWAS Catalog (BUNIELLO *et al.*, 2019). Antes da busca nos exomas, realizou-se uma filtragem de exclusão nas variantes presentes no GWAS Catalog: variantes sem o alelo associado reportado, ausência de localização em pelo menos algum transcrito TSL1 (“*all splice junctions of the transcript are supported by at least one non-suspect mRNA*”), ausência de valor de OR (*Odds ratio*) ou beta reportado, estudos que não continham pelo menos uma população europeia.

A construção dos haplótipos foram baseados na inspeção das estatísticas de desequilíbrio de ligação (R^2 e D') entre as variantes, selecionando

blocos de variantes com alto desequilíbrio de ligação (principalmente aquelas com $D' > 0,8$), com gráficos “*heat map*”. Os gráficos “*heat map*” foram construídos utilizando o pacote “LDheatmap” (SHIN *et al.*, 2006) na linguagem R 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022). Após a seleção das variantes, a construção e obtenção das frequências utilizou o pacote “haplo.stats” (SINNWELL; SCHAID, 2022) na linguagem R 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022) para estas análises.

As frequências alélicas e haplotípicas da população menonita foram comparadas às de diferentes populações pelo teste exato de Fisher ou teste do qui-quadrado bicaudais. As populações menonita e europeia não-finlandesa foram comparadas para identificar variantes cujas frequências sofreram um possível efeito fundador, em relação a população ancestral. Já a comparação entre as populações menonita e Amish permite identificar efeitos da deriva genética, resultantes dos 300 anos de separação, a partir da população anabatista original. As frequências alélicas das populações europeias não finlandesas (non-FIN EURO) e Amish foram obtidas a partir do site: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (KARCZEWSKI *et al.*, 2020). Já as frequências alélicas da população brasileira foram extraídas do site: <http://abraom.ib.usp.br> (NASLAVSKY *et al.*, 2022). Além disso, para identificar haplótipos com evidências de possível efeito fundador em relação a população ancestral as frequências foram comparadas entre as populações menonita e europeia não-finlandesa, utilizando o pacote LDlinkR na linguagem R 4.2.2 (MACHIELA; CHANOCK, 2015; MYERS; CHANOCK; MACHIELA, 2020). Os testes foram realizados na linguagem R 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022). Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.9 METODOLOGIA DA INVESTIGAÇÃO DAS VARIANTES DO GENE *LBR* E SUA ASSOCIAÇÃO COM A ANOMALIA DE PELGER-HUËT.

Os exomas de 325 indivíduos menonitas residentes em Colônia Nova – RS (n = 200), Witmarsum/Palmeira (n = 1) e de Curitiba - PR (n = 137) foram utilizados nas buscas das variantes. Além disso, 2 amostras de exomas sequenciadas pela plataforma Ion Torrent também foram incluídas. As amostras foram cedidas em colaboração com o Dr. Roberto Rosati do Instituto Pelé Pequeno Príncipe (Hospital Pequeno Príncipe).

As variantes escolhidas para as análises e buscas nos exomas foram aquelas se localizavam no gene *LBR* e com um potencial patogênico avaliado no site Varsome (KOPANOS *et al.*, 2019). A filtragem para escolha das variantes utilizou a ferramenta VEP (Variant Effect Predictor) - Ensembl! (MCLAREN *et al.*, 2016), a qual foi utilizada para a anotação das variantes. Após, para a escolha das variantes a linguagem R (R CORE TEAM, 2022) e o programa PLINK 1.9 (CHANG, C. C. *et al.*, 2015; PURCELL; CHANG, [s. d.]) foram utilizados para a busca dos genótipos da variante em todos os dados de exoma da população menonita. O site Varsome (KOPANOS *et al.*, 2019) foi utilizado para se obter a classificação ACMG (2015) e algoritmos de patogenicidade das variantes.

As frequências alélicas da população menonita foram comparadas às de diferentes populações pelo teste exato de Fisher bicaudal na linguagem R 4.2.2 (R CORE TEAM, 2022). As populações menonita e europeia não-finlandesa foram comparadas para identificar variantes cujas frequências sofreram um possível efeito fundador, em relação a população ancestral. Já a comparação entre as populações menonita e Amish permite identificar efeitos da deriva genética, resultantes dos 300 anos de separação, a partir da população anabatista original. As frequências alélicas das populações europeias não finlandesas (non-FIN EURO) e Amish foram obtidas a partir do site: <https://gnomad.broadinstitute.org/> (KARCZEWSKI *et al.*, 2020). Já as frequências alélicas da população brasileira foram extraídas do site: <http://abraom.ib.usp.br> (NASLAVSKY *et al.*, 2022).

6 CAPÍTULO 1

6.1 NON-CODING RNA NETWORK ASSOCIATED WITH OBESITY AND RHEUMATOID ARTHRITIS

O manuscrito da revisão anexado nesta seção foi publicado na revista *Immunobiology* (doi: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152281>). A imagem abaixo apresenta a primeira página como demonstração da versão publicada na revista.



Non-coding RNA network associated with obesity and rheumatoid arthritis

Eduardo Delabio Auer^a, Denisson de Carvalho Santos^b, Ismael Júnior Valério de Lima^b,
Angelica Beate Winter Boldt^{a,*}

^a Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

^b Human Molecular Genetics Laboratory, Genetics Department, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990 Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Obesity
Autoimmune
Rheumatoid arthritis
miRNA
lncRNA
ncRNA

ABSTRACT

Obesity causes epigenetic alterations mediated by non-coding RNAs (ncRNAs) that increase susceptibility to autoimmune and inflammatory pathways. Obese individuals with rheumatoid arthritis (RA) are particularly affected, with worse clinical outcomes and treatment responses. In order to identify micro RNAs (miRNAs) and long ncRNAs (lncRNAs) that may influence RA development, progression, treatment efficacy, and clinical outcomes in obese individuals, we systematically screened PubMed, Web of Science, and Scopus databases for articles on these topics, published in the last decade. We ended up with 38 of initially 1110 documents and found that both obesity and RA share dysregulated expression of miR-21, miR-143, miR-146a, miR-155 miRNAs, H19, and HOTAIR lncRNAs (all but H19, up-regulated). With one exception (H19 and BMI in brown fat tissue), they correlated positively with clinical measures and disease activity. H19 and HOTAIR regulate 24 miRNAs, some differentially expressed in the investigated diseases. Both regulate miR-143-3p. We also investigated eleven GWAS-identified SNVs found in exonic lncRNA regions (there were none in exonic miRNA genes). Eight were associated with RA and three with obesity-related traits, seven change binding sites for miRNAs, especially on LINC01184 and GATA3-AS1, four were associated with gene expression in adipocytes (including *LINC01184*) and two may also change the secondary structure of ENSG00000284825 and LINC02656. These ncRNAs compose a unique regulatory network in obese RA patients, compiled for the first time in this review, which we suggest as future therapeutic targets in these simultaneous conditions.

1. Introduction

Excessive visceral fat characterizes overweight and obesity. In 2016, more than 1.9 billion adults presented overweight and, within this

group, more than 650 million were obese (WHO, 2020). Obesity increases the risk for developing rheumatoid arthritis (RA) (Crowson et al., 2013), as evident by the high prevalence of obesity among RA patients, which ranges between 18 and 39 % (Armstrong et al., 2006; Labitigan

Abbreviations: ACPAs, anti-Citrullinated Protein Antibodies; AKT/GSK, Protein kinase B/Glycogen Synthase Kinase pathway; ATP, Adenosine Triphosphate; BMI, Body Mass Index; CCL3, C-C Motif Chemokine Ligand 3; CCL4, C-C Motif Chemokine Ligand 4; CCL5, C-C Motif Chemokine Ligand 5; CCL7, C-C Motif Chemokine Ligand 7; CCR8, C-C Motif Chemokine Ligand 8; CD95L, CD95 Ligand; CDAI, Clinical Disease Activity Index; ceRNA, competing endogenous RNA; CHI3L1, Chitinase 3-Like-1; CRP, C Reactive Protein; DAS28, Disease Activity Score in 28 joints; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate; FABP4, Fatty Acid Binding Protein 4; FasL, Fas Ligand; FLS, Fibroblasts-Like Synovial cells; GWAS, Genome-Wide Association Studies; HAQ, Health Assessment Questionnaire; hs-CRP, hypersensitive C Reactive Protein; IGF1R, Insulin Like Growth Factor 1 Receptor; IGFBP5, Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5; IL-1 β , Interleukin-1 Beta; IL-6, Interleukin-6; IL-8, Interleukin-8; IL-17, Interleukin-17; IL-22, Interleukin-22; LDL, Low-Density Lipoproteins; lncRNAs, long non-coding RNAs; LPL, Lipoprotein Lipase; LPS, Lipopolysaccharide; MAPK, Mitogen-Activated Protein Kinase; MMP-1, Matrix metalloproteinase-1; MMP-3, Matrix metalloproteinase-3; MMP-9, Matrix metalloproteinase-9; MMP-13, Matrix metalloproteinase-13; miRNA, micro-RNAs; ncRNAs, non-coding RNAs; NF- κ B, Nuclear Factor κ B; PI3K-Akt pathway, Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B pathway; PMCs, peripheral blood mononuclear cells; PPAR γ , Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma; PTEN, Phosphatase and Tensin Homolog; RA, rheumatoid arthritis; RANK, Receptor Activator of Nuclear Factor κ B; RANKL, Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B ligand; RF, Rheumatoid Factor; RR, Relative Risk; SFRP4, Secreted Frizzled-Related Protein 4; SIRT 1, Sirtuin 1; SNF5, SWI/SNF complex subunit SNF5; SNVs, Single Nucleotide Variants; TNF, Tumor Necrosis Factor; TNF- α , Tumor Necrosis Factor Alpha; VAS, Visual Analog Scale; VLDL, Very Low-Density Lipoproteins.

* Corresponding author at: Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Departamento de Genética, Caixa Postal 19071, 81531-980 Curitiba, PR, Brazil.

E-mail address: angelicaboldt@ufpr.br (A.B.W. Boldt).

<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2022.152281>

Received 22 June 2022; Accepted 13 September 2022

Available online 19 September 2022

0171-2985/© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Non-coding RNA network associated with obesity and rheumatoid arthritis

Eduardo Delabio Auer¹, Denisson de Carvalho Santos², Ismael Júnior Valério de Lima², Angelica Beate Winter Boldt^{1*}.

¹ Postgraduate Program in Genetics. Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

² Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

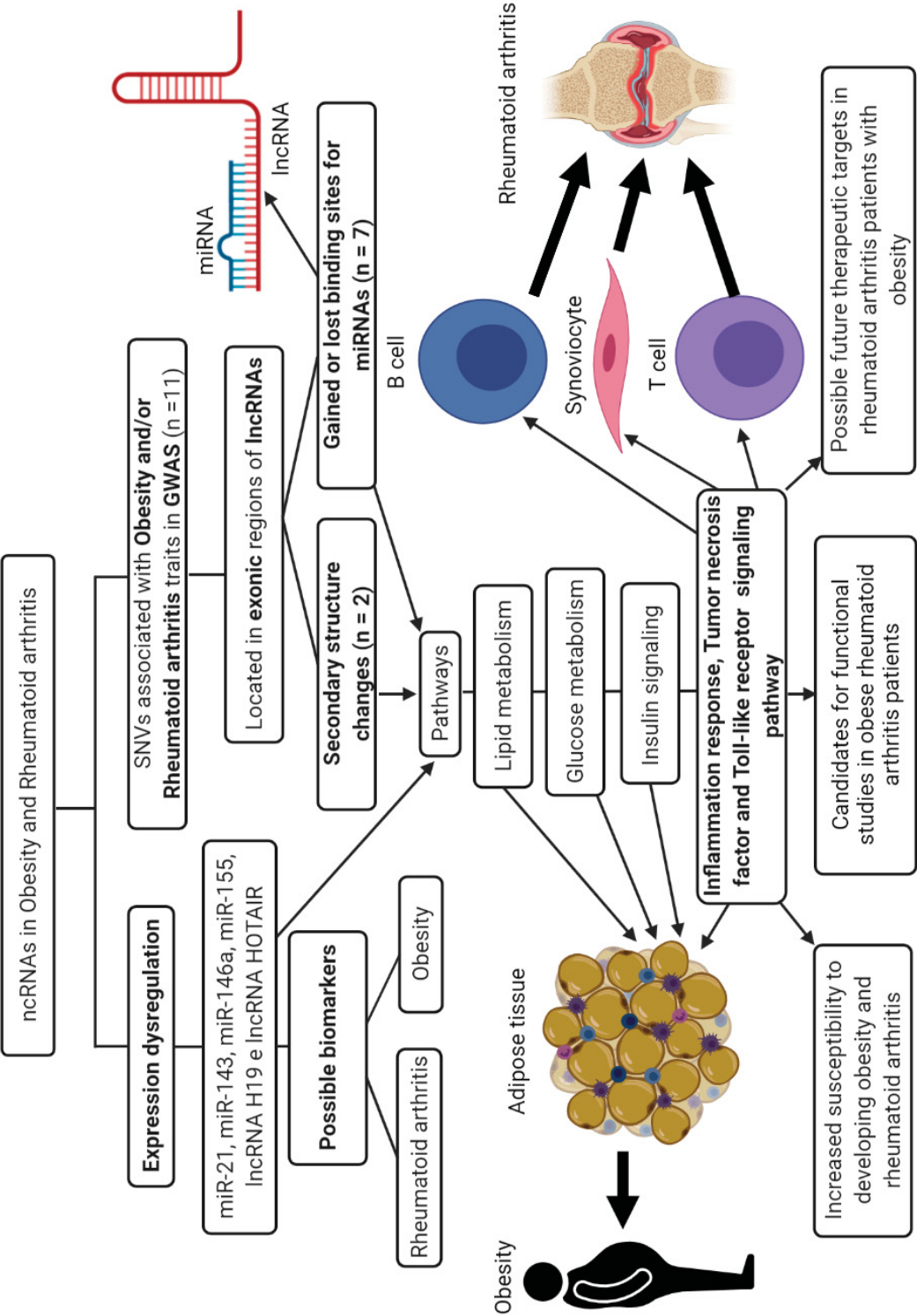
*Corresponding author:

Angelica Beate Winter Boldt
angelicaboldt@gmail.com

Universidade Federal do Paraná
Centro Politécnico, Departamento de Genética
Curitiba, PR, Brazil. Caixa Postal 19071
81531-980 Curitiba

ACPAs: Anti-Citrullinated Protein Antibodies. AKT/GSK: Protein kinase B/Glycogen Synthase Kinase pathway. ATP: Adenosine Triphosphate. BMI: Body Mass Index. CCL3: C-C Motif Chemokine Ligand 3. CCL4: C-C Motif Chemokine Ligand 4. CCL5: C-C Motif Chemokine Ligand 5. CCL7: C-C Motif Chemokine Ligand 7. CCR8: C-C Motif Chemokine Ligand 8. CD95L: CD95 Ligand. CDAI: Clinical Disease Activity Index. ceRNA: competing endogenous RNA. Chitinase 3-Like-1 (CHI3L1). CRP: C Reactive Protein. DAS28: Disease Activity Score in 28 joints. ESR: Erythrocyte Sedimentation Rate. FABP4: Fatty Acid Binding Protein 4. FasL: Fas Ligand. FLS: Fibroblasts-Like Synovial cells. GWAS: Genome-Wide Association Studies. HAQ: Health Assessment Questionnaire. hs-CRP: hypersensitive C Reactive Protein. IGF1R: Insulin Like Growth Factor 1 Receptor. IGFBP5: Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5. IL-1 β : Interleukin-1 Beta. IL-6: Interleukin-6. IL-8: Interleukin-8. IL-17: Interleukin-17. IL-22: Interleukin-22. LDL: Low-Density Lipoproteins. lncRNAs: long non-coding RNAs. LPL: Lipoprotein Lipase. LPS: Lipopolysaccharide. MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase. MMP-1: Matrix metalloproteinase-1. MMP-3: Matrix metalloproteinase-3. MMP-9: Matrix metalloproteinase-9. MMP-13: Matrix metalloproteinase-13. miRNA: micro-RNAs. ncRNAs: non-coding RNAs. NF- κ B: Nuclear Factor κ B. PI3K-Akt pathway: Phosphoinositide 3-kinase/Protein kinase B pathway. PMCs: peripheral blood mononuclear cells. PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. PTEN: Phosphatase and Tensin Homolog. RA: rheumatoid arthritis. RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor κ B. RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B ligand. RF: Rheumatoid Factor. RR: Relative Risk. SFRP4: Secreted Frizzled-Related Protein 4. SIRT 1: Sirtuin 1. SNF5: SWI/SNF complex subunit SNF5. SNVs: Single Nucleotide Variants. TNF: Tumor Necrosis Factor. TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha. VAS: Visual Analog Scale. VLDL: Very Low-Density Lipoproteins.

6.1.1 Graphical abstract



6.1.2 Abstract

Obesity causes epigenetic alterations mediated by non-coding RNAs (ncRNAs) that increase susceptibility to autoimmune and inflammatory pathways. Obese individuals with rheumatoid arthritis (RA) are particularly affected, with worse clinical outcomes and treatment responses. In order to identify micro RNAs (miRNAs) and long ncRNAs (lncRNAs) that may influence RA development, progression, treatment efficacy, and clinical outcomes in obese individuals, we systematically screened PubMed, Web of Science, and Scopus databases for articles on these topics, published in the last decade. We ended up with 38 of initially 1110 documents and found that both obesity and RA share dysregulated expression of miR-21, miR-143, miR-146a, miR-155 miRNAs, H19, and HOTAIR lncRNAs (all but H19, up-regulated). With one exception (H19 and BMI in brown fat tissue), they correlated positively with clinical measures and disease activity. These lncRNAs regulate 24 miRNAs, some differentially expressed in the investigated diseases. H19 and HOTAIR regulate miR-143-3p. We also investigated eleven GWAS-identified SNVs found in exonic lncRNA regions (there were none in exonic miRNA genes). Eight were associated with RA and three with obesity-related traits, seven change binding sites for miRNAs, especially on LINC01184 and GATA3-AS1, four were associated with gene expression in adipocytes (including *LINC01184*) and two may also change the secondary structure of ENSG00000284825 and LINC02656. These ncRNAs compose a unique regulatory network in obese RA patients, compiled for the first time in this review, which we suggest as future therapeutic targets in these simultaneous conditions.

KEYWORDS: Obesity, Autoimmune, Rheumatoid arthritis, miRNA, lncRNA, ncRNA.

6.1.3 Introduction

Excessive visceral fat characterizes overweight and obesity. In 2016, more than 1.9 billion adults presented overweight and, within this group, more than 650 million were obese (WHO, 2020). Obesity increases the risk for developing rheumatoid arthritis (RA) (CROWSON *et al.*, 2013), as evident by the high prevalence of obesity among RA patients, which ranges between 18 - 39% (ARMSTRONG *et al.*, 2006; LABITIGAN *et al.*, 2014; NARANJO *et al.*, 2008). Both conditions are associated with altered expression of non-coding RNAs (ncRNAs) (CASTAÑO *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2018; SHAKER *et al.*, 2019; TRYGGESTAD *et al.*, 2019; YANG, Jialiang *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2018), but the role of ncRNA interaction, regulation of gene expression and pleiotropy in RA susceptibility of obese individuals is largely unexplored.

ncRNAs include micro-RNAs (miRNAs) and long non-coding RNAs (lncRNAs) with a length of 21 – 23 or higher than 200 nucleotides, respectively. miRNAs regulate gene expression at the post-transcriptional level, by blocking the translation or causing the degradation of mRNA with which they present an incomplete or complete base pairing, respectively (GEBERT; MACRAE, 2019; MERCER; DINGER; MATTICK, 2009). lncRNAs may exert many effects like chromatin/nucleosome remodeling, transcriptional control, post-transcriptional processing (regulating splicing, RNA editing, transport, translation and degradation processes), competition for endogenous RNA (ceRNA) or miRNA sequestration (“sponging” and thus blocking miRNA functions) (MERCER; DINGER; MATTICK, 2009; SALVIANO-SILVA *et al.*, 2018).

Differential miRNA and lncRNA expression have been associated with susceptibility to obesity, obesity biomarkers, and clinical measurements

(CASTAÑO *et al.*, 2018; LIU, N. *et al.*, 2017; LIU, W. *et al.*, 2017; LU *et al.*, 2017; NUERMAIMAITI *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2018). Similarly, susceptibility to RA development, clinical biomarkers, disease activity, and pathogenic mechanisms have been associated with differential expression of ncRNAs (ABDUL-MAKSoud *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019; YANG, Jialiang *et al.*, 2020; YUE *et al.*, 2019).

RA is a systemic autoimmune disease with chronic inflammation in the joints (synovitis) and presence of autoantibodies (RF - rheumatoid factor and ACPAs - anti-citrullinated protein antibodies), caused by environmental triggers in individuals with higher genetic susceptibility (SMOLEN *et al.*, 2018). Joint deposition of immune complexes further stimulates the release of pro-inflammatory cytokines, causing metabolic problems (impaired lipid metabolism and insulin resistance), coagulatory and cardiovascular diseases (FERGUSON *et al.*, 2019; SMOLEN *et al.*, 2018). Obesity also decreases the response to RA treatment (GREMESE *et al.*, 2013; KLAASEN *et al.*, 2011; SCHULMAN *et al.*, 2018) and worsens RA disease activity (JAWAHEER *et al.*, 2010; STAVROPOULOS-KALINOGLU *et al.*, 2009). Therapeutic potential has been described to some ncRNAs for RA and for obesity, but not for both conditions (LIU *et al.*, 2018; PAN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2020; WU, Z.-M. *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2020). Considering this, we searched for potential therapeutic targets among miRNAs and lncRNAs that might influence RA development, progression, treatment efficacy and clinical outcomes in obese individuals.

6.1.4 Methods

We followed the Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses (PRISMA) for screening, inclusion and exclusion criteria studies. To evaluate the possible influence of ncRNAs in obesity and rheumatoid arthritis, three investigators independently screened articles in PubMed, Web of Science and Scopus databases with the following keywords and boolean operators: ("obesity" OR "overweight" OR "obese" OR "bmi" OR "body mass index" OR "adiposity" OR "adipose" AND "rheumatoid arthritis" OR "RA") AND ("epigenetic" OR "miRNA" OR "microRNA" OR "long non coding rna" OR "lncrna" OR "small interfering RNA" OR "siRNA") AND ("mortality" OR "das28" OR "clinical outcome" OR "cdai" OR "Clinical Disease Activity Index" OR "crp" OR "c protein reactive" OR "esr" OR "sed rate" OR "erythrocyte sedimentation rate" OR "cytokine" OR "inflammation" OR "inflammation marker" OR "inflammation biomarker" OR "abdominal waist"). We only included articles published in English from September 2003 until January 2021 and with the above keywords. Exclusion criteria: duplicated documents, review articles, documents that did not mention ncRNAs associated and/or dysregulated in obesity and/or rheumatoid arthritis, methodology issues (unclear methodology or missing comparison groups that otherwise would allow unambiguous results), patents, retracted publications, books, and book chapters. We also checked publications cited in screened articles and reviews.

Biological pathways potentially regulated by miRNAs were found in miRPathDB v2.0, GeneTrail2 v1.6 and DIANA-miRPath v3.0 (BACKES *et al.*, 2017; KEHL *et al.*, 2020; STÖCKEL *et al.*, 2016; VLACHOS *et al.*, 2015). False Discovery Rate (Benjamini-Hochberg) multiple testing correction was selected for biological pathways potentially regulated by miRNAs. Bonferroni correction was only

available in miRPathDB v2.0. Genes targeted by miRNAs and simultaneously associated with RA and obesity were identified in GSEA (MOOTHA *et al.*, 2003; SUBRAMANIAN *et al.*, 2005). Their possible implication in RA and/or obesity was further evaluated by gene associations in the GWAS (Genome-wide association studies) catalog. We also searched for ncRNA genes whose polymorphisms were found associated in GWAS with RA and/or obesity, checking for the results in the same catalog (BUNIELLO *et al.*, 2019). LncSEA database was used for enrichment analysis and to evaluate lncRNA regulation and interaction with miRNAs (CHEN *et al.*, 2021). Possible structural consequences and miRNA-lncRNA binding site changes caused by exonic SNVs were assessed in the lncRNASNP2 database (MIAO, Y.-R. *et al.*, 2018). The evaluation of possible structural consequences by exonic SNVs is given by the empirical p -value, and a $p < 0.2$ indicates a high probability of impacting a lncRNA structure. In addition, the RNAfold WebServer, which uses Vienna RNA package, predicted possible visual structural changes in lncRNAs for each allele using minimum free energy (MFE) and positional entropy (LORENZ *et al.*, 2011). Ultimately, eQTL associations for SNVs located in lncRNA exons were assessed using Qtlizer (MUNZ *et al.*, 2015).

Graphical figures were created using R language 4.1.3 (R CORE TEAM, 2022) with the following packages: dplyr (WICKHAM *et al.*, 2021), ggplot2 (WICKHAM *et al.*, 2020b), ggthemes (ARNOLD, 2021) and openxlsx (SCHAUBERGER; WALKER, 2020). Gene enrichment analysis was conducted by using enrichR package (JAWAID, 2021; KULESHOV *et al.*, 2016).

6.1.5 Results and discussion

6.1.5.1 Eligible articles

One thousand one hundred ten document records were obtained from a search conducted in PubMed, Web of Science and Scopus databases, published until January 2021. After excluding 42 duplicated entries, 1068 documents were screened by checking the title and abstract. Seven hundred sixty-six documents were excluded, and 298 reached the eligibility criteria. However, only 38 documents from 298 met the final inclusion criteria (articles discussing ncRNAs deregulated in obesity and RA) (Figure 1). Supplementary figures 1 - 3 summarize our findings in PubMed, Web of Science and Scopus databases, according to document type, year of publication and investigated phenotypes. The number of publications discussing ncRNAs in RA ($n = 319$) was much higher than those investigating them in obesity ($n = 23$) or in individuals presenting both conditions ($n = 13$). In the ten years covered by our review, the rate of publications on the role of ncRNAs in RA grew much faster than the publication rate of articles on ncRNAs and obesity or in both conditions (Supplementary figure 3). These data highlight the need for more studies focused on the last two areas.

6.1.5.2 ncRNAs

Tissues, cells, plasma and serum from RA patients, obese individuals, and animal models for RA and obesity shared dysregulated expression of *miR-21*, *miR-143*, *miR-146a*, *miR-155*, *H19* and *HOTAIR lncRNAs* (all up-regulated but H19) (Table 1). Their expression levels correlated positively with the following clinical measures and disease activity in RA and/or obesity: ESR (erythrocyte sedimentation rate), hypersensitive C reactive protein (hs-CRP) and CRP levels, DAS28 (Disease Activity Score in 28 joints), radiographic bone erosions, BMI

(body mass index), proinflammatory cytokine levels, VLDL (Very Low-Density Lipoproteins) and LDL serum levels, triglyceride serum levels, waist circumference, visceral adiposity and adipogenic markers. There were also inverse correlations between lncRNA H19 levels with BMI in obese individuals and of miR-155 levels with DAS28 (Disease Activity Score in 28 joints) in RA patients (Table 2). Hence, they might have the potential to be used as biomarkers in RA and obesity, and will be briefly discussed below.

6.1.5.2.1 *miR-21*

hsa-miR-21 is involved in several biological pathways related to obesity (Supplementary table 1), consistent with the association of its overexpression (as *mmu-miR-21*) with obesity development in mice (Chartoumpekis et al., 2012) and with its positive correlation with waist circumference and visceral adiposity in RA patients (*hsa-miR-21-5p*) (ANDONIAN *et al.*, 2019). In addition, *mmu-miR-21* knockout protects mice treated with an adipogenic diet from glucose intolerance and hepatic steatosis (CALO *et al.*, 2016).

hsa-miR-21 also operates in RA-related pathways (Supplementary table 1). Its up-regulation enhances FLS (fibroblast-like synoviocytes) proliferation (CHEN *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016) and resistance to apoptosis, due to higher levels of antiapoptotic *BCL2* (B-cell lymphoma 2) gene and protein expression. Furthermore, hsa-miR-21 inhibition decreases the Bcl-2/Bax (BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator) ratio (YANG *et al.*, 2016). Moreover, miR-21 stimulates LPS (lipopolysaccharide)-induced inflammation by down-regulating the translation of SNF5 mRNA, a subunit of the activating nucleosome remodeler SWI/SNF complex. This is followed by the activation of NF- κ B and PTEN (Phosphatase and

Tensin Homolog)/PI3K (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha)/AKT (Protein kinase B) pathways in an immortalized rheumatoid FLS line (MH7A) cells (WU, S. *et al.*, 2020). Finally, it was reported that the inhibition of *hsa-miR-21* expression in FLS (Fibroblasts-Like Synovial cells) obtained from RA patients, downregulated MMP-1 (Matrix metalloproteinase-1), MMP-3 (Matrix metalloproteinase-3), MMP-13 (Matrix metalloproteinase-13) and TGF β 1 protein expression (XIONG *et al.*, 2016).

Therefore, there is strong evidence for *miR-21*'s contribution to obesity and RA pathogenesis by increasing the synovial inflammatory response, upregulating FLS proliferation and resistance to apoptosis, and stimulating adipogenesis with concomitant impairment of insulin pathways and glucose intolerance (in the murine animal model) (ANDONIAN *et al.*, 2019; CALO *et al.*, 2016; CHARTOUMPEKIS *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2016; WU, S. *et al.*, 2020; XIONG *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2016).

6.1.5.2.2 miR-143

Obese mice up-regulate *mmu-miR-143* in liver and adipose tissue. Its overexpression impaired glucose metabolism and contributed to insulin resistance in mice animal models (JORDAN *et al.*, 2011; TAKANABE *et al.*, 2008). These findings are coherent with biological pathways influenced by miR-143, such as adipogenesis, glucose transmembrane transport, lipid metabolism pathway, and adipocytokine signaling pathway (Supplementary table 2).

Furthermore, RA patients present a positive correlation between miR-143-3p and pro-inflammatory cytokine levels (interleukins IL-6 and IL-8) in plasma and

synovia (ANDONIAN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2018). The concentration of miR-143 was also higher in plasma of patients whose first RA symptoms included bone erosions, compared with those without (YUE *et al.*, 2019). As with miR-21, *miR-143* expression is associated with enhanced proliferation and decreased apoptosis of cells in RA patients' synovia. These phenomena may be associated with miR-143-driven interruption of *IGF1R* (insulin-like growth factor 1 receptor) and *IGFBP5* (Insulin-like growth factor-binding protein 5) translation and regulation of activation of the Ras/p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway (YANG *et al.*, 2018). The results found by the authors are consonant with the documented miR-143 interactions with these pathways (Supplementary table 2).

Consequently, *miR-143* participation in obesity and RA might increase the inflammatory response and adipogenesis, enhance synovial cell proliferation and reduce apoptosis. Similar to miR-21, it may also contribute to insulin resistance and disturb glucose equilibrium homeostasis.

6.1.5.2.3 miR-146a

Adipose tissue up-regulates the expression of *mmu-miR-146a*, a miRNA associated with obesity development in a mice model fed with a high-fat diet (CHARTOUMPEKIS *et al.*, 2012). *miR-146a* levels correlate positively with human body fat measurement and abdominal adipose tissue expression of *SFRP4* (Secreted Frizzled-Related Protein 4), which encodes an antiangiogenic proinflammatory factor, type 2 diabetes marker that decreases insulin secretion induced by glucose (BHATTARAI *et al.*, 2007; MULEY *et al.*, 2010; NUNEZ

LOPEZ *et al.*, 2018). Finally, *hsa-miR-146a* and *hsa-miR-146a-3p* expression levels were positively correlated with atherogenic biomarkers (triglycerides and plasma large very low-density lipoproteins - VLDL particles) and BMI index in RA patients (ANDONIAN *et al.*, 2019; NUNEZ LOPEZ *et al.*, 2018). Thus, *miR-146a* exerts an adipogenic and inflammatory effect in adipose tissue, contributing to various pathways that lead to obesity (Supplementary table 3).

miR-146a also influences pathways related to regulation of cell death, TNF and FasL/CD95L signaling pathway, T cell activation and proliferation (Supplementary table 3). It was found up-regulated in CD4⁺ T cells from RA patients (LI *et al.*, 2010). Additionally, overexpression of *hsa-miR-146a* was correlated with TNF- α levels and associated with suppression of Jurkat T cell apoptosis by regulating the expression of Fas associated factor 1 (FAF1) (LI *et al.*, 2010).

Therefore, miR-146a may contribute to obesity by enhancing pro-inflammatory and adipogenic activities of adipose tissue. Moreover, miR-146a may intensify RA pathogenesis and RA susceptibility by deregulating activation, proliferation and apoptosis of T cells.

6.1.5.2.4 miR-155

hsa-miR-155 expression is up-regulated in obese individuals' sera and adipose tissue (*hsa-miR-155-5p*), correlating positively with TNF- α serum levels and BMI (KARKENI *et al.*, 2016; TRYGGESTAD *et al.*, 2019). Furthermore, knockdown of *mmu-miR-155-3p* and *mmu-miR-155-5p* reflects the association of miR-155 with obesity. Its deletion protects mice on a high fat-diet from gaining bodyweight and

gonadal white adipose tissue, insulin resistance, adipogenesis and inflammation in white adipose tissue (GAUDET *et al.*, 2016). Moreover, overexpression of *hsa-miR-155-5p* in macrophages, adipocytes and adipocyte-derived microvesicles in adipose tissue of obese patients may contribute to a chronic inflammatory and insulin resistance state (KARKENI *et al.*, 2016; TRYGGESTAD *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2016). Thus, miR-155 is implicated in pathways related to inflammation in adipose tissue, adipogenesis, insulin and glucose balance (Supplementary table 4), causing metabolism and inflammation deregulation, which may assist in obesity development.

miR-155 might be involved in triggering autoimmune events in B and T cells, pro-inflammatory state and chemokine recruitment of leukocytes in RA patients' synovia (Supplementary table 4). Expression of *hsa-miR-155* is involved in the generation of autoreactive B and T cells and B-cell activation in RA (*hsa-miR-155-5p*); resistance to apoptosis of CD14⁺ monocytes in peripheral blood and synovial fluid of RA patients, as well as reduced viability and induced apoptosis with cell cycle arrest of RA synovial fibroblasts (*hsa-miR-155-5p*); increased levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-8, and IL-1 β) in RA synovia; increased expression of CC-motif chemokine ligands (CCL3, CCL4, CCL5, and CCL8) and pro-inflammatory CC-motif chemokine receptor 7 (CCR7) in monocytes of RA individuals (ALIVERNINI *et al.*, 2016; BLÜML *et al.*, 2011; ELMESMARI *et al.*, 2016; KUROWSKA-STOLARSKA *et al.*, 2011; LI, H. *et al.*, 2019; RAJASEKHAR *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019). Furthermore, *hsa-miR-155* expression was positively correlated with serum and plasma levels of TNF- α and IL-1 β in RA patients. Both positive and negative correlations were reported between *hsa-miR-155-5p* and DAS-28 (ABDUL-MAKSoud *et al.*, 2017;

ORMSETH *et al.*, 2015). This controversial association might be related to differential pain perception, which might affect DAS-28 score, caused by cultural and ethnic differences between different populations (KRUPIC *et al.*, 2019; LOSIN *et al.*, 2020).

Consistent with all these findings, miR-155 may increase susceptibility and augment obesity and rheumatoid arthritis pathogenesis by concomitantly increasing inflammation in adipose tissue and synovia, initiating autoimmune events through dysfunction of mechanisms regulating T and B cell activation and cell cycle, stimulating adipogenesis and impairing lipid metabolism, glucose homeostasis and insulin resistance, and stimulating immune cell chemotaxis in inflamed synovia.

6.1.5.2.5 lncRNAs H19 and HOTAIR

The expression of H19 and HOTAIR lncRNAs is associated with several pathways in both obesity and RA (Supplementary table 5). H19 levels were inversely proportional to BMI values in brown fat tissues (SCHMIDT *et al.*, 2018). Nevertheless, its expression was associated with increased levels of proinflammatory cytokines and proliferation of synovial cells (YANG, Jialiang *et al.*, 2020). In obesity, *HOTAIR* ectopic expression increased the expression of adipogenic genes and differentiation of preadipocytes (*ADIPOQ*, *FABP4*, *PPARGC1A* and *LPL*) (DIVOUX *et al.*, 2014). Besides, *HOTAIR* was associated with hepatic insulin resistance by inhibiting the AKT/GSK signaling pathway and down-regulating *Sirt1* (sirtuin 1, a histone deacetylase) expression in insulin-resistant mice (LI, M. *et al.*, 2018). Finally, *HOTAIR* was overexpressed in serum

of sedentary and obese people, and its overexpression was associated with intestinal cell proliferation and possibly with colorectal tumorigenesis (LU *et al.*, 2017). In RA patients, HOTAIR levels were positively correlated with the ESR and MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9) levels, being considered as an independent RA predictor in multivariate logistic models (SHAKER *et al.*, 2019).

H19 and HOTAIR regulate 24 miRNAs (Supplementary table 6), most probably by sequestering them: H19 regulates let-7b, miR-17, miR-19a, miR-19b, miR-106b, miR-130a and miR-148b (JIA *et al.*, 2019; LI, J. *et al.*, 2020; SU *et al.*, 2018; YANG, Juhua *et al.*, 2020; ZHU *et al.*, 2019), and HOTAIR may sequester miR-20b, miR-106a, miR-130a, and miR-230a (FU; ZHANG; ZHANG, 2022; GUO *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2020; XIAO *et al.*, 2018). Among these miRNAs, miR-19a and miR-19b might be negative regulators of inflammation in RA FLS by down-regulating *TLR2* mRNA and protein, which may decrease IL-6 or metalloproteinase 3 release (PHILIPPE *et al.*, 2012). miR-19a lower expression was correlated with higher levels of *IL6* mRNA expression in polyclonal V γ 9V δ 2 T-cell lines from RA patients; in the same way, miR-106a targets *IL8* mRNA and its down-regulated expression correlated with higher levels of IL8 mRNA up-regulated expression (GUGGINO *et al.*, 2018; HONG *et al.*, 2015). Therefore, H19 and HOTAIR may increase the inflammatory response by sequestering miR-19a, miR-19b and miR-106a.

It is noteworthy that some miRNAs (let-7b, miR-17, miR-20a, miR-20b, miR-25, miR-93, miR-103, miR-106a, miR-106b) might be associated with or influence cancer pathways such as metastasis, invasive phenotype, angiogenesis, and progression (BORGES *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2013; LIU, S. *et al.*, 2017; MASLIAH-PLANCHON *et al.*, 2013; PIDÍKOVÁ; HERICHOVÁ, 2021). They may

be responsible for the cancer-like phenotype adopted by RA FLS, which increase their invasiveness and proliferation (MOUSAVI *et al.*, 2021). These miRNAs are enriched in pathways related to arthritis, RA, and type 2 diabetes mellitus: white fat differentiation, lipid, and energy metabolism, inflammation response and regulation of the cell cycle and activation of T and B lymphocytes, plasma cells and macrophages, and cytokine signaling/production (Supplementary table 7). Besides, these miRNAs were enriched in joints and immune cells (Supplementary table 8). Lastly, miRNAs regulated by H19 and HOTAIR targeted 71 genes associated with RA and or obesity, metabolism regulation, inflammation, cancer and other autoimmune diseases (Supplementary table 9 and Supplementary figure 4). Therefore, H19 and HOTAIR may be associated with RA and obesity susceptibility pathways directly or indirectly by regulating miRNAs involved in relevant biological pathways.

6.1.5.3 Exonic SNVs in lncRNAs associated with RA or obesity

Another source of evidence is given by genetic association of SNVs located in ncRNA genes, with both RA and obesity. We found no SNV simultaneously associated with both conditions in GWAS, most probably due to the lack of comparisons between obese and non-obese RA patients, or obese patients with and without RA.

We further screened GWAS results for exonic ncRNA SNVs, which may impair secondary RNA structure and thus, its function (WAPINSKI; CHANG, 2011; XING *et al.*, 2016). For practical reasons, we ignored SNVs of intronic/regulatory regions of ncRNA genes, which may act as eQTLs (expression quantitative trait loci), focusing only on those with a possible structural impact. In fact, functional,

structural change and loss of binding sites for miRNAs, DNA, and proteins in lncRNAs affected by SNVs were reported to increase susceptibility to different cancers (FUJIMOTO *et al.*, 2016; LI; SHUCH; GERSTEIN, 2017; PAN *et al.*, 2016a, 2016b; ZHENG *et al.*, 2016).

We identified eleven GWAS-associated SNVs in exonic lncRNA regions (there were none in exonic miRNA genes) (Table 3). Seven SNVs might change binding sites for miRNAs in lncRNAs: rs3812049, rs3093024, rs10275421, rs2275806, rs9604529, rs78246608, rs4750316 (Table 4). Two of these SNVs may also change lncRNA secondary structure: rs3093024 and rs4750316 (Figure 2). miRNAs that lose or gain a binding site on lncRNAs due to SNVs were associated with Toll-like receptor signaling pathways, which present critical roles in RA and obesity development (Supplementary table 10) (AHMAD *et al.*, 2016; ESER; SAHIN, 2016; KIM *et al.*, 2012; SACRE *et al.*, 2016; VITSEVA *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2017).

The obesity-associated *rs3812049**C allele might increase adipogenesis and RA-inflammatory state by creating a binding site for several miRNAs on LINC01184. The miR-9-5p miRNA is among them. Its plasma levels were lower in RA patients and even lower in patients with RA and peripheral neuropathy, compared with patients presenting only RA. This miRNA targets the repressor element-1 silencing transcription factor (REST) and up-regulates miR-132, thereby protecting Schwann cells from RA-induced inflammatory damage (LEE *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2015). Furthermore, miR-9-5p down-regulates the NF- κ B1-RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B ligand) pathway by targeting NF- κ B1 and RANKL expression in RA FLS, causing reduced inflammation and joint damages in rat models (LEE *et al.*, 2020). miR-370-5p does also count among

miRNAs that gained a binding site on LINC01184. The ssc-miR-370 and mmu-miR-370 had a suppressive effect in adipogenesis and triglyceride deposition in porcine and murine adipocytes (CHU; YAO; LI, 2021; ZHANG, P. *et al.*, 2021). Moreover, mmu-miR-370 was down-regulated in obese mice with high fat diet (ZHANG, P. *et al.*, 2021). In humans, miR-370-5p is down-regulated in systemic lupus erythematosus (YE *et al.*, 2019) (Ye *et al.*, 2019). Furthermore, miR-3679-3p was predicted to modulate insulin resistance and bone mineral density (DE-UGARTE *et al.*, 2017; DOUMATEY *et al.*, 2015). Although induced by metabolic syndrome, the expression of miR-381-5p, another miRNA probably sequestered by LINC01184, reduces proliferation and invasion of breast cancer cells activated by lower NAD⁺ levels in metabolic syndrome (FARRÉ *et al.*, 2018). Moreover, miR-381 can down-regulate Chitinase 3-Like-1 (CHI3L1) which is up-regulated in cancers and chronic inflammation, and whose increased serum levels correlate with RA disease severity (COFFMAN, 2008; DENG *et al.*, 2021). Two miRNAs were predicted to lose a binding site on LINC01184 through *rs3812049**C. Among them, *miR-6068* was up-regulated in obese individuals compared with those having Prader-Willi syndrome (PASCUT *et al.*, 2018) and in type II diabetic nephropathy patients, compared with controls and with type II diabetic patients only (DELIĆ *et al.*, 2016).

Regarding miRNAs that probably lost binding sites on the tumor suppressor lncRNA LNCPRESS1 (AN *et al.*, 2018) through *rs10275421**G, *miR-3189-3p* was up-regulated in hepatocellular carcinoma patients' plasma and prostate cancer microdissected tumors (MOUSTAFA *et al.*, 2017; ZHANG, X. *et al.*, 2021), *miR-4674* was up-regulated in pancreatic cancer patients' plasma compared with controls (MAZZA *et al.*, 2020), *miR-635* higher expression was correlated with

poor clinical outcome of breast cancer patients tissues (LIANG *et al.*, 2019). They may all be associated with the cancer-like phenotype of FLS in RA.

GATA3 expression is up-regulated by the GATA3-AS1 lncRNA, and its down-regulation is implicated in RA pathogenesis (BARATI *et al.*, 2017; GIBBONS *et al.*, 2018; REZAEIPOOR *et al.*, 2020). *rs2275806*G* is associated with RA and creates binding sites in GATA3-AS1 for many miRNAs, possibly sponging them: *miR-3681-5p* is downregulated in patients with type I diabetes (YI; CHENG, 2021), *miR-4436b-5p* might down-regulate IL-8 expression, whose higher levels in RA are implicated in NETosis and citrullinated autoantigen exposure (AN *et al.*, 2018; KHANDPUR *et al.*, 2013; LI, C. *et al.*, 2018), *miR-4700-5p* expression was increased in fecal samples in individuals with active physical exercise (FRANCAVILLA *et al.*, 2021) and *miR-6751-5p* was upregulated in saliva from individuals after a long-distance run, *miR-6777-3p* down-regulation in hepatic tissue enhances hepatocellular carcinoma cells proliferation and invasion (ZHOU *et al.*, 2020), *miR-6817-3p* has an antitumoral role in head and neck squamous cell carcinomas by targeting the Wnt2B/ β -catenin pathway (LI, M. *et al.*, 2020). *rs2275806*G* may cause GATA3-AS1 binding site loss for *miR-1246*, whose higher levels are associated with pro-inflammatory environment in breast cancer tissues (increased release of IL-6, and chemokines CCL2 and CCL5) (BOTT *et al.*, 2017). In addition, *miR-1246* was up-regulated in osteoarthritis synovial fluid and participated on inflammatory pathogenesis caused by increased IL-6 production (QI *et al.*, 2019).

miR-6874-5p is down-regulated in urine samples from pancreatic cancer patients (YASUI *et al.*, 2017). In addition, *miR-6874-5p* and *miR-2115-5p* are down-regulated in PBMCs of patients with type 1 diabetes (YI; CHENG, 2021). Both

former miRNAs have gained binding sites in LINC00452 by *rs9604529*G* (SNV associated with RA). Finally, the last SNV (*rs4750316*C*) associated with RA created a new binding site for *miR-4693-5p* in LINC02656. *miR-4693-5p* was down-regulated in colon rectal cancer and might act as tumoral suppressor by targeting TRIP13 (Thyroid hormone receptor interactor 13) mRNA (CHEN *et al.*, 2022).

