



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ISAURA ISABELLE FONSECA GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* E *NFKB1* E
MIRNAS REGULATÓRIOS EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM ARTRITE
REUMATOIDE**

Recife

2021

ISAURA ISABELLE FONSECA GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* E *NFKB1* E
MIRNAS REGULATÓRIOS EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM ARTRITE
REUMATOIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal de Pernambuco como
requisito parcial para obtenção do título de Doutora em
Genética.

Área de concentração: Genética

Orientador: Dra. Paula Sandrin Garcia

Coorientador: Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Silva, Isaura Isabelle Fonseca Gomes da

Avaliação da expressão dos genes *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* e *NFKB1* e miRNAs regulatórios em monócitos de pacientes com artrite reumatóide / Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva. – 2021.

144 f. : il.

Orientadora: Dra. Paula Sandrin Garcia.

Coorientador: Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Artrite reumatóide. 2. Doenças autoimunes. 3. Expressão gênica. I. Garcia, Paula Sandrin (orientadora) II. Souza, Paulo Roberto Eleutério de (coorientador). III. Título.

616.7227

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-130

ISAURA ISABELLE FONSECA GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES MYD88, IRAK3, TRAF6 E NFkB1 E
MIRNAS REGULATÓRIOS EM MONÓCITOS DE PACIENTES COM ARTRITE
REUMATOIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal de Pernambuco como
requisito parcial para obtenção do título de Doutora em
Genética.

Área de concentração: Genética

Aprovada em 13/12/2021

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Renata Santos Almeida
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

Dra. Michelly Cristiny Pereira
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Jessica Catarine Frutuoso do Nascimento
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

Recife

2021

Dedico este trabalho a minha avó Auristele (*in memoriam*) por ter sido luz e esperança quando todos viam trevas, por ter vivido para dar amor a todos a sua volta e por ter dedicado tantos anos a ser exemplo de empatia e altruísmo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois mesmo não acreditando no que pregam muitas religiões, sei que há uma força poderosa guiando meus passos e me auxiliando a trilhar este caminho.

Agradeço ao meu melhor amigo Marcilio, que por uma felicidade do acaso também se tornou meu marido e companheiro de jornada. Muito obrigada pelo amor incondicional, por me transmitir serenidade e por escolher todos os dias seguir a estrada ao meu lado. Sem você, nada disso faria sentido. Seguirei você até que a última luz ser apague.

Agradeço a minha família, em especial aos meus irmãos Nelson Gomes-Neto e Karoline Gomes, pelo apoio, amor e compreensão nos momentos em que fui ausente para conseguir cumprir minhas obrigações. Obrigada por me darem tanto amor, mesmo quando eu não fui merecedora de recebê-lo. Agradeço a Heitor, meu sobrinho e afilhado, cujo superpoder é abrilhantar os meus dias quando dá um simples sorriso, obrigada por todos os abraços, beijinhos e carinho. Amo você mais do que consigo descrever. Agradeço também aos meus pais Nelson Gomes Jr e Dulciene Fonseca, pelo apoio e suporte neste período. A minhas tias Ceça e Aurelice que sempre me impulsionam a alçar novos vãos e que são, além de tias, amigas e protetoras. E a minha sogra, Marisene, que se tornou uma segunda mãe no momento mais difícil da minha vida. Amo-as infinitamente. Agradeço a minha avó Auristele, a quem esta tese é dedicada, pois sempre foi a pessoa que acreditou no meu potencial e apostaria todas as suas fichas que a caminhada valeria a pena. Embora ela não esteja mais aqui em corpo presente, tenho certeza que onde quer que ela esteja, está vibrando por mais essa conquista como se fosse uma conquista dela mesma. Obrigada por ter me amado desde sempre e ter me feito abrir os olhos para a luz quando eu só conseguia enxergar escuridão. E a todos os outros familiares que direta ou indiretamente contribuíram para que eu desse os passos que me fizeram chegar aqui.

Agradeço a minha orientadora, Paula Sandrin, pois mesmo não tendo idade para tal, cuida de mim como se fosse uma filha e se importa tanto com meu desenvolvimento intelectual/profissional e pessoal. Espero que a ciência continue sendo agraciada com seu brilhantismo por muito tempo e que a senhora continue sendo um exemplo de que o amor e empatia podem ser a chave para motivar os alunos e fazer com que a ciência aconteça. E aos outros professores que me motivaram e foram peças-chaves para que essa caminhada fosse trilhada, em especial o prof Fabricio Souto, prof Paulo Souza e profa Maria de Mascena que também foram fonte de inspiração e motivação em muitos momentos desse doutorado.