In adipose tissue, *rs3812049*C* and *rs9604529*G* are eQTLs associated with down- and up-regulation of *LINC01184* and *LINC00452*, respectively (in the case of *LINC01184*, down-regulation occurs at several other tissues, including blood cells). The *rs3812049*C* allele also occurs in high linkage disequilibrium (LD) with *rs17764730*T* ($r^2 = 0.96$). This last allele is located within an alternative exon of *LINC01184*, changing the secondary structure of one of its three most common transcripts (ENST00000501702.7, see Figure 2) and binding sites for hsa-miR-145-3p (site gain) and hsa-miR-1279 (site loss). miR-145-3p has a tumor suppressor effect in osteosarcoma cells, endometrial neoplastic cells, head and neck squamous cell carcinoma by targeting *HDAC4* mRNA, regulating *TCF4*, and *MYO1B* gene expression, respectively (JIANG *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2018; YAMADA *et al.*, 2017). In addition, miR-145-3p may upregulate IL-10 production in M2 macrophages (HUANG *et al.*, 2019), and *mmu-miR-145-3p* up-regulation alleviates traumatic brain injury inflammation by negative modulation of the NFATc2/NF- κ B pathway in a rat model (CUI *et al.*, 2021). In conclusion, the impact of the many associated and predicted consequences of *rs3812049* are weighted out by its eQTL down-regulating effect and must be functionally evaluated.

Furthermore, the RA-associated *rs3093024**A allele is associated with lower expression of the chemokine receptor gene *CCR6* (beta = -0.14) and higher expression of the ribonuclease gene *RNASET2* (beta = 0.22) (Supplementary table 11). *CCR6* and *RNASET2* were previously found in GWAS associated with autoimmune and inflammatory diseases such as RA itself, but also vitiligo, inflammatory bowel disease, and Crohn's disease (CHEN *et al.*, 2020; DE LANGE *et al.*, 2017; FRANKE *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2015).

In addition, other pathways regulated by those miRNAs and likely associated with both RA and obesity were: leukocyte migration, metabolism, lipid metabolism and insulin signaling pathways (Supplementary table 10). Therefore, RNA secondary structure changes and loss/gain of binding sites might be a possible hypothesis to explain the GWAS associations with lncRNA polymorphisms.

6.1.5.4 Limitations

Our literature review included articles on dysregulated ncRNAs in obesity and RA based on animal models and *in vitro* studies (Supplementary table 12). However, it did not cover small nucleolar RNAs and circular RNAs. Regarding GWAS SNVs in ncRNAs analysis, we focused on genetic association studies reported in the GWAS Catalog database only and may have missed some work published elsewhere. We ignored intronic/regulatory SNVs located in ncRNA genes, which may also ultimately impact gene expression and ncRNA levels. We did also not evaluate the influence of the associated polymorphisms on alternative ncRNA splicing, a topic still largely unexplored in ncRNA genetic association studies. Finally, possible changes in lncRNA secondary structure and changes in miRNA

binding sites were based in prediction algorithms and must be confirmed in subsequent functional studies.

6.1.6 Conclusions

We reviewed ncRNAs common to obesity and RA, focusing on ncRNA expression dysregulation and exonic SNVs in lncRNAs. Since there were few studies on this topic until the end of this review's drafting, we want to encourage more research on ncRNA dysregulation and lncRNA SNVs effects in obese RA patients. Expression dysregulation of *miR-21*, *miR-143*, *miR-146a*, *miR-155*, *H19* and *HOTAIR* lncRNAs correlates with obesity and RA biomarkers and is associated with pathways common to both (inflammation, T and B cell activation, lipid metabolism, glucose metabolism, insulin signaling and tumor necrosis factor signaling pathways). Thus, these ncRNAs may have a synergistic effect on concomitant development of obesity and RA. We also found nine SNVs (rs78246608, rs62107261, rs212389, rs3093024, rs4750316, rs3812049, rs10275421, rs2275806, rs9604529) in exonic regions of lncRNAs from GWAS studies associated with RA or obesity, which might change susceptibility to these diseases by changing lncRNA secondary structure or miRNA binding sites. Ultimately, ncRNAs with dysregulated expression and miRNAs that lost or gained binding sites by SNVs in lncRNAs (particularly on LINC01184 and GATA3-AS1), identified in this study, were associated with a proinflammatory immunometabolic state that increases the odds of developing both obesity and RA, or inflammatory related conditions. Moreover, they may be partly responsible for an increased risk of an inadequate response to treatment and decreased chance of remission of RA in obese patients. We suggest them as candidates for future functional

studies focusing on both obesity and RA, to evaluate if their expression might be therapeutically targeted to improve the treatment of RA patients with obesity.

FUNDING

This review was supported by grants of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP–Finance Code 001), which provided financial support and scholarships to EDA (88882.382141/2019-01), and from Fundação Araucária and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (PPSUS 053/2021). ABWB receives a CNPq research productivity scholarship (protocol numbers 314288/2018–0 and 313741/2021-2). The funding agencies had no role in study design, interpretation, and manuscript drafting and submission.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

The authors report no conflicts of interest or competing financial interests.

AUTHORS' CONTRIBUTION

ABWB and EDA conceived and edited the manuscript. DCS, EDA and IJVL wrote, edited the manuscript and prepared figures.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor Dr. Marcia Holsbach Beltrame for critical reading and helpful suggestions for the manuscript. Furthermore, we also thank Dr. Gabriela Canalli Kretzschmar for analysis suggestions on GWAS SNVs found in lncRNAs.

6.1.7 References

- Abdul-Maksoud, R., Sediq, A., Kattaia, A., Elsayed, W., Ezzeldin, N., Abdel Galil, S., Ibrahim, R., 2017. Serum miR-210 and miR-155 expression levels as novel biomarkers for rheumatoid arthritis diagnosis. *Br. J. Biomed. Sci.* 74, 209–213. <https://doi.org/10.1080/09674845.2017.1343545>
- Ahmad, R., Kochumon, S., Thomas, R., Atizado, V., Sindhu, S., 2016. Increased adipose tissue expression of TLR8 in obese individuals with or without type-2 diabetes: significance in metabolic inflammation. *J. Inflamm.* 13, 38. <https://doi.org/10.1186/s12950-016-0147-y>
- Alivernini, S., Kurowska-Stolarska, M., Tolusso, B., Benvenuto, R., Elmesmari, A., Canestri, S., Petricca, L., Mangoni, A., Fedele, A.L., Di Mario, C., Gigante, M.R., Gremese, E., McInnes, I.B., Ferraccioli, G., 2016. MicroRNA-155 influences B-cell function through PU.1 in rheumatoid arthritis. *Nat. Commun.* 7, 12970. <https://doi.org/10.1038/ncomms12970>
- An, Q., Yan, W., Zhao, Y., Yu, K., 2018. Enhanced neutrophil autophagy and increased concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and MCP-1 in rheumatoid arthritis. *Int. Immunopharmacol.* 65, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.09.011>
- Andonian, B.J., Chou, C.-H., Ilkayeva, O.R., Koves, T.R., Connelly, M.A., Kraus, W.E., Kraus, V.B., Huffman, K.M., 2019. Plasma MicroRNAs in Established Rheumatoid Arthritis Relate to Adiposity and Altered Plasma and Skeletal Muscle Cytokine and Metabolic Profiles. *Front. Immunol.* 10, 1475. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01475>
- Armstrong, D.J., McCausland, E.M., Quinn, A.D., Wright, G.D., 2006. Obesity

- and cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 45, 782–782. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel124>
- Arnold, J.B., 2021. ggthemes: Extra Themes, Scales and Geoms for “ggplot2.”
- Backes, C., Kehl, T., Stöckel, D., Fehlmann, T., Schneider, L., Meese, E., Lenhof, H.-P., Keller, A., 2017. miRPathDB: a new dictionary on microRNAs and target pathways. *Nucleic Acids Res.* 45, D90–D96. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw926>
- Bae, S.-C., Lee, Y.H., 2018. MiR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. *Int. J. Rheum. Dis.* 21, 1335–1342. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13338>
- Barati, A., Jamshidi, A.-R., Ahmadi, H., Aghazadeh, Z., Mirshafiey, A., 2017. Effects of β -D-mannuronic acid, as a novel non-steroidal anti-inflammatory medication within immunosuppressive properties, on IL17, ROR γ t, IL4 and GATA3 gene expressions in rheumatoid arthritis patients. *Drug Des. Devel. Ther.* Volume11, 1027–1033. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S129419>
- Blüml, S., Bonelli, M., Niederreiter, B., Puchner, A., Mayr, G., Hayer, S., Koenders, M.I., van den Berg, W.B., Smolen, J., Redlich, K., 2011. Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. *Arthritis Rheum.* 63, 1281–1288. <https://doi.org/10.1002/art.30281>
- Borges, N.M., do Vale Elias, M., Fook-Alves, V.L., Andrade, T.A., de Conti, M.L., Macedo, M.P., Begnami, M.D., Campos, A.H.J.F.M., Etto, L.Y., Bortoluzzo, A.B., Alves, A.C., Young, K.H., Colleoni, G.W.B., 2016. Angiomirs expression profiling in diffuse large B-Cell lymphoma. *Oncotarget* 7, 4806–4816. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6624>
- Bott, A., Erdem, N., Lerrer, S., Hotz-Wagenblatt, A., Breunig, C., Abnaof, K.,

Wörner, A., Wilhelm, H., Münstermann, E., Ben-Baruch, A., Wiemann, S., 2017. miRNA-1246 induces pro-inflammatory responses in mesenchymal stem/stromal cells by regulating PKA and PP2A. *Oncotarget* 8, 43897–43914. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14915>

Bradfield, J.P., Vogelesang, S., Felix, J.F., Chesi, A., Helgeland, Ø., Horikoshi, M., Karhunen, V., Lowry, E., Cousminer, D.L., Ahluwalia, T.S., Thiering, E., Boh, E.T.-H., Zafarmand, M.H., Vilor-Tejedor, N., Wang, C.A., Joro, R., Chen, Z., Gauderman, W.J., Pitkänen, N., Parra, E.J., Fernandez-Rhodes, L., Alyass, A., Monnereau, C., Curtin, J.A., Have, C.T., McCormack, S.E., Hollensted, M., Frithioff-Bøjsøe, C., Valladares-Salgado, A., Peralta-Romero, J., Teo, Y.-Y., Standl, M., Leinonen, J.T., Holm, J.-C., Peters, T., Vioque, J., Vrijheid, M., Simpson, A., Custovic, A., Vaudel, M., Canouil, M., Lindi, V., Atalay, M., Kähönen, M., Raitakari, O.T., van Schaik, B.D.C., Berkowitz, R.I., Cole, S.A., Voruganti, V.S., Wang, Y., Highland, H.M., Comuzzie, A.G., Butte, N.F., Justice, A.E., Gahagan, S., Blanco, E., Lehtimäki, T., Lakka, T.A., Hebebrand, J., Bonnefond, A., Grarup, N., Froguel, P., Lyytikäinen, L.-P., Cruz, M., Kobes, S., Hanson, R.L., Zemel, B.S., Hinney, A., Teo, K.K., Meyre, D., North, K.E., Gilliland, F.D., Bisgaard, H., Bustamante, M., Bonnelykke, K., Pennell, C.E., Rivadeneira, F., Uitterlinden, A.G., Baier, L.J., Vrijkotte, T.G.M., Heinrich, J., Sørensen, T.I.A., Saw, S.-M., Pedersen, O., Hansen, T., Eriksson, J., Widén, E., McCarthy, M.I., Njølstad, P.R., Power, C., Hyppönen, E., Sebert, S., Brown, C.D., Järvelin, M.-R., Timpson, N.J., Johansson, S., Hakonarson, H., Jaddoe, V.W. V, Early Growth Genetics Consortium, Grant, S.F.A., 2019. A trans-ancestral meta-analysis of genome-wide association studies

reveals loci associated with childhood obesity. *Hum. Mol. Genet.* 28, 3327–3338. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz161>

Buniello, A., MacArthur, J.A.L., Cerezo, M., Harris, L.W., Hayhurst, J., Malangone, C., McMahon, A., Morales, J., Mountjoy, E., Sollis, E., Suveges, D., Vrousitou, O., Whetzel, P.L., Amode, R., Guillen, J.A., Riat, H.S., Trevanion, S.J., Hall, P., Junkins, H., Flicek, P., Burdett, T., Hindorff, L.A., Cunningham, F., Parkinson, H., 2019. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, D1005–D1012. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1120>

Calo, N., Ramadori, P., Sobolewski, C., Romero, Y., Maeder, C., Fournier, M., Rantakari, P., Zhang, F.-P., Poutanen, M., Dufour, J.-F., Humar, B., Nef, S., Foti, M., 2016. Stress-activated miR-21/miR-21* in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. *Gut* 65, 1871–1881. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310822>

Castaño, C., Kalko, S., Novials, A., Párrizas, M., 2018. Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 115, 12158–12163. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808855115>

Chartoumpekis, D. V., Zaravinos, A., Ziros, P.G., Iskrenova, R.P., Psyrogiannis, A.I., Kyriazopoulou, V.E., Habeos, I.G., 2012. Differential Expression of MicroRNAs in Adipose Tissue after Long-Term High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *PLoS One* 7, e34872. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034872>

- Chen, J., Zhang, J., Gao, Y., Li, Y., Feng, C., Song, C., Ning, Z., Zhou, X., Zhao, J., Feng, M., Zhang, Y., Wei, L., Pan, Q., Jiang, Y., Qian, F., Han, J., Yang, Y., Wang, Q., Li, C., 2021. LncSEA: a platform for long non-coding RNA related sets and enrichment analysis. *Nucleic Acids Res.* 49, D969–D980. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa806>
- Chen, M.-H., Raffield, L.M., Mousas, A., Sakaue, S., Huffman, J.E., Moscati, A., Trivedi, B., Jiang, T., Akbari, P., Vuckovic, D., Bao, E.L., Zhong, X., Manansala, R., Laplante, V., Chen, M., Lo, K.S., Qian, H., Lareau, C.A., Beaudoin, M., Hunt, K.A., Akiyama, M., Bartz, T.M., Ben-Shlomo, Y., Beswick, A., Bork-Jensen, J., Bottinger, E.P., Brody, J.A., van Rooij, F.J.A., Chitrala, K., Cho, K., Choquet, H., Correa, A., Danesh, J., Di Angelantonio, E., Dimou, N., Ding, J., Elliott, P., Esko, T., Evans, M.K., Floyd, J.S., Broer, L., Grarup, N., Guo, M.H., Greinacher, A., Haessler, J., Hansen, T., Howson, J.M.M., Huang, Q.Q., Huang, W., Jorgenson, E., Kacprowski, T., Kähönen, M., Kamatani, Y., Kanai, M., Karthikeyan, S., Koskeridis, F., Lange, L.A., Lehtimäki, T., Lerch, M.M., Linneberg, A., Liu, Y., Lyytikäinen, L.-P., Manichaikul, A., Martin, H.C., Matsuda, K., Mohlke, K.L., Mononen, N., Murakami, Y., Nadkarni, G.N., Nauck, M., Nikus, K., Ouwehand, W.H., Pankratz, N., Pedersen, O., Preuss, M., Psaty, B.M., Raitakari, O.T., Roberts, D.J., Rich, S.S., Rodriguez, B.A.T., Rosen, J.D., Rotter, J.I., Schubert, P., Spracklen, C.N., Surendran, P., Tang, H., Tardif, J.-C., Trembath, R.C., Ghanbari, M., Völker, U., Völzke, H., Watkins, N.A., Zonderman, A.B., VA Million Veteran Program, Wilson, P.W.F., Li, Y., Butterworth, A.S., Gauchat, J.-F., Chiang, C.W.K., Li, B., Loos, R.J.F., Astle, W.J., Evangelou, E., van Heel, D.A., Sankaran, V.G., Okada, Y.,

- Soranzo, N., Johnson, A.D., Reiner, A.P., Auer, P.L., Lettre, G., 2020. Trans-ethnic and Ancestry-Specific Blood-Cell Genetics in 746,667 Individuals from 5 Global Populations. *Cell* 182, 1198-1213.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.045>
- Chen, Y., Chen, D., Qin, Y., Qiu, C., Zhou, Y., Dai, M., Li, L., Sun, Q., Jiang, Y., 2022. TRIP13, identified as a hub gene of tumor progression, is the target of microRNA-4693-5p and a potential therapeutic target for colorectal cancer. *Cell Death Discov.* 8, 35. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00824-w>
- Chen, Y., Xian, P.-F., Yang, L., Wang, S.-X., 2016. MicroRNA-21 Promotes Proliferation of Fibroblast-Like Synoviocytes through Mediation of NF- κ B Nuclear Translocation in a Rat Model of Collagen-Induced Rheumatoid Arthritis. *Biomed Res. Int.* 2016, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/9279078>
- Chu, Y., Yao, Y., Li, X., 2021. MiR-370 enhances cell cycle and represses lipid accumulation in porcine adipocytes. *Anim. Biotechnol.* 32, 334–342. <https://doi.org/10.1080/10495398.2019.1697278>
- Coffman, F.D., 2008. Chitinase 3-Like-1 (CHI3L1): A Putative Disease Marker at the Interface of Proteomics and Glycomics. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 45, 531–562. <https://doi.org/10.1080/10408360802334743>
- Crowson, C.S., Matteson, E.L., Davis, J.M., Gabriel, S.E., 2013. Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 65, 71–77. <https://doi.org/10.1002/acr.21660>
- Cui, C., Zhang, D., Sun, K., Li, H., Xu, L., Lin, G., Guo, Y., Hu, J., Chen, J., Nong, L., Cai, Y., Yu, D., Yang, W., Wang, P., Sun, Y., 2021. Propofol maintains Th17/Treg cell balance and reduces inflammation in rats with

- traumatic brain injury via the miR-145-3p/NFATc2/NF- κ B axis. *Int. J. Mol. Med.* 48, 135. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2021.4968>
- De-Ugarte, L., Caro-Molina, E., Rodríguez-Sanz, M., García-Pérez, M.A., Olmos, J.M., Sosa-Henríquez, M., Pérez-Cano, R., Gómez-Alonso, C., Del Rio, L., Mateo-Agudo, J., Blázquez-Cabrera, J.A., González-Macías, J., Pino-Montes, J. del, Muñoz-Torres, M., Diaz-Curiel, M., Malouf, J., Cano, A., Pérez-Castrillon, J.L., Nogues, X., Garcia-Giralt, N., Diez-Perez, A., 2017. SNPs in bone-related miRNAs are associated with the osteoporotic phenotype. *Sci. Rep.* 7, 516. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00641-7>
- de Lange, K.M., Moutsianas, L., Lee, J.C., Lamb, C.A., Luo, Y., Kennedy, N.A., Jostins, L., Rice, D.L., Gutierrez-Achury, J., Ji, S.-G., Heap, G., Nimmo, E.R., Edwards, C., Henderson, P., Mowat, C., Sanderson, J., Satsangi, J., Simmons, A., Wilson, D.C., Tremelling, M., Hart, A., Mathew, C.G., Newman, W.G., Parkes, M., Lees, C.W., Uhlig, H., Hawkey, C., Prescott, N.J., Ahmad, T., Mansfield, J.C., Anderson, C.A., Barrett, J.C., 2017. Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* 49, 256–261. <https://doi.org/10.1038/ng.3760>
- Delić, D., Eisele, C., Schmid, R., Baum, P., Wiech, F., Gerl, M., Zimdahl, H., Pullen, S.S., Urquhart, R., 2016. Urinary Exosomal miRNA Signature in Type II Diabetic Nephropathy Patients. *PLoS One* 11, e0150154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150154>
- Deng, Y., Cai, L., Wang, F., Huang, J., Wang, H., Li, L., Lv, H., 2021. Upregulated microRNA-381-5p strengthens the effect of dexmedetomidine preconditioning to protect against myocardial ischemia–reperfusion injury in

- mouse models by inhibiting CHI3L1. *Int. Immunopharmacol.* 92, 107326.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107326>
- Divoux, A., Karastergiou, K., Xie, H., Guo, W., Perera, R.J., Fried, S.K., Smith, S.R., 2014. Identification of a novel lncRNA in gluteal adipose tissue and evidence for its positive effect on preadipocyte differentiation. *Obesity* 22, 1781–1785. <https://doi.org/10.1002/oby.20793>
- Doumatey, A.P., Xu, H., Huang, H., Trivedi, N.S., Lei, L., Elkahoul, A., Adeyemo, A., Rotimi, C.N., 2015. Global Gene Expression Profiling in Omental Adipose Tissue of Morbidly Obese Diabetic African Americans. *J. Endocrinol. Metab.* 5, 199–210. <https://doi.org/10.14740/jem286w>
- Elmesmari, A., Fraser, A.R., Wood, C., Gilchrist, D., Vaughan, D., Stewart, L., McSharry, C., McInnes, I.B., Kurowska-Stolarska, M., 2016. MicroRNA-155 regulates monocyte chemokine and chemokine receptor expression in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology* 55, 2056–2065.
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kew272>
- Eser, B., Sahin, N., 2016. Evaluation of toll-like receptor-2 and 4 and interleukin-6 gene expressions in Turkish rheumatoid arthritis patients. *Clin. Rheumatol.* 35, 2693–2697. <https://doi.org/10.1007/s10067-016-3282-1>
- Eyre, S., Bowes, J., Diogo, D., Lee, A., Barton, A., Martin, P., Zhernakova, A., Stahl, E., Viatte, S., McAllister, K., Amos, C.I., Padyukov, L., Toes, R.E.M., Huizinga, T.W.J., Wijmenga, C., Trynka, G., Franke, L., Westra, H.-J., Alfredsson, L., Hu, X., Sandor, C., de Bakker, P.I.W., Davila, S., Khor, C.C., Heng, K.K., Andrews, R., Edkins, S., Hunt, S.E., Langford, C., Symmons, D., Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate, Wellcome Trust Case Control Consortium, Concannon,

- P., Onengut-Gumuscu, S., Rich, S.S., Deloukas, P., Gonzalez-Gay, M.A., Rodriguez-Rodriguez, L., Ärletig, L., Martin, J., Rantapää-Dahlqvist, S., Plenge, R.M., Raychaudhuri, S., Klareskog, L., Gregersen, P.K., Worthington, J., 2012. High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 44, 1336–40. <https://doi.org/10.1038/ng.2462>
- Farré, P.L., Scalise, G.D., Duca, R.B., Dalton, G.N., Massillo, C., Porretti, J., Graña, K., Gardner, K., De Luca, P., De Siervi, A., 2018. CTBP1 and metabolic syndrome induce an mRNA and miRNA expression profile critical for breast cancer progression and metastasis. *Oncotarget* 9, 13848–13858. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24486>
- Ferguson, L.D., Siebert, S., McInnes, I.B., Sattar, N., 2019. Cardiometabolic comorbidities in RA and PsA: lessons learned and future directions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 15, 461–474. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0256-0>
- Francavilla, A., Gagliardi, A., Piaggieschi, G., Tarallo, S., Cordero, F., Pensa, R.G., Impeduglia, A., Caviglia, G.P., Ribaldone, D.G., Gallo, G., Grioni, S., Ferrero, G., Pardini, B., Naccarati, A., 2021. Faecal miRNA profiles associated with age, sex, BMI, and lifestyle habits in healthy individuals. *Sci. Rep.* 11, 20645. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00014-1>
- Franke, A., McGovern, D.P.B., Barrett, J.C., Wang, K., Radford-Smith, G.L., Ahmad, T., Lees, C.W., Balschun, T., Lee, J., Roberts, R., Anderson, C.A., Bis, J.C., Bumpstead, S., Ellinghaus, D., Festen, E.M., Georges, M., Green, T., Haritunians, T., Jostins, L., Latiano, A., Mathew, C.G., Montgomery, G.W., Prescott, N.J., Raychaudhuri, S., Rotter, J.I., Schumm, P., Sharma, Y., Simms, L.A., Taylor, K.D., Whiteman, D., Wijmenga, C.,

- Baldassano, R.N., Barclay, M., Bayless, T.M., Brand, S., Büning, C., Cohen, A., Colombel, J.-F., Cottone, M., Stronati, L., Denson, T., De Vos, M., D’Inca, R., Dubinsky, M., Edwards, C., Florin, T., Franchimont, D., Gearry, R., Glas, J., Van Gossum, A., Guthery, S.L., Halfvarson, J., Verspaget, H.W., Hugot, J.-P., Karban, A., Laukens, D., Lawrance, I., Lemann, M., Levine, A., Libioulle, C., Louis, E., Mowat, C., Newman, W., Panés, J., Phillips, A., Proctor, D.D., Regueiro, M., Russell, R., Rutgeerts, P., Sanderson, J., Sans, M., Seibold, F., Steinhart, A.H., Stokkers, P.C.F., Torkvist, L., Kullak-Ublick, G., Wilson, D., Walters, T., Targan, S.R., Brant, S.R., Rioux, J.D., D’Amato, M., Weersma, R.K., Kugathasan, S., Griffiths, A.M., Mansfield, J.C., Vermeire, S., Duerr, R.H., Silverberg, M.S., Satsangi, J., Schreiber, S., Cho, J.H., Annesse, V., Hakonarson, H., Daly, M.J., Parkes, M., 2010. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn’s disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* 42, 1118–25. <https://doi.org/10.1038/ng.717>
- Fu, K., Zhang, K., Zhang, X., 2022. LncRNA HOTAIR facilitates proliferation and represses apoptosis of retinoblastoma cells through the miR-20b-5p/RRM2/PI3K/AKT axis. *Orphanet J. Rare Dis.* 17, 119. <https://doi.org/10.1186/s13023-022-02206-y>
- Fujimoto, A., Furuta, M., Totoki, Y., Tsunoda, T., Kato, M., Shiraishi, Y., Tanaka, H., Taniguchi, H., Kawakami, Y., Ueno, M., Gotoh, K., Ariizumi, S., Wardell, C.P., Hayami, S., Nakamura, T., Aikata, H., Arihiro, K., Boroevich, K.A., Abe, T., Nakano, K., Maejima, K., Sasaki-Oku, A., Ohsawa, A., Shibuya, T., Nakamura, H., Hama, N., Hosoda, F., Arai, Y., Ohashi, S., Urushidate, T., Nagae, G., Yamamoto, S., Ueda, H., Tatsuno, K., Ojima,

- H., Hiraoka, N., Okusaka, T., Kubo, M., Marubashi, S., Yamada, T., Hirano, S., Yamamoto, M., Ohdan, H., Shimada, K., Ishikawa, O., Yamaue, H., Chayama, K., Miyano, S., Aburatani, H., Shibata, T., Nakagawa, H., 2016. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. *Nat. Genet.* 48, 500–509.
<https://doi.org/10.1038/ng.3547>
- Gaudet, A.D., Fonken, L.K., Gushchina, L. V., Aubrecht, T.G., Maurya, S.K., Periasamy, M., Nelson, R.J., Popovich, P.G., 2016. miR-155 Deletion in Female Mice Prevents Diet-Induced Obesity. *Sci. Rep.* 6, 22862.
<https://doi.org/10.1038/srep22862>
- Gebert, L.F.R., MacRae, I.J., 2019. Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 21–37. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>
- Gibbons, H.R., Shaginurova, G., Kim, L.C., Chapman, N., Spurlock, C.F., Aune, T.M., 2018. Divergent lncRNA GATA3-AS1 Regulates GATA3 Transcription in T-Helper 2 Cells. *Front. Immunol.* 9.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02512>
- Gremese, E., Carletto, A., Padovan, M., Atzeni, F., Raffener, B., Giardina, A.R., Favalli, E.G., Erre, G.L., Gorla, R., Galeazzi, M., Foti, R., Cantini, F., Salvarani, C., Olivieri, I., Lapadula, G., Ferraccioli, G., 2013. Obesity and reduction of the response rate to anti-tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis: An approach to a personalized medicine. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 65, 94–100. <https://doi.org/10.1002/acr.21768>
- Guggino, G., Orlando, V., Saieva, L., Ruscitti, P., Cipriani, P., La Manna, M.P., Giacomelli, R., Alessandro, R., Triolo, G., Ciccia, F., Dieli, F., Caccamo, N.,

2018. Downregulation of miRNA17–92 cluster marks V γ 9V δ 2 T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 20, 236.
<https://doi.org/10.1186/s13075-018-1740-7>
- Guo, J., Dou, D., Zhang, T., Wang, B., 2020. HOTAIR Promotes Cisplatin Resistance of Osteosarcoma Cells by Regulating Cell Proliferation, Invasion, and Apoptosis via miR-106a-5p/STAT3 Axis. *Cell Transplant.* 29, 096368972094844. <https://doi.org/10.1177/0963689720948447>
- Gutierrez-Achury, J., Zorro, M.M., Ricaño-Ponce, I., Zhernakova, D. V, Coeliac Disease Immunochip Consortium, R.C., Diogo, D., Raychaudhuri, S., Franke, L., Trynka, G., Wijmenga, C., Zhernakova, A., 2016. Functional implications of disease-specific variants in loci jointly associated with coeliac disease and rheumatoid arthritis. *Hum. Mol. Genet.* 25, 180–90.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddv455>
- Ha, E., Bae, S.-C., Kim, K., 2021. Large-scale meta-analysis across East Asian and European populations updated genetic architecture and variant-driven biology of rheumatoid arthritis, identifying 11 novel susceptibility loci. *Ann. Rheum. Dis.* 80, 558–565. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-219065>
- Hong, Z., Hong, H., Liu, J., Zheng, X., Huang, M., Li, C., Xia, J., 2015. miR-106a Is Downregulated in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Chronic Hepatitis B and Associated with Enhanced Levels of Interleukin-8. *Mediators Inflamm.* 2015, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2015/629862>
- Huang, Y., Du, K.L., Guo, P.Y., Zhao, R.M., Wang, B., Zhao, X.L., Zhang, C.Q., 2019. IL-16 regulates macrophage polarization as a target gene of mir-145-3p. *Mol. Immunol.* 107, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.027>

Jawaheer, D., Olsen, J., Lahiff, M., Forsberg, S., Lähteenmäki, J., da Silveira, I.G., Rocha, F.A., Magalhães Laurindo, I.M., Henrique da Mota, L.M., Drosos, A.A., Murphy, E., Sheehy, C., Quirke, E., Cutolo, M., Rexhepi, S., Dadonienė, J., Verstappen, S.M.M., Sokka, T., QUEST-RA, 2010. Gender, body mass index and rheumatoid arthritis disease activity: results from the QUEST-RA Study. *Clin. Exp. Rheumatol.* 28, 454–61.

Jawaid, W., 2021. enrichR: Provides an R Interface to “Enrichr.”

Jia, J., Zhang, X., Zhan, D., Li, J., Li, Z., Li, H., Qian, J., 2019. LncRNA H19 interacted with miR-130a-3p and miR-17-5p to modify radio-resistance and chemo-sensitivity of cardiac carcinoma cells. *Cancer Med.* 8, 1604–1618. <https://doi.org/10.1002/cam4.1860>

Jiang, B., Xue, M., Xu, D., Song, J., Zhu, S., 2020. Down-regulated lncRNA HOTAIR alleviates polycystic ovaries syndrome in rats by reducing expression of insulin-like growth factor 1 via microRNA-130a. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 451–464. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14753>

Jiang, Y., Qiao, Z., Jiang, J., Zhang, J., 2021. LINC00958 promotes endometrial cancer cell proliferation and metastasis by regulating the miR-145-3p/TCF4 axis. *J. Gene Med.* 23. <https://doi.org/10.1002/jgm.3345>

Jin, Y., Andersen, G., Yorgov, D., Ferrara, T.M., Ben, S., Brownson, K.M., Holland, P.J., Birlea, S.A., Siebert, J., Hartmann, A., Lienert, A., van Geel, N., Lambert, J., Luiten, R.M., Wolkerstorfer, A., Wietze van der Veen, J.P., Bennett, D.C., Taïeb, A., Ezzedine, K., Kemp, E.H., Gawkrödger, D.J., Weetman, A.P., Köks, S., Prans, E., Kingo, K., Karelson, M., Wallace, M.R., McCormack, W.T., Overbeck, A., Moretti, S., Colucci, R., Picardo, M., Silverberg, N.B., Olsson, M., Valle, Y., Korobko, I., Böhm, M., Lim, H.W.,

- Hamzavi, I., Zhou, L., Mi, Q.-S., Fain, P.R., Santorico, S.A., Spritz, R.A., 2016. Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. *Nat. Genet.* 48, 1418–1424. <https://doi.org/10.1038/ng.3680>
- Jordan, S.D., Krüger, M., Willmes, D.M., Redemann, N., Wunderlich, F.T., Brönneke, H.S., Merkwirth, C., Kashkar, H., Olkkonen, V.M., Böttger, T., Braun, T., Seibler, J., Brüning, J.C., 2011. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat. Cell Biol.* 13, 434–446. <https://doi.org/10.1038/ncb2211>
- Karkeni, E., Astier, J., Tourniaire, F., El Abed, M., Romier, B., Gouranton, E., Wan, L., Borel, P., Salles, J., Walrand, S., Ye, J., Landrier, J.-F., 2016. Obesity-associated Inflammation Induces microRNA-155 Expression in Adipocytes and Adipose Tissue: Outcome on Adipocyte Function. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 1615–1626. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-3410>
- Kehl, T., Kern, F., Backes, C., Fehlmann, T., Stöckel, D., Meese, E., Lenhof, H.-P., Keller, A., 2020. miRPathDB 2.0: a novel release of the miRNA Pathway Dictionary Database. *Nucleic Acids Res.* 48, D142–D147. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1022>
- Keller, P., Gburcik, V., Petrovic, N., Gallagher, I.J., Nedergaard, J., Cannon, B., Timmons, J.A., 2011. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocr. Disord.* 11, 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6823-11-7>
- Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V.,

- Thompson, P., Chen, P., Fox, D.A., Pennathur, S., Kaplan, M.J., 2013. NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. *Sci. Transl. Med.* 5, 178ra40-178ra40. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005580>
- Kim, B.-H., Hong, S.W., Kim, A., Choi, S.H., Yoon, S.O., 2013. Prognostic implications for high expression of oncogenic microRNAs in advanced gastric carcinoma. *J. Surg. Oncol.* 107, 505–510. <https://doi.org/10.1002/jso.23271>
- Kim, K., Bang, S.-Y., Lee, H.-S., Cho, S.-K., Choi, C.-B., Sung, Y.-K., Kim, T.-H., Jun, J.-B., Yoo, D.H., Kang, Y.M., Kim, S.-K., Suh, C.-H., Shim, S.-C., Lee, S.-S., Lee, J.J.-Y., Chung, W.T., Choe, J.-Y., Shin, H.D., Lee, J.J.-Y., Han, B.-G., Nath, S.K., Eyre, S., Bowes, J., Pappas, D.A., Kremer, J.M., Gonzalez-Gay, M.A., Rodriguez-Rodriguez, L., Ärlestig, L., Okada, Y., Diogo, D., Liao, K.P., Karlson, E.W., Raychaudhuri, S., Rantapää-Dahlqvist, S., Martin, J., Klareskog, L., Padyukov, L., Gregersen, P.K., Worthington, J., Greenberg, J.D., Plenge, R.M., Bae, S.-C., 2015. High-density genotyping of immune loci in Koreans and Europeans identifies eight new rheumatoid arthritis risk loci. *Ann. Rheum. Dis.* 74, e13. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204749>
- Kim, S.-J., Choi, Y., Choi, Y.-H., Park, T., 2012. Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. *J. Nutr. Biochem.* 23, 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.10.012>
- Klaasen, R., Wijbrandts, C.A., Gerlag, D.M., Tak, P.P., 2011. Body mass index and clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*

63, 359–64. <https://doi.org/10.1002/art.30136>

- Kochi, Y., Okada, Y., Suzuki, A., Ikari, K., Terao, C., Takahashi, A., Yamazaki, K., Hosono, N., Myouzen, K., Tsunoda, T., Kamatani, N., Furuichi, T., Ikegawa, S., Ohmura, K., Mimori, T., Matsuda, F., Iwamoto, T., Momohara, S., Yamanaka, H., Yamada, R., Kubo, M., Nakamura, Y., Yamamoto, K., 2010. A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. *Nat. Genet.* 42, 515–9. <https://doi.org/10.1038/ng.583>
- Krupić, F., Čustović, S., Jašarević, M., Šadić, S., Fazlić, M., Grbic, K., Samuelsson, K., 2019. Ethnic differences in the perception of pain: a systematic review of qualitative and quantitative research. *Med. Glas. (Zenica)*. 16, 108–114. <https://doi.org/10.17392/966-19>
- Kuleshov, M. V., Jones, M.R., Rouillard, A.D., Fernandez, N.F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S.L., Jagodnik, K.M., Lachmann, A., McDermott, M.G., Monteiro, C.D., Gundersen, G.W., Ma'ayan, A., 2016. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* 44, W90–W97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>
- Kurowska-Stolarska, M., Alivernini, S., Ballantine, L.E., Asquith, D.L., Millar, N.L., Gilchrist, D.S., Reilly, J., Ierna, M., Fraser, A.R., Stolarski, B., McSharry, C., Hueber, A.J., Baxter, D., Hunter, J., Gay, S., Liew, F.Y., McInnes, I.B., 2011. MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 11193–11198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019536108>
- Labitigan, M., Bahçe-Altuntas, A., Kremer, J.M., Reed, G., Greenberg, J.D., Jordan, N., Putterman, C., Broder, A., 2014. Higher Rates and Clustering of

- Abnormal Lipids, Obesity, and Diabetes Mellitus in Psoriatic Arthritis Compared With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res. (Hoboken)*. 66, 600–607. <https://doi.org/10.1002/acr.22185>
- Laufer, V.A., Tiwari, H.K., Reynolds, R.J., Danila, M.I., Wang, J., Edberg, J.C., Kimberly, R.P., Kottyan, L.C., Harley, J.B., Mikuls, T.R., Gregersen, P.K., Absher, D.M., Langefeld, C.D., Arnett, D.K., Bridges, S.L., 2019. Genetic influences on susceptibility to rheumatoid arthritis in African-Americans. *Hum. Mol. Genet.* 28, 858–874. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy395>
- Lee, W.S., Yasuda, S., Kono, Michihiro, Kudo, Y., Shimamura, S., Kono, Michihito, Fujieda, Y., Kato, M., Oku, K., Shimizu, T., Onodera, T., Iwasaki, N., Atsumi, T., 2020. MicroRNA-9 ameliorates destructive arthritis through down-regulation of NF- κ B1-RANKL pathway in fibroblast-like synoviocytes. *Clin. Immunol.* 212, 108348. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108348>
- Li, C., Jiang, J.-Y., Wang, J.-M., Sun, J., An, M.-X., Li, S., Yan, J., Wang, H.-Q., 2018. BAG3 regulates stability of IL-8 mRNA via interplay between HuR and miR-4312 in PDACs. *Cell Death Dis.* 9, 863. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0874-5>
- Li, H., Liu, P., Gong, Y., Liu, J., Ruan, F., 2019. Expression and function of miR-155 in rat synovial fibroblast model of rheumatoid arthritis. *Exp. Ther. Med.* <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7581>
- Li, J., Quan, X., Chen, G., Hong, J., Wang, Q., Xu, L., Wang, B., Yu, Z., Yu, H.-M., 2020. PFOS-induced placental cell growth inhibition is partially mediated by lncRNA H19 through interacting with miR-19a and miR-19b. *Chemosphere* 261, 127640. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127640>

- Li, J., Wan, Y., Guo, Q., Zou, L., Zhang, Jinyu, Fang, Y., Zhang, Jingbo, Zhang, Jinjun, Fu, X., Liu, H., Lu, L., Wu, Y., 2010. Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4⁺ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R81.
<https://doi.org/10.1186/ar3006>
- Li, M., Ding, X., Zhang, Y., Li, X., Zhou, H., Yang, L., Li, Y., Yang, P., Zhang, X., Hu, J., Nice, E., Wu, H., Xu, H., 2020. Antisense oligonucleotides targeting lncRNA AC104041.1 induces antitumor activity through Wnt2B/ β -catenin pathway in head and neck squamous cell carcinomas. *Cell Death Dis.* 11, 672. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02820-3>
- Li, M., Guo, Y., Wang, X.-J., Duan, B.-H., Li, L., 2018. HOTAIR participates in hepatic insulin resistance via regulating SIRT1. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 7883–7890. https://doi.org/10.26355/eurrev_201811_16414
- Li, S., Shuch, B.M., Gerstein, M.B., 2017. Whole-genome analysis of papillary kidney cancer finds significant noncoding alterations. *PLOS Genet.* 13, e1006685. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006685>
- Li, Y.R., Li, J., Zhao, S.D., Bradfield, J.P., Mentch, F.D., Maggadottir, S.M., Hou, C., Abrams, D.J., Chang, D., Gao, F., Guo, Y., Wei, Z., Connolly, J.J., Cardinale, C.J., Bakay, M., Glessner, J.T., Li, D., Kao, C., Thomas, K.A., Qiu, H., Chiavacci, R.M., Kim, C.E., Wang, F., Snyder, J., Richie, M.D., Flatø, B., Førre, Ø., Denson, L.A., Thompson, S.D., Becker, M.L., Guthery, S.L., Latiano, A., Perez, E., Resnick, E., Russell, R.K., Wilson, D.C., Silverberg, M.S., Annese, V., Lie, B.A., Punaro, M., Dubinsky, M.C., Monos, D.S., Strisciuglio, C., Staiano, A., Miele, E., Kugathasan, S., Ellis, J.A., Munro, J.E., Sullivan, K.E., Wise, C.A., Chapel, H., Cunningham-

- Rundles, C., Grant, S.F.A., Orange, J.S., Sleiman, P.M.A., Behrens, E.M., Griffiths, A.M., Satsangi, J., Finkel, T.H., Keinan, A., Prak, E.T.L., Polychronakos, C., Baldassano, R.N., Li, H., Keating, B.J., Hakonarson, H., 2015. Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases. *Nat. Med.* 21, 1018–27.
<https://doi.org/10.1038/nm.3933>
- Liang, Y., Song, X., Li, Y., Ma, T., Su, P., Guo, R., Chen, B., Zhang, H., Sang, Y., Liu, Y., Duan, Y., Zhang, N., Li, X., Zhao, W., Wang, L., Yang, Q., 2019. Targeting the circBMP2/miR-553/USP4 Axis as a Potent Therapeutic Approach for Breast Cancer. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 17, 347–361.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.05.005>
- Liu, C., Deng, Z., Du, E., Xu, C., 2018. Long non-coding RNA BC168687 small interfering RNA reduces high glucose and high free fatty acid-induced expression of P2X7 receptors in satellite glial cells. *Mol. Med. Rep.*
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8601>
- Liu, J.Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S.C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J.C., Jostins, L., Shah, T., Abadian, S., Cheon, J.H., Cho, J., Dayani, N.E., Franke, L., Fuyuno, Y., Hart, A., Juyal, R.C., Juyal, G., Kim, W.H., Morris, A.P., Poustchi, H., Newman, W.G., Midha, V., Orchard, T.R., Vahedi, H., Sood, A., Sung, J.Y., Malekzadeh, R., Westra, H.-J., Yamazaki, K., Yang, S.-K., International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, International IBD Genetics Consortium, Barrett, J.C., Alizadeh, B.Z., Parkes, M., Bk, T., Daly, M.J., Kubo, M., Anderson, C.A., Weersma, R.K., 2015. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across

- populations. *Nat. Genet.* 47, 979–986. <https://doi.org/10.1038/ng.3359>
- Liu, S., Xie, F., Xiang, X., Liu, Sinan, Dong, S., Qu, K., Lin, T., 2017. Identification of differentially expressed genes, lncRNAs and miRNAs which are associated with tumor malignant phenotypes in hepatoblastoma patients. *Oncotarget* 8, 97554–97564. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22181>
- Liu, W., Ma, C., Yang, B., Yin, C., Zhang, B., Xiao, Y., 2017. LncRNA Gm15290 sponges miR-27b to promote PPAR γ -induced fat deposition and contribute to body weight gain in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 493, 1168–1175. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.114>
- Liu, X., Ni, S., Li, C., Xu, N., Chen, W., Wu, M., van Wijnen, A.J., Wang, Y., 2019. Circulating microRNA-23b as a new biomarker for rheumatoid arthritis. *Gene* 712, 143911. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.06.001>
- Ljung, L., Rantapää-Dahlqvist, S., 2016. Abdominal obesity, gender and the risk of rheumatoid arthritis – a nested case–control study. *Arthritis Res. Ther.* 18, 277. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1171-2>
- Lorenz, R., Bernhart, S.H., Höner zu Siederdissen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P.F., Hofacker, I.L., 2011. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol. Biol.* 6, 26. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>
- Losin, E.A.R., Woo, C.-W., Medina, N.A., Andrews-Hanna, J.R., Eisenbarth, H., Wager, T.D., 2020. Neural and sociocultural mediators of ethnic differences in pain. *Nat. Hum. Behav.* 4, 517–530. <https://doi.org/10.1038/s41562-020-0819-8>
- Lu, X., Bai, D., Liu, X., Zhou, C., Yang, G., 2017. Sedentary lifestyle related exosomal release of Hotair from gluteal-femoral fat promotes intestinal cell

- proliferation. *Sci. Rep.* 7, 45648. <https://doi.org/10.1038/srep45648>
- Mahdi, T., Hänzelmann, S., Salehi, A., Muhammed, S.J., Reinbothe, T.M., Tang, Y., Axelsson, A.S., Zhou, Y., Jing, X., Almgren, P., Krus, U., Taneera, J., Blom, A.M., Lyssenko, V., Esguerra, J.L.S., Hansson, O., Eliasson, L., Derry, J., Zhang, E., Wollheim, C.B., Groop, L., Renström, E., Rosengren, A.H., 2012. Secreted Frizzled-Related Protein 4 Reduces Insulin Secretion and Is Overexpressed in Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* 16, 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.10.009>
- Masliah-Planchon, J., Pasmant, E., Luscan, A., Laurendeau, I., Ortonne, N., Hivelin, M., Varin, J., Valeyrie-Allanore, L., Dumaine, V., Lantieri, L., Leroy, K., Parfait, B., Wolkenstein, P., Vidaud, M., Vidaud, D., Bièche, I., 2013. MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: evidences of PTEN pathway alterations in early NF1 tumorigenesis. *BMC Genomics* 14, 473. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-473>
- Mazza, T., Gioffreda, D., Fontana, A., Biagini, T., Carella, M., Palumbo, O., Maiello, E., Bazzocchi, F., Andriulli, A., Tavano, F., 2020. Clinical Significance of Circulating miR-1273g-3p and miR-122-5p in Pancreatic Cancer. *Front. Oncol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00044>
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., Mattick, J.S., 2009. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10, 155–159. <https://doi.org/10.1038/nrg2521>
- Miao, Y.-R., Liu, W., Zhang, Q., Guo, A.-Y., 2018. IncRNASNP2: an updated database of functional SNPs and mutations in human and mouse lncRNAs. *Nucleic Acids Res.* 46, D276–D280. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1004>

- Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K.-F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstråle, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M.J., Patterson, N., Mesirov, J.P., Golub, T.R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E.S., Hirschhorn, J.N., Altshuler, D., Groop, L.C., 2003. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267–273. <https://doi.org/10.1038/ng1180>
- Mousavi, M.J., Karami, J., Aslani, S., Tahmasebi, M.N., Vaziri, A.S., Jamshidi, A., Farhadi, E., Mahmoudi, M., 2021. Transformation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis; from a friend to foe. *Autoimmun. Highlights* 12, 3. <https://doi.org/10.1186/s13317-020-00145-x>
- Moustafa, A.A., Ziada, M., Elshaikh, A., Datta, A., Kim, H., Moroz, K., Srivastav, S., Thomas, R., Silberstein, J.L., Moparty, K., Salem, F.E.H., El-Habit, O.H., Abdel-Mageed, A.B., 2017. Identification of microRNA signature and potential pathway targets in prostate cancer. *Exp. Biol. Med.* 242, 536–546. <https://doi.org/10.1177/1535370216681554>
- Muley, A., Majumder, S., Kolluru, G.K., Parkinson, S., Viola, H., Hool, L., Arfuso, F., Ganss, R., Dharmarajan, A., Chatterjee, S., 2010. Secreted Frizzled-Related Protein 4. *Am. J. Pathol.* 176, 1505–1516. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090465>
- Munz, M., Tönnies, S., Balke, W.-T., Simon, E., 2015. Multidimensional gene search with Genehopper. *Nucleic Acids Res.* 43, W98–W103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv511>
- Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., Asahara, H., 2008. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis

synovial tissue. *Arthritis Rheum.* 58, 1284–1292.

<https://doi.org/10.1002/art.23429>

Naranjo, A., Sokka, T., Descalzo, M.A., Calvo-Alen, J., Horslev-Petersen, K., Luukkainen, R.K., Combe, B., Burmester, G.R., Devlin, J., Ferraccioli, G., Morelli, A., Hoekstra, M., Majdan, M., Sadkiewicz, S., Belmonte, M., Holmqvist, A.-C., Choy, E., Tunc, R., Dimic, A., Bergman, M., Toloza, S., Pincus, T., 2008. Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. *Arthritis Res. Ther.* 10, R30.
<https://doi.org/10.1186/ar2383>

Nuermairaiti, N., Liu, J., Liang, X., Jiao, Y., Zhang, D., Liu, L., Meng, X., Guan, Y., 2018. Effect of lncRNA HOXA11-AS1 on adipocyte differentiation in human adipose-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 1878–1884. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.006>

Nunez Lopez, Y.O., Garufi, G., Pasarica, M., Seyhan, A.A., 2018. Elevated and Correlated Expressions of miR-24, miR-30d, miR-146a, and SFRP-4 in Human Abdominal Adipose Tissue Play a Role in Adiposity and Insulin Resistance. *Int. J. Endocrinol.* 2018, 1–7.
<https://doi.org/10.1155/2018/7351902>

Okada, Y., Wu, D., Trynka, G., Raj, T., Terao, C., Ikari, K., Kochi, Y., Ohmura, K., Suzuki, A., Yoshida, S., Graham, R.R., Manoharan, A., Ortmann, W., Bhangale, T., Denny, J.C., Carroll, R.J., Eyler, A.E., Greenberg, J.D., Kremer, J.M., Pappas, D.A., Jiang, L., Yin, J., Ye, L., Su, D.-F., Yang, J., Xie, G., Keystone, E., Westra, H.-J., Esko, T., Metspalu, A., Zhou, X., Gupta, N., Mirel, D., Stahl, E.A., Diogo, D., Cui, J., Liao, K., Guo, M.H., Myouzen, K., Kawaguchi, T., Coenen, M.J.H., van Riel, P.L.C.M., van de

- Laar, M.A.F.J., Guchelaar, H.-J., Huizinga, T.W.J., Dieudé, P., Mariette, X., Louis Bridges Jr, S., Zhernakova, A., Toes, R.E.M., Tak, P.P., Miceli-Richard, C., Bang, S.-Y., Lee, H.-S., Martin, J., Gonzalez-Gay, M.A., Rodriguez-Rodriguez, L., Rantapää-Dahlqvist, S., Ärlestig, L., Choi, H.K., Kamatani, Y., Galan, P., Lathrop, M., Eyre, S., Bowes, J., Barton, A., de Vries, N., Moreland, L.W., Criswell, L.A., Karlson, E.W., Taniguchi, A., Yamada, R., Kubo, M., Liu, J.S., Bae, S.-C., Worthington, J., Padyukov, L., Klareskog, L., Gregersen, P.K., Raychaudhuri, S., Stranger, B.E., De Jager, P.L., Franke, L., Visscher, P.M., Brown, M.A., Yamanaka, H., Mimori, T., Takahashi, A., Xu, H., Behrens, T.W., Siminovitch, K.A., Momohara, S., Matsuda, F., Yamamoto, K., Plenge, R.M., 2014. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* 506, 376–381. <https://doi.org/10.1038/nature12873>
- Ormseth, M.J., Solus, J.F., Vickers, K.C., Oeser, A.M., Raggi, P., Stein, C.M., 2015. Utility of Select Plasma MicroRNA for Disease and Cardiovascular Risk Assessment in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 42, 1746–1751. <https://doi.org/10.3899/jrheum.150232>
- Pan, S., Yang, X., Jia, Y., Li, R., Zhao, R., 2014. Microvesicle-Shuttled miR-130b Reduces Fat Deposition in Recipient Primary Cultured Porcine Adipocytes by Inhibiting PPAR- γ Expression. *J. Cell. Physiol.* 229, 631–639. <https://doi.org/10.1002/jcp.24486>
- Pan, W., Liu, L., Wei, J., Ge, Y., Zhang, J., Chen, H., Zhou, L., Yuan, Q., Zhou, C., Yang, M., 2016a. A functional lncRNA HOTAIR genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility. *Mol. Carcinog.* 55, 90–96. <https://doi.org/10.1002/mc.22261>

- Pan, W., Zhou, L., Ge, M., Zhang, B., Yang, X., Xiong, X., Fu, G., Zhang, J., Nie, X., Li, H., Tang, X., Wei, J., Shao, M., Zheng, J., Yuan, Q., Tan, W., Wu, C., Yang, M., Lin, D., 2016b. Whole exome sequencing identifies lncRNA GAS8-AS1 and LPAR4 as novel papillary thyroid carcinoma driver alternations. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1875–1884.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw056>
- Pascut, D., Tamini, S., Bresolin, S., Giraudi, P., Basso, G., Minocci, A., Tiribelli, C., Grugni, G., Sartorio, A., 2018. Differences in circulating microRNA signature in Prader–Willi syndrome and non-syndromic obesity. *Endocr. Connect.* 7, 1262–1274. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0329>
- Philippe, L., Alsaleh, G., Suffert, G., Meyer, A., Georgel, P., Sibilia, J., Wachsmann, D., Pfeffer, S., 2012. TLR2 Expression Is Regulated by MicroRNA miR-19 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes. *J. Immunol.* 188, 454–461. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102348>
- Pidíková, P., Herichová, I., 2021. miRNA Clusters with Up-Regulated Expression in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 13, 2979.
<https://doi.org/10.3390/cancers13122979>
- Qi, K., Lin, R., Xue, C., Liu, T., Wang, Y., Zhang, Y., Li, J., 2019. Long Non-Coding RNA (LncRNA) CAIF is Downregulated in Osteoarthritis and Inhibits LPS-Induced Interleukin 6 (IL-6) Upregulation by Downregulation of MiR-1246. *Med. Sci. Monit.* 25, 8019–8024.
<https://doi.org/10.12659/MSM.917135>
- R Core Team, 2021. R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rajasekhar, M., Olsson, A.M., Steel, K.J.A., Georgouli, M., Ranasinghe, U., Brender Read, C., Frederiksen, K.S., Taams, L.S., 2017. MicroRNA-155

contributes to enhanced resistance to apoptosis in monocytes from patients with rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* 79, 53–62.

<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.01.002>

Rask-Andersen, M., Karlsson, T., Ek, W.E., Johansson, Å., 2019. Genome-wide association study of body fat distribution identifies adiposity loci and sex-specific genetic effects. *Nat. Commun.* 10, 339.

<https://doi.org/10.1038/s41467-018-08000-4>

Raychaudhuri, S., Remmers, E.F., Lee, A.T., Hackett, R., Guiducci, C., Burtt, N.P., Gianniny, L., Korman, B.D., Padyukov, L., Kurreeman, F.A.S., Chang, M., Catanese, J.J., Ding, B., Wong, S., van der Helm-van Mil, A.H.M., Neale, B.M., Coblyn, J., Cui, J., Tak, P.P., Wolbink, G.J., Crusius, J.B.A., van der Horst-Bruinsma, I.E., Criswell, L.A., Amos, C.I., Seldin, M.F., Kastner, D.L., Ardlie, K.G., Alfredsson, L., Costenbader, K.H., Altshuler, D., Huizinga, T.W.J., Shadick, N.A., Weinblatt, M.E., de Vries, N., Worthington, J., Seielstad, M., Toes, R.E.M., Karlson, E.W., Begovich, A.B., Klareskog, L., Gregersen, P.K., Daly, M.J., Plenge, R.M., 2008. Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 40, 1216–23. <https://doi.org/10.1038/ng.233>

Rezaeepoor, M., Pourjafar, M., Tahamoli-Roudsari, A., Basiri, Z., Hajilooi, M., Solgi, G., 2020. Altered expression of microRNAs may predict therapeutic response in rheumatoid arthritis patients. *Int. Immunopharmacol.* 83, 106404. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106404>

Saad, M.N., Mabrouk, M.S., Eldeib, A.M., Shaker, O.G., 2019. Studying the effects of haplotype partitioning methods on the RA-associated genomic results from the North American Rheumatoid Arthritis Consortium (NARAC)

dataset. *J. Adv. Res.* 18, 113–126.

<https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.01.006>

Sacre, S., Lo, A., Gregory, B., Stephens, M., Chamberlain, G., Stott, P., Brennan, F., 2016. Oligodeoxynucleotide inhibition of Toll-like receptors 3, 7, 8, and 9 suppresses cytokine production in a human rheumatoid arthritis model. *Eur. J. Immunol.* 46, 772–781.

<https://doi.org/10.1002/eji.201546123>

Salviano-Silva, A., Lobo-Alves, S., Almeida, R., Malheiros, D., Petzl-Erler, M., 2018. Besides Pathology: Long Non-Coding RNA in Cell and Tissue Homeostasis. *Non-Coding RNA* 4, 3. <https://doi.org/10.3390/ncrna4010003>

Schauberger, P., Walker, A., 2020. openxlsx: Read, Write and Edit xlsx Files.

Schmidt, E., Dhaouadi, I., Gaziano, I., Oliverio, M., Klemm, P., Awazawa, M., Mitterer, G., Fernandez-Rebollo, E., Pradas-Juni, M., Wagner, W., Hammerschmidt, P., Loureiro, R., Kiefer, C., Hansmeier, N.R., Khani, S., Bergami, M., Heine, M., Ntini, E., Frommolt, P., Zentis, P., Ørom, U.A., Heeren, J., Blüher, M., Bilban, M., Kornfeld, J.-W., 2018. LincRNA H19 protects from dietary obesity by constraining expression of monoallelic genes in brown fat. *Nat. Commun.* 9, 3622. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05933-8>

Schulman, E., Bartlett, S.J., Schieir, O., Andersen, K.M., Boire, G., Pope, J.E., Hitchon, C., Jamal, S., Thorne, J.C., Tin, D., Keystone, E.C., Haraoui, B., Goodman, S.M., Bykerk, V.P., Ahluwalia, V., Akhavan, P., Barra, L., Barber, C., Barnabe, C., Baron, M., Bessette, L., Bykerk, V., Colmegna, I., Fallavollita, S., Haaland, D., Hazlewood, G., Joshi, R., Kuriya, B., Larche, M., Lyddell, C., Nair, B., Penney, C., Rubin, L., Tremblay, J.L., Villeneuve,

- E., Zummer, M., 2018. Overweight, Obesity, and the Likelihood of Achieving Sustained Remission in Early Rheumatoid Arthritis: Results From a Multicenter Prospective Cohort Study. *Arthritis Care Res.* 70, 1185–1191. <https://doi.org/10.1002/acr.23457>
- Shaker, O.G., Mahmoud, R.H., Abdelaleem, O.O., Ahmed, T.I., Fouad, N.A., Hussein, H.A., Nassr, M.H., Zaki, O.M., Abdelghaffar, N.K., Hefzy, E.M., 2019. Expression Profile of Long Noncoding RNAs, Inc-Cox2, and HOTAIR in Rheumatoid Arthritis Patients. *J. Interf. Cytokine Res.* 39, 174–180. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0117>
- Smolen, J.S., Aletaha, D., Barton, A., Burmester, G.R., Emery, P., Firestein, G.S., Kavanaugh, A., McInnes, I.B., Solomon, D.H., Strand, V., Yamamoto, K., 2018. Rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4, 18001. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>
- Song, J., Kim, D., Han, J., Kim, Y., Lee, M., Jin, E.-J., 2015. PBMC and exosome-derived Hotair is a critical regulator and potent marker for rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Med.* 15, 121–126. <https://doi.org/10.1007/s10238-013-0271-4>
- Stahl, E.A., Raychaudhuri, S., Remmers, E.F., Xie, G., Eyre, S., Thomson, B.P., Li, Y., Kurreeman, F.A.S., Zhernakova, A., Hinks, A., Guiducci, C., Chen, R., Alfredsson, L., Amos, C.I., Ardlie, K.G., BIRAC Consortium, Barton, A., Bowes, J., Brouwer, E., Burtt, N.P., Catanese, J.J., Coblyn, J., Coenen, M.J.H., Costenbader, K.H., Criswell, L.A., Crusius, J.B.A., Cui, J., de Bakker, P.I.W., De Jager, P.L., Ding, B., Emery, P., Flynn, E., Harrison, P., Hocking, L.J., Huizinga, T.W.J., Kastner, D.L., Ke, X., Lee, A.T., Liu, X., Martin, P., Morgan, A.W., Padyukov, L., Posthumus, M.D., Radstake,

T.R.D.J., Reid, D.M., Seielstad, M., Seldin, M.F., Shadick, N.A., Steer, S., Tak, P.P., Thomson, W., van der Helm-van Mil, A.H.M., van der Horst-Bruinsma, I.E., van der Schoot, C.E., van Riel, P.L.C.M., Weinblatt, M.E., Wilson, A.G., Wolbink, G.J., Wordsworth, B.P., YEAR Consortium, Wijmenga, C., Karlson, E.W., Toes, R.E.M., de Vries, N., Begovich, A.B., Worthington, J., Siminovitch, K.A., Gregersen, P.K., Klareskog, L., Plenge, R.M., 2010. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat. Genet.* 42, 508–14.
<https://doi.org/10.1038/ng.582>

Stavropoulos-Kalinoglou, A., Metsios, G.S., Panoulas, V.F., Nevill, A.M., Jamurtas, A.Z., Koutedakis, Y., Kitas, G.D., 2009. Underweight and obese states both associate with worse disease activity and physical function in patients with established rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 28, 439–444. <https://doi.org/10.1007/s10067-008-1073-z>

Stöckel, D., Kehl, T., Trampert, P., Schneider, L., Backes, C., Ludwig, N., Gerasch, A., Kaufmann, M., Gessler, M., Graf, N., Meese, E., Keller, A., Lenhof, H.-P., 2016. Multi-omics enrichment analysis using the GeneTrail2 web service. *Bioinformatics* 32, 1502–1508.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv770>

Stuhlmüller, B., Kunisch, E., Franz, J., Martinez-Gamboa, L., Hernandez, M.M., Pruss, A., Ulbrich, N., Erdmann, V.A., Burmester, G.R., Kinne, R.W., 2003. Detection of Oncofetal H19 RNA in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. *Am. J. Pathol.* 163, 901–911. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63450-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63450-5)

Su, H., Xu, X., Yan, C., Shi, Y., Hu, Y., Dong, L., Ying, S., Ying, K., Zhang, R.,

2018. LncRNA H19 promotes the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells through AT1R via sponging let-7b in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* 19, 254.
<https://doi.org/10.1186/s12931-018-0956-z>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., Mesirov, J.P., 2005. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 15545–15550. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
- Takanabe, R., Ono, K., Abe, Y., Takaya, T., Horie, T., Wada, H., Kita, T., Satoh, N., Shimatsu, A., Hasegawa, K., 2008. Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 728–732.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.050>
- Tryggestad, J.B., Teague, A.M., Sparling, D.P., Jiang, S., Chernausek, S.D., 2019. Macrophage-Derived microRNA-155 Increases in Obesity and Influences Adipocyte Metabolism by Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Obesity* 27, 1856–1864.
<https://doi.org/10.1002/oby.22616>
- Vitseva, O.I., Tanriverdi, K., Tchkonja, T.T., Kirkland, J.L., McDonnell, M.E., Apovian, C.M., Freedman, J., Gokce, N., 2008. Inducible Toll-like Receptor and NF-κB Regulatory Pathway Expression in Human Adipose Tissue. *Obesity* 16, 932–937. <https://doi.org/10.1038/oby.2008.25>
- Vlachos, I.S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M.D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T., Hatzigeorgiou, A.G., 2015.

DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 43, W460–W466.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkv403>

Wang, J., Bansal, A.T., Martin, M., Germer, S., Benayed, R., Essioux, L., Lee, J.S., Begovich, A., Hemmings, A., Kenwright, A., Taylor, K.E., Upmanyu, R., Cutler, P., Harari, O., Marchini, J., Criswell, L.A., Platt, A., 2013.

Genome-wide association analysis implicates the involvement of eight loci with response to tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis.

Pharmacogenomics J. 13, 235–41. <https://doi.org/10.1038/tpj.2012.8>

Wang, Y., Chen, L., Li, F., Bao, M., Zeng, J., Xiang, J., Luo, H., Li, J., Tang, L., 2017. TLR4 rs41426344 increases susceptibility of rheumatoid arthritis (RA) and juvenile idiopathic arthritis (JIA) in a central south Chinese Han population. *Pediatr. Rheumatol.* 15, 12. <https://doi.org/10.1186/s12969-017-0137-5>

Wang, Y., Feng, T., Duan, S., Shi, Y., Li, S., Zhang, X., Zhang, L., 2019.

miR-155 promotes fibroblast-like synoviocyte proliferation and inflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis by targeting FOXO3a. *Exp. Ther. Med.* <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8330>

Wapinski, O., Chang, H.Y., 2011. Long noncoding RNAs and human disease.

Trends Cell Biol. 21, 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.04.001>

WHO, 2020. Obesity and overweight [WWW Document]. URL

<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (accessed 6.18.20).

Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T.L., Takahashi, K., Wilke, C.,

Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D., 2020. ggplot2: Create Elegant Data

Visualisations Using the Grammar of Graphics.

Wickham, H., François, R., Henry, L., Müller, K., 2021. dplyr: A Grammar of Data Manipulation.

Wu, G., Yu, W., Zhang, M., Yin, R., Wu, Y., Liu, Q., 2018. MicroRNA-145-3p suppresses proliferation and promotes apoptosis and autophagy of osteosarcoma cell by targeting HDAC4. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 46, 579–586. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1464459>

Wu, S., Wang, J., Li, J., Li, F., 2020. microRNA-21 Aggravates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in MH7A Cells Through Targeting SNF5. *Inflammation* 43, 441–454. <https://doi.org/10.1007/s10753-019-01117-8>

Wu, Z.-M., Luo, J., Shi, X.-D., Zhang, S.-X., Zhu, X.-B., Guo, J., 2020. Icarin alleviates rheumatoid arthritis via regulating miR-223-3p/NLRP3 signalling axis. *Autoimmunity* 53, 450–458. <https://doi.org/10.1080/08916934.2020.1836488>

Xiao, Z., Qu, Z., Chen, Z., Fang, Z., Zhou, K., Huang, Z., Guo, X., Zhang, Y., 2018. LncRNA HOTAIR is a Prognostic Biomarker for the Proliferation and Chemoresistance of Colorectal Cancer via MiR-203a-3p-Mediated Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* 46, 1275–1285. <https://doi.org/10.1159/000489110>

Xing, F., Matsumiya, T., Hayakari, R., Yoshida, H., Kawaguchi, S., Takahashi, I., Nakaji, S., Imaizumi, T., 2016. Alteration of Antiviral Signalling by Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of Mitochondrial Antiviral Signalling Protein (MAVS). *PLoS One* 11, e0151173. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151173>

- Xiong, G., Huang, Z., Jiang, H., Pan, Z., Xie, J., Wang, S., 2016. Inhibition of microRNA-21 decreases the invasiveness of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis via TGF β /Smads signaling pathway. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 19, 787–793.
- Yamada, Y., Koshizuka, K., Hanazawa, T., Kikkawa, N., Okato, A., Idichi, T., Arai, T., Sugawara, S., Katada, K., Okamoto, Y., Seki, N., 2017. Passenger strand of miR-145-3p acts as a tumor-suppressor by targeting MYO1B in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.*
<https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4190>
- Yang, Jialiang, Li, Y., Wang, L., Zhang, Z., Li, Z., Jia, Q., 2020. LncRNA H19 aggravates TNF- α -induced inflammatory injury via TAK1 pathway in MH7A cells. *BioFactors* n/a. <https://doi.org/10.1002/biof.1659>
- Yang, Juhua, Yin, Z., Li, Y., Liu, Y., Huang, G., Gu, C., Fei, J., 2020. The Identification of Long Non-coding RNA H19 Target and Its Function in Chronic Myeloid Leukemia. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 19, 1368–1378.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.01.021>
- Yang, S., Jiang, S., Wang, Y., Tu, S., Wang, Z., Chen, Z., 2016. Interleukin 34 Upregulation Contributes to the Increment of MicroRNA 21 Expression through STAT3 Activation Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 43, 1312–1319.
<https://doi.org/10.3899/jrheum.151253>
- Yang, Z., Wang, J., Pan, Z., Zhang, Y., 2018. miR-143-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting IGF1R and IGFBP5 and regulating the Ras/p38 MAPK signaling pathway in rheumatoid arthritis. *Exp. Ther. Med.* <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5907>

- Yasui, T., Yanagida, T., Ito, S., Konakade, Y., Takeshita, D., Naganawa, T., Nagashima, K., Shimada, T., Kaji, N., Nakamura, Y., Thiodorus, I.A., He, Y., Rahong, S., Kanai, M., Yukawa, H., Ochiya, T., Kawai, T., Baba, Y., 2017. Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires. *Sci. Adv.* 3. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1701133>
- Ye, H., Wang, X., Wang, L., Chu, X., Hu, X., Sun, L., Jiang, M., Wang, H., Wang, Z., Zhao, H., Yang, X., Wang, J., 2019. Full high-throughput sequencing analysis of differences in expression profiles of long noncoding RNAs and their mechanisms of action in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* 21, 70. <https://doi.org/10.1186/s13075-019-1853-7>
- Yi, X., Cheng, X., 2021. Understanding Competitive Endogenous RNA Network Mechanism in Type 1 Diabetes Mellitus Using Computational and Bioinformatics Approaches. *Diabetes, Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* Volume 14, 3865–3945. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S315488>
- Yue, J., Lau, T.C.K., Griffith, J.F., Xu, J., Xiao, F., Shi, L., Wang, D., Wong, P.C.H., Li, E.K., Tam, L.L.P., Li, M., Li, T.K., Mak, W.Y., Hung, V., Qin, L., Tam, L.L.P., 2019. Circulating miR-99b-5p as a novel predictor of erosion progression on high-resolution peripheral quantitative computed tomography in early rheumatoid arthritis: A prospective cohort study. *Int. J. Rheum. Dis.* 22, 1724–1733. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13644>
- Zhang, P., Li, X., Zhang, S., Wu, S., Xiao, Q., Gu, Y., Guo, X., Lin, X., Chen, L., Zhao, Y., Niu, L., Tang, G., Jiang, Y., Shen, L., Zhu, L., 2021. miR-370-3p Regulates Adipogenesis through Targeting Mknk1. *Molecules* 26, 6926. <https://doi.org/10.3390/molecules26226926>

- Zhang, X., Ma, L., Zhai, L., Chen, D., Li, Yong, Shang, Z., Zhang, Z., Gao, Y., Yang, W., Li, Yixun, Pan, Y., 2021. Construction and validation of a three-microRNA signature as prognostic biomarker in patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Med. Sci.* 18, 984–999.
<https://doi.org/10.7150/ijms.49126>
- Zhang, Y., Mei, H., Chang, X., Chen, F., Zhu, Y., Han, X., 2016. Adipocyte-derived microvesicles from obese mice induce M1 macrophage phenotype through secreted miR-155. *J. Mol. Cell Biol.* 8, 505–517.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw040>
- Zhao, X.-Y., Xiong, X., Liu, T., Mi, L., Peng, X., Rui, C., Guo, L., Li, S., Li, X., Lin, J.D., 2018. Long noncoding RNA licensing of obesity-linked hepatic lipogenesis and NAFLD pathogenesis. *Nat. Commun.* 9, 2986.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-05383-2>
- Zheng, J., Huang, X., Tan, W., Yu, D., Du, Z., Chang, J., Wei, L., Han, Y., Wang, Chengfeng, Che, X., Zhou, Y., Miao, X., Jiang, G., Yu, X., Yang, X., Cao, G., Zuo, C., Li, Z., Wang, Chunyou, Cheung, S.T., Jia, Y., Zheng, X., Shen, H., Wu, C., Lin, D., 2016. Pancreatic cancer risk variant in LINC00673 creates a miR-1231 binding site and interferes with PTPN11 degradation. *Nat. Genet.* 48, 747–757. <https://doi.org/10.1038/ng.3568>
- Zhou, F., Lei, Y., Xu, X., Zhou, H., Liu, H., Jiang, J., Yang, Y., Wu, B., 2020. LINC00355:8 promotes cell proliferation and migration with invasion via the MiR-6777-3p/Wnt10b axis in Hepatocellular Carcinoma. *J. Cancer* 11, 5641–5655. <https://doi.org/10.7150/jca.43831>
- Zhu, H., Fu, J., Chen, S., Li, X., Liang, H., Hou, Y., Dou, H., 2020. FC-99 reduces macrophage tenascin-C expression by upregulating miRNA-494 in

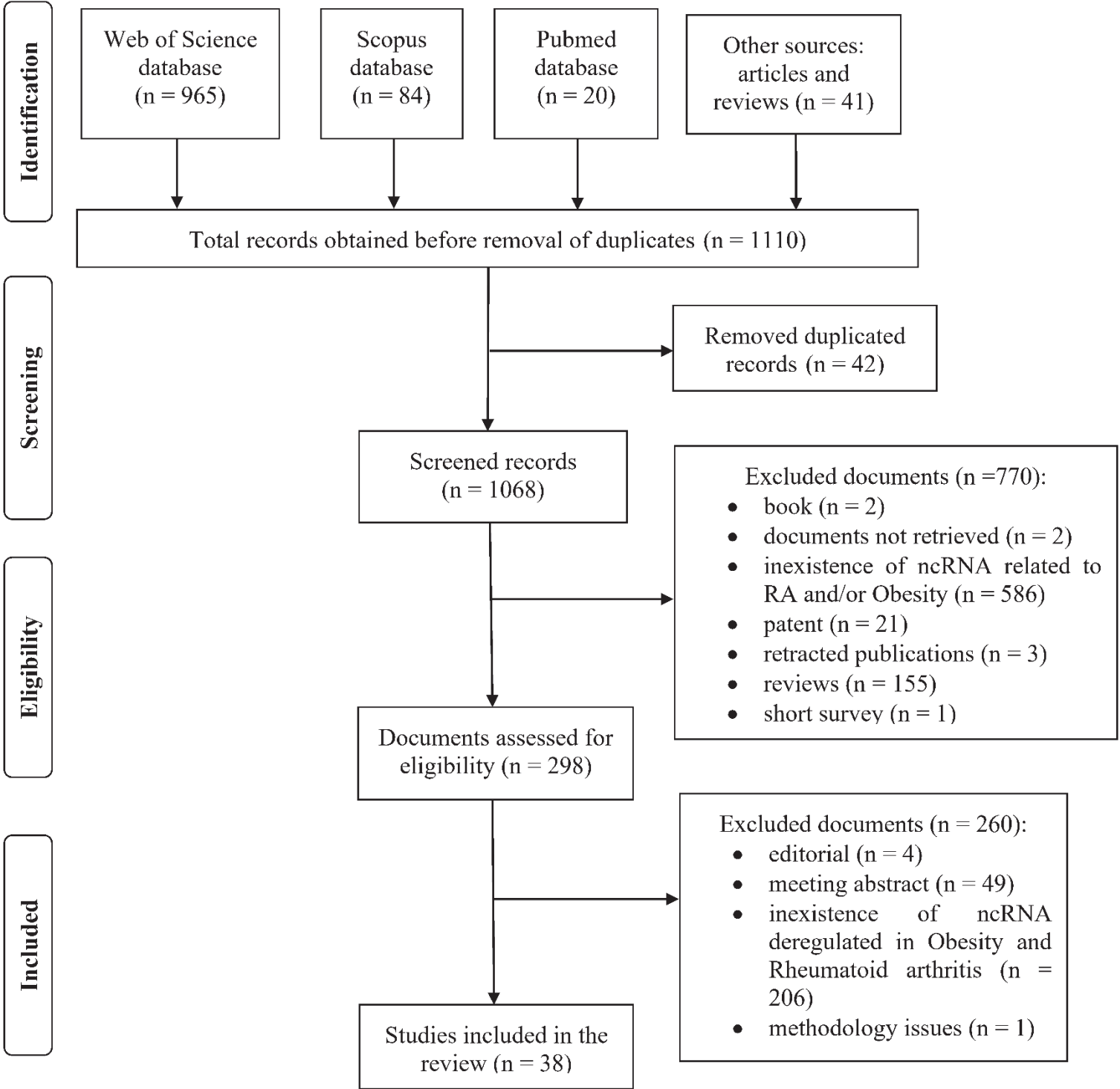
arthritis. *Int. Immunopharmacol.* 79, 106105.

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.106105>

Zhu, Y., Ni, T., Lin, J., Zhang, C., Zheng, L., Luo, M., 2019. Long non-coding RNA H19, a negative regulator of microRNA-148b-3p, participates in hypoxia stress in human hepatic sinusoidal endothelial cells via NOX4 and eNOS/NO signaling. *Biochimie* 163, 128–136.

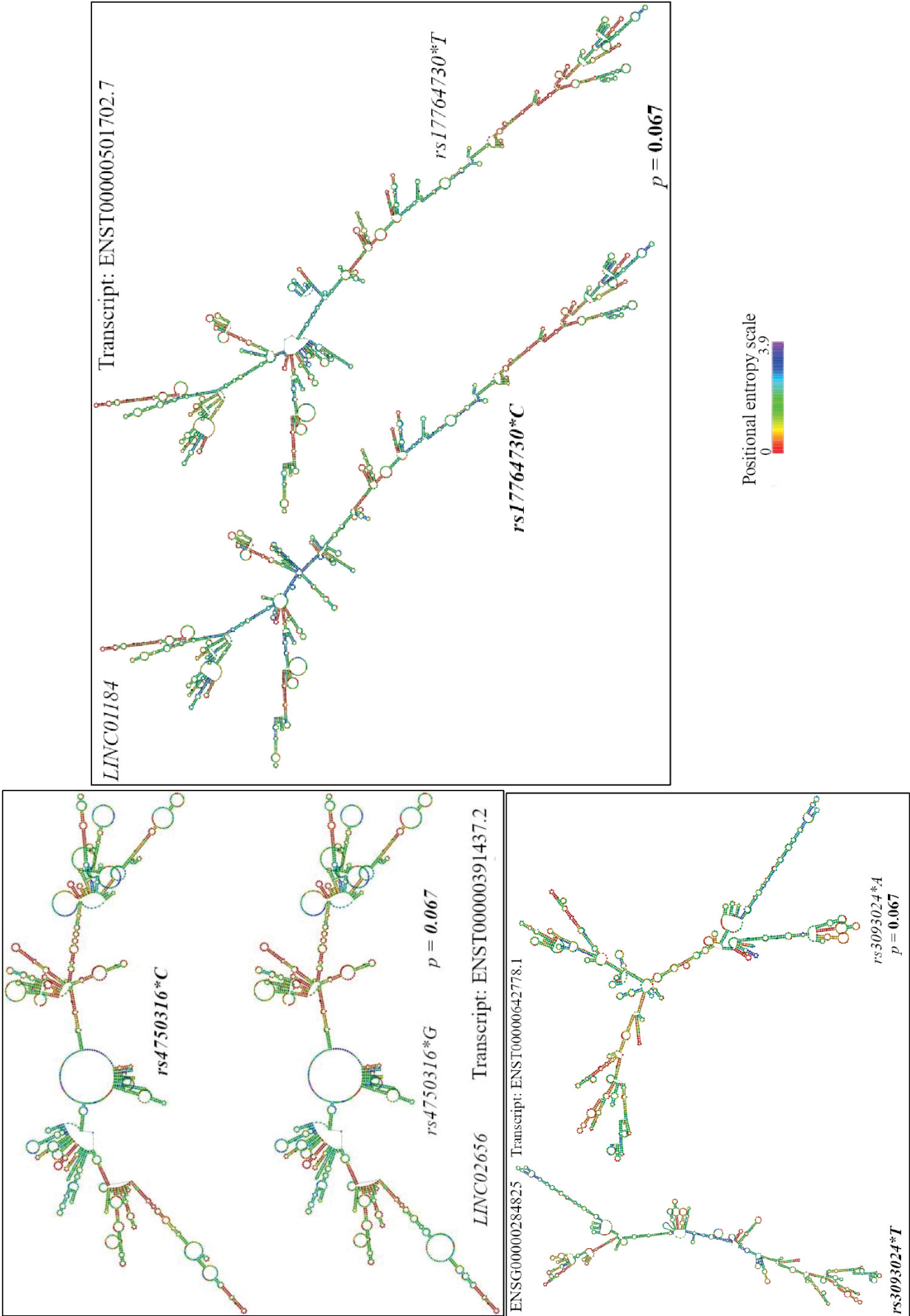
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.04.006>

Figure 1 - Flowchart for this review.



ncRNA: non-coding RNA. RA: rheumatoid arthritis.

Figure 2 – Prediction of lncRNAs secondary structure changes possibly caused by SNVs associated with RA or obesity



The secondary structures models of the lncRNAs were predicted in RNAfold web server, which uses Vienna RNA package, using the minimum free energy (*LINC01184* and *ENSG00000284825*) or centroid (*LINC02656*) models and positional entropy calculation methods. Structures were created for both alleles (reference alleles in bold). The *p*-value is empirical, calculated for in silico models by IncRNASNP2, which analyses possible changes in lncRNA secondary structure caused by SNV ($p < 0.2$ considers a high probability of RNA secondary structure transcript change). Positional entropy scale: low entropy (red) predict less structural flexibility (prediction is more reliable), and high entropy (violet) indicates several other alternative structures (prediction is less reliable).

Table 1 - ncRNAs with differential expression implicated in obesity and rheumatoid arthritis.

ncRNA	obesity	rheumatoid arthritis	References
<i>miR-21</i>	Up-regulated in adipose and hepatic tissues in obese patients and mice.	Up-regulated in RA patients' synovia, FLS and peripheral blood (<i>miR-21-5p</i>), and in FLS in RA rat models.	CHARTOUMPEKIS <i>et al.</i> , 2012; CHEN <i>et al.</i> , 2016; KELLER <i>et al.</i> , 2011; REZAEIPOOR <i>et al.</i> , 2020; XIONG <i>et al.</i> , 2016; YANG <i>et al.</i> , 2016
<i>miR-143</i>	Up-regulated on liver and adipose tissue of mice with obesity.	Up-regulated in plasma of early RA patients with erosions. Up-regulated expression in plasma and synovia (<i>miR-143-3p</i>) of RA patients.	JORDAN <i>et al.</i> , 2011; TAKANABE <i>et al.</i> , 2008; YANG <i>et al.</i> , 2018; YUE <i>et al.</i> , 2019
<i>miR-146a</i>	Up-regulated in adipose tissue in obese mice models.	Up-regulated expression in synovial tissues and CD4 ⁺ T cells in RA patients.	BAE; LEE, 2018; CHARTOUMPEKIS <i>et al.</i> , 2012; LI <i>et al.</i> , 2010; NAKASA <i>et al.</i> , 2008
<i>miR-155</i>	Up-regulated expression in sera, adipose tissue, macrophages, adipocytes and microvesicles in individual with obesity (<i>hsa-miR-155-5p</i>).	Up-regulated expression in plasma and serum, synovial tissues (<i>miR-155-5p</i>), B-cells (<i>miR-155-5p</i>), monocytes and synovial fluid in RA patients.	ABDUL-MAKSOUUD <i>et al.</i> , 2017; ALIVERNINI <i>et al.</i> , 2016; BLÜML <i>et al.</i> , 2011; ELMESMARI <i>et al.</i> , 2016; KARKENI <i>et al.</i> , 2016; KUROWSKA-STOLARSKA <i>et al.</i> , 2011; LI, H. <i>et al.</i> , 2019; ORMSETH <i>et al.</i> , 2015; TRYGGESTAD <i>et al.</i> , 2019; WANG <i>et al.</i> , 2019; ZHANG <i>et al.</i> , 2016
<i>lncRNA H19</i>	Down-regulated expression in adipose tissues of obese individuals.	Up-regulated expression in synovia of RA patients.	SCHMIDT <i>et al.</i> , 2018; STUHLMÜLLER <i>et al.</i> , 2003
<i>lncRNA HOTAIR</i>	Up-regulated exosomal expression from serum samples of obese individuals and Type 2 diabetes patients.	Up-regulated expression in PBMC and sera exosomes in patients with RA.	LI, M. <i>et al.</i> , 2018; LU <i>et al.</i> , 2017; SHAKER <i>et al.</i> , 2019; SONG <i>et al.</i> , 2015

ncRNA: non-coding RNA. RA: rheumatoid arthritis. FLS: fibroblast-like synoviocytes. PBMC: peripheral blood mononuclear cells.

Table 2 - ncRNAs correlated/associated with clinical biomarkers, clinical measures and disease activity in RA and obesity.

ncRNA	obesity	rheumatoid arthritis	References
<i>miR-21</i>	Positive correlation with BMI index in obese persons and mice models.	Positive correlation with waist circumference, visceral adiposity, ESR, CRP, RF, anti-CCP and DAS28 in RA patients. Inhibition in FLS isolated from RA patients downregulates MMP-1, MMP-3, MMP-13, and TGF β 1 protein expression.	ANDONIAN <i>et al.</i> , 2019; CHARTOUMPEKIS <i>et al.</i> , 2012; KELLER <i>et al.</i> , 2011; XIONG <i>et al.</i> , 2016; YANG <i>et al.</i> , 2016
<i>miR-143</i>	Positive correlation with body and mesenteric fat weight in obese mice model.	Positive correlation with pro-inflammatory interleukins (IL-8 and IL-6) in plasma and synovia (<i>miR-143-3p</i>).	ANDONIAN <i>et al.</i> , 2019; JORDAN <i>et al.</i> , 2011; TAKANABE <i>et al.</i> , 2008; YANG <i>et al.</i> , 2018
<i>miR-146a</i>	Positive correlation with percent body fat in obese individuals.	Positive correlation with waist circumference, ESR, visceral adiposity, triglycerides, plasma large VLDL, BMI, TNF- α levels in RA patients (<i>miR-146a-5p</i>).	ANDONIAN <i>et al.</i> , 2019; BAE; LEE, 2018; LI <i>et al.</i> , 2010; NUNEZ LOPEZ <i>et al.</i> , 2018
<i>miR-155</i>	Positive correlation with serum TNF α levels and BMI index in obese persons.	Positively correlated with increased pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-8, and IL-1 β) levels in RA patients' synovia. Positively correlated with TNF- α and IL-1 β in serum and plasma levels of RA patients.	ABDUL-MAKSOUUD <i>et al.</i> , 2017; ALIVERNINI <i>et al.</i> , 2016; BLÜML <i>et al.</i> , 2011; ELMESMARI <i>et al.</i> , 2016; GAUDET <i>et al.</i> , 2016; KARKENI <i>et al.</i> , 2016; KUROWSKA-STOLARSKA <i>et al.</i> , 2011; ORMSETH <i>et al.</i> , 2015; TRYGGESTAD <i>et al.</i> , 2019; WANG <i>et al.</i> , 2019; ZHANG <i>et al.</i> , 2016
<i>lncRNA H19</i>	Inverse correlation with BMI index in brown fat tissues from obese individuals.	Positively correlated with increased injury to RA synovia via TNF- α and increased inflammatory cytokines (IL-8, IL-1 β , and IL-6).	SCHMIDT <i>et al.</i> , 2018; YANG, Jialiang <i>et al.</i> , 2020
<i>lncRNA HOTAIR</i>	Ectopic overexpression in abdominal preadipocytes increased genes/markers related to adipogenesis (<i>ADIPOQ</i> , <i>FABP4</i> , <i>PPARGC1A</i> and <i>LPL</i>).	Expression positively correlated with MMP-9 and ESR on sera of RA patients. Independent predictor for RA (multiple logistic regression analysis).	DIVOUX <i>et al.</i> , 2014; SHAKER <i>et al.</i> , 2019

anti-CCP: Anticyclic citrullinated peptide antibodies. BMI: Body Mass Index. DAS28: Disease Activity Score in 28 joints. CRP: C-reactive protein. ESR: Erythrocyte sedimentation rate. ADIPOQ: adiponectin. FABP4: Fatty Acid-Binding Protein 4. LPL: Lipoprotein Lipase. MMP-9: Matrix metalloproteinase 9. ncRNA: non-coding RNA. IL-1 β : Interleukin-1 Beta. IL-6: Interleukin-6. IL-8: Interleukin-8. RA: rheumatoid arthritis. RF: rheumatoid factor. PPARGC1A: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. TNF- α : Tumor Necrosis Factor Alpha.

Table 3 – SNVs associated with RA or obesity, localized in lncRNA exons.