Agradeço aos irmãos que fiz durante o doutorado, Denise Queiroga e Werbson Guaraná, pois sem eles eu não teria conseguido escalar a montanha. Se eu fosse Frodo, eles

seriam meus Sam. Em muitos momentos nesta jornada eles foram meus pontos de apoio e calma em meio a turbulência de mares revoltos. Amo-os de todo coração. Agradeço a Camilla Lima que sempre esteve disponível pra me guiar e me inspirar com a sua serenidade e tranquilidade. Ela é, sem sombra de dúvidas, a melhor pessoa para compartilhar a escrita de um artigo. Obrigada por todos os ensinamentos.

Agradeço também aos outros amigos de jornada e companheiros de laboratório e de sala de aula, Dalila, Leandro, Wlisses, Renata, Diego, Braziliano, e tantos outros que não caberiam nesta página. Obrigada por me ajudarem nesta caminhada.

Agradeço aos amigos de trabalho que sempre estavam dispostos a ouvir os perrengues de uma "quase" doutora, em especial, minha líder Isabel, que é ótima em ouvir e dar conselhos sobre a pós-graduação e fez o que pôde para que esta caminhada fosse mais leve.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida no período do doutorado e a outras agências de fomento como FACEPE e CNPq cujos recursos auxiliaram o desenvolvimento desta pesquisa e de grande parte do desenvolvimento científico deste país. Que o obscurantismo que persegue a ciência nestes tempos seja substituído à luz do conhecimento.

E, por último e mais importante, agradeço aos pacientes que mesmo em seu momento de sofrimento contribuíram para que esse projeto fosse desenvolvido e mais um passo fosse dado na compreensão da Artrite Reumatoide e da autoimunidade.

Aos leitores desta tese, muito obrigada pelo tempo que me foi concedido.

“Tudo que temos que decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado.”

(TOLKIEN, 2001, p.53)

RESUMO

Desregulações em monócitos podem estar relacionadas ao aumento e cronicidade da inflamação e, conseqüentemente, no desenvolvimento de Artrite Reumatoide (AR) em alguns indivíduos. No entanto, ainda são incipientes os estudos que verificam alterações no perfil transcriptômico e epigenético nessas células. O presente estudo avaliou a expressão dos genes *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* e *NFkB1* e miRNAs (miR194-5p, miR124a-3p, miR-9-5p e miR-340-5p) em monócitos de pacientes com AR e controles saudáveis a fim de elucidar o papel destes no desenvolvimento e patogênese da doença e sua relação com a inflamação. Nossos resultados mostraram uma significativa diminuição da expressão do *IRAK3* em pacientes comparados aos controles (Fold Change (FC) = -1,63, p = 0,054) e em pacientes com alta atividade da doença comparados aos com baixa atividade (FC = -1,78, p = 0,030), indicando uma influência deste gene no desenvolvimento e gravidade da AR. Em relação às análises dos miRNAs, os miR194-5p e miR-9-5p foram mais expressos em pacientes tratados com prednisona, indicando um efeito da estratégia de tratamento sobre a modulação desses miRNAs (FC = -2,31; p = 0,031; FC = -3,05; p = 0,031, respectivamente). Ainda observamos uma super expressão dos genes *TRAF6* e *NFkB1* concomitante a super expressão dos miR-194-5p, miR-9-5p e miR-340-5p (p < 0,001). Finalmente, observamos uma correlação moderada entre o miR-124-3p e IL-6 (r = 0,46; p = 0,033). Em suma, pôde-se observar uma relação entre a expressão do gene *IRAK3* com a AR e um efeito da prednisona sobre a expressão dos miR-194-5p e miR-9-5p. Além disso, os miRNAs parecem ter um papel regulatório nos genes *TRAF6* e *NFkB1*.

Palavras-chave: IRAK3, MYD88, TRAF6, NFkB1, miRNAs, monócitos.