Chr	lncRNA	Disease/Trait	SNV	Allele	AF (%)	OR/ β	95% CI/SE	p	References
2p25.3	ENSG00000226277	Body fat distribution	rs62107261	C	2.9 ^a	0.08	?	2 x 10 ⁻³⁸	RASK-ANDERSEN <i>et al.</i> , 2019
5q23.3	LINC01184	Body fat distribution	rs3812049	C	22.0	0.08	?	2 x 10 ⁻³⁸	RASK-ANDERSEN <i>et al.</i> , 2019
11p15.3	LINC00958	Childhood obesity	rs78246608	A	99.3 ^b	-0.81	0.12	2 x 10 ⁻⁶	BRADFIELD <i>et al.</i> , 2019
15q23	DRAIC	Rheumatoid arthritis	rs8026898	A	34.0	1.15	1.11 - 1.18	4 x 10 ⁻¹⁹	EYRE <i>et al.</i> , 2012; KIM <i>et al.</i> , 2015; LAUFER <i>et al.</i> , 2019; OKADA <i>et al.</i> , 2014
6q27	ENSG00000284825	Rheumatoid arthritis	rs3093024	A	39.0	1.19	1.15 - 1.24	8 x 10 ⁻¹⁹	KOCHI <i>et al.</i> , 2010
6q25.3	ENSG00000285492	Celiac disease and Rheumatoid arthritis	rs62107261	A?	35.0	1.1	?	6 x 10 ⁻¹¹	GUTIERREZ-ACHURY <i>et al.</i> , 2016
6q25.3	TAGAP-AS1	Rheumatoid arthritis	rs212389	A	60.1	1.11	1.08 - 1.14	7 x 10 ⁻¹³	EYRE <i>et al.</i> , 2012; HA; BAE; KIM, 2021; KIM <i>et al.</i> , 2015
7q22.1	LINCRESS1	Rheumatoid arthritis	rs10275421	G	92.7	?	?	8 x 10 ⁻⁹	SAAD <i>et al.</i> , 2019
10p14	GATA3-AS1	Rheumatoid arthritis	rs2275806	G	55.0	1.11	?	5 x 10 ⁻⁸	EYRE <i>et al.</i> , 2012
13q34	LINC00452	Response to tocilizumab in Rheumatoid arthritis	rs9604529	G?	23.5	0.35	?	7 x 10 ⁻⁷	WANG <i>et al.</i> , 2013
10p15.1	LINC02656	Rheumatoid arthritis	rs4750316	C	23.0	1.15	1.09 - 1.22	2 x 10 ⁻⁶	RAYCHAUDHURI <i>et al.</i> , 2008; STAHL <i>et al.</i> , 2010

Allele: SNV allele associated with a disease or trait. Chr: Chromosome region. DRAIC: Downregulated RNA In Cancer, Inhibitor of Cell Invasion and Migration. GATA3-AS1: GATA3 antisense RNA 1. LINCRESS1: lncRNA p53 regulated and ESC associated 1. lncRNA: long non-coding RNA gene names. LINC00452: long intergenic non-protein coding RNA 452. LINC00958: long intergenic non-protein coding RNA 958. LINC01184: long intergenic non-protein coding RNA 1184. LINC02656: Long intergenic non-protein coding RNA 2656. AF: global frequency of the associated allele (from gnomAD 3.1.2). OR/ β : lowest or highest Odds ratio/beta value. p: lowest p-value reported for SNV. SNV: SNV associated with a disease or trait. 95% CI/SE: 95% confidence interval for odds ratio, confidence interval or standard error for beta. ?: information not reported. TAGAP-AS1: TAGAP antisense RNA 1. ^aNot yet identified in East Asian populations. ^bAssociated in the African population. The less common G allele was not identified in Amish, Ashkenazi Jewish, East Asian, European (Finnish), Middle Eastern and South Asian populations.

Table 4 – Structural and functional consequences of lncRNA exonic SNVs associated with RA or obesity.

SNV	Probability of secondary structural change	lncRNA:miR interaction gain	lncRNA:miR interaction loss
rs62107261*C	Low for ENSG00000226277 ($p = 0.39$)	No impact	No impact
rs3812049*C	Low for LINC01184 ($p = 0.61$)	<u>hsa-miR-9-5p</u> , <u>hsa-miR-370-5p</u> , <u>hsa-miR-3679-3p</u> , <u>hsa-miR-381-5p</u> , <u>hsa-miR-4737</u> , <u>hsa-miR-3119</u> , <u>hsa-miR-5580-5p</u>	<u>hsa-miR-6068</u> , <u>hsa-miR-4781-5p</u>
rs78246608*A	Low for LINC00958 ($p = 0.98$)	No impact	<u>hsa-miR-4536-5p</u> , <u>hsa-miR-4703-3p</u>
rs3093024*A	High for ENSG00000284825 ($p = 0.067$)	No impact	<u>hsa-miR-5693</u>
rs212389*A	Low for TAGAP-AS1 ($p = 0.86$)	No impact	No impact
rs10275421*G	Low for LNCPRESS1 ($p = 0.87$)	<u>hsa-miR-3944-3p</u> , <u>hsa-miR-6781-3p</u>	<u>hsa-miR-3189-3p</u> , <u>hsa-miR-4674</u> , <u>hsa-miR-635</u> , <u>hsa-miR-6774-5p</u>
rs2275806*G	Low for GATA3-AS1 ($p = 0.68$)	<u>hsa-miR-3681-5p</u> , <u>hsa-miR-4436b-5p</u> , <u>hsa-miR-4639-3p</u> , <u>hsa-miR-4693-3p</u> , <u>hsa-miR-4700-5p</u> , <u>hsa-miR-6751-5p</u> , <u>hsa-miR-6777-3p</u> , <u>hsa-miR-6817-3p</u> , <u>hsa-miR-6849-5p</u> , <u>hsa-miR-8056</u>	<u>hsa-miR-1246</u> , <u>hsa-miR-3123</u> , <u>hsa-miR-3919</u>
rs9604529*G	Low for LINC00452 ($p = 0.48$)	<u>hsa-miR-2115-5p</u> , <u>hsa-miR-6874-5p</u>	No impact
rs4750316*C	High for LINC02656 ($p = 0.067$)	<u>hsa-miR-4693-5p</u>	No impact

There were no results for rs8026898 and rs212400. The first three SNVs were associated with obesity-related traits, all others with RA in GWAS (check Table 3). In bold: miRNAs associated with both obesity and RA-related traits, underlined: with either of them or related inflammatory/ autoimmune conditions. lncRNA:miR interaction gain: possible micro-RNAs which gained or lost binding targets in lncRNA caused by SNV. lncRNA:miR interaction loss: possible RNAs which lost binding targets in lncRNA caused by SNV. Secondary structure change: Probability and empirical p -value to occurs changes in lncRNA secondary structure caused by SNV. $p < 0.2$ is considered as high probability of RNA secondary structure transcript change. SNV: Single nucleotide variant associated with a disease or trait. No analysis was possible with rs8026898 and rs212400.

6.2 ANÁLISE DE FATORES DE RISCO ASSOCIADOS COM ARTRALGIA E LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO

Em um levantamento epidemiológico inicial feito por (OLIVEIRA *et al.*, 2019) na população menonita brasileira; as quais se localizam nas colônias de CWB, CWI e CON; foi vista uma prevalência de aproximadamente 7,97% de indivíduos com artralgia sendo maior que na população brasileira (6,4%) relatada na Pesquisa Nacional de Saúde de 2013 (DATASUS, 2013).

Em um novo levantamento realizado na população menonita com 588 indivíduos (que responderam ao questionário); sendo 224 indivíduos de CON, 158 de CWI e 206 de CWB; reportou que o número de autorrelato para artralgia foi de 7,8% (46/588). Esta prevalência artralgia quando comparada à população brasileira (7,6%), relatada na Pesquisa Nacional de Saúde de 2019 (STOPA *et al.*, 2020), se tornou similar. Desses 46 autorrelatos, 10 eram indivíduos do sexo masculino (22%) e 36 do sexo feminino (78%). A prevalência é maior no sexo feminino é estatisticamente significativa, segundo o Teste exato de Fisher ($p = 0,012$).

As análises dos fatores independentemente associados com a artralgia foram realizados nos indivíduos que autorrelataram a artralgia ($n = 46$) por meio da análise de regressão logística multivariada, a qual utilizou os resultados de associações das regressões univariadas ($p_{corr} \leq 0,2$) para criar um melhor modelo reduzido. As regressões univariadas encontraram 22 variáveis associadas com a Artralgia (TABELA 9), sendo que destas apenas cinco apresentavam associação independente com a artralgia: idade ($OR = 1,05$; $p_{corr} < 10^{-3}$ e TABELA 10), sexo masculino ($OR = 0,40$; $p_{corr} = 0,023$ e TABELA 10), prática de exercício físico moderada ou leve ($OR = 0,31$; $p_{corr} = 0,001$ e TABELA 10), autopercepção de saúde negativa ($OR = 3,25$; $p = 0,005$ e TABELA 10) e familiar próximo afetado ($OR = 3,73$; $p_{corr} < 10^{-3}$ e TABELA 10).

TABELA 9 - Análise de regressões univariadas para a associação com a artralgia na população menonita

Variável	OR	IC 95%	p	p_{corr}
Idade (anos)	1,04	1,02 - 1,06	$< 10^{-3}$	0,001
Familiar próximo com artralgia	3,20	1,70 - 6,32	$< 10^{-3}$	0,008
Prática atividade física moderada ou vigorosa	0,32	0,17 - 0,59	$< 10^{-3}$	0,008

Variável	OR	IC 95%	p	pcorr
Autopercepção negativa de saúde	3,31	1,64 - 7,44	0,002	0,021
Dor espinhal/lombar/costas	2,67	1,45 - 5,07	0,002	0,021
Distúrbios da Tireoide	3,06	1,44 - 6,15	0,002	0,021
Escala de autopercepção da saúde	1,59	1,17 - 2,17	0,003	0,023
Trabalhou exposto ao sol	2,51	1,35 - 4,83	0,005	0,030
Como classifica o ambiente familiar na infância	1,89	1,20 - 3,01	0,006	0,037
Anti-CCP positivo	8,06	1,68 - 43,2	0,009	0,042
Ocupação do lar	2,38	1,22 - 4,48	0,009	0,042
Distúrbios musculoesqueléticos relacionados ao trabalho	2,25	1,17 - 4,21	0,012	0,053
Sexo masculino	0,40	0,19 - 0,80	0,014	0,056
Diagnóstico de depressão	2,05	1,07 - 3,83	0,026	0,10
Origem geográfica (Colônia Menonita)	0,68	0,46 - 0,97	0,040	0,14
Quantos dias por semana realiza atividade física moderada ou vigorosa	0,84	0,69 - 1,00	0,060	0,18
Experimentou cigarro	1,79	0,97 - 3,32	0,062	0,18
Massa muscular	0,94	0,87 - 1,00	0,061	0,18
Diagnóstico de fibromialgia	3,45	0,76 - 11,6	0,065	0,18
Índice de massa corporal (IMC)	1,05	0,99 - 1,11	0,074	0,20
Rota migratória avô paterno	0,67	0,41 - 1,00	0,081	0,20
Trabalhou em local fechado	0,43	0,14 - 1,04	0,086	0,21
Ocupação religiosa	2,98	0,66 - 9,81	0,10	0,23
Risco muito elevado de complicações cardiometabólicos (Razão cintura/quadril)	1,93	0,81 - 4,82	0,14	0,32
Porcentagem de gordura corporal	1,03	0,98 - 1,07	0,21	0,44
Diagnóstico de diabetes do tipo II	0,30	0,02 - 1,45	0,24	0,50
Rota migratória avó paterna	0,81	0,54 - 1,12	0,25	0,50
Diagnóstico de alergia alimentar	0,33	0,02 - 1,60	0,28	0,53
Trabalho em contato com produtos químicos	1,38	0,74 - 2,52	0,30	0,54
Rota migratória avô materno	0,83	0,55 - 1,14	0,30	0,54
Diagnóstico da alopecia areata	3,06	0,15 - 21,3	0,32	0,55
Diagnóstico de síndrome do intestino irritável	1,70	0,49 - 4,60	0,34	0,57
Trabalho em contato com a poeira	1,28	0,70 - 2,37	0,42	0,67
Quantidade de fumantes no ambiente de trabalho	1,32	0,55 - 2,59	0,45	0,69
Trabalhou em contato com metal pesado	1,81	0,28 - 6,82	0,45	0,69
Diagnóstico de doença infecciosa	1,24	0,66 - 2,35	0,51	0,73
Diagnóstico da dermatite herpetiforme	2,07	0,11 - 12,5	0,50	0,73
Ocupação na área da saúde	1,37	0,40 - 3,65	0,57	0,79
Trabalho em contato com fumaça	0,81	0,34 - 1,70	0,60	0,81
Diagnóstico de psoríase	1,74	0,09 - 10,1	0,61	0,81
Massa óssea	0,92	0,53 - 1,58	0,76	0,86
Diagnóstico de câncer	1,18	0,47 - 2,58	0,70	0,86
Diagnóstico de doença celíaca	0,71	0,04 - 3,62	0,75	0,86
Diagnóstico de intolerância à lactose	1,23	0,29 - 3,65	0,75	0,86
Rota migratória avó materna	1,05	0,80 - 1,32	0,72	0,86
Ocupação em agronegócio	1,12	0,53 - 2,20	0,76	0,86
Ocupação na área do comércio	0,78	0,18 - 2,26	0,69	0,86
Ocupação na área da educação	1,13	0,45 - 2,47	0,78	0,86
Fuma diariamente	1,31	0,06 - 9,77	0,82	0,87
Trabalhou em contato com fumaça de tabaco	0,90	0,36 - 2,00	0,81	0,87
Fumantes no ambiente de trabalho	1,11	0,17 - 4,10	0,89	0,93
Fumante ativo	1,11	0,06 - 6,62	0,93	0,94
Altos níveis de NETs	0,99	0,34 - 2,50	0,99	0,99

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: OR: *Odds Ratio*. IC 95%: intervalo de confiança de 95%. *p*: valor de *p* não corrigido. *pcorr*: valor de *p* corrigido para múltipla testagem pelo método do “*False discovery rate*”. *pcorr* < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Em negrito estão os valores de *p*, corrigidos para múltipla testagem pelo método do “*False discovery rate*”, considerados estatisticamente significantes.

TABELA 10 - Variáveis independentemente associadas com a artralgia na população menonita

Variável	Estatística descritiva		Regressão logística multivariada			
	Não relatou artralgia (n = 542)	Autorrelatou artralgia (n = 46)	OR	IC 95%	p	pcorr
Intercepto	-	-	-	-	< 10 ⁻³	< 10⁻³
Idade (anos) ¹	50 (38 - 64)	64 (55 - 72)	1,05	1,03 - 1,08	< 10 ⁻³	< 10⁻³
Familiar próximo com artralgia	225 / 540 (42%)	32 / 46 (70%)	3,73	1,88 - 7,80	< 10 ⁻³	< 10⁻³
Pratica atividade física moderada ou vigorosa	355 / 525 (68%)	18 / 45 (40%)	0,31	0,16 - 0,61	< 10 ⁻³	0,001
Autopercepção negativa de saúde	294 / 531 (55%)	37 / 46 (80%)	3,25	1,52 - 7,65	0,004	0,005
Sexo masculino	221 / 542 (41%)	10 / 46 (22%)	0,40	0,18 - 0,84	0,021	0,021

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: ¹Mediana (IQR): mediana com intervalo interquartil. OR: *Odds Ratio*; IC 95%: intervalo de confiança de 95%. IQR: intervalo interquartil. p: valor de p. pcorr: valor de p corrigido pelo método do “*False discovery rate*”. pcorr < 0,05 foram considerados estatisticamente significantes. Em negrito estão os valores de p, corrigidos para múltipla testagem pelo método do “*False discovery rate*”, considerados estatisticamente significantes. Razão de verossimilhança: -123,37. R² Cox e Snell: 0,10. R² Nagelkerke: 0,25. R² McFadden: 0,20. Teste da razão de verossimilhança com o modelo reduzido vs modelo nulo: p = 5,8 x 10⁻¹⁵.

O sexo masculino apresentou uma associação de proteção para a artralgia cerca de 2,5 vezes (OR = 0,40; pcorr < 0,023 e TABELA 10). O sexo é um fator de susceptibilidade associado com a artralgia e AR. Além disso, um estudo já relatou que mulheres têm de 2 a 3 vezes mais chance de desenvolver a AR do que homens (NGO; STEYN; MCCOMBE, 2014). Isto pode ser devido a influência do estrogênio no sistema imune, porém esse mecanismo ainda é controverso (TRYNKA *et al.*, 2013). Foi visto que mulheres nulíparas possuem maior chance de desenvolver a AR e que a gravidez é associada com a remissão da doença, sendo que as crises da doença normalmente ocorrem no período pós-parto (ALAMANOS; VOULGARI; DROSOS, 2006). Ademais, já foi relatada a influência de genes presentes no cromossomo X na regulação da resposta imune e associação com o aumento da suscetibilidade para a AR (BIANCHI *et al.*, 2012; LIBERT; DEJAGER; PINHEIRO, 2010). Por exemplo, foi encontrada a associação entre a variação do número de cópias e a expressão dos genes *TLR7* e *TLR8*, localizados no cromossomo X. Homens com AR apresentavam células com mosaicismo cromossômico (46, XX ou 47, XXY) em células do sangue periférico; as quais possuíam um cromossomo X a mais e por consequência um maior número de cópias dos genes *TLR7* e *TLR8* e maior expressão destes genes (MARTIN *et al.*, 2019).

A associação da artralgia com indivíduos com idade mais avançada (OR = 1,05 e pcorr < 10⁻³; TABELA 10) pode estar associada com doenças que

causam a artralgia e que tem uma maior prevalência nestes indivíduos, por exemplo a AR, a osteoartrite e distúrbios musculoesqueléticos (LAIHO; TUOMILEHTO; TILVIS, 2001; LOUGHLIN, 2015). Entretanto, a maior parte do diagnóstico da AR costuma ocorrer entre as idades de 25 a 45 anos (BES, 2018).

A presença de familiares próximos que relataram artralgia aumenta a chance em 4 vezes de desenvolvimento da artralgia ($OR = 3,73$ e $p_{corr} < 10^{-3}$; TABELA 10). Esta associação sugere uma agregação familiar de variantes genéticas que poderia levar ao desenvolvimento da AR e seus sintomas articulares, a qual já também foi relatada na literatura (KUO *et al.*, 2017).

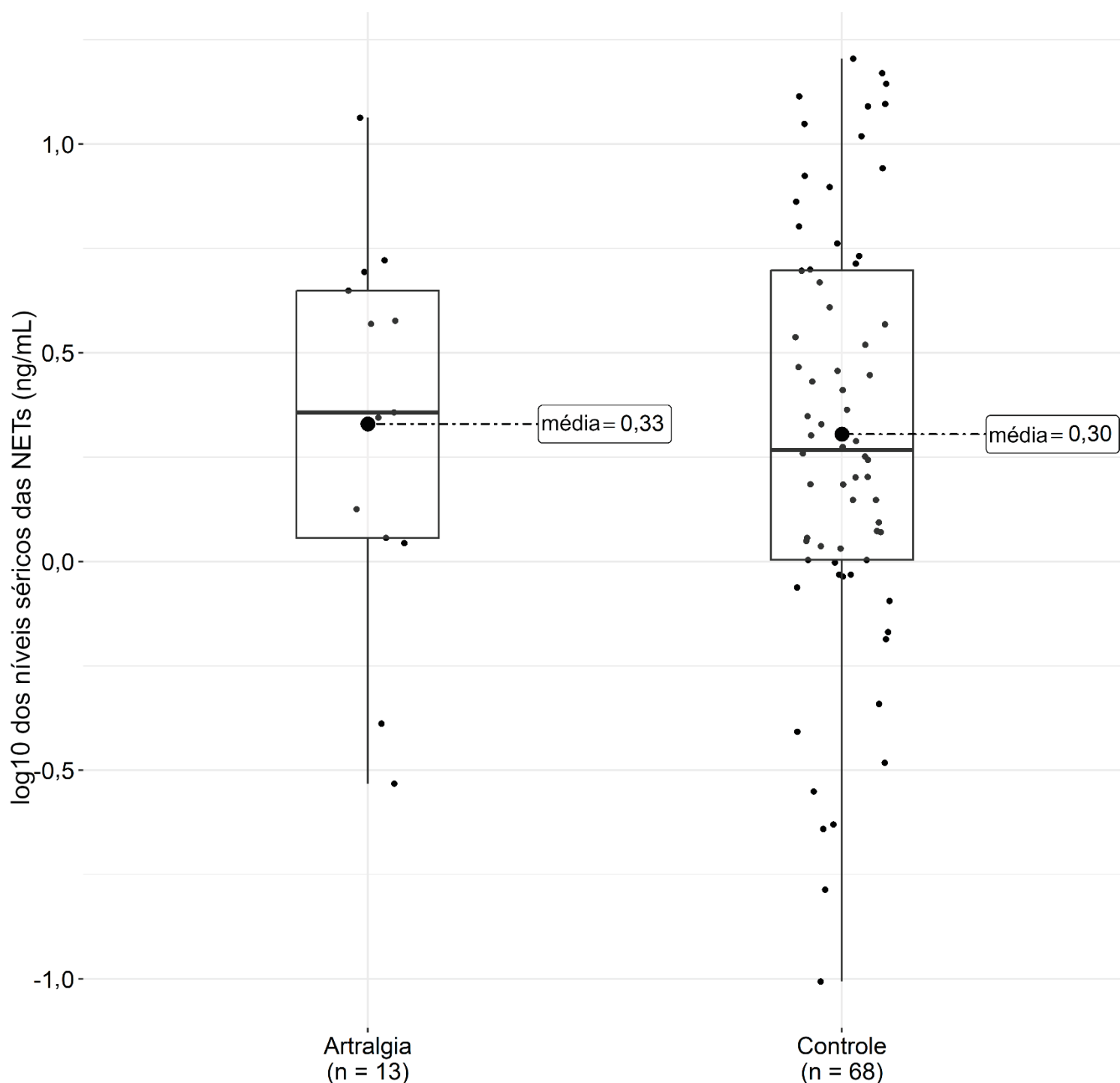
A prática regular de exercícios foi um fator de proteção para o desenvolvimento da artralgia em um pouco mais de três vezes ($OR = 0,31$ e $p_{corr} = 0,001$; TABELA 10). Isto está em concordância com a literatura, que relatou a associação do exercício físico na redução da atividade da AR e os sintomas articulares (COONEY *et al.*, 2011).

Os indivíduos que relataram uma autopercepção negativa da própria saúde apresentaram uma maior frequência e predisposição para o autorrelato de artralgia ($OR = 3,25$; $p_{corr} = 0,005$ e TABELA 10). Escores negativos de autopercepção da saúde também foram associadas com um pior curso clínico e qualidade de vida nos pacientes com AR (BERNER *et al.*, 2018).

Em relação aos níveis séricos das NETs, o grupo de menonitas que autorrelataram artralgia não apresentou uma média de concentração sérica de NETs diferentes dos controles (FIGURA 11 e $p = 0,87$).

FIGURA 11 - Comparação dos níveis séricos das NETs entre indivíduos que autorrelataram artralgia vs controles

$$t_{\text{Student}}(79) = 0,16, p = 0,87$$



FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: t_{Student} : estatística t obtida pelo Teste t de Student. p : valor de p obtido pelo Teste t de Student. $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

NOTA: o grupo controle continha indivíduos não autorrelataram artralgia e não possuíam parentes próximos com autorrelato de artralgia.

Além disso, a presença de anticorpos anti-CCP também foi avaliada, por meio de ensaio ELISA em 169 indivíduos (142 controles e 27 com artralgia). A

prevalência de indivíduos positivos para o anti-CCP e artralgia foi muito menor ($n = 4$ e 8%), que o esperado para pacientes de AR ($70 - 75\%$) (GOELDNER *et al.*, 2010, 2011; PAYET *et al.*, 2014; RAMOS-REMUS *et al.*, 2015). No entanto, a prevalência de positividade do anti-CCP ($n = 4$ e 8%) foi maior nos indivíduos com artralgia ($OR = 8,06$; $IC\ 95\% = 1,68 - 43,2$; $p_{corr} = 0,042$; TABELA 9). Portanto, o grupo de indivíduos com artralgia pode incluir indivíduos com uma provável predisposição para a AR. Ademais, sabe-se que indivíduos podem ser negativos para anti-CCP e ainda assim, ser diagnosticados com AR (LU *et al.*, 2021), o que pode ser mais comum em uma população geneticamente isolada, como a menonita. Em nossas análises, não conseguimos observar associação entre as concentrações de NETs e anti-CCP nos indivíduos com artralgia (devido ao baixo poder estatístico, dada a amostragem pequena).

As análises dos fatores risco ao grupo de indivíduos que autorrelataram dores articulares sugerem evidências da predisposição para desenvolver AR (principalmente pela maior agregação familiar para a artralgia, relatos em indivíduos do sexo feminino e maior positividade de anti-CCP). Contudo, a maior prevalência dos relatos da artralgia em idade avançada pode sugerir, que uma parte dos indivíduos deste grupo possa ter indivíduos com outras doenças como a osteoartrite. Desta forma, estas análises avaliaram a predisposição desta população para possíveis “gatilhos” ou fatores de risco para a AR, a qual na sua fase pré-clínica iniciam-se com artralgia e inflamação articular. Além disso, estas análises disponibilizaram variáveis, independentemente associadas com artralgia, que serão utilizadas na correção das análises fatores de risco genético (análises nos exomas) destes indivíduos.

6.3 RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS EXOMAS EM INDIVÍDUOS COM ARTRALGIA

Vinte variantes (dezessete variantes de nucleotídeo único – SNVs e três Indels - Inserções e deleções), foram associados ao risco ou desenvolvimento da artralgia, dentre as variantes identificados nos exomas (TABELA 11). Duas variantes (*rs2290401*C* e *rs113182*A*) apresentam uma maior frequência alélica na população menonita, comparado a população europeia não-finlandesa, refletindo um possível efeito fundador (TABELA 12). Em relação ao efeito da

deriva genética; efeito da separação e isolamento entre as populações Amish e Menonita cerca de 200 anos atrás; foi observado uma maior frequência alélica na população menonita em onze variantes (*rs3740613*A*, *rs61732006*G*, *rs61732005*A*, *rs2279211*T*, *rs1052333*T*, *rs1320303*C*, *rs78302043*T*, *rs35886251*AT*, *rs11569585*A*, *rs10421265*T* e *rs34204906*G*). Além disso, três variantes (*rs2290401*C*, *rs72494581*C*, *rs1131820*A*) possuem maior frequência alélica na população menonita em comparação à população brasileira (TABELA 12). Por fim, avaliou-se a possibilidade de as associações serem devido a haplótipos associados com os sintomas (FIGURAS 12 e 13). Oito variantes de um total de vinte formam três haplótipos (*rs61732006*G_rs61732005*A* - gene *PTPRZ1*, *rs2291668*A_rs11569585*A* - genes *TNFSF14* e *C3*, e *rs2279211*T_rs1052333*T_rs4598574*A_rs3740613*A* - gene *PFKP*), os quais foram encontrados associados com a artralgia (TABELA 13). Ademais, apenas o haplótipo *rs2291668*A_rs11569585*A* (*TNFSF14* e *C3*) apresentou uma evidência de efeito fundador com maior frequência haplotípica na população menonita (TABELA 13).

TABELA 11 - Variantes associadas com a artralgia encontradas nas análises de exomas

dbSNP ID	Gene	Consequência da variante	Alelo	Alteração proteica	Modelo	Freq controle (%)	Freq caso (%)	OR	IC 95%	p	p _{corr}
rs2291668	TNFSF14	Intron e sinônima	A	p.Ala49=	Dominante	10,47	52,78	26,56	6,39 – 110,5	6,5 x 10 ⁻⁶	1,0 x 10 ⁻³
rs79153019	PSORS1C1	Frameshift e intron	A	p.(Pro94Leu fsTer35)	Aditivo	7,36	36,11	17,19	4,64 - 63,7	2,0 x 10 ⁻⁵	1,0 x 10 ⁻³
rs3740613	PFKP	Intron	A	-	Aditivo	28,68	72,22	6,39	2,68 - 15,25	2,9 x 10 ⁻⁵	1,0 x 10 ⁻³
rs4598574	PFKP	Intron	A	-	Dominante	11,63	38,89	14,66	4,03 - 53,33	4,6 x 10 ⁻⁵	1,0 x 10 ⁻³
rs2290401	IDUA, SLC26A1	Intron	C	-	Dominante	13,18	50	15,98	4,14 - 61,63	5,7 x 10 ⁻⁵	1,0 x 10 ⁻³
rs227221	SYT14	Intron	C	-	Recessivo	22,09	72,22	10,65	3,21 - 35,35	1,1 x 10 ⁻⁴	1,0 x 10 ⁻³
rs61732006	PTPRZ1	Não-sinônima, sinônima e intron	G	p.Thr1359=	Aditivo e dominante	3,1	27,78	21,12	5,43 - 82,17	1,0 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻³
rs61732005	PTPRZ1	Não-sinônima e intron	A	p.Asp1384A sn	Aditivo e dominante	3,1	27,78	21,12	5,43 - 82,17	1,0 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻³
rs2279211	PFKP	Região de splicing, sinônima e intron	T	-	Aditivo	26,74	69,44	7,66	3 - 19,6	2,0 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻³
rs1052333	PFKP	Sinônima	T	p.Ala598=	Aditivo	26,74	69,44	7,66	3,0 - 19,60	3,5 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻³
rs1320303	ALDH16A1	Não-sinônima	C	p.Val227Leu	Recessivo	27,13	55,56	18,56	4,56 - 75,61	4,6 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻³
rs78302043	CAND2	5'UTR	T	-	Aditivo e dominante	2,71	25	14,78	4,02 - 54,37	5,1 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻³
rs72494581	BTNL3	Intron	C	-	Recessivo	29,07	66,67	13,17	3,78 - 45,89	5,2 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻³
rs35886251	PTCD3	Intron	AT	-	Dominante	3,1	22,22	17,05	4,25 - 68,41	6,3 x 10 ⁻⁵	1,1 x 10 ⁻³
rs11569585	C3	3'UTR	A	-	Aditivo e dominante	1,93	22,22	19,32	4,79 - 78,02	3,2 x 10 ⁻⁵	1,2 x 10 ⁻³
rs1131820	KCNN3	Sinônima	A	p.Asn349=	Recessivo	22,07	55,56	29,72	5,56 – 159,0	7,4 x 10 ⁻⁵	1,2 x 10 ⁻³
rs2037358	CDCP1	Intron	G	-	Aditivo	26,74	52,78	6,99	2,44 - 15,2	1,1 x 10 ⁻⁴	3,5 x 10 ⁻³
rs2022065	TRIM10	3'UTR	T	-	Aditivo	20,54	52,78	7,94	2,85 - 22,11	7,2 x 10 ⁻⁵	7,7 x 10 ⁻³
rs10421265	PALM	Sinônima	T	p.Ala354=	Aditivo	14,34	50	6,71	2,57 - 17,51	1,0 x 10 ⁻⁴	7,8 x 10 ⁻³
rs34204906	ZNF544	3'UTR	G	-	Aditivo	13,18	47,22	9,14	3,07 - 27,23	7,1 x 10 ⁻⁵	0,035

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: dbSNP ID: dbSNP ID da variante associada. Gene: gene onde a variante associada está localizada. Alelo: Alelo da variante associada. Alteração proteica: nomenclatura HGVS para a alteração proteica causada pela variante. Consequência da variante: consequência(s) funcional(is) da variante associada. Modelo: modelo utilizado nas análises de regressão logística multivariada para se avaliar as associações. Freq controle (%): frequência em percentagem do alelo associado no grupo controle (indivíduos que não relataram artralgia). Freq caso (%): frequência em percentagem do alelo associado no grupo caso (indivíduos que autorrelataram artralgia). OR: *odds ratio*. IC 95%: intervalo de confiança de 95% do *odds ratio*. p: valor de p não-coriado. p_{corr}: valor de p

corrigido pelo método da permutação de Monte Carlo para cada modelo testado. Na coluna modelo: o modelo reportado foi aquele com menor valor p corrigido, no entanto, quando dois modelos apresentavam associações iguais (OR, IC 95%, p , p_{corr}) ambos eram reportados nesta coluna. $p_{corr} < 0,05$ foram considerado estatisticamente significante.

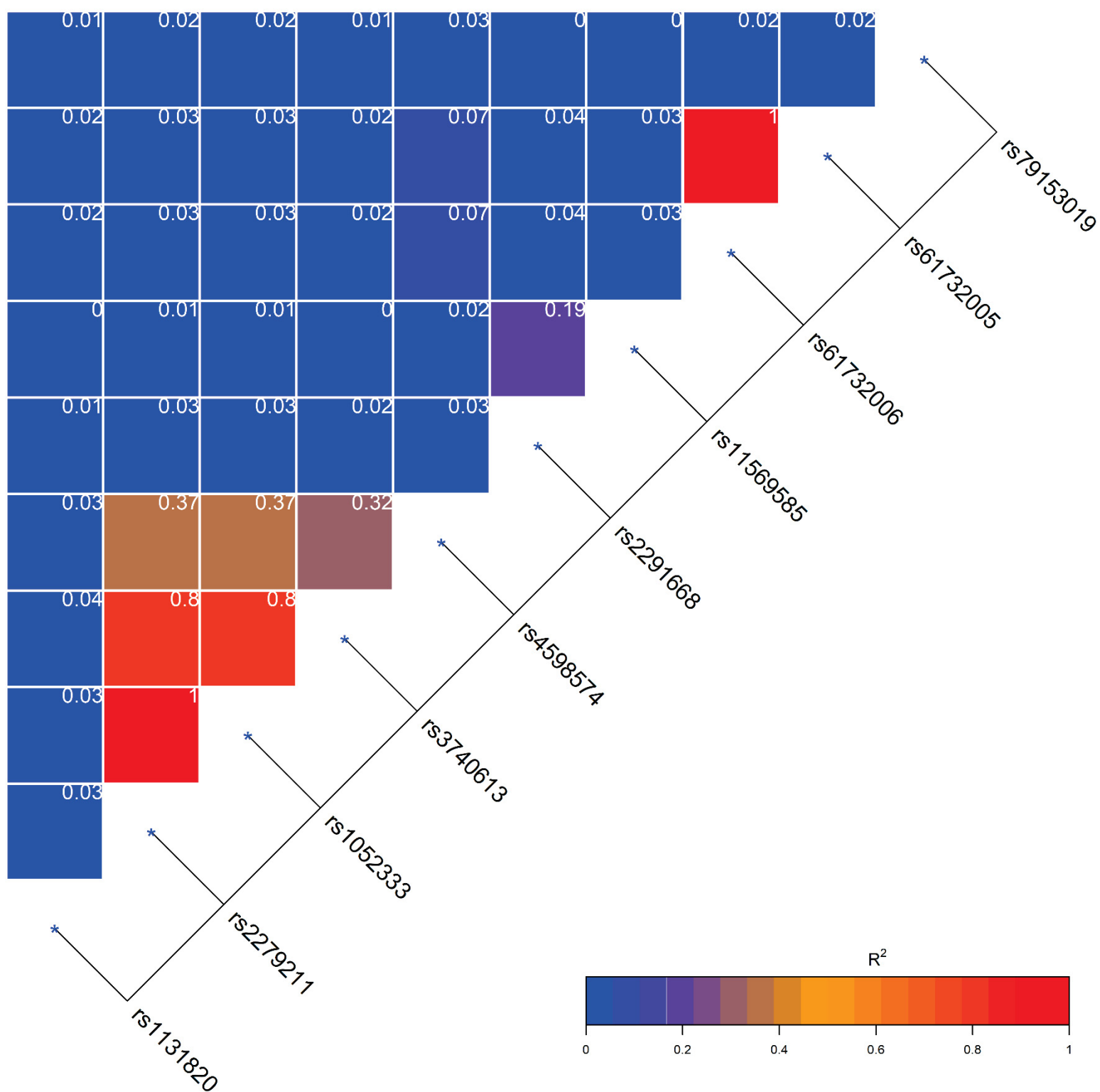
TABELA 12 - Avaliação das frequências alélicas das variantes associadas entre as populações europeias não-finlandesas, amish e brasileira

dbSNP ID	Menonita % (n)	non-FIN EURO % (n)	p*	Amish % (n)	p**	ABRAOM % (n)	p***
rs2291668^a	19,85 (650)	31,26 (10518)	8,9 x 10⁻¹⁰	28,37 (906)	1,2 x 10⁻⁴	18,40 (2342)	0,4
rs79153019 ^a	11,38 (650)	10,20 (67802)	0,36	11,95 (904)	0,10	-	-
rs3740613^a	40,92 (650)	40,59 (67970)	0,86	34,18 (910)	6,5 x 10⁻³	45,34 (2342)	0,045
rs4598574^a	18,46 (650)	22,33 (67984)	0,018	19,89 (910)	0,48	27,49 (2342)	3,0 x 10⁻⁶
rs2290401^a	21,38 (650)	15,77 (68002)	9,4 x 10⁻⁵	18,68 (910)	0,19	10,33 (2342)	7,5 x 10⁻¹⁴
rs227221 ^a	46,15 (650)	43,80 (67950)	0,24	42,87 (912)	0,24	55,0 (2342)	6,4 x 10⁻⁵
rs61732006 ^a	7,23 (650)	7,36 (68030)	0,90	4,84 (910)	0,047	7,17 (2342)	0,96
rs61732005 ^a	7,23 (650)	7,31 (68014)	0,94	4,83 (912)	0,045	5,34 (2342)	0,07
rs2279211^a	38,0 (650)	36,74 (67978)	0,51	29,61 (912)	5,4 x 10⁻⁴	39,97 (2342)	0,51
rs1052333^a	38,0 (650)	36,72 (67980)	0,50	29,97 (910)	5,7 x 10⁻⁴	39,79 (2342)	0,50
rs1320303^a	30,15 (650)	28,09 (67922)	0,24	17,11 (912)	1,2 x 10⁻⁹	35,10 (2342)	0,019
rs78302043^a	6,92 (650)	7,88 (67970)	0,37	4,51 (910)	0,039	5,85 (2342)	0,31
rs72494581^a	34,92 (650)	32,41 (67708)	0,17	37,03 (902)	0,39	30,23 (2342)	0,022
rs35886251^b	4,78 (648)	4,90 (65698)	1,0	1,15 (872)	1,8 x 10⁻⁵	10,55 (1184)	1,5 x 10⁻⁵
rs11569585 ^b	4,92 (650)	4,39 (68044)	0,50	0,22 (912)	8,6 x 10⁻¹¹	4,95 (2342)	1,0
rs1131820^a	31,23 (650)	27,18 (67998)	0,021	44,18 (910)	2,3 x 10⁻⁷	25,19 (2342)	2,0 x 10⁻³
rs2037358^a	32,0 (650)	47,32 (67948)	7,0 x 10⁻¹⁵	43,30 (910)	6,2 x 10⁻⁶	46,97 (2342)	1,0 x 10⁻¹¹
rs2022065^a	26,15 (650)	30,88 (67966)	9,4 x 10⁻³	33,08 (910)	3,3 x 10⁻³	27,28 (2342)	0,57
rs10421265 ^a	21,54 (650)	22,61 (67926)	0,52	9,69 (908)	6,9 x 10⁻¹¹	22,45 (2342)	0,62
rs34204906^a	17,23 (650)	19,89 (67976)	0,09	11,84 (912)	2,6 x 10⁻³	20,37 (2342)	0,075

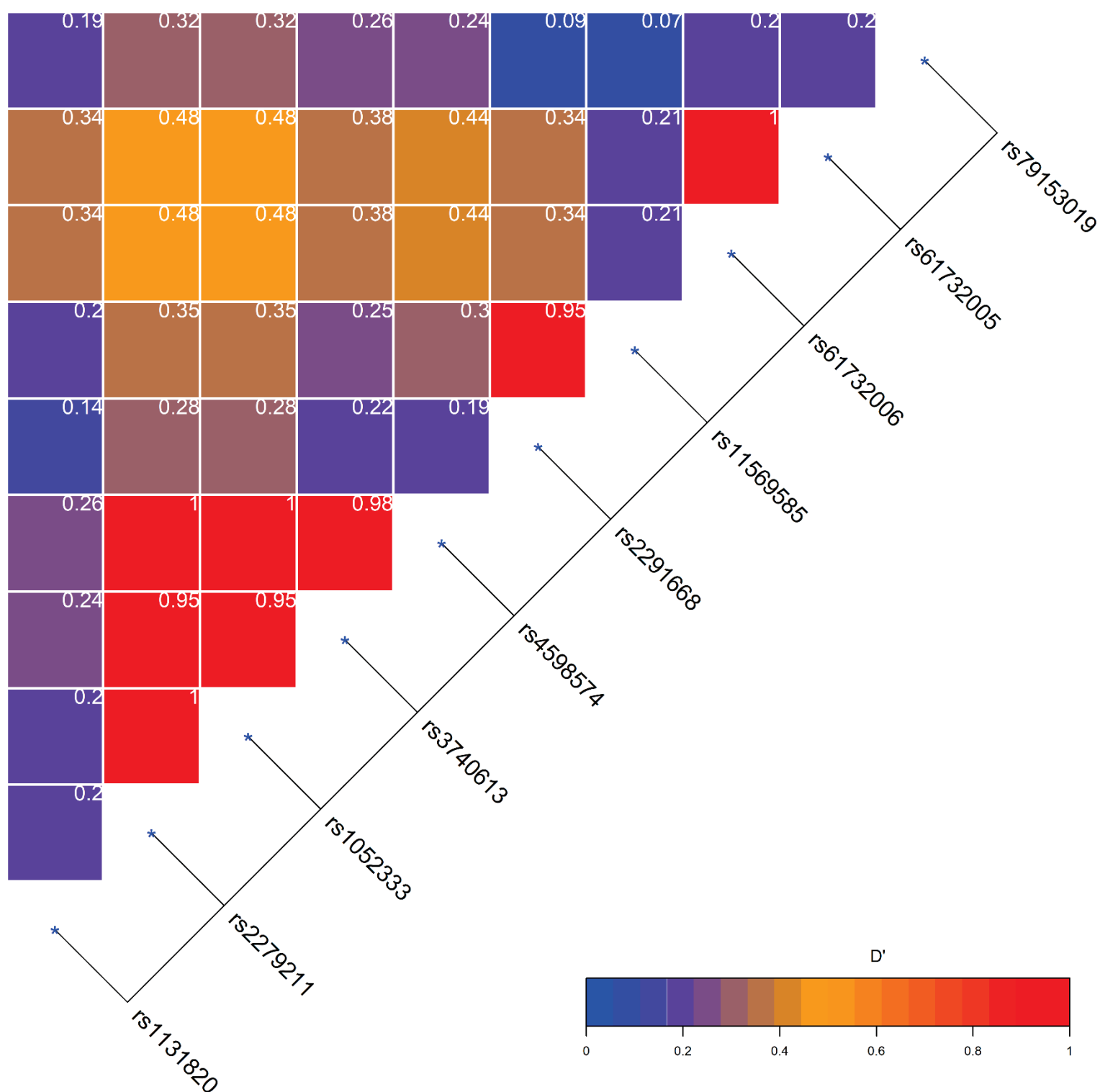
FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: dbSNP ID : dbSNP ID da variante associada. Menonita % (n): porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (n° de cromossomos) na população menonita brasileira. non-FIN EURO %: porcentagens das frequências alélicas e número amostral total(n° de cromossomos) reportada na população europeia não-finlandesa pelo gnomAD (v3.1.2). p*: valor de p obtido pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher na comparação da frequência alélica da população menonita vs europeia não-finlandesa. Amish %: porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (n° de cromossomos) reportada na população amish pelo gnomAD (v3.1.2). p**: valor de p obtido pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher na comparação da frequência alélica da população menonita vs amish. ABRAOM %: porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (n° de cromossomos) reportada na população brasileira pelo ABRAOM (Brazilian Genomic Variants), p***: valor de p obtido pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher na comparação da frequência alélica da população menonita vs brasileira. ^a: Teste do qui-quadrado de Pearson. ^b: Teste exato de Fisher. Na coluna dbSNP ID: em negrito estão as variantes em que a frequência alélica difere da população Europeia não finlandesa; italico, as variantes em que a frequência alélica difere

da população Brasileira; sublinhado são as variantes em que a frequência alélica diferem da população Amish; negrito e sublinhado são as variantes em que a frequência alélica diferem da populações Europeia não-finlandesa e Amish; negrito e itálico são as variantes em que a frequência alélica diferem da populações Europeia não-finlandesa e Brasileira; itálico e sublinhado em que a frequência alélica difere da populações Brasileira e Amish; negrito, itálico e sublinhado, são as variantes em que a frequência alélica diferem das populações Europeia não finlandesa, Amish e Brasileira. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Em negrito nas colunas p^* , p^{**} e p^{***} : valores considerados estatisticamente significantes.

FIGURA 12 - R^2 entre as variantes associadas nos exomas para o genes *PTPRZ1*, *TNFSF14*, *C3* e *PFKP*

FONTE: O autor (2023)

FIGURA 13 - D' entre as variantes associadas nos exomas para o genes *PTPRZ1*, *TNFSF14*, *C3* e *PFKP*

FONTE: O autor (2023)

NOTA: D' > 0,8 foi considerado como limiar para um alto desequilíbrio de ligação entre os alelos das variantes.