ABSTRACT

Dysregulations in monocytes can be related to the inflammation increase and chronicity and, consequently, to the Rheumatoid Arthritis (RA) development in some individuals. However, studies that evaluated changes in the genetic and epigenetic profile of these cells are incipient. The present study evaluated the expression of *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* and *NFkB1* genes and miRNAs (miR194-5p, miR124a-3p, miR-9-5p and miR-340-5p) in monocytes from RA patients and healthy controls in order to elucidate their role in the development and pathogenesis of the disease and their relationship with inflammation. Our results showed a significant decrease in *IRAK3* expression in patients compared to controls (Fold Change (FC) = -1.63, $p = 0.054$) and in patients with high disease activity compared to those with low activity (FC = -1.78, $p = 0.030$), indicating an influence of this gene on the RA development and severity. Regarding the analysis of miRNAs, miR194-5p and miR-9-5p were more expressed in patients treated with prednisone, indicating an effect of the treatment strategy on the modulation of these miRNAs (FC = -2.31; $p = 0.031$; FC = -3.05; $p = 0.031$, respectively). We also observed an overexpression of the *TRAF6* and *NFkB1* genes concomitant with the overexpression of miR-194-5p, miR-9-5p and mi-340-5p ($p < 0.001$). Finally, we observed a moderate correlation between miR-124-3p and IL-6 ($r = 0.46$; $p = 0.033$). In summary, it was possible to observe a relationship between the expression of the *IRAK3* gene with RA and an effect of prednisone on the expression of miR-194-5p and miR-9-5p. Furthermore, miRNAs appear to have a regulatory role in the *TRAF6* and *NFkB1* genes.

Keywords: IRAK3, MYD88, TRAF6, NFkB1, miRNAs, monocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1 -** Manifestações clínicas da Artrite Reumatoide. a) inchaço nas articulações metacarpofalângicas e interfalângicas proximais; b) diversas deformidades incluindo subluxação das articulações metacarpofalângicas, deformidade de pescoço de cisne em muitos dedos; c) deformidades nas articulações do tornozelo e do pé; d) articulação normal; e) erosão óssea e estreitamento do espaço articular; f) deformidades do tipo *pencil-in-cup*; g) destruição do raio distal e ulna distal; h) presença de nódulos reumatoides. Imagem de SMOLEN et al. (2018)22
- Figura 2 -** Articulações avaliadas nos índices de atividade DAS28 (do inglês, Disease Activity Score 28 joints) e CDAI (do inglês, Clinical Disease Activity Index) de pacientes com artrite reumatoide. Imagem disponível na calculadora online da plataforma Rheumakit (<<https://www.rheumakit.com/en/calculators/das28>>).26
- Figura 3 -** Moléculas envolvidas na patogênese da Artrite Reumatoide e as drogas modificadoras da doença (DMARDs). Os medicamentos utilizados estão discriminados dentro de caixas de texto e indicam as moléculas onde se ligam e bloqueiam. Inibidores de TNF e inibidores de IL-6R atuam se ligando e bloqueando citocinas plasmáticas; Inibidores de C80, CD86 atuam em macrófagos e impedem a apresentação de antígenos para linfócitos T; Drogas anti-CD20 atuam bloqueando células B e impedindo a produção de autoanticorpos; Inibidores de Jak atuam inibindo a sinalização pela via Janus Kinase principalmente em células residentes da sinovia. Imagem adaptada de Smolen et al. (2018).28
- Figura 4 -** Linha do tempo indicando os genes que predisõem à susceptibilidade da AR identificados em estudos de GWAS (do inglês, genome-wide association studies) em populações de ascendência europeia e asiática. Imagem adaptada de Yamamoto et al. (2015).30
- Figura 5 -** Desenvolvimento e progressão da Artrite Reumatoide. Imagem adaptada de Smolen et al. (2018)..32