TABELA 13 - Análises de haplótipos das variantes associadas nos exomas e comparação das frequências entre as populações menonitas brasileiras e europeias não-finlandesas

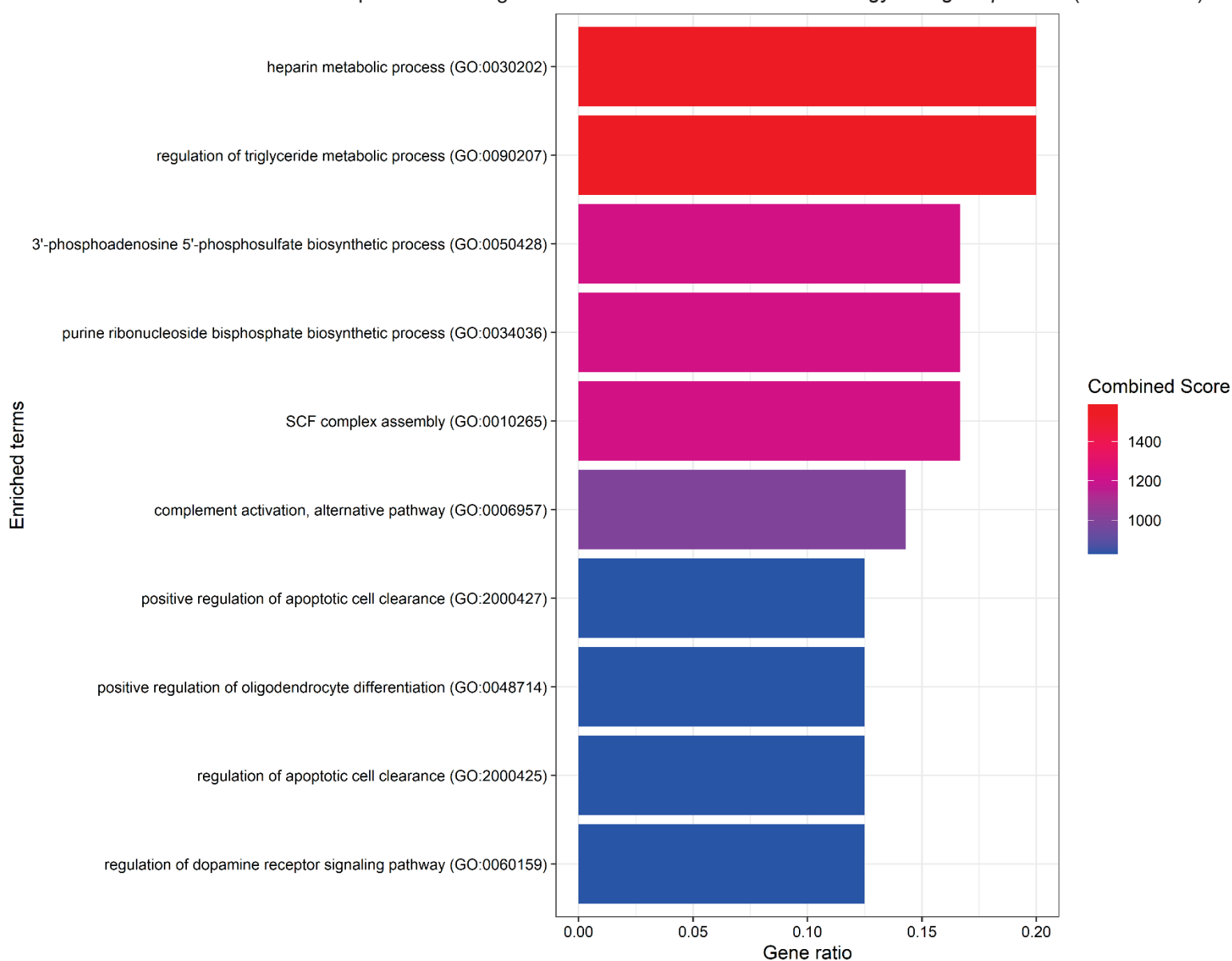
Haplótipo	Modelo	Freq controle (%)	Freq caso (%)	OR	IC 95%	p	p _{corr}	Menonitas s % (n)	non-FIN EURO % (n)	p*
rs61732006_rs61732005										
GA	Aditivo	3,1	27,78	21,12	5,43 – 82,17	1,3 x10 ⁻⁷	4,6 x10 ⁻⁷	7,23 (650)	5,82 (808)	0,28
rs2291668_rs11569585										
AA	Aditivo	1,52	22,22	32,12	6,22 – 165,92	8,9 x10 ⁻⁸	4,6 x10 ⁻⁷	4,74 (650)	2,60 (808)	0,032
rs2279211_rs1052333_rs4598574_rs3740613										
TTAA	Dominante	11,23	38,89	20,76	4,86 – 88,70	1,6 x 10 ⁻⁶	3,7 x10 ⁻⁶	18,3 (650)	-	-

FONTE: O autor (2023).

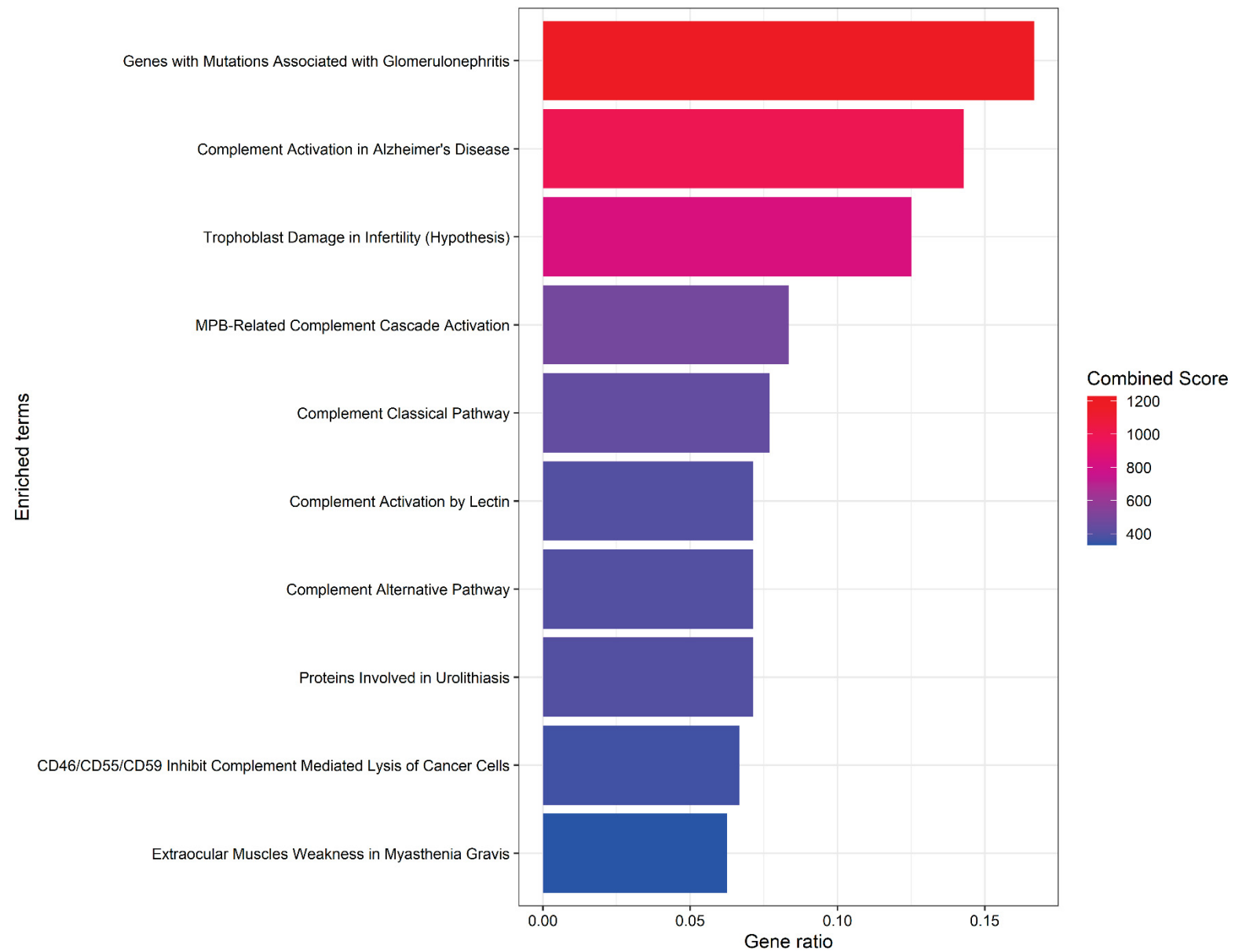
LEGENDA: Menonitas % (n): porcentagens das frequências haplotípicas e número amostral total na população menonita brasileira. non-FIN EURO %: porcentagens das frequências haplotípicas e número amostral total reportada na população europeia não-finlandesa no LDhap (as populações seguintes populações foram utilizadas: CEU - residentes da cidade de Utah nos Estados Unidos da América com ancestralidade predominantemente do norte e oeste da Europa, TSI –Toscanos na Itália, GBR – indivíduos residentes na Inglaterra e Escócia, IBS – indivíduos Ibéricos na Espanha). OR: *odds ratio*. IC 95%: intervalo de confiança de 95% do *odds ratio*. p: valor de p não-corrigido. p_{corr}: valor de p corrigido pelo método da permutação de Monte Carlo para cada modelo testado. p*: valor de p obtido pelo teste exato de Fisher na comparação da frequência haplotípica da população haplotípica da população menonita vs europeia não-finlandesa. Coluna haplótipo: somente foram reportados os haplótipos contendo alelos encontrados associados com a artralgia. Na coluna modelo: apenas foi reportado o modelo com menor valor de p. Os valores de p < 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

Até o momento, não houve associações diretas das variantes encontradas em nossas análises reportada na literatura (caso-controle e GWAS) com doenças inflamatórias e autoimunes articulares. No entanto, após a análise de enriquecimento dos genes, em vias biológicas (FIGURAS 14, 15, 16 e 17) foram vistas possíveis associações com vias da inflamação, danos sinoviais e articulares: ativação da superfamília de receptores TNF e a via não-canônica de NF- κ B, ativação do sistema complemento (vias alternativas, clássica e das lecitinas), células ou moléculas relacionadas a resposta inflamatória.

FIGURA 14 - Análise de enriquecimento de genes no banco de dados *Gene Ontology biological process* (versão 2021)

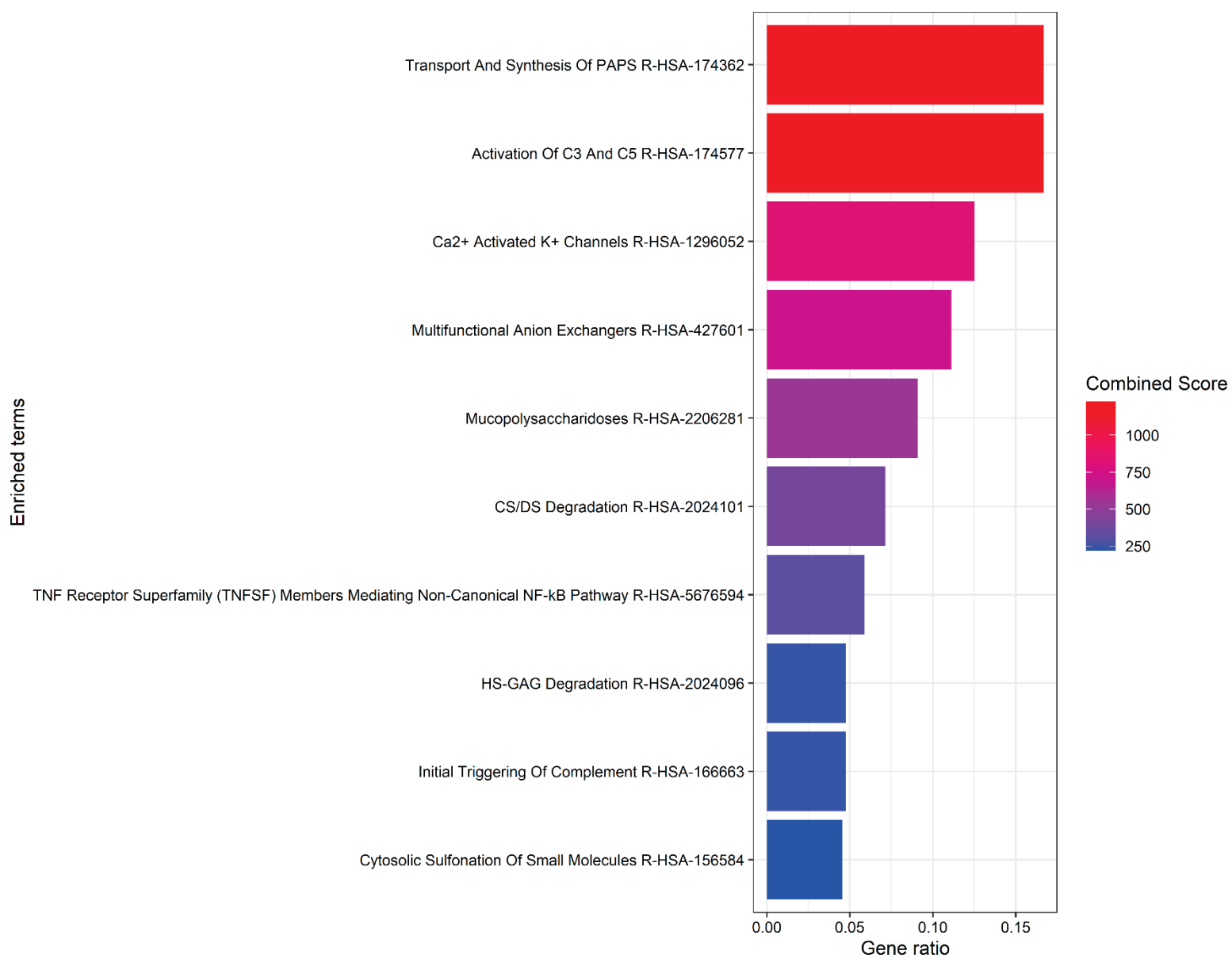


FONTE: O autor (2023).

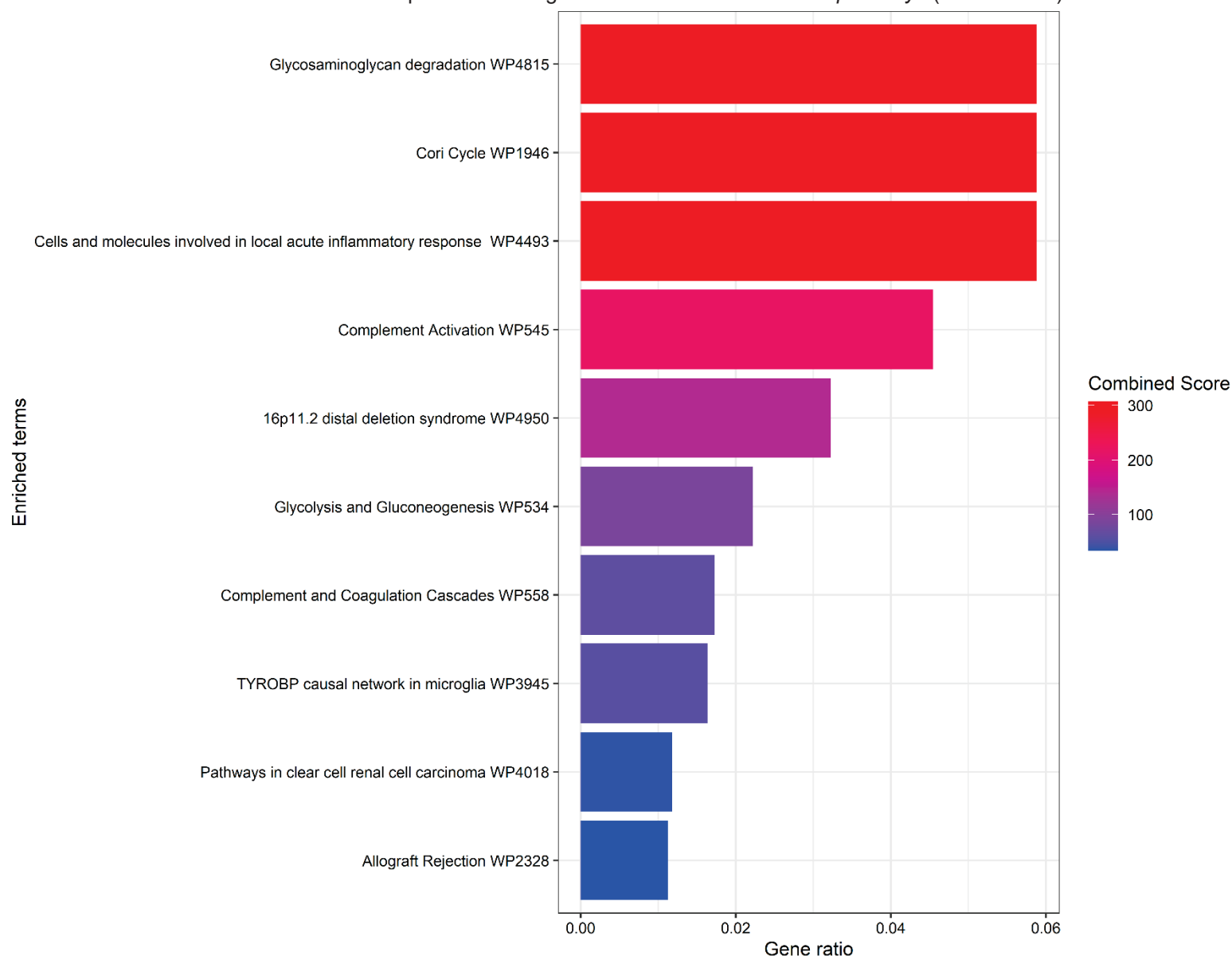
FIGURA 15 - Análise de enriquecimento de genes no banco de dados *Elsevier pathway collection*

FONTE: O autor (2023).

FIGURA 16 - Análise de enriquecimento de genes no banco de dados Reactome (versão 2022)



FONTE: O autor (2023).

FIGURA 17 - Análise de enriquecimento de genes no banco de dados *Wikipathways* (versão 2021)

FONTE: O autor (2023).

O sistema complemento já apresentou associações com os mecanismos patogênicos nos eventos de início e progressão desenvolvimento da AR (HOLERS *et al.*, 2018; HOLERS; BANDA, 2018). Em relação ao início da AR, existe uma possível relação entre os autoanticorpos anti-CCP, ativação do complemento com complexo de ataque à membrana, aumento da osteoclastogênese (por consequência aumento da erosão articular) e NETs. Exemplificando a possível ligação entre os eventos anteriores, os autoanticorpos podem se ligar a células de linhagem osteoblástica (ligação às proteínas citrulinadas à membrana celular destas células), estimulando sua diferenciação em osteoclastos. Além disso, já foi visto que NETs contendo proteínas

carbamiladas (principalmente histonas) também podem estimular diretamente a diferenciação dos para osteoclastos (aumentando a erosão óssea). Em seguida; existe um evento relacionado ao aumento do influxo de cálcio extracelular e a hipercitrulinização. Este último evento pode ser causado pela ativação do sistema complemento e complexo de ataque à membrana por imunocomplexos de anti-CCP (anti-CCP ligados às proteínas citrulinadas). A ativação do sistema complemento e complexo de ataque à membrana pode desencadear a hipercitrulinização (pela maior liberação das enzimas PAD da citólise e maior estímulo das enzimas que são dependentes de cálcio presentes no ambiente extracelular com cálcio) e maior produção de NETs com exposição de proteínas citrulinadas das NETs (durante a NETose pode haver mais liberação das PADs no ambiente extracelular). O autoanticorpo anti-colágeno do tipo II, também já foi relacionado a este mesmo mecanismo, o qual pode estimular a ativação do complemento quando ligado na superfície da cartilagem (BEARD *et al.*, 1980; BUGATTI *et al.*, 2016; COOKE *et al.*, 1975; DARRAH *et al.*, 2012; DOUDA *et al.*, 2015; FUJISAKI; SUGAWARA, 1981; GUPTA *et al.*, 2014; HARRE *et al.*, 2012; KONIG *et al.*, 2016; MALININ; PEKIN; ZVAIFLER, 1967; MALMSTRÖM; CATRINA; KLARESKOG, 2017; O'NEIL *et al.*, 2023; ROGERS, 1962; ROGERS; HARDING; LLEWELLYN-SMITH, 1977; ROGERS; SIMMONDS, 1958; ROMERO *et al.*, 2013; SPENGLER *et al.*, 2015; TOES; PISETSKY, 2020; TROUW *et al.*, 2009). Por fim, também já foi vista uma maior deposição e produção de proteínas relacionadas ao sistema complemento (C1, C2, C3, C4, C5) no tecido sinovial de indivíduos com AR em comparação aqueles com artrite de origem traumática, degenerativa ou sem AR (NAKAGAWA *et al.*, 1999; RUDDY; COLTEN, 1974).

A superfamília de receptores TNF englobam os receptores FAS, CD40, CD27 e RANK . Estes receptores podem ativar as vias canônicas e não-canônica de NF- κ B, quando seus agonistas se ligam, como por exemplo o TNF alfa (IDRISS; NAISMITH, 2000). A via não-canônica de NF- κ B já foi associada ao recrutamento de células para iniciar a resposta inflamatória e produção de quimiocinas, estímulo da angiogênese, estímulo da persistência controla a seleção negativa de células autorreativas (principalmente células B), osteoclastogênese e perda óssea por meio do estímulo do receptor RANK (NOORT; TAK; TAS, 2015; SUN, 2017). Portanto, a ativação destes receptores

pode, juntamente com a ativação do sistema complemento, aumentar o estímulo da inflamação e autoimunidade.

Por último, existe uma relação entre a inflamação e a produção de proteínas citrulinadas; a qual pode demonstrar que a inflamação pode ser um fator de risco ou o evento inicial da autoimunidade, estimulando pelo estímulo da produção de anticorpos anti-CCP (VOSSENAAR *et al.*, 2004).

As vias biológicas potencialmente desreguladas estão interligadas. Ao final, temos ciclos patogênicos viciosos onde pode haver a produção e exposição de autoantígenos ou autoanticorpos, ativação do sistema complemento, perda óssea e a resposta inflamatória com injúria na membrana sinovial. Portanto, a ativação ou desregulação destas vias tem um potencial de retroalimentação positiva para inflamação, predisposição a autoimunidade, injúria sinovial e articular; as quais podem aumentar a predisposição destes indivíduos ao desenvolvimento da AR.

Finalmente, as diferenças nas frequências alélicas e haplotípicas das variantes entre as populações brasileira, Amish e europeia não-finlandesa (população de origem dos menonitas), os quais podem estar associadas com um fator de risco para o desenvolvimento da AR, indicam evidências de um efeito fundador e da deriva genética destas variantes em menonitas. Além disso, estes achados necessitam ser funcionalmente validados, visto que, pode haver evidências de um componente genético de risco para a AR na população menonita.

7 CAPÍTULO 2

7.1 INVESTIGAÇÃO SOBRE VARIANTES PREVIAMENTE ASSOCIADAS EM GWAS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO NA POPULAÇÃO MENONITA

Na população menonita brasileira, houve somente um relato de diagnóstico LES. Portanto, a análises de associação nos exomas com LES foi inviável. No entanto, foi possível investigar variantes previamente associadas

com LES em GWAS nos dados de exomas, analisando sua frequência alélica na população menonita em busca de variantes com efeito fundador.

A busca das variantes previamente associadas com LES em GWAS nos dados de exomas dos menonitas retornaram 21 variantes (*rs10419308*A*, *rs10516487*G*, *rs1059312*G*, *rs1143679*A*, *rs11755393*A*, *rs12093154*A*, *rs1270942*G*, *rs17849501*T*, *rs17849502*T*, *rs1801274*G*, *rs2286672*T*, *rs2288012*A*, *rs2304256*C*, *rs2476601*A*, *rs3131379*A*, *rs35472514*G*, *rs35677470*A*, *rs3794060*C*, *rs405858*T*, *rs428073*T*, *rs6914831*C*), as quais 4 apresentaram o alelo associado com proteção (*rs10419308*A*, *rs12093154*A*, *rs11755393*A*, *rs405858*T*) e as demais (17 variantes) associadas com o desenvolvimento de LES ou outras doenças autoimunes (TABELA 14).

Treze variantes (*rs10419308*A*, *rs1143679*A*, *rs12093154*A*, *rs2286672*T*, *rs2304256*C*, *rs2288012*A*, *rs2476601*A*, *rs35472514*G*, *rs35677470*A*, *rs3794060*C*, *rs405858*T*, *rs428073*T*, *rs6914831*C*) apresentaram evidências de efeito fundador na população menonita: oito variantes (*rs1143679*A*, *rs2286672*T*, *rs2304256*C*, *rs2476601*A*, *rs35472514*G*, *rs3794060*C*, *rs428073*T*, *rs6914831*C*) possuem alelos com efeito de suscetibilidade em menor frequência na população menonita; duas variantes (*rs10419308*A* e *rs405858*T*) possuem alelos com efeito protetor em maior frequência na população menonita; duas variantes (*rs2288012*A* e *rs35677470*A*) possuem alelos com efeito de suscetibilidade em maior frequência na população menonita; uma variante (*rs12093154*A*) possui alelo com efeito protetor em menor frequência na população menonita (TABELA 15).

Em relação ao efeito da deriva genética, dezessete variantes (*rs10419308*A*, *rs10516487*G*, *rs1143679*A*, *rs12093154*A*, *rs1270942*G*, *rs17849501*T*, *rs17849502*T*, *rs1801274*G*, *rs2286672*T*, *rs2288012*A*, *rs2304256*C*, *rs2476601*A*, *rs3131379*A*, *rs35472514*G*, *rs35677470*A*, *rs3794060*C*, *rs6914831*C*) apresentaram evidências deste efeito na população menonita: oito variantes (*rs10516487*G*, *rs1143679*A*, *rs17849501*T*, *rs17849502*T*, *rs3131379*A*, *rs35472514*G*, *rs3794060*C*, *rs6914831*C*) possuem alelos com efeito de suscetibilidade em menor frequência na população menonita; uma variante (*rs10419308*A*) possui alelo com efeito protetor em maior frequência na população menonita; sete variantes (*rs1270942*G*, *rs1801274*G*, *rs2286672*T*, *rs2288012*A*, *rs2304256*C*, *rs2476601*A*,

*rs35677470*A*) possuem alelos com efeito de suscetibilidade em maior frequência na população menonita; uma variante (*rs12093154*A*) possui alelo com efeito protetor em menor frequência na população menonita (TABELA 15).

Por fim, a população menonita apresentou dezessete variantes com frequências alélicas diferentes da população brasileira (*rs10419308*A*, *rs10516487*G*, *rs1059312*G*, *rs1143679*A*, *rs11755393*A*, *rs12093154*A*, *rs1270942*G*, *rs1801274*G*, *rs2286672*T*, *rs2288012*A*, *rs2476601*A*, *rs3131379*A*, *rs35472514*G*, *rs35677470*A*, *rs3794060*C*, *rs405858*T*, *rs6914831*C*): oito possuem alelos com efeito de suscetibilidade em menor frequência na população menonita (*rs10516487*G*, *rs1059312*G*, *rs1143679*A*, *rs1801274*G*, *rs2286672*T*, *rs35472514*G*, *rs3794060*C*, *rs6914831*C*); três variantes (*rs10419308*A*, *rs11755393*A*, *rs405858*T*) possuem alelos com efeito protetor em maior frequência na população menonita; cinco variantes (*rs1270942*G*, *rs2288012*A*, *rs2476601*A*, *rs3131379*A*, *rs35677470*A*) possuem alelos com efeito de suscetibilidade em maior frequência na população menonita; uma variante (*rs12093154*A*) possui alelo com efeito protetor em menor frequência na população menonita (TABELA 15).

TABELA 14 - Variantes associadas em GWAS com lúpus eritematoso sistêmico e doenças autoimunes encontradas na população Menonita brasileira

Gene	Fenótipo	SNV	Alelo	Consequência	OR	IC 95%	p	Referências
<i>TMEM86B</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs10419308	A	Variante na região de <i>splicing</i> e intron	0,83	0,75 - 0,90	4,0 x 10 ⁻⁸	(WANG <i>et al.</i> , 2021)
<i>BANK1</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs10516487	G	Variante não-sinônima e intron	1,38	1,25 - 1,53	4,0 x 10 ⁻¹⁰	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015; KOZYREV <i>et al.</i> , 2008)
<i>SLC15A4</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs1059312	G ^a	Variante sinônima	1,17	1,12 - 1,21	1,0 x 10 ⁻¹³	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)
<i>ITGAM</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs1143679	A	Variante não-sinônima	2,30	1,97 - 2,70	3,0 x 10 ⁻²¹	(ALARCÓN-RIQUELME <i>et al.</i> , 2016; TANGTANATAKUL <i>et al.</i> , 2020)
<i>UHRF1BP1</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs11755393	A ^b	Variante não-sinônima	0,87	0,83 - 0,91	2,0 x 10 ⁻¹²	(GATEVA <i>et al.</i> , 2009; SONG <i>et al.</i> , 2021)
<i>C1QTNF12</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs12093154	A	Variante não-sinônima	0,84	0,78 - 0,90	3,0 x 10 ⁻⁹	(WANG <i>et al.</i> , 2021)
<i>CFB</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs1270942	G ^c	Variante no intron	2,28	2,15 - 2,42	2,0 x 10 ⁻¹⁶⁵	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)
<i>NCF2</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs17849501	T	Variante sinônima	2,01	-	2,0 x 10 ⁻⁵⁹	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)
<i>NCF2</i>	Esclerose sistêmica ou lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatoide ou miopatias inflamatórias idiopáticas	rs17849502	T	Variante não-sinônima	2,62	1,37 - 5,02	3,0 x 10 ⁻¹⁷	(ACOSTA-HERRERA <i>et al.</i> , 2019; LEFFERS <i>et al.</i> , 2022; SAKAUE <i>et al.</i> , 2021)
<i>FCGR2A</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs1801274	G ^d	Variante não-sinônima	1,16	1,11 - 1,21	1,0 x 10 ⁻¹²	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)
<i>PLD2</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs2286672	T	Variante não-sinônima	1,27	1,16 - 1,35	3,0 x 10 ⁻⁹	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)
<i>PRSS54</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs2288012	A	Variante sinônima	1,12	1,07 - 1,17	4,0 x 10 ⁻⁶	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)
<i>TYK2</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs2304256	C	Variante não-sinônima	1,24	1,17 - 1,31	4,0 x 10 ⁻¹³	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)
<i>PTPN22</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs2476601	A	Variante não-sinônima e intron	1,43	1,34 - 1,53	1,0 x 10 ⁻²⁸	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015; GATEVA <i>et al.</i> , 2009)
<i>MSH5</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs3131379	A	Variante no intron	2,36	2,11 - 2,64	2,0 x 10 ⁻⁵²	(INTERNATIONAL CONSORTIUM FOR SYSTEMIC LUPUS

<i>ITGAM</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs35472514	G	Variante no intron	1,70	-	4,0 x 10 ⁻⁵²	ERYTHEMATOSUS GENETICS (SLEGEN) <i>et al.</i> , 2008)
<i>DNASE1L3</i>	Esclerose sistêmica ou lúpus eritematoso sistêmico ou artrite reumatoide ou miopatias inflamatórias idiopáticas	rs35677470	A	Variante não-sinônima	1,22	1,14 - 1,30	5,0 x 10 ⁻⁹	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)
<i>NADSYN1</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs3794060	C	Variante no intron	1,23	1,18 - 1,29	1,0 x 10 ⁻²⁰	(ACOSTA-HERRERA <i>et al.</i> , 2019)
<i>ANKRD27</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs405858	T	Variante sinônima	0,89	0,85 - 0,93	2,0 x 10 ⁻⁹	(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)
<i>TAOK3</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs428073	T	Variante não-sinônima	1,12	1,08 - 1,16	3,0 x 10 ⁻⁸	(WANG <i>et al.</i> , 2021)
<i>AHL1</i>	lúpus eritematoso sistêmico	rs6914831	C	Variante não-sinônima e intron	1,11	1,07 - 1,16	4,0 x 10 ⁻⁷	(GATEVA <i>et al.</i> , 2009; WANG <i>et al.</i> , 2022)
								(BENTHAM <i>et al.</i> , 2015)

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Alelo: Alelo do SNV associado com o fenótipo. Consequência: consequência causada pelo SNV. Gene: gene onde o SNV se encontra localizado. OR: Odds ratio. *p*: menor valor reportado. SNV: ID do dbSNP. IC 95%: Intervalo de confiança de 95% do Odds Ratio. -: informação não reportada. ^a O alelo associado reportado pelo estudo foi "C". ^b O alelo "G" também já foi reportado associado com lúpus eritematoso sistêmico (OR = 1,10, IC 95% = 1,10 – 1,24 e *p* = 2,2 x 10⁻⁸). ^c O alelo associado reportado pelo estudo foi "C". ^d O alelo associado reportado pelo estudo foi "C".

TABELA 15 - Comparação das frequências alélicas de variantes associadas em GWAS com LES nas populações menonitas brasileiras, europeias não-finlandesas e brasileira

SNV	Alelo	Menonita % (n)	non-FIN EURO % (n)	p^*	Amish % (n)	p^{**}	ABRAOM % (n)	p^{***}
<u>rs10419308^a</u>	A	26,15 (650)	18,67 (67968)	$1,2 \times 10^{-16}$	16,89 (912)	$8,5 \times 10^{-6}$	19,56 (2342)	$2,6 \times 10^{-4}$
<u>rs10516487^a</u>	G	67,69 (650)	70,16 (67986)	0,17	82,89 (912)	$2,7 \times 10^{-12}$	74,64 (2342)	$4,1 \times 10^{-4}$
<u>rs1059312^a</u>	G ^c	37,85 (650)	38,91 (67986)	0,58	38,19 (906)	0,89	44,88 (2342)	$1,4 \times 10^{-3}$
<u>rs1143679^a</u>	A	8,15 (650)	11,56 (67982)	$6,8 \times 10^{-3}$	19,12 (910)	$1,4 \times 10^{-9}$	17,25 (2342)	$1,2 \times 10^{-8}$
<u>rs11755393^a</u>	A	67,85 (650)	65,33 (67996)	0,18	69,45 (910)	0,50	55,89 (2342)	$4,5 \times 10^{-8}$
<u>rs12093154^a</u>	A	5,69 (650)	9,54 (67990)	$8,8 \times 10^{-4}$	11,18 (912)	$1,7 \times 10^{-4}$	8,67 (2342)	0,013
<u>rs1270942^a</u>	G ^d	12,46 (650)	10,70 (67996)	0,15	7,13 (912)	$3,6 \times 10^{-4}$	4,53 (2342)	$1,4 \times 10^{-13}$
<u>rs17849501^a</u>	T	3,69 (650)	5,01 (68028)	0,13	11,07 (912)	$1,2 \times 10^{-7}$	4,31 (2342)	0,48
<u>rs17849502^a</u>	T	3,69 (650)	5,00 (68032)	0,13	10,99 (910)	$1,5 \times 10^{-7}$	4,39 (2342)	0,43
<u>rs1801274^a</u>	G ^e	47,54 (650)	50,82 (67990)	0,096	36,84 (912)	$2,3 \times 10^{-5}$	51,96 (2342)	0,045
<u>rs2286672^b</u>	T	4,92 (650)	7,56 (68004)	$8,9 \times 10^{-3}$	0,44 (912)	$6,2 \times 10^{-9}$	8,42 (2342)	$2,6 \times 10^{-3}$
<u>rs2288012^a</u>	A	24,46 (650)	22,05 (67986)	$1,1 \times 10^{-5}$	14,62 (910)	0,013	23,40 (2342)	$4,8 \times 10^{-12}$
<u>rs2304256^a</u>	C	76,77 (650)	72,23 (68024)	0,01	58,52 (904)	$6,4 \times 10^{-14}$	74,55 (2342)	0,25
<u>rs2476601^a</u>	A	7,69 (650)	10,04 (68020)	0,047	3,95 (912)	$1,4 \times 10^{-3}$	4,61 (2342)	$1,9 \times 10^{-3}$
<u>rs3131379^a</u>	A	6,45 (650)	10,76 (68018)	0,13	6,91 (912)	$1,3 \times 10^{-4}$	4,91 (2342)	$2,4 \times 10^{-12}$
<u>rs35472514^a</u>	G	8,92 (650)	12,44 (67980)	$6,8 \times 10^{-3}$	19,09 (906)	$2,6 \times 10^{-8}$	17,25 (2342)	$2,0 \times 10^{-7}$
<u>rs35677470^b</u>	A	10,77 (650)	7,57 (68012)	$3,6 \times 10^{-3}$	1,97 (912)	$1,5 \times 10^{-13}$	4,10 (2342)	$1,4 \times 10^{-9}$
<u>rs3794060^a</u>	C	19,69 (650)	25,72 (67972)	$4,6 \times 10^{-4}$	27,74 (912)	$2,6 \times 10^{-4}$	49,70 (2342)	$< 2,2 \times 10^{-16}$
<u>rs405858^a</u>	T	72,77 (650)	68,86 (68006)	0,03	76,43 (908)	0,10	59,22 (2342)	$3,0 \times 10^{-10}$
<u>rs428073^a</u>	T	65,85 (650)	69,45 (67990)	0,047	64,14 (912)	0,49	69,81 (2342)	0,053
<u>rs6914831^a</u>	C	44,46 (650)	56,58 (67986)	$5,5 \times 10^{-10}$	66,89 (912)	$< 2,2 \times 10^{-16}$	59,48 (2342)	$8,6 \times 10^{-12}$

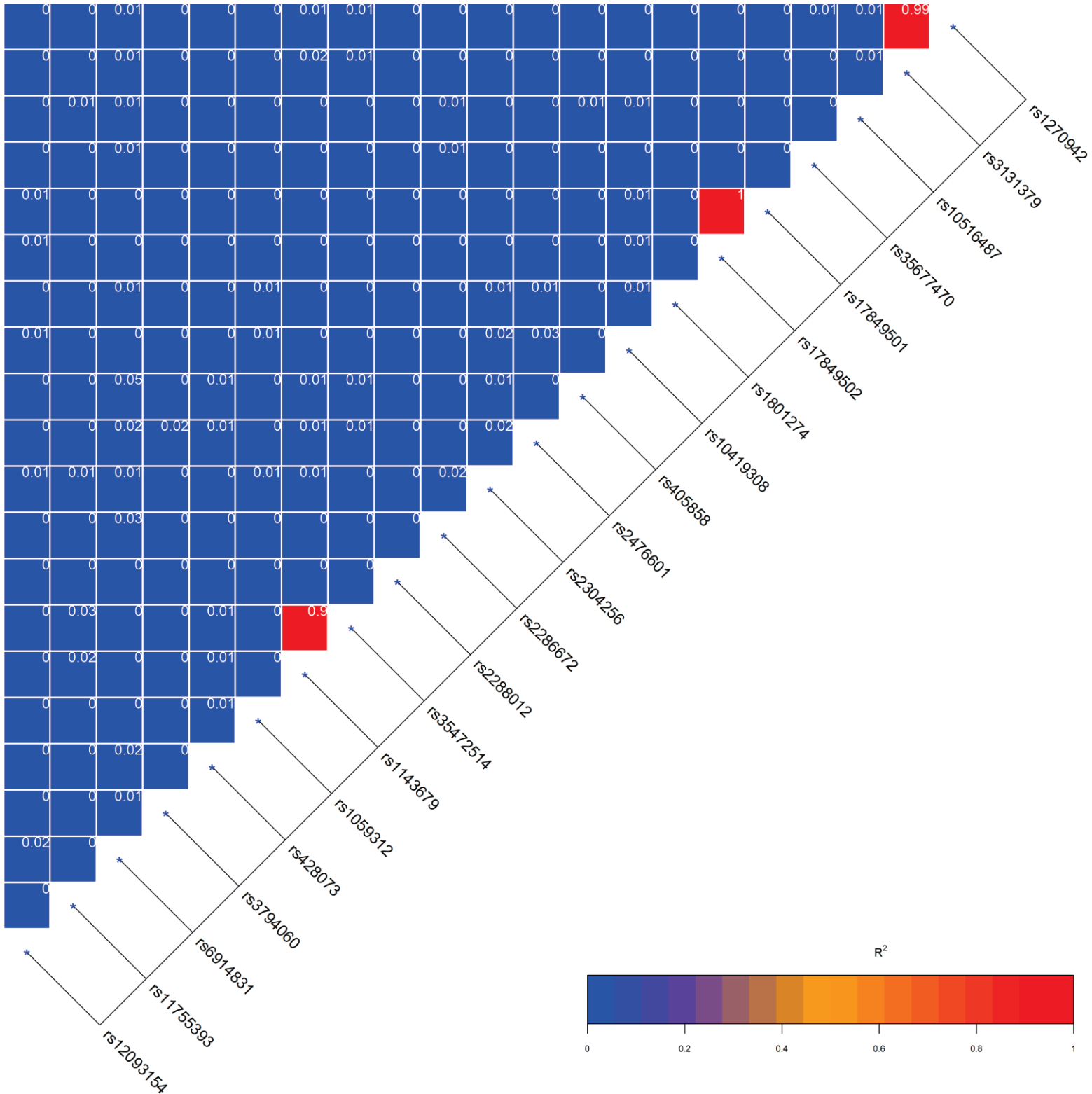
FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: SNV: ID do dbSNP. Alelo: Alelo do SNV associado com o fenótipo. Menonita % (n): porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (nº de cromossomos) na população menonita brasileira. non-FIN EURO %: porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (nº de cromossomos) reportada na população europeia não-finlandesa pelo gnomAD (v3.1.2). p^* : valor de p obtido pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher na comparação da frequência alélica da população menonita vs europeia não-finlandesa. Amish %: porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (nº de cromossomos) reportada na população amish pelo gnomAD (v3.1.2). p^{**} : valor de p obtido pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher na comparação da frequência alélica da população menonita vs amish. ABRAOM %: porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (nº de cromossomos) reportada na população brasileira pelo ABRAOM (Brazilian Genomic Variants), p^{***} : valor de p obtido pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher na comparação da frequência alélica da população menonita vs brasileira. ^a: Teste do qui-quadrado de Pearson. ^b: Teste exato de Fisher. ^c: O alelo associado reportado pelo estudo foi "C". ^d: O alelo associado reportado pelo estudo foi "C". ^e: O alelo associado reportado pelo estudo foi "C". Em negrito estão os valores

p estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Coluna do SNV: estão em *italico* as associações protetivas para o lúpus eritematoso sistêmico e as sublinhadas são associações de suscetibilidade.

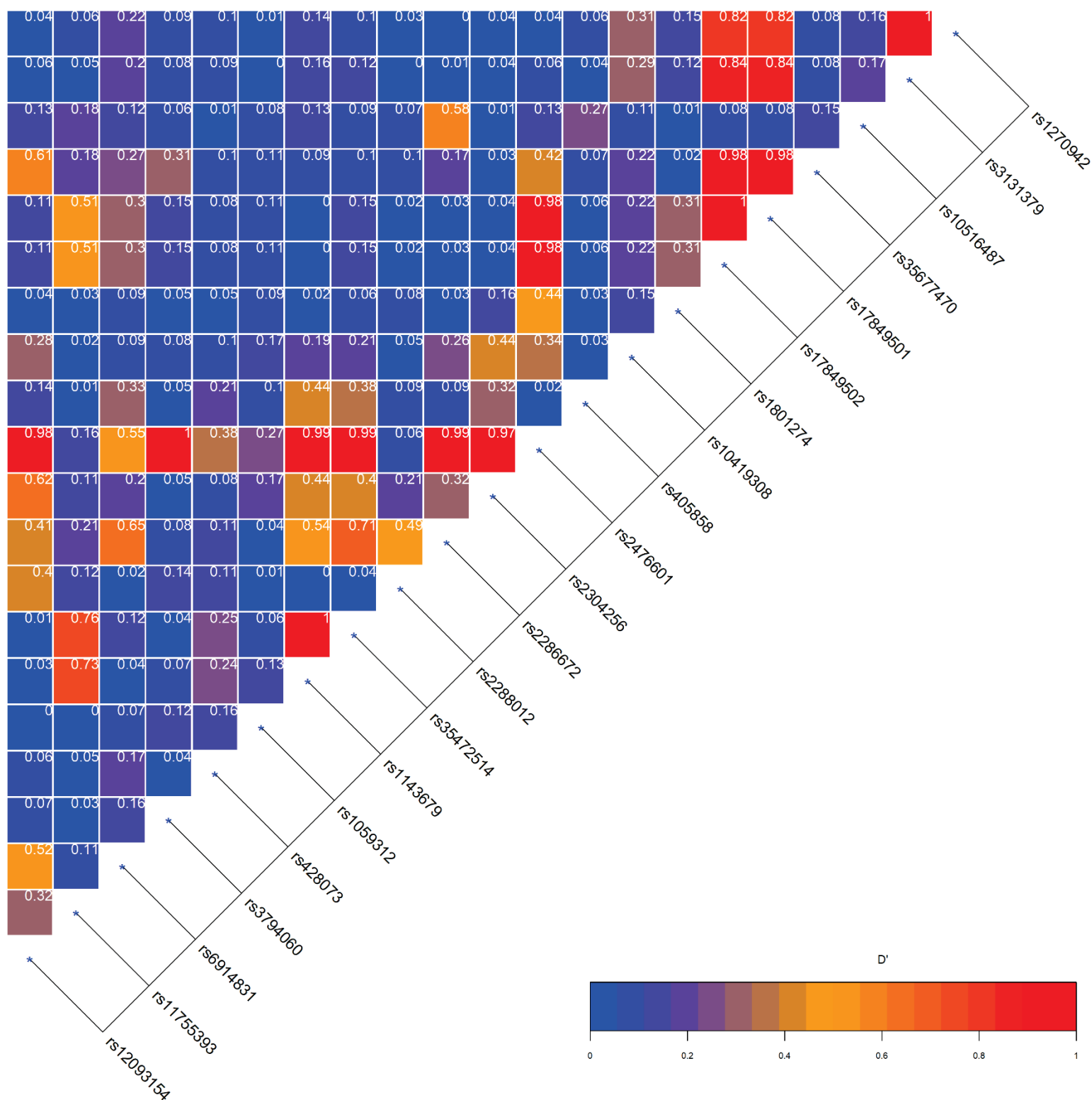
Por fim, a avaliação das frequências de haplótipos das variantes associadas em GWAS revelou a existência de três haplótipos (FIGURAS 18 e 19), os quais apresentam diferentes frequências em relação a população europeia não-finlandesa (TABELA 16). Os referidos haplótipos constituem-se por *rs1143679*A_rs35472514*G* (gene *ITGAM*), *rs17849502*T_rs17849501*T*, (gene *NCF2*) e *rs3131379*A_rs1270942*G* (gene *MSH5* e *CFB*). A frequência dos haplótipos com os alelos associados foram avaliados (todos possuíam associação de suscetibilidade), dois (*rs1143679*A_rs35472514* - gene, *rs17849502*T_rs17849501*T*) estão em menor frequência (8,15% vs 13,37%, 3,69% vs 6,81% e $p \leq 0,01$ respectivamente) e somente um (*rs3131379*A_rs1270942*G*) com maior frequência (12,46% vs 7,05% e $p = 5,8 \times 10^{-4}$) na população menonita em relação à população europeia não-finlandesa (TABELA 16).

FIGURA 18 -- Desequilíbrio de ligação representado pelos valores de R^2 entre SNPs associados em GWAS para SLE, em menonitas.



FONTE: O autor (2023)

FIGURA 19 – Valores de D' entre os SNPs associados em GWAS com LES, em menonitas.



FONTE: O autor (2023)

TABELA 16 - Comparação das frequências haplotípicas das variantes associadas em GWAS com LES, nas populações menonitas brasileiras e europeias não-finlandesas e brasileira

Haplótipo	Menonitas % (n)	non-FIN EURO % (n)	p
rs1143679_rs35472514			
AG	8,15 (650)	13,37 (803)	2,4 x 10⁻⁴
rs17849502_rs17849501			
TT	3,69 (650)	6,81 (808)	0,01
rs3131379_rs1270942			
AG	12,46 (650)	7,05 (801)	5,8 x 10⁻⁴

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: Menonitas % (n): porcentagens das frequências haplotípicas e número amostral total na população menonita brasileira. non-FIN EURO %: porcentagens das frequências haplotípicas e número amostral total reportada na população europeia não finlandesa no LDhap (as populações seguintes populações foram utilizadas: CEU - residentes da cidade de Utah nos Estados Unidos da América com ancestralidade predominantemente do norte e oeste da Europa, TSI –Toscanos na Itália, GBR – indivíduos residente na Inglaterra e Escócia, IBS – indivíduos Ibéricos na Espanha). *p*: valor de *p* obtido pelo teste exato de Fisher na comparação da frequência haplotípica da população menonita vs europeia não-finlandesa. Os valores de *p* < 0.05 foram considerados estatisticamente significativos.

Em suma, a população menonita apresenta evidências de um possível efeito fundador com um componente genético protetor para o LES, as quais em seu maior número são variantes com maior frequência alélica de associação protetora e menor frequência para suscetibilidade para o LES. Além disso, viu-se que um maior número de haplótipos com alelos com associação de risco, para o desenvolvimento do LES, estão em menor frequência em relação a população europeia não-finlandesa. Portanto, estes achados trazem das evidências do componente genético protetor para o LES na população menonita brasileira.

7.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE NETS EM PACIENTES BRASILEIROS COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO

O manuscrito anexado neste apêndice foi formatado e enviado à revista *Lupus – SAGE* no modelo de *concise report*.

Association of neutrophil extracellular traps levels with Raynaud's phenomenon, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies and glomerulonephritis in SLE patients from Brazil

Eduardo Delabio Auer¹, Valéria Bumiller-Bini Hoch¹, Emiliano Borges da Silva² Yohan Ricci Zonta³, Luciane Alarcão Dias-Melicio^{3,4}, Thelma Larocca Skare⁵, Vanessa F. Picceli⁶, Iara Messias-Reason⁷, Angelica Beate Winter Boldt^{1*}.

¹Postgraduate Program in Genetics. Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, Paraná, Brazil.

²Federal University of Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.

³São Paulo State University (UNESP), Medical School of Botucatu, Laboratory of Immunopathology and Infectious Agents - LIAI, UNIPLEX - Experimental Research Unity, Sector 5, Botucatu, SP, Brazil.

⁴São Paulo State University (UNESP), Medical School of Botucatu, Department of Pathology, Botucatu, SP, Brazil.

⁵Mackenzie Evangelical School of Medicine Paraná– Curitiba, Paraná, Brazil.

⁶Hospital Geral de Curitiba - Exército Brasileiro - Curitiba, Paraná, Brazil.

⁷Laboratory of Immunopathology, Department of Clinical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

*Corresponding author:

Angelica Beate Winter Boldt
angelicaboldt@gmail.com

Universidade Federal do Paraná
Centro Politécnico, Departamento de Genética
Curitiba, PR, Brazil. Caixa Postal 19071
81531-980 Curitiba

ABSTRACT

Background: Neutrophil extracellular traps (NETs) are cell-extruded DNA strands coated with neutrophils' nuclear proteins and enzymes from cytotoxic granules, produced by NETosis, a cell death pathway. They perform an important defensive role in innate immunity, but their increased production and/or inefficient degradation expose new antigens, such as DNA or citrullinated histone peptides, triggering autoimmunity. **Objectives:** This study aimed to access possible associations between serum NETs levels with epidemiological, clinical, and serological data from a well-characterized SLE Brazilian patients' cohort. **Methods:** NET levels were

evaluated in one hundred seventy serum samples of patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) using an Immunoassay. Univariate and multivariate binary logistic regression used clinical patients' data as independent variables. Parametric and non-parametric tests compared log₁₀ base serum NET levels transformed between patients' groups. SLE patients were also dichotomized into "High serum NET levels" and "Low serum NET levels" groups. All analyses were performed in R language 4.1.2, and $p < 0.05$ were considered significant. **Results:** Increased susceptibility for high serum NET levels was observed in SLE patients with Raynaud's phenomenon (OR = 2.30, 95% CI = 1.06 – 5.21 and $p = 0.039$), independently of any other risk factor. Also, SLE patients with Raynaud's phenomenon presented higher mean NET serum compared to patients without its levels (mean = -0.13 vs -0.51, $p = 0.01$). In addition, higher mean NET serum levels were associated with glomerulonephritis (mean = -0.45 vs -0.12, $p = 0.03$). Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) positivity were related to higher mean NET serum levels (mean = 0.03 vs -0.41, $p = 0.03$) in the SLE patients. **Conclusions:** The formation of NETs might be implicated in Raynaud's phenomenon, ANCA production, and glomerulonephritis in SLE patients. Our results highlight the importance of serum NET levels as a possible therapeutical target to modulate the clinical course of SLE.

Keywords: NETs, SLE; glomerulonephritis, ANCA; Raynaud's syndrome.

INTRODUCTION

Neutrophil extracellular traps (NETs) are an innate immunity defensive mechanism against bacteria and other pathogens. Neutrophils produce NETs by extruding DNA

containing citrullinated histones, nuclear proteins and enzymes released from the nucleus and cytotoxic granules as elastase and myeloperoxidase during NETosis, a cell death pathway (GRAYSON; KAPLAN, 2016). Increased production or inefficient NET degradation are proposed to enhance the susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and vasculitis associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA), due to the exposure of previously hidden antigens including DNA, citrullinated histones and neutrophil enzymes (APEL; ZYCHLINSKY; KENNY, 2018; GRAYSON; KAPLAN, 2016; KIMURA *et al.*, 2021; LEFFLER *et al.*, 2013; SCHREIBER *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2015). In this study, we explored the association of NET levels with clinical features in Brazilian SLE patients.

METHODS

Patients and samples

A total of 170 serum samples obtained from SLE patients followed up at the Rheumatologic Clinic of the Mackenzie Evangelical Hospital of Paraná in Curitiba, Southern Brazil were evaluated for NETs levels.

Neutrophil extracellular traps (NETs) quantification

Serum NET levels (ng/mL) quantification were measured by an immunoassay using anti-elastase (Calbiochem – Merck Millipore) and Quant-iT™ PicoGreen® kit (Invitrogen - Carlsbad, Califórnia, USA) according to the manufacturer's instructions, with some adaptations (KRETZSCHMAR *et al.*, 2021; ZONTA *et al.*, 2021). Briefly, anti-elastase (5 µg/mL) antibody (Calbiochem – Merck Millipore) was used to coat a 96-well clear-bottom black plate (Corning - Corning, Nova York, EUA) overnight at

4°C. Supernatants were then settled to the plate, and the extracellular DNA bounded to the elastase, a NET constituent, was measured with Quant-iT™ PicoGreen® kit. Samples were analyzed by fluorescence intensity (excitation at 488 nm and emission at 525 nm wavelength) by a FlexStation 3 Microplate Reader (Molecular Devices, CA, USA), and concentrations were calculated comparing to a standard curve using known levels of DNA. The immunoassays were conducted in Laboratory of Immunopathology and Infectious Agents - LIAI, UNIPEX, FMB, UNESP.

STATISTICAL ANALYSIS

The SLE patients were dichotomized into "High serum NET levels" and "Low serum NET levels" groups using the third quartile (0.77 ng/mL) as a threshold. Associations with $p < 0.20$ in the univariate analysis were selected to create a stepwise multivariate binary logistic regression model. Lilliefors and F tests were used to evaluate normality of data distribution and to assess the variance hypothesis, after log10 base transformation of serum NET levels. Then, according to the results, a parametric test (Fisher's one-way ANOVA and Student t-test) or *non-parametric* (Mann-Whitney) compared continuous variables between the groups. ROC curve analyses were made with "PlotROC" and "easyROC" packages using log10 base transformed serum NET levels. All associated clinical features were evaluated by ROC curve analyses. Also, the Younden method assessed sensibility and specificity. All analyses were performed in R language 4.2.2 and $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

One hundred and fifty-eight epidemiological, clinical, and serological data were collected from 170 SLE patients; except serum NETs levels ($n = 170$), antiphospholipid syndrome ($n = 156$), erythrocyte sedimentation rate ($n = 137$), SLEDAI score ($n = 167$), C-reactive protein ($n = 135$), and miscarriage ($n = 148$). After log10 transformation of serum NETs levels, ninety-three quantifications were available for analysis (Table 1). Regarding patients' description data, one hundred and forty-eight (93.7%) were female, ninety-three (58.9%) had predominantly European ancestry, sixty-seven (42.4%) were diagnosed with glomerulonephritis, seventy-five (47.5%) presented Raynaud's phenomenon, and twenty-six (16.5%) were positive for ANCA IgG and or IgM positive (Table 1).

Raynaud's phenomenon in SLE patients was associated with higher NET serum levels ($p = 0.01$ and Figure 1a) and more susceptibility to increased serum NETs levels (OR = 2.30, 95% CI = 1.06 - 5.21, $p = 0.039$ and Supplementary table 2). Interestingly, Raynaud's phenomenon was the only clinical manifestation independently associated with high serum NET levels.

We also observed that ANCA-positive SLE patients had increased serum NET compared to ANCA-negative SLE patients ($p = 0.03$ and Figure 1b). Moreover, high serum NET levels were associated with glomerulonephritis in SLE patients with high ($p = 0.03$ and Figure 1c).

DISCUSSION

Raynaud's phenomenon can cause ischemia-reperfusion events. These events stimulate platelet activation, which increases the production of NETs through two different pathways. First, by recognizing platelet-released products (such as mitochondria or mitochondrial DNA) by the DAMP (damage-associated molecular

pattern) recognition pathway. Second, by interacting P-selectin and GPIb on activated platelets with their neutrophil receptors (P-selectin-binding glycoprotein 1 - PSGL-1 and CD18, respectively) (CARESTIA *et al.*, 2016; ETULAIN *et al.*, 2015; JANSEN *et al.*, 2017; PAMUK *et al.*, 2007; SHEMIRANI *et al.*, 2012). These mechanisms may explain the association of high serum NET levels with Raynaud's phenomenon observed in Brazilian SLE patients.

Higher production and/or decreased degradation of NETs may also lead to the exposure of autoantigens and activation of the alternative complement pathway, reported to be involved in the pathogenesis of ANCA vasculitis and SLE glomerulonephritis (KIMURA *et al.*, 2021; LEFFLER *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015; WESTHORPE *et al.*, 2017). An ANCA-associated vasculitis was recently reported in an SLE patient presenting NET renal deposition and lower NET degradation in serum (SENDA *et al.*, 2022).

Ultimately, our results bring new information about SLE patients, corroborating the possible role of NETs in the pathogenic pathways involved in ANCAs and glomerulonephritis in SLE patients.

CONCLUSIONS

Increased serum NET levels were associated with clinical features such as Raynaud's phenomenon, ANCA positivity, and glomerulonephritis in SLE patients from Brazil, highlighting the possible pathogenic importance of NETs in the disease process. Since higher NET production and/or reduced degradation may be implicated in ANCA and glomerulonephritis pathogenic pathways in SLE, controlling NET production or degradation might be a promising therapeutic strategy in the treatment of SLE patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are deeply grateful for the patients who volunteered for this study. We also thank Tamyres Mingorance Carvalho for suggestions and advices regarding the ROC plots analysis.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IMR, VFP and TLS, collected or provided samples with clinical data; EBS, YRZ, and LADM dosed the samples; EBS, VBB and EDA aliquoted patients' sera samples; EDA and ABWB analyzed the data; LADM provided reagents and assays; EDA and ABWB drafted the manuscript; all authors critically reviewed and revised the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interests.

FUNDING

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This article was supported by grants of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROAP–Finance Code 001, PROBAL Edital nº 14/2019 -

88887.371430/2019-00), financial support and scholarships to EDA (88882.382141/2019-01); and from Fundação Araucária and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (PPSUS 053/2021). ABWB and IJMR received a CNPq research productivity scholarship (protocol numbers 314288/2018–0 and 313741/2021-2). The funding agencies had no role in study design, interpretation, and manuscript drafting and submission.

REFERENCES

- APEL, F.; ZYCHLINSKY, A.; KENNY, E. F. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 467–475, 2018.
- CARESTIA, A. *et al.* Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 153–162, 2016.
- ETULAIN, J. *et al.* P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. **Blood**, [s. l.], v. 126, n. 2, p. 242–246, 2015.
- GRAYSON, P. C.; KAPLAN, M. J. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 253–264, 2016.
- JANSEN, M. P. B. *et al.* Release of extracellular DNA influences renal ischemia reperfusion injury by platelet activation and formation of neutrophil extracellular traps. **Kidney International**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 352–364, 2017.
- KIMURA, H. *et al.* Immunohistochemical detection of citrullinated histone H3-positive neutrophils is useful for identifying active glomerular and interstitial lesions in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. **Histopathology**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 520–531, 2021.
- KRETZSCHMAR, G. C. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps: A Perspective of Neuroinflammation and Complement Activation in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 8, n. April, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.630869/full>.
- LEFFLER, J. *et al.* Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. R84, 2013.
- PAMUK, G. E. *et al.* Increased circulating platelet–leucocyte complexes in patients with primary Raynaud's phenomenon and Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis: a comparative study. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 297–302, 2007.
- SCHREIBER, A. *et al.* Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 114, n. 45, 2017. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1708247114>.

SENDA, A. *et al.* Involvement of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of glomerulonephritis in a case of systemic lupus erythematosus and antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis overlap syndrome. **CEN Case Reports**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 339–346, 2022.

SHEMIRANI, A.-H. *et al.* Increased mean platelet volume in primary Raynaud's phenomenon. **Platelets**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 312–316, 2012.

WANG, H. *et al.* Neutrophil extracellular traps can activate alternative complement pathways. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 181, n. 3, p. 518–527, 2015.

WESTHORPE, C. L. V. *et al.* In Vivo Imaging of Inflamed Glomeruli Reveals Dynamics of Neutrophil Extracellular Trap Formation in Glomerular Capillaries. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 187, n. 2, p. 318–331, 2017.

ZONTA, Y. R. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis Releases a DNase-Like Protein That Degrades NETs and Allows for Fungal Escape. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.592022/full>.

Table 1 – Descriptive data of SLE patients.

Data		
<i>Epidemiological</i>	n	
Active Smoker	158	0 / 158 (0.0%)
Age at Diagnosis	158	
Range ^a		0 - 69
Mean (SD) ^b		31 (11)
Ancestry	158	
Predominant African		65 / 158 (41.1%)
Predominant European		93 / 158 (58.9%)
Disease duration (months)	158	
Range ^a		0 - 384
Median (IQR) ^c		36 (12 - 72)
Sex	158	
Female		148 / 158 (93.7%)
Male		10 / 158 (6.3%)
Tobacco exposure	158	0 / 158 (0.0%)
<i>Clinical</i>	n	
Alopecia	158	83 / 158 (52.5%)
Photosensitivity	158	110 / 158 (69.6%)
Oral ulcers	158	63 / 158 (39.9%)
Malar rash	158	74 / 158 (46.8%)
Discoid lesion	158	23 / 158 (14.6%)
Raynaud's phenomenon	158	75 / 158 (47.5%)
Articular involvement	158	116 / 158 (73.4%)
Glomerulonephritis (Presence)	158	67 / 158 (42.4%)
Glomerulonephritis (Class)	67	
Class 1		2 / 158 (1.3%)
Class 2		4 / 158 (2.5%)
Class 3		14 / 158 (8.9%)
Class 4		25 / 158 (15.8%)
Class 5		17 / 158 (10.8%)
Class 6		5 / 158 (3.2%)
Hemolysis	158	13 / 158 (8.2%)
Leukopenia	158	42 / 158 (26.6%)
Thrombocytopenia	158	32 / 158 (20.3%)
Serositis	158	38 / 158 (24.1%)
Seizures	158	17 / 158 (10.8%)
Psychosis	158	15 / 158 (9.5%)

Hypothyroidism	158	43 / 158 (27.2%)
Antiphospholipid syndrome	156	8 / 156 (5.1%)
Miscarriage	148	32 / 148 (21.6%)
Erythrocyte sedimentation rate (cm)	137	
Range ^a		1.00 – 140.00
Median (IQR) ^c		20.00 (12.00 – 38.00)
SLEDAI (score)	167	
Range ^a		0.00 – 14.00
Median (IQR) ^c		1.00 (0.00 – 4.00)
Serological	n	
ANA	158	158 / 158 (100%)
anti-dsDNA	158	53 / 158 (33.5%)
anti-La	158	36 / 158 (22.8%)
anti-RNP	158	44 / 158 (27.8%)
anti-Ro	158	65 / 158 (41.1%)
anti-Sm	158	41 / 158 (25.9%)
Coombs Test	158	11 / 158 (7.0%)
C-reactive protein (mg/L)	135	
Range ^a		0.00 – 192.00
Median (IQR) ^c		5.00 (3.00 - 13.85)
Rheumatoid factor	158	37 / 158 (23.4%)
Anticardiolipin	158	18 / 158 (11.4%)
VDRL Test	158	11 / 158 (7.0%)
ANCA IgG	158	19 / 158 (12.0%)
ANCA IgM	158	19 / 158 (12.0%)
ANCA (IgG and or IgM positive)	158	26 / 158 (16.5%)
Serum NET levels (ng/mL)	170	
Range ^a		0.00 - 28.11
Median (IQR) ^c		0.04 (0.00 - 0.49)
log10 serum NET levels	93	
Range ^a		-1.82 - 1.45
Mean (SD) ^b		-0.31 (0.72)

^aRange: minimum - maximum; ^bMean (SD): mean with standard deviation; ^cMedian (IQR): median with interquartile range; n: sample size.

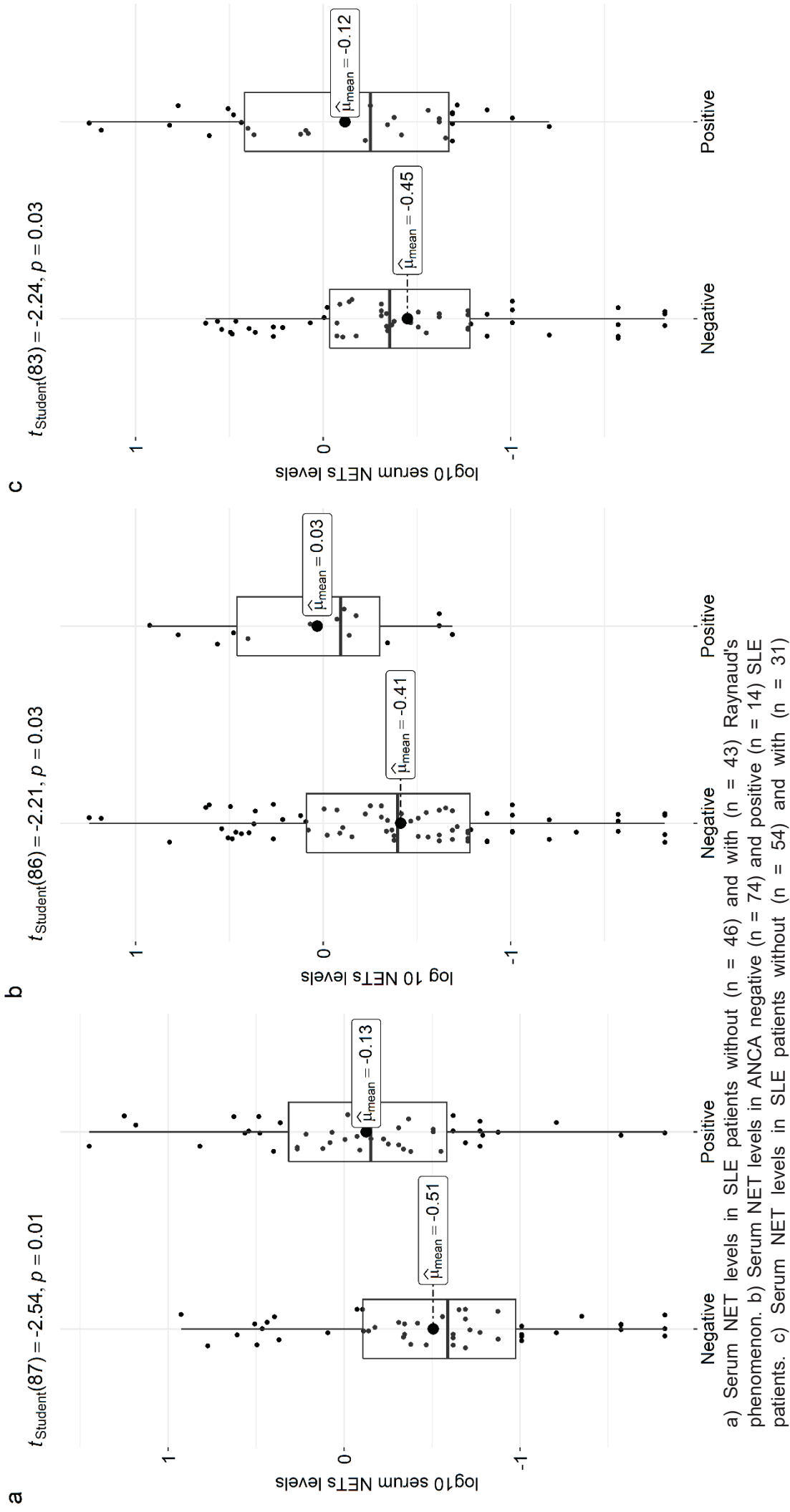
Table 2 - Univariate association between serum NET levels and SLE clinical and serological data.

Data	OR	95% CI	p
Epidemiological			
Active Smoker	1.53	0.67 - 3.41	0.30
Age at Diagnosis	1.00	0.96 - 1.03	0.88
Ancestry	1.70	0.79 - 3.72	0.18
Disease duration (months)	1.00	0.99 - 1.00	0.50
Sex	0.94	0.14 - 3.97	0.93
Tobacco exposure	1.38	0.61 - 3.03	0.42
Clinical			
Alopecia	0.95	0.44 - 2.06	0.90
Photosensitivity	1.47	0.63 - 3.74	0.39
Oral ulcers	1.14	0.52 - 2.48	0.74
Malar rash	1.73	0.80 - 3.81	0.17
Discoid lesion	2.35	0.86 - 6.04	0.082
Raynaud's phenomenon	2.30	1.06 - 5.21	0.039
Articular involvement	0.96	0.41 - 2.36	0.92
Glomerulonephritis (Presence)	0.85	0.38 - 1.85	0.69
Glomerulonephritis (Class)	0.94	0.55 - 1.63	0.83
Hemolysis	0.67	0.10 - 2.66	0.61
Leukopenia	0.86	0.33 - 2.02	0.73
Lymphopenia	0.61	0.17 - 1.75	0.40
Thrombocytopenia	0.48	0.13 - 1.34	0.20
Serositis	1.01	0.39 - 2.41	0.98

Seizures	0.21	0.01 - 1.11	0.14
Psychosis	0.56	0.08 - 2.15	0.46
Hypothyroidism	1.45	0.62 - 3.28	0.38
Antiphospholipid syndrome	1.31	0.19 - 6.03	0.75
Miscarriage	1.07	0.39 - 2.68	0.88
Erythrocyte sedimentation rate (cm)	1.00	0.99 - 1.02	0.61
SLEDAI (score)	1.05	0.94 - 1.17	0.38
Serological			
anti-dsDNA	1.17	0.51 - 2.58	0.70
anti-La	1.11	0.43 - 2.65	0.82
anti-RNP	0.51	0.18 - 1.26	0.17
anti-Ro	1.07	0.48 - 2.32	0.87
anti-Sm	0.44	0.14 - 1.15	0.12
Anticardiolipin	1.54	0.46 - 4.46	0.45
Coombs Test	0.36	0.02 - 1.98	0.34
C-reactive protein (mg/L)	1.01	0.99 - 1.03	0.39
Rheumatoid factor	0.38	0.11 - 1.07	0.094
VDRL Test	0.83	0.12 - 3.44	0.82
ANCA IgG	1.01	0.27 - 3.04	0.98
ANCA IgM	1.01	0.27 - 3.04	0.98
ANCA (IgG and or IgM positive)	1.50	0.54 - 3.83	0.41

OR: Odds Ratio; 95% CI: 95% Confidence interval; *p*: *p*-value. *p* < 0.05 were considered significant; In bold: significant *p*-values.

Figure 1 - Serum NET levels in patients with Raynaud's phenomenon, ANCA and/or glomerulonephritis.

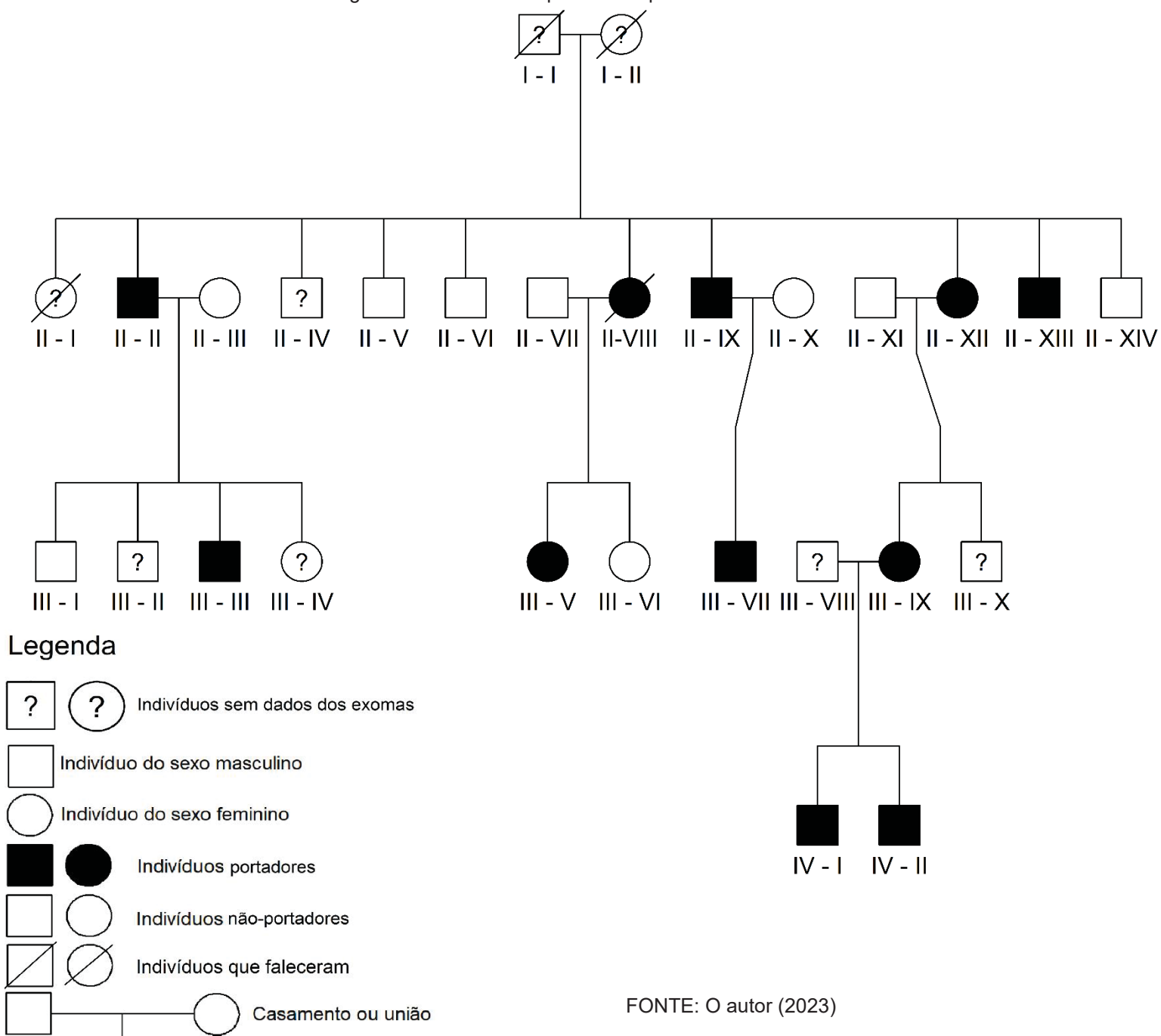


glomerulonephritis. n : sample size. $\hat{\mu}$ mean: group mean. t_{student} : a t-statistic value obtained from Student t-test. p : p-value obtained from Student t-test.

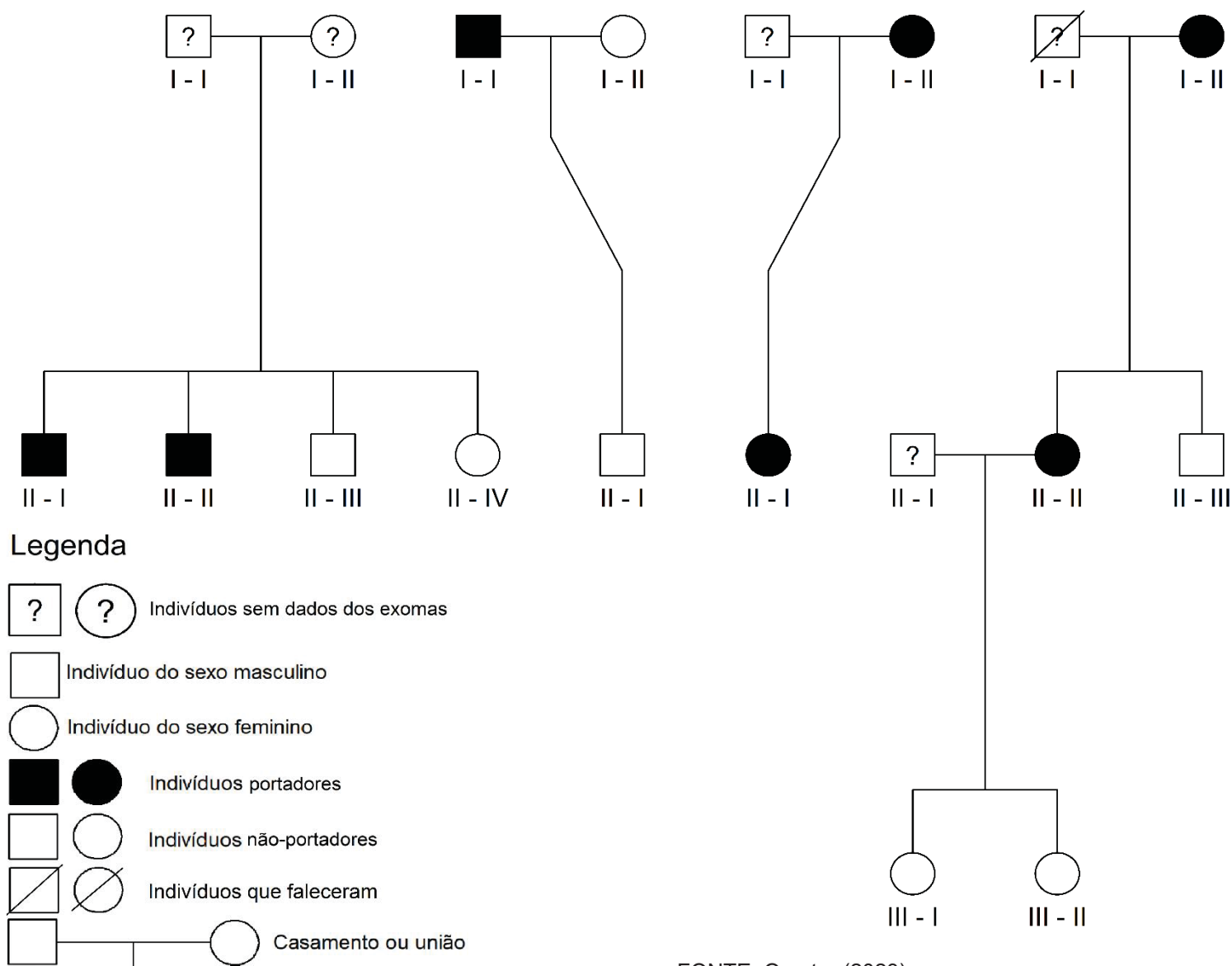
8 CAPÍTULO 3

8.1 INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES DO GENE *LBR* E SUA ASSOCIAÇÃO COM A ANOMALIA DE PELGÜER-HUET NA POPULAÇÃO MENONITA

Ao todo foram descobertos dezenove indivíduos heterozigotos para 2 variantes (*rs200180113*A* e *rs137852605*A*, TABELA 17) associadas com a anomalia de Pelger-Hüet. As FIGURAS 20 e 21 mostram os heredogramas de 18 indivíduos portadores para as variantes, os quais possuem dados familiares para sua construção. Dentre os 19 indivíduos, onze são portadores da variante *rs200180113*A* e oito são da variante *rs137852605*A*. Além disso, todos estes indivíduos são apenas heterozigotos para uma das variantes apresentadas. Estas variantes possuem uma maior frequência alélica na população menonita provavelmente devido ao efeito fundador, o qual é visto com maior frequência em comparação com a população europeia não-finlandesa e também na brasileira (TABELA 17). Além disso, nós obtivemos acesso de dados de hemograma de dois portadores, um portador *rs200180113*A* e o outro portador apresentava *rs137852605*A*, e o resultado indicava a anomalia de Pelger-Huët (um número elevado de neutrófilos bastonetes e hipossegmentação nos neutrófilos acima do valor de referência). A FIGURA 22 demonstra, as imagens de lâminas hematológicas, os neutrófilos bilobulados ou hipossegmentados de uma portadora da variante *rs137852605*A*.

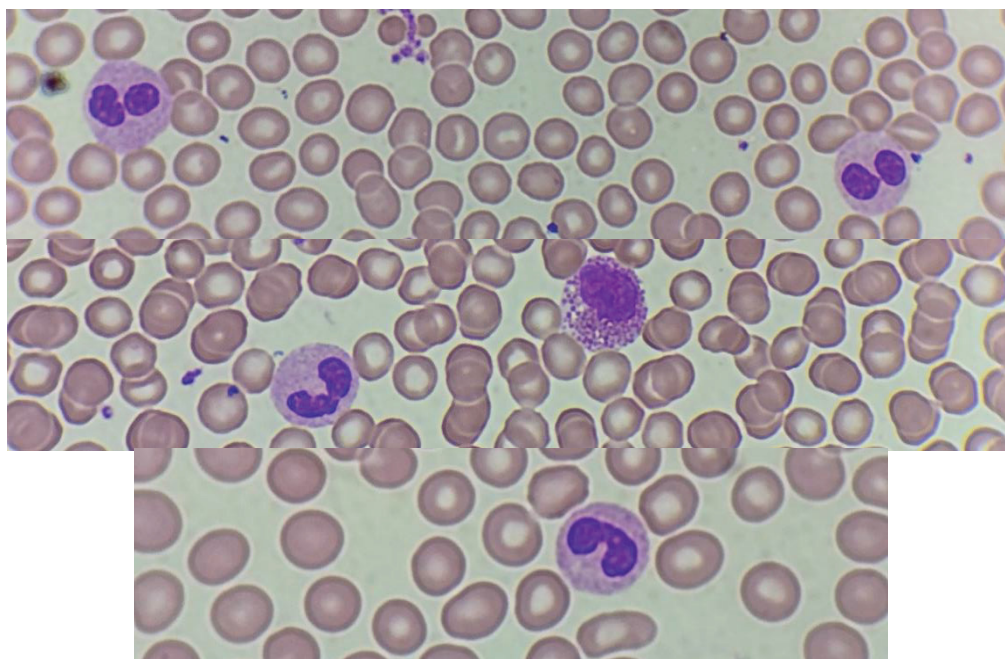
FIGURA 20 - - Heredograma dos indivíduos portadores para a variante *rs200180113**A

FONTE: O autor (2023)

FIGURA 21 - Heredograma dos indivíduos portadores para a variante *rs137852605*A*

FONTE: O autor (2023)

Figura 22 - Lâmina hematológica de uma portadora da variante *rs137852605*A* demonstrando os neutrófilos com hipossegmentação

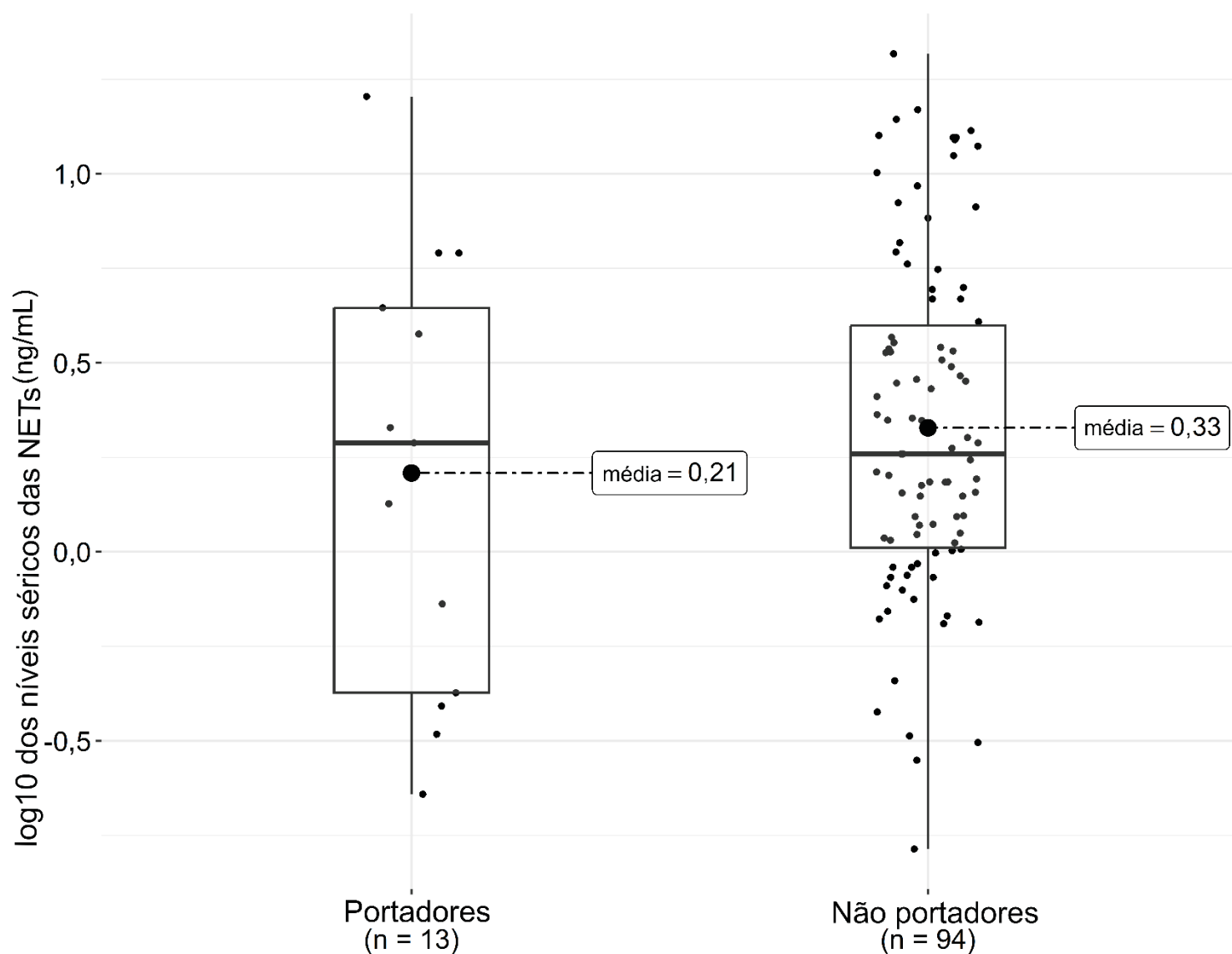


FONTE: O autor (2023)

Nós também avaliamos o possível efeito que as variantes teriam sobre os níveis séricos das NETs nos indivíduos portadores, visto que, a nossa hipótese era se possíveis distúrbios na compactação da cromatina ou na lâmina nuclear (causadas por estas variantes) poderiam predispor a maior produção séricas das NETs. Portanto, nós realizamos uma comparação entre todos os indivíduos portadores (*rs200180113*A* e *rs200180113*A*, $n = 13$) vs não portadores do alelo alternativo ($n = 94$). O resultado foi que não houve diferença estatística significativa (FIGURA 23 e $p_{corr} = 0,65$) na média de níveis das NETs (normalizados pelo logaritmo na base 10) entre os dois grupos pelo Teste t Student.

Além disso, foi avaliada se estas variantes podem influir no metabolismo de lipídios, visto que sua proteína está associada no metabolismo do colesterol (TURNER; SCHLIEKER, 2016; WATERHAM *et al.*, 2003). Portanto, os níveis séricos dos componentes do lipidograma (colesterol total, triglicerídeos, LDL e HDL) dos indivíduos portadores das variantes foram comparados com não-portadores. O resultado não revelou diferença nas médias e medianas dos componentes do lipidograma (FIGURAS 24 e 25, $p_{corr} > 0,05$).

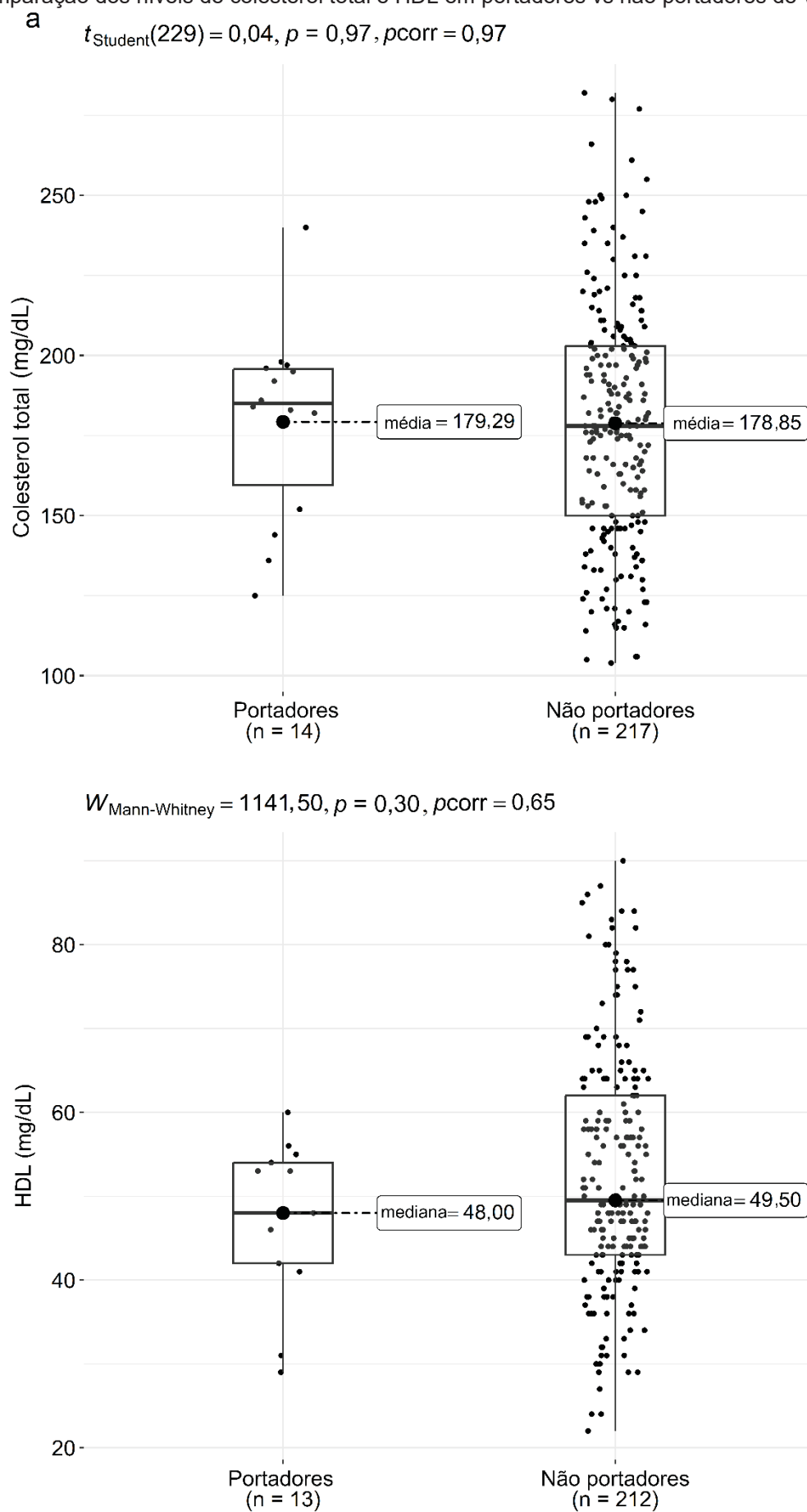
FIGURA 23 - Comparação nos níveis séricos das NETs entre os em portadores vs não portadores de variantes do gene *LBR*
 $t_{\text{Student}}(105) = -0,87, p = 0,39, p_{\text{corr}} = 0,65$



FONTE: O autor (2023).