- Figura 6 -** Via de sinalização induzida por TLRs (do inglês, *Toll-like receptors*) que levam a ativação do complexo Myddossoma, composto por MyD88 (do inglês, *Myeloid differentiation primary response 88*) e as proteínas IRAK (do inglês, *interleukin-1 receptor-associated kinases*): IRAK1, IRAK2, e IRAK4. Os TLRs ativado leva ao recrutamento do MyD88 e IRAK1, IRAK2 e IRAK4, que recrutam o TRAF6 (do inglês, *E3 ubiquitin ligase tumor necrosis factor TNFR-associated factor 6*) e ativam fatores de transcrição como MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*) e NFκB (do inglês, *nuclear factor kappa B*) e posterior produção de citocinas pro-inflamatórias e interferons. Imagem adaptada de (Aluri et al. 2021)36
- Figura 7 -** Via de sinalização dos TLRs (*Toll-like receptors*) que quando estimulados interagem com a proteína MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) e forma o complexo Myddossoma, composto por Myd88 e IRAK4. O complexo Myddossoma recruta o IRAK1 e IRAK2 e resultam na fosforilação de IRAKs. Os IRAKs fosforilados interagem com o TRAF6, induz a ativação do TAK-1 e TAB2/3 e resulta na ativação de IκB e MAPK, que promovem a translocação do do NFκB (p65 e p50) e AP-1 para o núcleo. Essa cascata de sinalização promove a produção de citocinas proinflamatórias. Imagem adaptada de Zheng et al. (2020)38
- Figura 8 -** A ativação do TLR por PAMPs induz o recrutamento de proteínas IRAKs e da molécula adaptadora MyD88, formando o complexo Myddossoma. A ligação entre estas moléculas promove a fosforilação das proteínas IRAKs, sua consequente mudança conformacional e dissociação do complexo Myddossoma para seguir adiante na cascata de sinalização. Na presença de IRAK-3 (IRAK-M) a fosforilação das proteínas IRAK é inibida e, como não há mudança conformacional, ocorre a não dissociação do complexo e uma inibição da cascata downstream (Imagem adaptada de Kobayashi et al. (2002).41
- Figura 9 -** Vias de ativação do TRAF6 e proteínas que interagem levando a indução da expressão de genes associados a inflamação. O TRAF6 liga-se diretamente aos receptores IL-17R, TGFβRI, enquanto ligase através de outras proteínas adaptadoras nos receptores TCR, RANK e alguns TLRs. O TRAF6 é capaz de mediar a sinalização das moléculas ativando fatores de transcrição como

NFκB, AP-1 e MAPK, levando ao aumento na expressão de genes associados a inflamação. Imagem adaptada de Walsh et al. (2015).45

Figura 10 - Via canônica e não canônica de ativação do NFκB. A via canônica é desencadeada por TLRs e receptores de citocinas que levam a ativação do RelA/p50 e se deslocam para o núcleo. Já a via não canônica é ativada por citocinas da família TNF (mas não o TNF) e resulta na ativação do heterodímero p52/RelB que se deslocam para o núcleo. As IKKs regulam a ativação das moléculas através da fosforilação (P) e ubiquitinação (Ub) que mediam a degradação das proteínas pelo proteassoma. Imagem adaptada de Lawrence (2009).48

Figura 11 - Via de ativação do NFκB e atuação das subunidades p50/RelA no núcleo celular. A via canônica tem ativação das subunidades de IKK (NEMO, IKKα e IKKβ) que atuam induzindo a degradação de inibidores IκBs e tornam ativas as subunidades p50/RelA. A via atípica, por sua vez, parte da ativação de Tyr kinase ou Ck2 que induzem a degradação de inibidores IκBs e tornam ativas as subunidades p50/RelA. Ambas as vias geram a ativação da p50/RelA que podem se unir a co-ativadores (gerando ativação transcrricional), co-repressores (gerando repressão transcrricional) ou fatores de transcrição *Zn-Finger* que promove uma seletividade de alvos. Imagem adaptada de Perkins (2007).50

Figura 12 - Via canônica e não canônica de biogênese de miRNAs. A via canônica ocorre a transcrição do miRNA a partir do seu gene que gera um pri-miRNA com posterior processamento pelo complexo Drosha-DGCR8 e formação do pre-miRNA. Na via não canônica ocorre a síntese de um mRNA que libera regiões intrônicas através do processo do spliceossomo e são formados os pré-miRNAs. Os pré-miRNAs vão para o citoplasma através da exportin 5 e podem ser degradados de imediato se sofrerem ubiquitinação ou podem ser processados e ativos pelo complexo Dicer-TRBP-AGO. O TRBP é recrutado mediante a fosforilação por ERK1/2 e a AGO2 é recrutada mediante MAPK e C-P4H. O processamento do miRNA dupla-fita que terá uma das fitas degradadas tornando-se fita única ocorre dentro do Corpo de Processamento, bem como sua ligação no mRNA alvo. Imagem adaptada de Li and Rana (2014).55