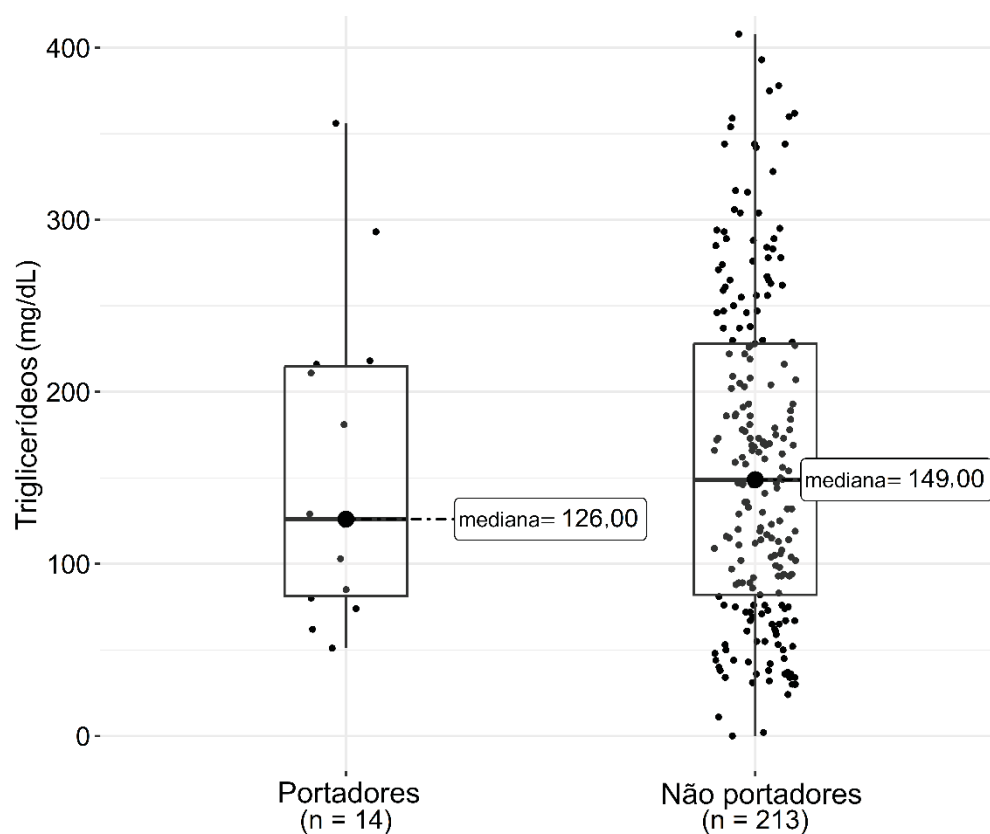
LEGENDA: t_{Student} : estatística t obtida pelo Teste t de Student. p : valor de p obtido pelo Teste t de Student. p_{corr} : valor de p corrigido pelo método do "False discovery rate". Comparação de médias de log10 nível sérico das NETs entre os grupos de portadores ($n = 13$) e não portadores ($n = 94$) de variantes do gene *LBR*. $p_{\text{corr}} < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

FIGURA 24 - Comparação dos níveis de colesterol total e HDL em portadores vs não portadores de variantes do gene *LBR*

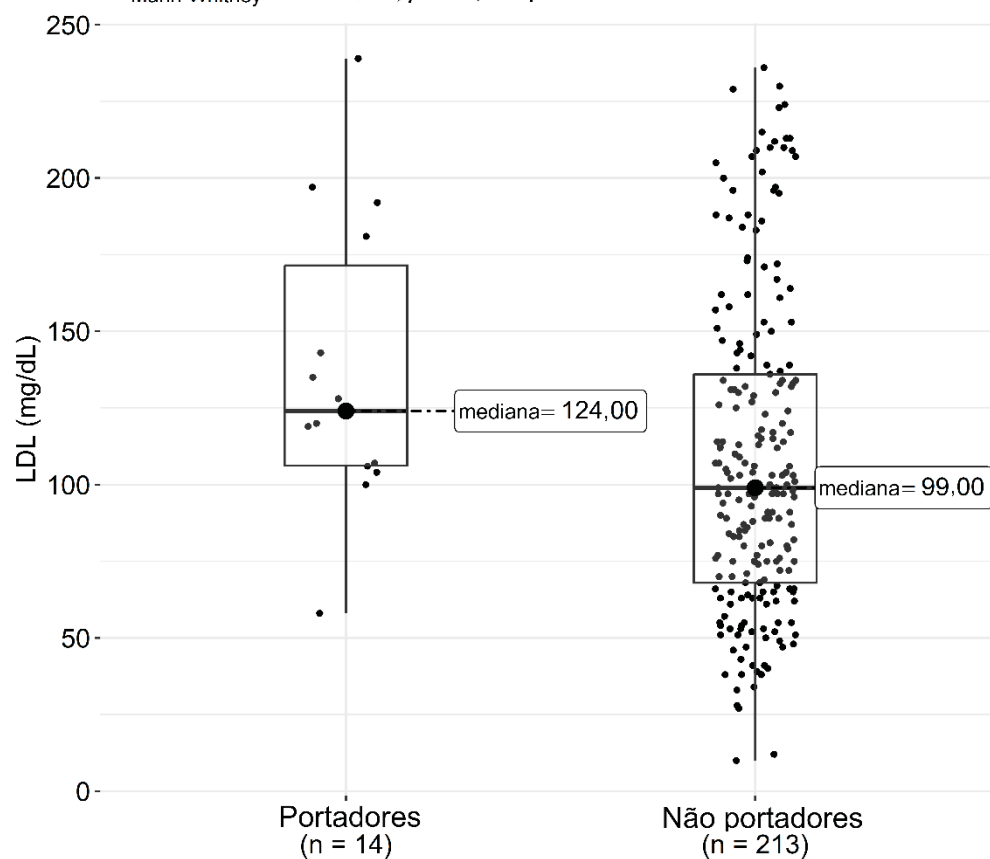


FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: t_{Student} : estatística t obtida pelo Teste t de Student. $W_{\text{Mann-Whitney}}$: estatística W obtida pelo Teste de Mann-Whitney. p : valor de p obtido pelo Teste t de Student ou Mann-Whitney. p_{corr} : valor de p corrigido pelo método do "False discovery rate". a) Comparação de médias do nível sérico de colesterol total (mg/dL) entre os grupos de portadores ($n = 14$) e não portadores ($n = 217$) de variantes do gene *LBR*. b) Comparação de medianas do nível sérico de HDL (mg/dL) entre os grupos de portadores ($n = 13$) e não portadores ($n = 212$) de variantes do gene *LBR*. $p_{\text{corr}} < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

FIGURA 25 - Comparação dos níveis de triglicerídeos e LDL em portadores vs não portadores de variantes do gene *LBR*

b

 $W_{\text{Mann-Whitney}} = 2047,50, p = 0,02, p_{\text{corr}} = 0,10$ 

FONTE: O autor (2023).

LEGENDA: $W_{\text{Mann-Whitney}}$: estatística W obtida pelo Teste de Mann-Whitney. p = valor de p obtido pelo Mann-Whitney. p_{corr} : valor de p corrigido pelo método do “*False discovery rate*” a) Comparação de medianas do nível sérico de triglicerídeos (mg/dL) entre os grupos de portadores ($n = 14$) e não portadores ($n = 213$) de variantes do gene *LBR*. b) Comparação de medianas do nível sérico de LDL (mg/dL) entre os grupos de portadores ($n = 14$) e não portadores ($n = 213$) de variantes do gene *LBR*. $p_{\text{corr}} < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

A revisão da literatura reportou que um indivíduo heterozigoto para a variante *rs200180113*A* era portadora da síndrome de Reynolds (síndrome caracterizada principalmente por cirrose biliar primária com esclerose sistêmica cutânea) (GAUDY-MARQUESTE *et al.*, 2010). Os autores realizaram estudo de quantificação da expressão das proteínas por RT-PCR, *Western blotting* e imunofluorescência das lamininas e proteínas que interagem com elas (*LMNA*, *LMNB1*, *LMNB2*, *HP1a*) na linhagem linfoide e de fibroblastos (cultivados do indivíduo afetado e um controle saudável). O resultado foi que somente na linha dos fibroblastos houve uma redução drástica da expressão de *LMNA*, *LMNB1*, *LMNB2*, *HP1a*. Os autores concluem que esta mutação pode ter o potencial de ter um efeito deletério por perturbar o envoltório nuclear e predispor ao desenvolvimento desta síndrome autoimune (GAUDY-MARQUESTE *et al.*, 2010). Por fim, a variante *rs137852605*A* já foi reportada em segregação em famílias com indivíduos portadores da anomalia de Pelger-Huët (BEST *et al.*, 2003), o qual também foi visto em portadores menonitas. Portanto, não se descarta o risco para o desenvolvimento da síndrome de Reynolds, ou outros distúrbios relacionados a depleção da proteína do gene *LBR*, nos indivíduos portadores destas variantes.

TABELA 17 - Variantes no gene *LBR* encontradas na população menonita associadas à Anomalia de Pelger-Huët

dbSNP	HGVS cDNA	Exon	HGVS proteína	Classificação ACMG	Consequência	Menonita % (n)	non-FIN EURO % (n)	p*	Amish % (n)	p**	ABRAOM % (n)	p***
rs200180113	ENST000000272 163.9:c.1114C>T	9	ENSP0000002721 63.4:p.Arg372Cys	Significado clínico incerto	Não-sinônima	1,68 (654)	0,034 (68044)	1,3 x 10⁻¹⁴	0,22 (912)	2,7 x 10⁻³	-	-
rs137852605	ENST000000272 163.9:c.356C>T	3	ENSP0000002721 63.4:p.Pro119Leu	Significado clínico incerto	Não-sinônima	1,22 (654)	1,5 x 10 ⁻³ (68026)	5,8 x 10⁻¹⁶	0,0 (912)	-	-	-

LEGENDA: dbSNP: dbSNP ID da variante. Exon: posição do exon onde a variante está localizada no transcrito. Classificação ACMG: Classificação da variante segundo os critérios ACMG (2015) gerados pelo site Varsome. Consequência: consequência(s) funcional(is) da variante associada. Menonita % (n): porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (nº de cromossomos) na população menonita brasileira. non-FIN EURO %: porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (nº de cromossomos) reportada na população europeia não-finlandesa pelo gnomAD (v3.1.2). p*: valor de *p* obtido pelo teste exato de Fisher na comparação da frequência alélica da população amish vs europeia não-finlandesa. Amish %: porcentagens das frequências alélicas e número amostral total reportada na população amish pelo gnomAD (v3.1.2). p**: valor de *p* obtido pelo teste exato de Fisher na comparação da frequência alélica da população menonita vs amish. ABRAOM %: porcentagens das frequências alélicas e número amostral total (nº de cromossomos) reportada na população brasileira pelo ABRAOM (Brazilian Genomic Variants), p***: valor de *p* obtido pelo teste exato de Fisher na comparação da frequência alélica da população menonita vs brasileira. Em negrito: valores de *p* considerados estatisticamente. Todos os indivíduos eram heterozigotos para as variantes. Ambas as variantes apresentaram classificação patogênica ou provavelmente deletéria para os seguintes algoritmos de patogênicidade *in-silico*: Polyphen2, SIFT, CADD, REVEL, Meta RNN, e Mutation Taster.

9 CONCLUSÃO

Baseados nos resultados apresentados e discutidos nos capítulos e apêndices anteriormente apresentados:

- Os ncRNAs desregulados tanto na obesidade e na AR - *miR-21*, *miR-143*, *miR-146a*, *miR-155*, *lncRNA H19* e *HOTAIR* - estão correlacionados com os biomarcadores da obesidade e AR e associados a vias patogênicas comuns a ambos (inflamação, ativação de células T e B, metabolismo lipídico, metabolismo da glicose, sinalização da insulina e vias de sinalização do fator de necrose tumoral). Portanto, esses ncRNAs poderiam ter um efeito sinérgico no desenvolvimento concomitante da obesidade e AR. Também foram encontrados nove SNVs (*rs78246608*, *rs62107261*, *rs212389*, *rs3093024*, *rs4750316*, *rs3812049*, *rs10275421*, *rs2275806*, *rs9604529*) em regiões exônicas de lncRNAs em estudos de GWAS associados a AR ou obesidade, o que poderia alterar a suscetibilidade a essas doenças alterando a estrutura secundária do lncRNA ou os locais de ligação ao miRNA. Em última análise, ncRNAs com expressão desregulada e miRNAs que perderam ou ganharam sítios de ligação por SNVs em lncRNAs (particularmente em *LINC01184* e *GATA3-AS1*), identificados neste estudo, foram associados a um estado imunometabólico pró-inflamatório que aumenta as chances de desenvolver obesidade e AR, ou condições inflamatórias relacionadas. Além disso, podem ser parcialmente responsáveis por um risco aumentado de uma resposta inadequada ao tratamento e diminuição da chance de remissão da AR em pacientes obesos. Por conseguinte, podem ser candidatos a futuros estudos funcionais com foco na obesidade e AR, para avaliar se sua expressão pode ser terapêuticamente direcionada para a fim de melhorar o tratamento de pacientes com AR com obesidade.
- A população menonita apresentou 7,8% de prevalência de autorrelato de artralgia. As análises dos fatores predisponentes epidemiológicos e ambientais, no grupo de indivíduos que relataram artralgia, sugerem evidências de predisposição ao desenvolvimento da AR (maior positividade de anti-CCP, agregação familiar e relatos em indivíduos do sexo feminino para a artralgia). Além disso, não houve associação com maiores níveis séricos de NETs nos indivíduos com artralgia. Por fim, encontrou-se evidências de efeito fundador

com maior frequência de variantes e haplótipos na população menonita; os quais estão associados com a artralgia e podem regular as vias de inflamação, autoimunidade, injúria sinovial e articular; podendo ser um fator de predisposição genética para a AR.

- A população menonita brasileira pode possuir um componente genético protetor para o LES. Foram vistas variantes com evidências de efeito fundador, as quais eram associadas em GWAS, e seus haplótipos de suscetibilidade. Estas variantes possuem maior frequência alélica de associação protetora e menor frequência de alelos de suscetibilidade para o LES. Em relação aos haplótipos de risco para o desenvolvimento do LES, estes apresentam menor frequência na população menonita, comparado a população europeia não-finlandesa. Portanto, estes achados podem reforçar as evidências deste componente genético protetor nesta população.
- Na coorte de pacientes brasileiros com LES, os maiores níveis séricos foram associados com a positividade da Síndrome de Raynaud, anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos e glomerulonefrite. Portanto, os altos níveis séricos de NETs podem estar associados a um pior prognóstico de LES e seu controle seria um possível alvo terapêutico em estudos futuros.
- Dezenove indivíduos portadores foram encontrados para as variantes *rs200180113*A* e *rs137852605*A* (onze são portadores da variante *rs200180113*A* e oito são da variante *rs137852605*A*), as quais se localizam no gene *LBR* e estão associadas com a anomalia de Pelger-Huet. Além disso, não foram encontradas associações na alteração os níveis de NETs e no lipidograma nos indivíduos portadores. Finalmente, não se pode subestimar a predisposição à síndrome de Reynolds, ou outros distúrbios relacionados que a diminuição da proteína do gene *LBR* pode causar, nos portadores destas variantes.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. *E-book*. Disponível em: Acesso em: 28 jun. 2017.
- ABDUL-MAKSoud, R. *et al.* Serum miR-210 and miR-155 expression levels as novel biomarkers for rheumatoid arthritis diagnosis. **British Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. 209–213, 2017.
- AHMAD, R. *et al.* Increased adipose tissue expression of TLR8 in obese individuals with or without type-2 diabetes: significance in metabolic inflammation. **Journal of Inflammation**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 38, 2016.
- Al, R. *et al.* Distinct DNA Methylation Patterns of Rheumatoid Arthritis Peripheral Blood and Synovial Tissue T Cells. **ACR Open Rheumatology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 127–132, 2021.
- Al, R. *et al.* DNA Methylome Signature in Synoviocytes From Patients With Early Rheumatoid Arthritis Compared to Synoviocytes From Patients With Longstanding Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 67, n. 7, p. 1978–1980, 2015.
- ALETAHA, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 62, n. 9, p. 2569–2581, 2010.
- ALETAHA, D.; ALASTI, F.; SMOLEN, J. S. Rheumatoid factor, not antibodies against citrullinated proteins, is associated with baseline disease activity in rheumatoid arthritis clinical trials. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 229, 2015.
- ALIVERNINI, S. *et al.* MicroRNA-155 influences B-cell function through PU.1 in rheumatoid arthritis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12970, 2016.
- ALMOALLIM, H.; CHEIKH, M. (org.). **Skills in Rheumatology**. Singapore: Springer Singapore, 2021. *E-book*. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-981-15-8323-0>. Acesso em: 8 jun. 2023.
- ALMUTAIRI, K. *et al.* The global prevalence of rheumatoid arthritis: a meta-analysis based on a systematic review. **Rheumatology International**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 863–877, 2021.
- AN, Q. *et al.* Enhanced neutrophil autophagy and increased concentrations of IL-6, IL-8, IL-10 and MCP-1 in rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 65, p. 119–128, 2018.
- ANDONIAN, B. J. *et al.* Plasma MicroRNAs in Established Rheumatoid Arthritis Relate to Adiposity and Altered Plasma and Skeletal Muscle Cytokine and Metabolic Profiles. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, p. 1475, 2019.

APEL, F.; ZYCHLINSKY, A.; KENNY, E. F. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 467–475, 2018.

ARINGER, M. *et al.* 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 71, n. 9, p. 1400–1412, 2019.

ARISTIZABAL, M. J. *et al.* Biological embedding of experience: A primer on epigenetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 117, n. 38, p. 23261–23269, 2020.

ARMSTRONG, D. L. *et al.* GWAS identifies novel SLE susceptibility genes and explains the association of the HLA region. **Genes and immunity**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 347–354, 2014.

ARMSTRONG, D. J. *et al.* Obesity and cardiovascular risk factors in rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 782–782, 2006.

ARNOLD, J. B. **Ggthemes: Extra Themes, Scales and Geoms for “ggplot2”**. , 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=ggthemes>.

AUER, E. D. *et al.* Non-coding RNA network associated with obesity and rheumatoid arthritis. **Immunobiology**, [s. l.], v. 227, n. 6, p. 152281, 2022.

AZNAR, J.; VAYA, A. Homozygous Form of the Pelger-Huët Leukocyte Anomaly in Man. **Acta Haematologica**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 59–62, 1981.

BACKES, C. *et al.* miRPathDB: a new dictionary on microRNAs and target pathways. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 45, n. D1, p. D90–D96, 2017.

BAE, S.-C.; LEE, Y. H. MiR-146a levels in rheumatoid arthritis and their correlation with disease activity: a meta-analysis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 7, p. 1335–1342, 2018.

BARATI, A. *et al.* Effects of β -D-mannuronic acid, as a novel non-steroidal anti-inflammatory medication within immunosuppressive properties, on IL17, ROR γ t, IL4 and GATA3 gene expressions in rheumatoid arthritis patients. **Drug Design, Development and Therapy**, [s. l.], v. Volume11, p. 1027–1033, 2017.

BARTOK, B.; FIRESTEIN, G. S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 233, n. 1, p. 233–255, 2010.

BAYLEY, R. *et al.* The autoimmune-associated genetic variant PTPN22 R620W enhances neutrophil activation and function in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 74, n. 8, p. 1588–1595, 2015.

BEARD, H. K. *et al.* Anti-collagen antibodies in sera from rheumatoid arthritis patients. **Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 33, n. 11, p. 1077–1081, 1980.

BENDER, H. S.; ENS, H.; PETER PAULS, Jr. **Brazil**. [S. l.], 2013. Disponível em: <https://gameo.org/index.php?title=Brazil&oldid=128404>. Acesso em: 26 ago. 2019.

BENDER, H. S.; OYER, J. S. **Historiography: Anabaptist**. [S. l.], 1989. Disponível em: https://gameo.org/index.php?title=Historiography:_Anabaptist&oldid=161245. Acesso em: 24 ago. 2019.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BENTHAM, J. *et al.* Genetic association analyses implicate aberrant regulation of innate and adaptive immunity genes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **Nature genetics**, [s. l.], v. 47, n. 12, p. 1457–1464, 2015.

BERGMANN, C.; KRAHN, C. **Chortitza Mennonite Settlement (Zaporizhia Oblast, Ukraine)**. [S. l.], 1955. Disponível em: [https://gameo.org/index.php?title=Chortitza_Mennonite_Settlement_\(Zaporizhia_Oblast,_Ukraine\)&oldid=127181](https://gameo.org/index.php?title=Chortitza_Mennonite_Settlement_(Zaporizhia_Oblast,_Ukraine)&oldid=127181). Acesso em: 26 ago. 2019.

BEST, S. *et al.* Lamin B-receptor mutations in Pelger-Huët anomaly. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 123, n. 3, p. 542–544, 2003.

BHATTARAI, A. *et al.* Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. **PLoS medicine**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. e309, 2007.

BIANCHI, I. *et al.* The X chromosome and immune associated genes. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], v. 38, n. 2–3, p. J187–J192, 2012.

BLOCK, S. R. *et al.* Studies of twins with systemic lupus erythematosus. **The American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 533–552, 1975.

BLÜML, S. *et al.* Essential role of microRNA-155 in the pathogenesis of autoimmune arthritis in mice. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 63, n. 5, p. 1281–1288, 2011.

BOLDT, A. B. W. *et al.* Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindians and high CCR5*D32 frequency in Euro-Brazilians. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 12–19, 2009.

BONASIO, R.; TU, S.; REINBERG, D. Molecular Signals of Epigenetic States. **Science**, [s. l.], v. 330, n. 6004, p. 612–616, 2010.

BOONE, B. A. *et al.* The receptor for advanced glycation end products (RAGE) enhances autophagy and neutrophil extracellular traps in pancreatic cancer. **Cancer Gene Therapy**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 326–334, 2015.

BORGES, N. M. *et al.* Angiomirs expression profiling in diffuse large B-Cell lymphoma. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 4806–4816, 2016.

BOROVNIK, L. *et al.* Pelger-huet anomaly and a mild skeletal phenotype secondary to mutations in LBR. **American Journal of Medical Genetics Part A**, [s. l.], v. 161, n. 8, p. 2066–2073, 2013.

BOSCHMANN, S. E. *et al.* The Frequency of the *LCT**-13910C>T Polymorphism Associated with Lactase Persistence Diverges among Euro-Descendant Groups from Brazil. **Medical Principles and Practice**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 18–20, 2016.

BOTT, A. *et al.* miRNA-1246 induces pro-inflammatory responses in mesenchymal stem/stromal cells by regulating PKA and PP2A. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 27, p. 43897–43914, 2017.

BRADFIELD, J. P. *et al.* A trans-ancestral meta-analysis of genome-wide association studies reveals loci associated with childhood obesity. **Human molecular genetics**, [s. l.], v. 28, n. 19, p. 3327–3338, 2019.

BROWNELL, J. E. *et al.* Tetrahymena Histone Acetyltransferase A: A Homolog to Yeast Gcn5p Linking Histone Acetylation to Gene Activation. **Cell**, [s. l.], v. 84, n. 6, p. 843–851, 1996.

BUGATTI, S. *et al.* Anti-citrullinated protein antibodies and high levels of rheumatoid factor are associated with systemic bone loss in patients with early untreated rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 226, 2016.

BUNIELLO, A. *et al.* The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 47, n. D1, p. D1005–D1012, 2019.

BUYON, J. P. *et al.* The Effect of Combined Estrogen and Progesterone Hormone Replacement Therapy on Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus: A Randomized Trial. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 142, n. 12_Part_1, p. 953, 2005.

CALLE, E.; GÓMEZ-PUERTA, J. A. The Spectrum of Rheumatic Diseases. *Em: HANDBOOK OF SYSTEMIC AUTOIMMUNE DISEASES*. [S. l.]: Elsevier, 2018. v. 15, p. 1–13. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444638878000013>. Acesso em: 8 jun. 2023.

CALO, N. *et al.* Stress-activated miR-21/miR-21* in hepatocytes promotes lipid and glucose metabolic disorders associated with high-fat diet consumption. **Gut**, [s. l.], v. 65, n. 11, p. 1871–1881, 2016.

CAMPBELL, C. *et al.* ATM mutations on distinct SNP and STR haplotypes in ataxia-telangiectasia patients of differing ethnicities reveal ancestral founder effects. **Human Mutation**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 80–85, 2003.

CAO, R. *et al.* Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing. **Science**, [s. l.], v. 298, n. 5595, p. 1039–1043, 2002.

CARESTIA, A. *et al.* Mediators and molecular pathways involved in the regulation of neutrophil extracellular trap formation mediated by activated platelets. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 153–162, 2016.

CARMONA-RIVERA, C. *et al.* Synovial fibroblast-neutrophil interactions promote pathogenic adaptive immunity in rheumatoid arthritis. **Science Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 10, p. eaag3358, 2017.

CASTAÑO, C. *et al.* Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 115, n. 48, p. 12158–12163, 2018.

CASTOR, C. W. The microscopic structure of normal human synovial tissue. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 140–151, 1960.

CDC. **Arthritis Types**. [S. l.], 2022a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/arthritis/types/index.html>. Acesso em: 8 jun. 2023.

CDC. **Rheumatic Diseases and Pain**. [S. l.], 2022b. Disponível em: <https://www.cdc.gov/arthritis/communications/features/rheumatic-diseases-and-pain.html>. Acesso em: 8 jun. 2023.

CHANG, C. C. *et al.* Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. **GigaScience**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 7, 2015.

CHANG, H.-H. *et al.* The W620 Polymorphism in PTPN22 Disrupts Its Interaction With Peptidylarginine Deiminase Type 4 and Enhances Citrullination and NETosis. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 67, n. 9, p. 2323–2334, 2015.

CHARTOUMPEKIS, D. V. *et al.* Differential Expression of MicroRNAs in Adipose Tissue after Long-Term High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. e34872, 2012.

CHEN, J. *et al.* LncSEA: a platform for long non-coding RNA related sets and enrichment analysis. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 49, n. D1, p. D969–D980, 2021.

CHEN, Y. *et al.* MicroRNA-21 Promotes Proliferation of Fibroblast-Like Synoviocytes through Mediation of NF- κ B Nuclear Translocation in a Rat Model of Collagen-Induced Rheumatoid Arthritis. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2016, p. 1–8, 2016.

CHEN, M.-H. *et al.* Trans-ethnic and Ancestry-Specific Blood-Cell Genetics in 746,667 Individuals from 5 Global Populations. **Cell**, [s. l.], v. 182, n. 5, p. 1198–1213.e14, 2020.

CHEN, Y. *et al.* TRIP13, identified as a hub gene of tumor progression, is the target of microRNA-4693-5p and a potential therapeutic target for colorectal cancer. **Cell Death Discovery**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 35, 2022.

CHU, Y.; YAO, Y.; LI, X. MiR-370 enhances cell cycle and represses lipid accumulation in porcine adipocytes. **Animal Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 334–342, 2021.

CHUNG, S. A. *et al.* Differential genetic associations for systemic lupus erythematosus based on anti-dsDNA autoantibody production. **PLoS genetics**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. e1001323, 2011.

COFFMAN, F. D. Chitinase 3-Like-1 (CHI3L1): A Putative Disease Marker at the Interface of Proteomics and Glycomics. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, [s. l.], v. 45, n. 6, p. 531–562, 2008.

COLLINS, M. *et al.* A homozygous variant in the Lamin B receptor gene LBR results in a non-lethal skeletal dysplasia without Pelger-Huët anomaly. **Bone**, [s. l.], v. 141, p. 115601, 2020.

CONSTANTINO, B. T. Pelger-Huët Anomaly—Morphology, Mechanism, and Significance in the Peripheral Blood Film. **Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 103–107, 2005.

COOKE, T. D. *et al.* Identification of immunoglobulins and complement in rheumatoid articular collagenous tissues. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 541–551, 1975.

CROW, M. K.; OLFERIEV, M.; KIROU, K. A. Targeting of type I interferon in systemic autoimmune diseases. **Translational Research**, [s. l.], v. 165, n. 2, p. 296–305, 2015.

CROWSON, C. S. *et al.* Contribution of obesity to the rise in incidence of rheumatoid arthritis. **Arthritis Care & Research**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 71–77, 2013.

CRUZ-AGUILAR, M. *et al.* A Nonsense *ALMS1* Mutation Underlies Alström Syndrome in an Extended Mennonite Kindred Settled in North Mexico. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 397–401, 2017.

CUI, C. *et al.* Propofol maintains Th17/Treg cell balance and reduces inflammation in rats with traumatic brain injury via the miR-145-3p/NFATc2/NF-κB axis. **International Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 135, 2021.

DARRAH, E. *et al.* Peptidylarginine deiminase 2, 3 and 4 have distinct specificities against cellular substrates: novel insights into autoantigen selection

in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 92–98, 2012.

DATASUS. **PNS - Pesquisa Nacional de Saúde - 2013**. [S. l.], 2013.
Disponível em: <https://datasus.saude.gov.br/pns-pesquisa-nacional-de-saude-2013/>. Acesso em: 10 jun. 2023.

DE ANDRES, M. C. *et al.* Assessment of global DNA methylation in peripheral blood cell subpopulations of early rheumatoid arthritis before and after methotrexate. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 233, 2015.

DE BONT, C. M.; BOELEN, W. C.; PRUIJN, G. J. M. NETosis, complement, and coagulation: a triangular relationship. **Cellular & Molecular Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 19–27, 2019.

DE LANGE, K. M. *et al.* Genome-wide association study implicates immune activation of multiple integrin genes in inflammatory bowel disease. **Nature genetics**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 256–261, 2017.

DEAFEN, D. *et al.* A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 311–318, 1992.

DELIĆ, D. *et al.* Urinary Exosomal miRNA Signature in Type II Diabetic Nephropathy Patients. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e0150154, 2016.

DEMORUELLE, M. K. *et al.* Anti–Citruinated Protein Antibodies Are Associated With Neutrophil Extracellular Traps in the Sputum in Relatives of Rheumatoid Arthritis Patients. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 1165–1175, 2017.

DEMORUELLE, M. K. *et al.* Performance of Anti-Cyclic Citruinated Peptide Assays Differs in Subjects at Increased Risk of Rheumatoid Arthritis and Subjects With Established Disease: Anti-CCP Assays Differ. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 65, n. 9, p. 2243–2252, 2013.

DENG, Y. *et al.* Upregulated microRNA-381-5p strengthens the effect of dexmedetomidine preconditioning to protect against myocardial ischemia–reperfusion injury in mouse models by inhibiting CHI3L1. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 92, p. 107326, 2021.

DE-UGARTE, L. *et al.* SNPs in bone-related miRNAs are associated with the osteoporotic phenotype. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 516, 2017.

DISSICK, A. *et al.* Association of Periodontitis With Rheumatoid Arthritis: A Pilot Study. **Journal of Periodontology**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 223–230, 2010.

DIVOUX, A. *et al.* Identification of a novel lncRNA in gluteal adipose tissue and evidence for its positive effect on preadipocyte differentiation. **Obesity**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1781–1785, 2014.

DOUDA, D. N. *et al.* SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 9, p. 2817–2822, 2015.

DOUMATEY, A. P. *et al.* Global Gene Expression Profiling in Omental Adipose Tissue of Morbidly Obese Diabetic African Americans. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 199–210, 2015.

DU, J. *et al.* DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 519–532, 2015.

DYCK, C. J. **An introduction to Mennonite history**. Scottdale, Pa: Herald Press, 1967.

DYCK, C. J. **An Introduction to Mennonite History: A Popular History of the Anabaptists and the Mennonites**. [S. l.]: Herald Press, 1993.

ECKHARDT, F. *et al.* DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 38, n. 12, p. 1378–1385, 2006.

EDWARDS, N. J. *et al.* The role of neutrophil extracellular traps and TLR signaling in skeletal muscle ischemia reperfusion injury. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 15753–15770, 2020.

ELMESMARI, A. *et al.* MicroRNA-155 regulates monocyte chemokine and chemokine receptor expression in Rheumatoid Arthritis. **Rheumatology**, [s. l.], v. 55, n. 11, p. 2056–2065, 2016.

ESER, B.; SAHIN, N. Evaluation of toll-like receptor-2 and 4 and interleukin-6 gene expressions in Turkish rheumatoid arthritis patients. **Clinical Rheumatology**, [s. l.], v. 35, n. 11, p. 2693–2697, 2016.

ETULAIN, J. *et al.* P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. **Blood**, [s. l.], v. 126, n. 2, p. 242–246, 2015.

EYRE, S. *et al.* High-density genetic mapping identifies new susceptibility loci for rheumatoid arthritis. **Nature genetics**, [s. l.], v. 44, n. 12, p. 1336–1340, 2012.

FARRÉ, P. L. *et al.* CTBP1 and metabolic syndrome induce an mRNA and miRNA expression profile critical for breast cancer progression and metastasis. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 17, p. 13848–13858, 2018.

FAURSCHOU, M. *et al.* Prognostic factors in lupus nephritis: diagnostic and therapeutic delay increases the risk of terminal renal failure. **The Journal of rheumatology**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 1563–1569, 2006.

FERGUSON, L. D. *et al.* Cardiometabolic comorbidities in RA and PsA: lessons learned and future directions. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 461–474, 2019.

FINCKH, A. *et al.* Global epidemiology of rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], 2022.

FRANCAVILLA, A. *et al.* Faecal miRNA profiles associated with age, sex, BMI, and lifestyle habits in healthy individuals. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 20645, 2021.

FRANKE, A. *et al.* Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. **Nature genetics**, [s. l.], v. 42, n. 12, p. 1118–1125, 2010.

FREIRE-MAIA, N. **Genética de Populações Humanas**. São Paulo: USP, 1974.

FRESNEDA ALARCON, M.; MCLAREN, Z.; WRIGHT, H. L. Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 649693, 2021.

FRIESEN, J. W.; EPP, F. H. Mennonites in Canada; 1786-1920: The History of a Separate People. *Em:* , 1976. **Anais [...]**. [S. l.: s. n.], 1976.

FU, K.; ZHANG, K.; ZHANG, X. LncRNA HOTAIR facilitates proliferation and represses apoptosis of retinoblastoma cells through the miR-20b-5p/RRM2/PI3K/AKT axis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 119, 2022.

FUJIMOTO, A. *et al.* Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 500–509, 2016.

FUJISAKI, M.; SUGAWARA, K. Properties of Peptidylarginine Deiminase from the Epidermis of Newborn Rats1. **The Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 89, n. 1, p. 257–263, 1981.

GARCIA-ROMO, G. S. *et al.* Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 73, p. 73ra20-73ra20, 2011.

GAUDET, A. D. *et al.* miR-155 Deletion in Female Mice Prevents Diet-Induced Obesity. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 22862, 2016.

GAUDY-MARQUESTE, C. *et al.* LBR mutation and nuclear envelope defects in a patient affected with Reynolds syndrome. **Journal of Medical Genetics**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 361–370, 2010.

GE, C.; HOLMDAHL, R. The structure, specificity and function of anti-citrullinated protein antibodies. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 503–508, 2019.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 21–37, 2019.

GERLAG, D. M. *et al.* EULAR recommendations for terminology and research in individuals at risk of rheumatoid arthritis: report from the Study Group for Risk Factors for Rheumatoid Arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 638–641, 2012.

GESTERMANN, N. *et al.* Netting Neutrophils Activate Autoreactive B Cells in Lupus. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 200, n. 10, p. 3364–3371, 2018.

GIBBONS, H. R. *et al.* Divergent lncRNA GATA3-AS1 Regulates GATA3 Transcription in T-Helper 2 Cells. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02512/full>.

GIORGIO, E. *et al.* A novel case of Greenberg dysplasia and genotype–phenotype correlation analysis for *LBR* pathogenic variants: An instructive example of one gene-multiple phenotypes. **American Journal of Medical Genetics Part A**, [s. l.], v. 179, n. 2, p. 306–311, 2019.

GLOSSOP, J. R. *et al.* Genome-wide profiling in treatment-naïve early rheumatoid arthritis reveals DNA methylome changes in T and B lymphocytes. **Epigenomics**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 209–224, 2016.

GOELDNER, I. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies and rheumatoid factor in rheumatoid arthritis patients and relatives from Brazil. **Rheumatology**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 1590–1593, 2010.

GOELDNER, I. *et al.* Association of MASP-2 Levels and MASP2 Gene Polymorphisms with Rheumatoid Arthritis in Patients and Their Relatives. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. e90979, 2014.

GONZALEZ, J. R. *et al.* **SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies**. , 2007. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/SNPpassoc/index.html>. Acesso em: 15 out. 2022.

GORELIK, G. *et al.* Impaired T Cell Protein Kinase C δ Activation Decreases ERK Pathway Signaling in Idiopathic and Hydralazine-Induced Lupus. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 179, n. 8, p. 5553–5563, 2007.

GÖSCHL, L. *et al.* Histone deacetylase 1 (HDAC1): A key player of T cell-mediated arthritis. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], v. 108, p. 102379, 2020.

GRAHAM, R. R. *et al.* Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. **European Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 823–830, 2007.

GRAYSON, P. C.; KAPLAN, M. J. At the Bench: Neutrophil extracellular traps (NETs) highlight novel aspects of innate immune system involvement in autoimmune diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 253–264, 2016.

GREGERSEN, P. K.; SILVER, J.; WINCHESTER, R. J. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 1205–1213, 1987.

GREMESE, E. *et al.* Obesity and reduction of the response rate to anti-tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis: An approach to a personalized medicine. **Arthritis Care & Research**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 94–100, 2013.

GRENNAN, D. M. *et al.* Family and twin studies in systemic lupus erythematosus. **Disease markers**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 93–98, 1997.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

GROSS, J.; LIGGES, U. **Nortest: Tests for Normality**. , 2015. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=nortest>.

GUDERUD, K. *et al.* Rheumatoid Arthritis Patients, Both Newly Diagnosed and Methotrexate Treated, Show More DNA Methylation Differences in CD4+ Memory Than in CD4+ Naïve T Cells. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, p. 194, 2020.

GUGGINO, G. *et al.* Downregulation of miRNA17–92 cluster marks V γ 9V δ 2 T cells from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 236, 2018.

GUO, J. *et al.* HOTAIR Promotes Cisplatin Resistance of Osteosarcoma Cells by Regulating Cell Proliferation, Invasion, and Apoptosis via miR-106a-5p/STAT3 Axis. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 29, p. 096368972094844, 2020.

GUPTA, A. K. *et al.* Efficient Neutrophil Extracellular Trap Induction Requires Mobilization of Both Intracellular and Extracellular Calcium Pools and Is Modulated by Cyclosporine A. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. e97088, 2014.

GUTIERREZ-ACHURY, J. *et al.* Functional implications of disease-specific variants in loci jointly associated with coeliac disease and rheumatoid arthritis. **Human molecular genetics**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 180–190, 2016.

HA, E.; BAE, S.-C.; KIM, K. Large-scale meta-analysis across East Asian and European populations updated genetic architecture and variant-driven biology of rheumatoid arthritis, identifying 11 novel susceptibility loci. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 80, n. 5, p. 558–565, 2021.

HAIG, D. Commentary: The epidemiology of epigenetics. **International Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 13–16, 2012.

HARBERS, K. *et al.* DNA methylation and gene expression: endogenous retroviral genome becomes infectious after molecular cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 78, n. 12, p. 7609–7613, 1981.

HARRE, U. *et al.* Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 122, n. 5, p. 1791–1802, 2012.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

HAVERKAMP BEGEMANN, N.; VAN LOOKEREN CAMPAGNE, A. Homozygous Form of Pelger-Huët's Nuclear Anomaly in Man. **Acta Haematologica**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 295–303, 1952.

HAYER, S. *et al.* Tenosynovitis and osteoclast formation as the initial preclinical changes in a murine model of inflammatory arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 79–88, 2007.

HEINTZMAN, N. D. *et al.* Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 311–318, 2007.

HEMMINKI, K. *et al.* Familial associations of rheumatoid arthritis with autoimmune diseases and related conditions. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 661–668, 2009.

HOFFMANN, K. *et al.* Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger–Huët anomaly). **Nature Genetics**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 410–414, 2002.

HOFFMANN, K. *et al.* The granulocyte nucleus and lamin B receptor: avoiding the ovoid. **Chromosoma**, [s. l.], v. 116, n. 3, p. 227–235, 2007.

HOLERS, V. M. Autoimmunity to citrullinated proteins and the initiation of rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 728–735, 2013.

HOLERS, V. M. *et al.* Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: protection turns to destruction. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 542–557, 2018.

HOLERS, V. M.; BANDA, N. K. Complement in the Initiation and Evolution of Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, n. MAY, 2018.

Disponível em:

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01057/full>.

HOLMER, L.; PEZHMAN, A.; WORMAN, H. J. The Human Lamin B Receptor/Sterol Reductase Multigene Family. **Genomics**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 469–476, 1998.

HONG, Z. *et al.* miR-106a Is Downregulated in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Chronic Hepatitis B and Associated with Enhanced Levels of Interleukin-8. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2015, p. 1–9, 2015.

- HORIUCHI, M. *et al.* Expression and Function of Histone Deacetylases in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. **The Journal of Rheumatology**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 1580–1589, 2009.
- HOTCHKISS, R. D. The quantitative separation of purines, pyrimidines, and nucleosides by paper chromatography. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 175, n. 1, p. 315–332, 1948.
- HUANG, Y. *et al.* IL-16 regulates macrophage polarization as a target gene of mir-145-3p. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 107, p. 1–9, 2019.
- HUBER, L. C. *et al.* Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 1087–1093, 2007.
- HUMBY, F. *et al.* Ectopic Lymphoid Structures Support Ongoing Production of Class-Switched Autoantibodies in Rheumatoid Synovium. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. e1, 2009.
- IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). **Microscopy Research and Technique**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 184–195, 2000.
- ILLINGWORTH, R. *et al.* A Novel CpG Island Set Identifies Tissue-Specific Methylation at Developmental Gene Loci. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. e22, 2008.
- INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION. **Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) - GBD Compare**. [S. l.], 2021. Disponível em: <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare>. Acesso em: 19 abr. 2021.
- JACOBS, S. A. *et al.* Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 20, n. 18, p. 5232–5241, 2001.
- JAMES, J. A. Clinical Perspectives on Lupus Genetics. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 40, n. 3, p. 413–432, 2014.
- JANSEN, M. P. B. *et al.* Release of extracellular DNA influences renal ischemia reperfusion injury by platelet activation and formation of neutrophil extracellular traps. **Kidney International**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 352–364, 2017.
- JAWAHEER, D. *et al.* Gender, body mass index and rheumatoid arthritis disease activity: results from the QUEST-RA Study. **Clinical and experimental rheumatology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 454–461, 2010.
- JAWAID, W. **EnrichR: Provides an R Interface to “Enrichr”**. , 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=enrichR>.
- JIA, J. *et al.* LncRNA H19 interacted with miR-130a-3p and miR-17-5p to modify radio-resistance and chemo-sensitivity of cardiac carcinoma cells. **Cancer Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1604–1618, 2019.

JIANG, B. *et al.* Down-regulated lncRNA HOTAIR alleviates polycystic ovaries syndrome in rats by reducing expression of insulin-like growth factor 1 via microRNA-130a. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 451–464, 2020.

JIANG, Y. *et al.* LINC00958 promotes endometrial cancer cell proliferation and metastasis by regulating the miR-145-3p/TCF4 axis. **The Journal of Gene Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 7, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jgm.3345>.

JIN, Y. *et al.* Genome-wide association studies of autoimmune vitiligo identify 23 new risk loci and highlight key pathways and regulatory variants. **Nature genetics**, [s. l.], v. 48, n. 11, p. 1418–1424, 2016.

JOHNSON, C. A. *et al.* Functional and metabolic studies of polymorphonuclear leukocytes in the congenital Pelger-Huet anomaly. **Blood**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 466–469, 1980.

JONES, M. A. *et al.* Occurrence of rheumatoid arthritis is not increased in the first degree relatives of a population based inception cohort of inflammatory polyarthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 55, n. 2, p. 89–93, 1996.

JONES, P. A.; TAYLOR, S. M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. **Cell**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 85–93, 1980.

JORDAN, S. D. *et al.* Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. **Nature Cell Biology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 434–446, 2011.

JORGENSEN, K. T. *et al.* Cytokines, autoantibodies and viral antibodies in premorbid and postdiagnostic sera from patients with rheumatoid arthritis: case-control study nested in a cohort of Norwegian blood donors. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 67, n. 6, p. 860–866, 2008.

JUNCO, D. J. D. *et al.* THE FAMILIAL AGGREGATION OF RHEUMATOID ARTHRITIS AND ITS RELATIONSHIP TO THE HLA-DR4 ASSOCIATION. **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 119, n. 5, p. 813–829, 1984.

KAHLOW, B. S. *et al.* Cardiovascular risk and mannose binding lectin in patients with rheumatoid arthritis from southern Brazil. **IJC Heart & Vasculture**, [s. l.], v. 20, p. 27–31, 2018.

KALFA, T. A. *et al.* Pelger–Huët anomaly in a child with 1q42.3-44 deletion. **Pediatric Blood & Cancer**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 645–648, 2006.

KANG, H. *et al.* Silver Nanoparticles Induce Neutrophil Extracellular Traps Via Activation of PAD and Neutrophil Elastase. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 317, 2021.

KAPLAN, M. J. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 691–699, 2011.

KARCZEWSKI, K. J. *et al.* The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. **Nature**, [s. l.], v. 581, n. 7809, p. 434–443, 2020.

KARKENI, E. *et al.* Obesity-associated Inflammation Induces microRNA-155 Expression in Adipocytes and Adipose Tissue: Outcome on Adipocyte Function. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 1615–1626, 2016.

KARLSON, E. W. *et al.* Cumulative association of 22 genetic variants with seropositive rheumatoid arthritis risk. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 1077–1085, 2010.

KAROUZAKIS, E. *et al.* Analysis of early changes in DNA methylation in synovial fibroblasts of RA patients before diagnosis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 7370, 2018.

KAUL, A. *et al.* Systemic lupus erythematosus. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 16039, 2016.

KEHL, T. *et al.* miRPathDB 2.0: a novel release of the miRNA Pathway Dictionary Database. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 48, n. D1, p. D142–D147, 2020.

KELLER, P. *et al.* Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. **BMC Endocrine Disorders**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 7, 2011.

KEYSZER, G. *et al.* Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: A parallel investigation by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1378–1387, 1998.

KHANDPUR, R. *et al.* NETs Are a Source of Citrullinated Autoantigens and Stimulate Inflammatory Responses in Rheumatoid Arthritis. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 178, p. 178ra40-178ra40, 2013.

KIENER, H. P. *et al.* Cadherin 11 promotes invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 1305–1310, 2009.

KIM, K. *et al.* High-density genotyping of immune loci in Koreans and Europeans identifies eight new rheumatoid arthritis risk loci. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. e13, 2015.

KIM, S.-J. *et al.* Obesity activates toll-like receptor-mediated proinflammatory signaling cascades in the adipose tissue of mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 113–122, 2012.

KIM, B.-H. *et al.* Prognostic implications for high expression of oncogenic microRNAs in advanced gastric carcinoma. **Journal of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 107, n. 5, p. 505–510, 2013.

KIMURA, H. *et al.* Immunohistochemical detection of citrullinated histone H3-positive neutrophils is useful for identifying active glomerular and interstitial lesions in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis.

Histopathology, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 520–531, 2021.

KINSLOW, J. D. *et al.* Elevated IgA Plasmablast Levels in Subjects at Risk of Developing Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 68, n. 10, p. 2372–2383, 2016.

KLAASEN, R. *et al.* Body mass index and clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 359–364, 2011.

KOCHI, Y. *et al.* A regulatory variant in CCR6 is associated with rheumatoid arthritis susceptibility. **Nature genetics**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 515–519, 2010.

KONIG, M. F. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans – induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 369, 2016.

KORNBERG, R. D. Structure of Chromatin. **Annual Review of Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 931–954, 1977.

KRABBen, A.; HUIZINGA, T. W. J.; MIL, A. H. M. Biomarkers for Radiographic Progression in Rheumatoid Arthritis. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 147–169, 2014.

KRETZSCHMAR, G. C. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps: A Perspective of Neuroinflammation and Complement Activation in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [s. l.], v. 8, n. April, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2021.630869/full>.

KRISHNAMURTHY, A. *et al.* Identification of a novel chemokine-dependent molecular mechanism underlying rheumatoid arthritis-associated autoantibody-mediated bone loss. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 75, n. 4, p. 721–729, 2016.

KRUPIC, F. *et al.* Ethnic differences in the perception of pain: a systematic review of qualitative and quantitative research. **Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 108–114, 2019.

KULESHOV, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. W1, p. W90–W97, 2016.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Cotran, patologia: bases patológicas das doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

KUROWSKA-STOLARSKA, M. *et al.* MicroRNA-155 as a proinflammatory regulator in clinical and experimental arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 108, n. 27, p. 11193–11198, 2011.

LABITIGAN, M. *et al.* Higher Rates and Clustering of Abnormal Lipids, Obesity, and Diabetes Mellitus in Psoriatic Arthritis Compared With Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Care & Research**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 600–607, 2014.

LANDE, R. *et al.* Neutrophils Activate Plasmacytoid Dendritic Cells by Releasing Self-DNA–Peptide Complexes in Systemic Lupus Erythematosus. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 3, n. 73, 2011. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3001180>. Acesso em: 13 jun. 2023.

LANGFELD, C. D. *et al.* Transancestral mapping and genetic load in systemic lupus erythematosus. **Nature communications**, [s. l.], v. 8, p. 16021, 2017.

LAUFER, V. A. *et al.* Genetic influences on susceptibility to rheumatoid arthritis in African-Americans. **Human molecular genetics**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 858–874, 2019.

LAURENT, L. *et al.* IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 74, n. 7, p. 1425–1431, 2015.

LEE, W. S. *et al.* MicroRNA-9 ameliorates destructive arthritis through down-regulation of NF- κ B1-RANKL pathway in fibroblast-like synoviocytes. **Clinical Immunology**, [s. l.], v. 212, p. 108348, 2020.

LEFFLER, J. *et al.* Degradation of neutrophil extracellular traps co-varies with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. R84, 2013.

LI, J. *et al.* Altered microRNA expression profile with miR-146a upregulation in CD4⁺ T cells from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. R81, 2010.

LI, M. *et al.* Antisense oligonucleotides targeting lncRNA AC104041.1 induces antitumor activity through Wnt2B/ β -catenin pathway in head and neck squamous cell carcinomas. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 672, 2020.

LI, C. *et al.* BAG3 regulates stability of IL-8 mRNA via interplay between HuR and miR-4312 in PDACs. **Cell Death & Disease**, [s. l.], v. 9, n. 9, p. 863, 2018.

LI, H. *et al.* Expression and function of miR-155 in rat synovial fibroblast model of rheumatoid arthritis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], 2019. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2019.7581>.

LI, J. *et al.* ForestQC: Quality control on genetic variants from next-generation sequencing data using random forest. **PLOS Computational Biology**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. e1007556, 2019.

- LI, M. *et al.* HOTAIR participates in hepatic insulin resistance via regulating SIRT1. **European review for medical and pharmacological sciences**, Italy, v. 22, n. 22, p. 7883–7890, 2018.
- LI, Y. R. *et al.* Meta-analysis of shared genetic architecture across ten pediatric autoimmune diseases. **Nature medicine**, [s. l.], v. 21, n. 9, p. 1018–1027, 2015.
- LI, J. *et al.* PFOS-induced placental cell growth inhibition is partially mediated by lncRNA H19 through interacting with miR-19a and miR-19b. **Chemosphere**, [s. l.], v. 261, p. 127640, 2020.
- LI, X.-F. *et al.* PTEN Methylation Promotes Inflammation and Activation of Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 12, p. 700373, 2021.
- LI, E.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, [s. l.], v. 366, n. 6453, p. 362–365, 1993.
- LI, S.; SHUCH, B. M.; GERSTEIN, M. B. Whole-genome analysis of papillary kidney cancer finds significant noncoding alterations. **PLOS Genetics**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. e1006685, 2017.
- LI, E.; ZHANG, Y. DNA Methylation in Mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. a019133–a019133, 2014.
- LIANG, Y. *et al.* Targeting the circBMPR2/miR-553/USP4 Axis as a Potent Therapeutic Approach for Breast Cancer. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s. l.], v. 17, p. 347–361, 2019.
- LIBERT, C.; DEJAGER, L.; PINHEIRO, I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. 594–604, 2010.
- LIM, W.-J. *et al.* Identification of DNA-Methylated CpG Islands Associated With Gene Silencing in the Adult Body Tissues of the Ogye Chicken Using RNA-Seq and Reduced Representation Bisulfite Sequencing. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 10, p. 346, 2019.
- LIU, J. Z. *et al.* Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. **Nature genetics**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 979–986, 2015.
- LIU, X. *et al.* Circulating microRNA-23b as a new biomarker for rheumatoid arthritis. **Gene**, [s. l.], v. 712, n. May, p. 143911, 2019.
- LIU, S. *et al.* Identification of differentially expressed genes, lncRNAs and miRNAs which are associated with tumor malignant phenotypes in hepatoblastoma patients. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 57, p. 97554–97564, 2017.
- LIU, W. *et al.* LncRNA Gm15290 sponges miR-27b to promote PPAR γ -induced fat deposition and contribute to body weight gain in mice. **Biochemical and**

Biophysical Research Communications, [s. l.], v. 493, n. 3, p. 1168–1175, 2017.

LIU, C. *et al.* Long non-coding RNA BC168687 small interfering RNA reduces high glucose and high free fatty acid-induced expression of P2X7 receptors in satellite glial cells. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], 2018. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2018.8601>.

LIU, N. *et al.* Paeonol protects against TNF- α -induced proliferation and cytokine release of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by upregulating FOXO3 through inhibition of miR-155 expression. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 603–610, 2017.

LOPES *et al.* Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. **Human Biology**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 109, 2016a.

LOPES *et al.* Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. **Human Biology**, [s. l.], v. 88, n. 2, p. 109, 2016b.

LORENZ, R. *et al.* ViennaRNA Package 2.0. **Algorithms for Molecular Biology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 26, 2011.

LOSIN, E. A. R. *et al.* Neural and sociocultural mediators of ethnic differences in pain. **Nature Human Behaviour**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 517–530, 2020.

LU, X. *et al.* Sedentary lifestyle related exosomal release of Hotair from gluteal-femoral fat promotes intestinal cell proliferation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 45648, 2017.

MACGREGOR, A. J. *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 30–37, 2000.

MACHIELA, M. J.; CHANOCK, S. J. LDlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants: Fig. 1. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 31, n. 21, p. 3555–3557, 2015.

MACIEJEWSKA-RODRIGUES, H. *et al.* Epigenetics and rheumatoid arthritis: The role of SENP1 in the regulation of MMP-1 expression. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 15–22, 2010.

MAKRYGIANNAKIS, D. *et al.* Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 1488–1492, 2008.

MALININ, T. I.; PEKIN, T. J.; ZVAIFLER, N. J. Cytology of Synovial Fluid in Rheumatoid Arthritis. **American Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 203–208, 1967.

MALMSTRÖM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. **Nature reviews. Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 60–75, 2017.

MARTIN, G. V. *et al.* Mosaicism of XX and XXY cells accounts for high copy number of Toll like Receptor 7 and 8 genes in peripheral blood of men with Rheumatoid Arthritis. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 12880, 2019.

MASI, A. T. Articular patterns in the early course of rheumatoid arthritis. **The American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 16–26, 1983.

MASLIAH-PLANCHON, J. *et al.* MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: evidences of PTEN pathway alterations in early NF1 tumorigenesis. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 473, 2013.

MAZZA, T. *et al.* Clinical Significance of Circulating miR-1273g-3p and miR-122-5p in Pancreatic Cancer. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 10, 2020.
Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00044/full>.

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

MERCER, T. R.; DINGER, M. E.; MATTICK, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 155–159, 2009.

MEYER, O. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 62, n. 2, p. 120–126, 2003.

MIAO, C. *et al.* DNA hypermethylation of SFRP2 influences the pathology of rheumatoid arthritis through the canonical Wnt signaling in model rats. **Autoimmunity**, [s. l.], v. 51, n. 7, p. 319–332, 2018.

MIAO, Y.-R. *et al.* IncRNASNP2: an updated database of functional SNPs and mutations in human and mouse lncRNAs. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. D1, p. D276–D280, 2018.

MOHANDAS, T.; SPARKES, R.; SHAPIRO, L. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. **Science**, [s. l.], v. 211, n. 4480, p. 393–396, 1981.

MOOTHA, V. K. *et al.* PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 267–273, 2003.

MOTA, L. M. H. da *et al.* Diretrizes para o diagnóstico da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 53, n. 2, p. 141–157, 2013.

MOURA, M. C. *et al.* Perfil dos pacientes com manifestações extra-articulares de artrite reumatoide de um serviço ambulatorial em Curitiba, Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [s. l.], v. 52, n. 5, p. 686–694, 2012.

MOUSAVI, M. J. *et al.* Transformation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis; from a friend to foe. **Autoimmunity Highlights**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 3, 2021.

MOUSTAFA, A. A. *et al.* Identification of microRNA signature and potential pathway targets in prostate cancer. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 242, n. 5, p. 536–546, 2017.

MULEY, A. *et al.* Secreted Frizzled-Related Protein 4. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 1505–1516, 2010.

MULLER, S.; RADIC, M. Citrullinated Autoantigens: From Diagnostic Markers to Pathogenetic Mechanisms. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 232–239, 2015.

MUNZ, M. *et al.* Multidimensional gene search with Genehopper. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. W1, p. W98–W103, 2015.

MURTHY, P. *et al.* Enhanced Neutrophil Extracellular Trap Formation in Acute Pancreatitis Contributes to Disease Severity and Is Reduced by Chloroquine. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, p. 28, 2019.

MYERS, T. A.; CHANOCK, S. J.; MACHIELA, M. J. LDlinkR: An R Package for Rapidly Calculating Linkage Disequilibrium Statistics in Diverse Populations. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 11, 2020.

NAKAGAWA, K. *et al.* Complement C1s activation in degenerating articular cartilage of rheumatoid arthritis patients: immunohistochemical studies with an active form specific antibody. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 175–181, 1999.

NAKANO, K. *et al.* DNA methylome signature in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 110–117, 2013.

NAKASA, T. *et al.* Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 1284–1292, 2008.

NARANJO, A. *et al.* Cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis: results from the QUEST-RA study. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. R30, 2008.

NARANJO, A. *et al.* Smokers and non smokers with rheumatoid arthritis have similar clinical status: data from the multinational QUEST-RA database. **Clinical and experimental rheumatology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 820–827, 2010.

NASLAVSKY, M. S. *et al.* Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Brazil. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1004, 2022.

NASS, F. R. *et al.* Analysis of four serum biomarkers in rheumatoid arthritis: association with extra articular manifestations in patients and arthralgia in relatives. **Revista Brasileira de Reumatologia (English Edition)**, [s. l.], v. 57, n. 4, p. 286–293, 2017.

NGO, S. T.; STEYN, F. J.; MCCOMBE, P. A. Gender differences in autoimmune disease. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 347–369, 2014.

NGUYEN, G. T.; GREEN, E. R.; MECSAS, J. Neutrophils to the ROScue: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 7, 2017. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2017.00373/full>.

NICOGLLOU, A.; MERLIN, F. Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. **Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, [s. l.], v. 66, p. 73–82, 2017.

NIELEN, M. M. J. *et al.* Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 380–386, 2004.

NOORT, A. R.; TAK, P. P.; TAS, S. W. Non-canonical NF- κ B signaling in rheumatoid arthritis: Dr Jekyll and Mr Hyde?. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 15, 2015.

NUERMAIMAITI, N. *et al.* Effect of lncRNA HOXA11-AS1 on adipocyte differentiation in human adipose-derived stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 495, n. 2, p. 1878–1884, 2018.

NUNEZ LOPEZ, Y. O. *et al.* Elevated and Correlated Expressions of miR-24, miR-30d, miR-146a, and SFRP-4 in Human Abdominal Adipose Tissue Play a Role in Adiposity and Insulin Resistance. **International Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 2018, p. 1–7, 2018.

OCSKÓ, T. *et al.* Transcription factor Zbtb38 downregulates the expression of anti-inflammatory IL1r2 in mouse model of rheumatoid arthritis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, [s. l.], v. 1861, n. 11, p. 1040–1047, 2018.

OKADA, Y. *et al.* Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. **Nature**, [s. l.], v. 506, n. 7488, p. 376–381, 2014.

OLIVEIRA, L. C. *et al.* AUTOIMMUNE DISORDERS: A PUBLIC HEALTH PROBLEM IN SOUTH-BRAZILIAN MENNONITE COMMUNITIES. **Blucher Medical Proceedings**, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 347, 2019.

OLIVEIRA, L. C. *et al.* The Second Highest Prevalence of Celiac Disease Worldwide: Genetic and Metabolic Insights in Southern Brazilian Mennonites. **Genes**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 1026, 2023.

O'NEIL, L. J. *et al.* Neutrophil extracellular trap-associated carbamylation and histones trigger osteoclast formation in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 82, n. 5, p. 630–638, 2023.

O'NEIL, L. J. *et al.* Neutrophils in Rheumatoid Arthritis: Breaking Immune Tolerance and Fueling Disease. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 215–227, 2019.

OOSTERWIJK, J. C. Congenital abnormalities reported in Pelger-Huet homozygosity as compared to Greenberg/HEM dysplasia: highly variable expression of allelic phenotypes. **Journal of Medical Genetics**, [s. l.], v. 40, n. 12, p. 937–941, 2003.

ORMSETH, M. J. *et al.* Utility of Select Plasma MicroRNA for Disease and Cardiovascular Risk Assessment in Patients with Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Rheumatology**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 1746–1751, 2015.

ORTON, N. C. *et al.* Unique disease heritage of the Dutch-German Mennonite population. **American Journal of Medical Genetics Part A**, [s. l.], v. 146A, n. 8, p. 1072–1087, 2008.

PAMUK, G. E. *et al.* Increased circulating platelet–leucocyte complexes in patients with primary Raynaud's phenomenon and Raynaud's phenomenon secondary to systemic sclerosis: a comparative study. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 297–302, 2007.

PAN, W. *et al.* A functional lncRNA HOTAIR genetic variant contributes to gastric cancer susceptibility. **Molecular Carcinogenesis**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 90–96, 2016a.

PAN, S. *et al.* Microvesicle-Shuttled miR-130b Reduces Fat Deposition in Recipient Primary Cultured Porcine Adipocytes by Inhibiting PPAR- γ Expression. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 229, n. 5, p. 631–639, 2014.

PAN, W. *et al.* Whole exome sequencing identifies lncRNA GAS8-AS1 and LPAR4 as novel papillary thyroid carcinoma driver alternations. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 25, n. 9, p. 1875–1884, 2016b.

PAPADIMITROPOULOS, E. *et al.* The burden of illness of rheumatoid arthritis in Latin America—A systematic literature review. **International Journal of Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 405–421, 2022.

PARK, B. H.; DOLEN, J.; SNYDER, B. Defective Chemotactic Migration of Polymorphonuclear Leukocytes in Pelger-Huet Anomaly. **Experimental Biology and Medicine**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 51–54, 1977.

PASCUT, D. *et al.* Differences in circulating microRNA signature in Prader–Willi syndrome and non-syndromic obesity. **Endocrine Connections**, [s. l.], v. 7, n. 12, p. 1262–1274, 2018.

- PATIL, I. Visualizations with statistical details: The “ggstatsplot” approach. **Journal of Open Source Software**, [s. l.], v. 6, n. 61, p. 3167, 2021.
- PATIL, S.; DESHPANDE, S.; SENGUPTA, K. Nuclear envelope protein lamin B receptor protects the genome from chromosomal instability and tumorigenesis. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 745–763, 2023.
- PAULS JR, P. **Mennoniten in Brasilien**. Witmarsum: [s. n.], 1980.
- PAYNE, M. *et al.* Amish, Mennonite, and Hutterite Genetic Disorder Database. **Paediatrics & Child Health**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. e23–e24, 2011.
- PENNER, H.; GERLACH, H.; QUIRING, H. **Weltweite Bruderschaft: Ein mennonitisches Geschichtsbuch**. Weierhof: Verlag Mennonitischer Geschichtsverein, 1984.
- PÉREZ-SÁNCHEZ, C. *et al.* Diagnostic potential of NETosis-derived products for disease activity, atherosclerosis and therapeutic effectiveness in Rheumatoid Arthritis patients. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], v. 82, p. 31–40, 2017.
- PHILIPPE, L. *et al.* TLR2 Expression Is Regulated by MicroRNA miR-19 in Rheumatoid Fibroblast-like Synoviocytes. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 188, n. 1, p. 454–461, 2012.
- PIDÍKOVÁ, P.; HERICHOVÁ, I. miRNA Clusters with Up-Regulated Expression in Colorectal Cancer. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 2979, 2021.
- PILSCZEK, F. H. *et al.* A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 185, n. 12, p. 7413–7425, 2010.
- PRUIJN, G. J.; WIJK, A.; VAN VENROOIJ, W. J. The use of citrullinated peptides and proteins for the diagnosis of rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 203, 2010.
- PURCELL, S.; CHANG, C. **PLINK 1.9**. , [s. d.]. Disponível em: www.cog-genomics.org/plink/1.9/.
- QI, K. *et al.* Long Non-Coding RNA (LncRNA) CAIF is Downregulated in Osteoarthritis and Inhibits LPS-Induced Interleukin 6 (IL-6) Upregulation by Downregulation of MiR-1246. **Medical Science Monitor**, [s. l.], v. 25, p. 8019–8024, 2019.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2022. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.
- RAJASEKHAR, M. *et al.* MicroRNA-155 contributes to enhanced resistance to apoptosis in monocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, [s. l.], v. 79, p. 53–62, 2017.

- RASK-ANDERSEN, M. *et al.* Genome-wide association study of body fat distribution identifies adiposity loci and sex-specific genetic effects. **Nature communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 339, 2019.
- RAYCHAUDHURI, S. *et al.* Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. **Nature genetics**, [s. l.], v. 40, n. 10, p. 1216–1223, 2008.
- REA, S. *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. **Nature**, [s. l.], v. 406, n. 6796, p. 593–599, 2000.
- REDLICH, K.; SMOLEN, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 234–250, 2012.
- REPO, H. *et al.* Impaired neutrophil chemotaxis in Pelger-Huët anomaly. **Clinical and experimental immunology**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 326–333, 1979.
- REZAEIPOOR, M. *et al.* Altered expression of microRNAs may predict therapeutic response in rheumatoid arthritis patients. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 83, p. 106404, 2020.
- ROGERS, G. E. Occurrence of Citrulline in Proteins. **Nature**, [s. l.], v. 194, n. 4834, p. 1149–1151, 1962.
- ROGERS, G. E.; HARDING, H. W. J.; LLEWELLYN-SMITH, I. J. The origin of citrulline-containing proteins in the hair follicle and the chemical nature of trichohyalin, an intracellular precursor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, [s. l.], v. 495, n. 1, p. 159–175, 1977.
- ROGERS, G. E.; SIMMONDS, D. H. Content of Citrulline and Other Amino-Acids in a Protein of Hair Follicles. **Nature**, [s. l.], v. 182, n. 4629, p. 186–187, 1958.
- ROMERO, V. *et al.* Immune-Mediated Pore-Forming Pathways Induce Cellular Hypercitrullination and Generate Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 209, 2013.
- ROSETI, L.; GRIGOLO, B. COVID-19 and rheumatic diseases: A mini-review. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 9, p. 997876, 2022.
- RUDDY, S.; COLTEN, H. R. Rheumatoid Arthritis. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 290, n. 23, p. 1284–1288, 1974.
- S. E BOSCHMANN. **Análise genética da persistência da lactase nas populações menonita e euro-brasileira do sul do brasil**. 2012. 102 f. - Dissertação (Mestrado em Medicina Interna), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, [s. l.], 2012.
- SAAD, M. N. *et al.* Studying the effects of haplotype partitioning methods on the RA-associated genomic results from the North American Rheumatoid Arthritis

Consortium (NARAC) dataset. **Journal of advanced research**, [s. l.], v. 18, p. 113–126, 2019.

SACRE, S. *et al.* Oligodeoxynucleotide inhibition of Toll-like receptors 3, 7, 8, and 9 suppresses cytokine production in a human rheumatoid arthritis model. **European Journal of Immunology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 772–781, 2016.

SAFIRI, S. *et al.* Global, regional and national burden of rheumatoid arthritis 1990–2017: a systematic analysis of the Global Burden of Disease study 2017. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 78, n. 11, p. 1463–1471, 2019.

SALVIANO-SILVA, A. *et al.* Besides Pathology: Long Non-Coding RNA in Cell and Tissue Homeostasis. **Non-Coding RNA**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 3, 2018.

SANTOS-ROSA, H. *et al.* Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. **Nature**, [s. l.], v. 419, n. 6905, p. 407–411, 2002.

SCHAUBERGER, P.; WALKER, A. **Openxlsx: Read, Write and Edit xlsx Files**. , 2020. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=openxlsx>.

SCHETT, G.; GRAVALLESE, E. Bone erosion in rheumatoid arthritis: mechanisms, diagnosis and treatment. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. 656–664, 2012.

SCHMIDT, E. *et al.* LincRNA H19 protects from dietary obesity by constraining expression of monoallelic genes in brown fat. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 3622, 2018.

SCHREIBER, A. *et al.* Necroptosis controls NET generation and mediates complement activation, endothelial damage, and autoimmune vasculitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 114, n. 45, 2017. Disponível em: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1708247114>.

SCHROEDER, W.; HUEBERT, H. **Mennonite Historical Atlas**. [S. l.]: Springfield Publishers, 1996.

SCHULER, E.; LIN, F.; WORMAN, H. J. Characterization of the human gene encoding LBR, an integral protein of the nuclear envelope inner membrane. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 269, n. 15, p. 11312–11317, 1994.

SCHULMAN, E. *et al.* Overweight, Obesity, and the Likelihood of Achieving Sustained Remission in Early Rheumatoid Arthritis: Results From a Multicenter Prospective Cohort Study. **Arthritis Care and Research**, [s. l.], v. 70, n. 8, p. 1185–1191, 2018.

SCOFIELD, R. H. *et al.* Klinefelter's syndrome (47,XXY) in male systemic lupus erythematosus patients: Support for the notion of a gene-dose effect from the X chromosome. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 58, n. 8, p. 2511–2517, 2008.

SENDÁ, A. *et al.* Involvement of neutrophil extracellular traps in the pathogenesis of glomerulonephritis in a case of systemic lupus erythematosus

and antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis overlap syndrome. **CEN Case Reports**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 339–346, 2022.

SERFAS, K. D. *et al.* Comparison of the segregation of the RYR1 C1840T mutation with segregation of the caffeine/halothane contracture test results for malignant hyperthermia susceptibility in a large Manitoba Mennonite family. **Anesthesiology**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 322–329, 1996.

SHAKER, O. G. *et al.* Expression Profile of Long Noncoding RNAs, Inc-Cox2, and HOTAIR in Rheumatoid Arthritis Patients. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, [s. l.], v. 39, n. 3, p. 174–180, 2019.

SHAO, X. *et al.* Rheumatoid arthritis-relevant DNA methylation changes identified in ACPA-positive asymptomatic individuals using methylome capture sequencing. **Clinical Epigenetics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 110, 2019.

SHEMIRANI, A.-H. *et al.* Increased mean platelet volume in primary Raynaud's phenomenon. **Platelets**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 312–316, 2012.

SHI, J. *et al.* Anti-carbamylated protein (anti-CarP) antibodies precede the onset of rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 780–783, 2014.

SHIN, J.-H. *et al.* **LDheatmap: An R Function for Graphical Display of Pairwise Linkage Disequilibria Between Single Nucleotide Polymorphisms**. , 2006. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/LDheatmap/index.html>. Acesso em: 15 out. 2022.

SHIOTA, K. *et al.* Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. **Genes to Cells**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 961–969, 2002.

SHOGREN-KNAAK, M. Histone H4-K16 Acetylation Controls Chromatin Structure and Protein Interactions. **Science**, [s. l.], v. 311, n. 5762, p. 844–847, 2006.

SHULTZ, L. D. Mutations at the mouse ichthyosis locus are within the lamin B receptor gene: a single gene model for human Pelger-Huet anomaly. **Human Molecular Genetics**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 61–69, 2003.

SIEGERT, E.; BEIER, L.; GRÄBNER, H. Homozygotic Pelger-Huet anomaly. **Kinderärztliche Praxis**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 164–169, 1983.

SINGH, N. *et al.* Alterations in nuclear structure promote lupus autoimmunity in a mouse model. **Disease Models & Mechanisms**, [s. l.], 2016. Disponível em: <https://journals.biologists.com/dmm/article/doi/10.1242/dmm.024851/257169/Alterations-in-nuclear-structure-promote-lupus>.

SINNWELL, J.; SCHAID, D. **Haplo.stats**. , 2022. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/haplo.stats/index.html>. Acesso em: 15 out. 2022.

SJOBERG, D., D. *et al.* Reproducible Summary Tables with the gtsummary Package. **The R Journal**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 570, 2021.

SMITH, C. K. *et al.* Neutrophil Extracellular Trap-Derived Enzymes Oxidize High-Density Lipoprotein: An Additional Proatherogenic Mechanism in Systemic Lupus Erythematosus. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 66, n. 9, p. 2532–2544, 2014.

SMOLEN, J. S. *et al.* Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 18001, 2018.

SOKOLOVE, J. *et al.* Rheumatoid Factor as a Potentiator of Anti-Citrullinated Protein Antibody-Mediated Inflammation in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 813–821, 2014.

SONG, J. *et al.* PBMC and exosome-derived Hotair is a critical regulator and potent marker for rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Medicine**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 121–126, 2015.

SPENGLER, J. *et al.* Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 67, n. 12, p. 3135–3145, 2015.

STAHL, E. A. *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. **Nature genetics**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 508–514, 2010.

STAVROPOULOS-KALINOGLU, A. *et al.* Underweight and obese states both associate with worse disease activity and physical function in patients with established rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 439–444, 2009.

STETSON, D. B. Endogenous retroelements and autoimmune disease. **Current Opinion in Immunology**, [s. l.], v. 24, n. 6, p. 692–697, 2012.

STÖCKEL, D. *et al.* Multi-omics enrichment analysis using the GeneTrail2 web service. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 32, n. 10, p. 1502–1508, 2016.

STOLT, P. Silica exposure is associated with increased risk of developing rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 582–586, 2005.

STOPA, S. R. *et al.* Pesquisa Nacional de Saúde 2019: histórico, métodos e perspectivas. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s. l.], v. 29, n. 5, 2020.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

STUHLMÜLLER, B. *et al.* Detection of Oncofetal H19 RNA in Rheumatoid Arthritis Synovial Tissue. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 901–911, 2003.

SU, H. *et al.* LncRNA H19 promotes the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells through AT1R via sponging let-7b in monocrotaline-

induced pulmonary arterial hypertension. **RESPIRATORY RESEARCH**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 254, 2018.

SU, L.-C. *et al.* Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 1631–1637, 2017.

SUBRAMANIAN, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 102, n. 43, p. 15545–15550, 2005.

SUGIYAMA, D. *et al.* Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 69, n. 01, p. 70–81, 2010.

SUN, S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 545–558, 2017.

TAKANABE, R. *et al.* Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 376, n. 4, p. 728–732, 2008.

TELATAR, M. *et al.* Ataxia-Telangiectasia: Identification and Detection of Founder-Effect Mutations in the ATM Gene in Ethnic Populations. **The American Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 86–97, 1998.

TIAN, J. *et al.* Global epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comprehensive systematic analysis and modelling study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 351–356, 2023.

TOES, R.; PISETSKY, D. S. Response to: ‘Comment on editorial “Pathogenic effector functions of ACPA: where do we stand”’ by Holmdahl. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 79, n. 10, p. e127–e127, 2020.

TOO, C. L. *et al.* Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a Malaysian population-based case–control study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 997–1002, 2016a.

TOO, C. L. *et al.* Occupational exposure to textile dust increases the risk of rheumatoid arthritis: results from a Malaysian population-based case–control study. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 997–1002, 2016b.

TRAN, C. N. *et al.* Presentation of arthritogenic peptide to antigen-specific T cells by fibroblast-like synoviocytes. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 1497–1506, 2007.

TROUW, L. A. *et al.* Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 60, n. 7, p. 1923–1931, 2009.

TRUEDESSON, L.; BENGTSSON, A. A.; STURFELT, G. Complement deficiencies and systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 560–566, 2007.

TRYGGESTAD, J. B. *et al.* Macrophage-Derived microRNA-155 Increases in Obesity and Influences Adipocyte Metabolism by Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. **Obesity**, [s. l.], v. 27, n. 11, p. 1856–1864, 2019.

TRYNKA, G. *et al.* Chromatin marks identify critical cell types for fine mapping complex trait variants. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 45, n. 2, p. 124–130, 2013.

TURNER, E. M.; SCHLIEKER, C. Pelger-Huët anomaly and Greenberg skeletal dysplasia: LBR-associated diseases of cholesterol metabolism. **Rare Diseases**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. e1241363, 2016.

TÜYSÜZ, B. *et al.* Natural history and genetic spectrum of the Turkish metaphyseal dysplasia cohort, including rare types caused by biallelic COL10A1, COL2A1, and LBR variants. **Bone**, [s. l.], v. 167, p. 116614, 2023.

VAN DER HELM-VAN MIL, A. H.; HUIZINGA, T. W. Advances in the genetics of rheumatoid arthritis point to subclassification into distinct disease subsets. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 205, 2008.

VAN DER LINDEN, M. P. M. *et al.* Value of anti-modified citrullinated vimentin and third-generation anti-cyclic citrullinated peptide compared with second-generation anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in predicting disease outcome in undifferentiated arthritis and rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 60, n. 8, p. 2232–2241, 2009.

VAN GAALEN, F. A. *et al.* Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: A prospective cohort study. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 709–715, 2004.

VAN OOSTERHOUT, M. *et al.* Differences in synovial tissue infiltrates between anti-cyclic citrullinated peptide-positive rheumatoid arthritis and anti-cyclic citrullinated peptide-negative rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 53–60, 2008.

VAN STEENBERGEN, H. W. *et al.* EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 491–496, 2017.

VAN STEENBERGEN, H. W. *et al.* Preventing progression from arthralgia to arthritis: targeting the right patients. **Nature Reviews Rheumatology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 32–41, 2018.

VESPERINI, V. *et al.* Association of Tobacco Exposure and Reduction of Radiographic Progression in Early Rheumatoid Arthritis: Results From a French Multicenter Cohort. **Arthritis Care & Research**, [s. l.], v. 65, n. 12, p. 1899–1906, 2013.

VIATTE, S. *et al.* Genetic markers of rheumatoid arthritis susceptibility in anti-citrullinated peptide antibody negative patients. **Annals of the Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 71, n. 12, p. 1984–1990, 2012.

VIATTE, S. *et al.* Replication of Associations of Genetic Loci Outside the HLA Region With Susceptibility to Anti-Cyclic Citrullinated Peptide-Negative Rheumatoid Arthritis. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 68, n. 7, p. 1603–1613, 2016.

VILLANUEVA, E. *et al.* Netting Neutrophils Induce Endothelial Damage, Infiltrate Tissues, and Expose Immunostimulatory Molecules in Systemic Lupus Erythematosus. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 187, n. 1, p. 538–552, 2011.

VITSEVA, O. I. *et al.* Inducible Toll-like Receptor and NF- κ B Regulatory Pathway Expression in Human Adipose Tissue. **Obesity**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 932–937, 2008.

VLACHOS, I. S. *et al.* DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. W1, p. W460–W466, 2015.

VOSSENAAR, E. R. *et al.* The presence of citrullinated proteins is not specific for rheumatoid synovial tissue. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 50, n. 11, p. 3485–3494, 2004.

WADA, T. T. *et al.* Aberrant histone acetylation contributes to elevated interleukin-6 production in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 444, n. 4, p. 682–686, 2014.

WANG, J. *et al.* Genome-wide association analysis implicates the involvement of eight loci with response to tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. **The pharmacogenomics journal**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 235–241, 2013.

WANG, Y. *et al.* miR-155 promotes fibroblast-like synoviocyte proliferation and inflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis by targeting FOXO3a. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], 2019. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2019.8330>.

WANG, H. *et al.* Neutrophil extracellular traps can activate alternative complement pathways. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 181, n. 3, p. 518–527, 2015.

WANG, M. *et al.* The mechanism of Chinese herbal formula HQT in the treatment of rheumatoid arthritis is related to its regulation of lncRNA uc.477 and miR-19b. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 108, n. 2, p. 519–529, 2020.

WANG, Y. *et al.* TLR4 rs41426344 increases susceptibility of rheumatoid arthritis (RA) and juvenile idiopathic arthritis (JIA) in a central south Chinese Han population. **Pediatric Rheumatology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 12, 2017.

WAPINSKI, O.; CHANG, H. Y. Long noncoding RNAs and human disease. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 6, p. 354–361, 2011.

WATERHAM, H. R. *et al.* Autosomal recessive HEM/Greenberg skeletal dysplasia is caused by 3 beta-hydroxysterol delta 14-reductase deficiency due to mutations in the lamin B receptor gene. **American journal of human genetics**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 1013–1017, 2003.

WEBBER, M. P. *et al.* Nested Case-Control Study of Selected Systemic Autoimmune Diseases in World Trade Center Rescue/Recovery Workers: AUTOIMMUNE DISEASES AND WORLD TRADE CENTER WORK EXPOSURE. **Arthritis & Rheumatology**, [s. l.], v. 67, n. 5, p. 1369–1376, 2015.

WEIGLE, J. **Über Mennoniten. G-Gruppen - grenzenlose Genealogie über die Ostsee.** [S. l.], 2006. Disponível em: <http://www.g-gruppen.net/mennot.htm>. Acesso em: 22 jul. 2019.

WESTHORPE, C. L. V. *et al.* In Vivo Imaging of Inflamed Glomeruli Reveals Dynamics of Neutrophil Extracellular Trap Formation in Glomerular Capillaries. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 187, n. 2, p. 318–331, 2017.

WEYAND, C. M. The Influence of HLA-DRB1 Genes on Disease Severity in Rheumatoid Arthritis. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 117, n. 10, p. 801, 1992.

WHITE, P. C. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 26–34, 2016.

WHO. **Obesity and overweight.** [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 18 jun. 2020.

WICKHAM, H. *et al.* **Dplyr: A Grammar of Data Manipulation.** , 2020a. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=dplyr>.

WICKHAM, H. *et al.* **Dplyr: A Grammar of Data Manipulation.** , 2021.

WICKHAM, H. *et al.* **Ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics.** , 2020b. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=ggplot2>.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.** [S. l.]: Springer-Verlag New York, 2016. *E-book*. Disponível em: <https://ggplot2.tidyverse.org>.

WICKHAM, H.; BRYAN, J. **Readxl: Read Excel Files.** , 2019. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=readxl>.

WICKMAN, H. *et al.* **dplyr: A Grammar of Data Manipulation.** **CRAN Repository**, [s. l.], 2021.

WOLF, S. F. *et al.* Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 81, n. 9, p. 2806–2810, 1984.

WRIGHT, H. L. *et al.* Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid Neutrophils Drive Inflammation Through Production of Chemokines, Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Traps. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 11, p. 584116, 2021.

WU, Z.-M. *et al.* Icariin alleviates rheumatoid arthritis via regulating miR-223-3p/NLRP3 signalling axis. **Autoimmunity**, [s. l.], v. 53, n. 8, p. 450–458, 2020.

WU, S. *et al.* microRNA-21 Aggravates Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in MH7A Cells Through Targeting SNF5. **Inflammation**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 441–454, 2020.

WU, G. *et al.* MicroRNA-145-3p suppresses proliferation and promotes apoptosis and autophagy of osteosarcoma cell by targeting HDAC4. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, [s. l.], v. 46, n. sup2, p. 579–586, 2018.

XIAO, Z. *et al.* LncRNA HOTAIR is a Prognostic Biomarker for the Proliferation and Chemoresistance of Colorectal Cancer via MiR-203a-3p-Mediated Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 1275–1285, 2018.

XING, F. *et al.* Alteration of Antiviral Signalling by Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of Mitochondrial Antiviral Signalling Protein (MAVS). **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e0151173, 2016.

XIONG, G. *et al.* Inhibition of microRNA-21 decreases the invasiveness of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis via TGF β /Smads signaling pathway. **Iranian journal of basic medical sciences**, [s. l.], v. 19, n. 7, p. 787–793, 2016.

XU, F.; ZHANG, K.; GRUNSTEIN, M. Acetylation in Histone H3 Globular Domain Regulates Gene Expression in Yeast. **Cell**, [s. l.], v. 121, n. 3, p. 375–385, 2005.

YADAV, P. *et al.* Antibodies Elicited in Response to EBNA-1 May Cross-React with dsDNA. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. e14488, 2011.

YAMADA, Y. *et al.* Passenger strand of miR-145-3p acts as a tumor-suppressor by targeting MYO1B in head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, [s. l.], 2017. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2017.4190>.

YANG, L.-Y. *et al.* Increased neutrophil extracellular traps promote metastasis potential of hepatocellular carcinoma via provoking tumorous inflammatory response. **Journal of Hematology & Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 3, 2020.

YANG, S. *et al.* Interleukin 34 Upregulation Contributes to the Increment of MicroRNA 21 Expression through STAT3 Activation Associated with Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. **The Journal of Rheumatology**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 1312–1319, 2016.

YANG, Jialiang *et al.* LncRNA H19 aggravates TNF- α -induced inflammatory injury via TAK1 pathway in MH7A cells. **BioFactors**, [s. l.], v. n/a, n. n/a, 2020. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biof.1659>.

YANG, Z. *et al.* miR-143-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting IGF1R and IGFBP5 and regulating the Ras/p38 MAPK signaling pathway in rheumatoid arthritis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], 2018. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.5907>.

YANG, Juhua *et al.* The Identification of Long Non-coding RNA H19 Target and Its Function in Chronic Myeloid Leukemia. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s. l.], v. 19, p. 1368–1378, 2020.

YASUI, T. *et al.* Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires. **Science Advances**, [s. l.], v. 3, n. 12, 2017. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.1701133>.

YE, H. *et al.* Full high-throughput sequencing analysis of differences in expression profiles of long noncoding RNAs and their mechanisms of action in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 70, 2019.

YI, X.; CHENG, X. Understanding Competitive Endogenous RNA Network Mechanism in Type 1 Diabetes Mellitus Using Computational and Bioinformatics Approaches. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, [s. l.], v. Volume 14, p. 3865–3945, 2021.

YIN, X. *et al.* Meta-analysis of 208370 East Asians identifies 113 susceptibility loci for systemic lupus erythematosus. **Annals of the rheumatic diseases**, [s. l.], v. 80, n. 5, p. 632–640, 2021.

YOUNG, A. N. *et al.* Deletion of LBR N-terminal domains recapitulates Pelger-Huet anomaly phenotypes in mouse without disrupting X chromosome inactivation. **Communications Biology**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 478, 2021.

YOUSEFI, S. *et al.* Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. **Cell Death & Differentiation**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 1438–1444, 2009.

YUE, J. *et al.* Circulating miR-99b-5p as a novel predictor of erosion progression on high-resolution peripheral quantitative computed tomography in early rheumatoid arthritis: A prospective cohort study. **International Journal of Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 1724–1733, 2019.

YUN, T. *et al.* Accurate, scalable cohort variant calls using DeepVariant and GLnexus. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 36, n. 24, p. 5582–5589, 2021.

ZHANG, Y. *et al.* Adipocyte-derived microvesicles from obese mice induce M1 macrophage phenotype through secreted miR-155. **Journal of Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 505–517, 2016.

ZHANG, X. *et al.* Construction and validation of a three-microRNA signature as prognostic biomarker in patients with hepatocellular carcinoma. **International Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 984–999, 2021.

ZHANG, Q. *et al.* Dynamic and distinct histone modifications modulate the expression of key adipogenesis regulatory genes. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 11, n. 23, p. 4310–4322, 2012.

ZHANG, S. *et al.* Hydroxychloroquine inhibiting neutrophil extracellular trap formation alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by blocking TLR9 in mice. **Clinical Immunology**, United States, v. 216, p. 108461, 2020.

ZHANG, P. *et al.* miR-370-3p Regulates Adipogenesis through Targeting Mknk1. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 22, p. 6926, 2021.

ZHAO, X.-Y. *et al.* Long noncoding RNA licensing of obesity-linked hepatic lipogenesis and NAFLD pathogenesis. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 2986, 2018.

ZHENG, J. *et al.* Pancreatic cancer risk variant in LINC00673 creates a miR-1231 binding site and interferes with PTPN11 degradation. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 48, n. 7, p. 747–757, 2016.

ZHOU, F. *et al.* LINC00355:8 promotes cell proliferation and migration with invasion via the MiR-6777-3p/Wnt10b axis in Hepatocellular Carcinoma. **Journal of Cancer**, [s. l.], v. 11, n. 19, p. 5641–5655, 2020.

ZHU, H. *et al.* FC-99 reduces macrophage tenascin-C expression by upregulating miRNA-494 in arthritis. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 79, p. 106105, 2020.

ZHU, Y. *et al.* Long non-coding RNA H19, a negative regulator of microRNA-148b-3p, participates in hypoxia stress in human hepatic sinusoidal endothelial cells via NOX4 and eNOS/NO signaling. **Biochimie**, [s. l.], v. 163, p. 128–136, 2019.

ZIFF, M. Relation of cellular infiltration of rheumatoid synovial membrane to its immune response. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 313–319, 1974.

ZONTA, Y. R. *et al.* Paracoccidioides brasiliensis Releases a DNase-Like Protein That Degrades NETs and Allows for Fungal Escape. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 10, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020.592022/full>.