Figura 13 - Figura 13 Mecanismos de silenciamento gênico pós-transcricional mediado por miRNAs onde pode ocorrer a degradação do mRNA ou armazenamento do mesmo através de impedimento traducional. A) A inibição do início da tradução ocorre devido ao impedimento na montagem das subunidades de ribossomos; B) O silenciamento gênico ocorre devido a indução da desmontagem do ribossomo; C) O silenciamento ocorre devido a desestabilização do mRNA e indução da sua degradação. Imagem adaptada de Ha and Kim (2014).57

CAPÍTULO 2 – MIRNAS AND *NFKB1* AND *TRAF6* TARGET GENES: THE INITIAL FUNCTIONAL STUDY IN CD14+ MONOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Figure 1 - Relative expression levels of *TRAF6* and *NFKB1* and miRNAs in monocytes of RA patients and healthy controls. Statistical difference was tested with the non-parametric Mann-Whitney test. Data are presented as mean (central line) and standard deviation (top and bottom of the line)80

Figure 2 - Scatter plot demonstrating correlations of mRNAs and miRNAs gene expression (fold change) in monocytes from RA patients and controls using Spearman's correlation analyses. **a** - Correlation between *TRAF6* and *NFKB1* gene expression; **b** – Correlation between *TRAF6* gene expression and miR-194-5p expression; **c** – Correlation between *TRAF6* gene expression and miR-9-5p expression; **d** – Correlation between *NFKB1* gene expression and miR-194-5p expression; **e** – Correlation between *NFKB1* gene expression and miR-9-5p expression; **f** – Correlation between *NFKB1* gene expression and miR-340-5p expression.....81

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Critérios de diagnóstico da Artrite Reumatoide elaborado pelo ACR (American College of Rheumatology) (Arnett et al. 1988).....	24
Tabela 2 - Critérios de diagnóstico da Artrite Reumatoide elaborado pelo EULAR (European League Against Rheumatism) (Aletaha et al. 2010).....	24

CAPÍTULO 2 – MIRNAS AND *NFKB1* AND *TRAF6* TARGET GENES: THE INITIAL FUNCTIONAL STUDY IN CD14+ MONOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Table 1 - Demographic data and clinical parameters features of patients with rheumatoid arthritis and healthy controls.....	82
Table 2 - Correlation between <i>TRAF6</i> , <i>NFKB1</i> and miRNAs expression in CD14+ monocytes and clinical characteristics of RA patients.....	83
Table 3 - Normalized quantitative expression of <i>TRAF6</i> and <i>NFKB1</i> genes and miRNAs expression in CD14+ monocytes from RA patients in different treatment strategies.....	84
Table 4 - Correlation between <i>TRAF6</i> , <i>NFKB1</i> and miRNAs expression in CD14+ monocytes and TNF- α , IL-6, IL-2 and IL-10 plasma cytokines levels from RA patients and healthy controls.....	85
Table 5 - Supplementary material: Table summarizing results of the main published studies on expression of <i>TRAF6</i> and <i>NFKB1</i> genes and miR-194-5p, miR-124-3p, miR-9-5p and miR-340-5p its implication for Rheumatoid arthritis.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
5mC	5-metil-citosina
ACR	<i>American College of Rheumatology</i>
AGO2	<i>Argonaute 2</i>
APCs	<i>Antigen-presenting cell</i>
AR	Artrite Reumatoide
AVEs	Acidente vascular encefálico
BAFFR	<i>B cell-activating factor receptor</i>
bDMARD	drogas modificadoras da doença biológicas
BER	<i>Base excision repair</i>
CCP	<i>Cyclic citrullinated peptides</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDAI	<i>Clinical Disease Activity Index</i>
CGI	<i>CpG Island</i>
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
csDMARD	Drogas modificadoras da doença sintéticas convencionais
DAS28	<i>Disease Activity Score 28 joints</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region 8</i>
DNMT	DNAs metiltransferase
EBV	Epistein-barr Virus
EFCAB4B	<i>EF-hand calcium binding domain 4B</i>
EULAR	<i>European League Against Rheumatism</i>
EXOSC1	<i>Exosome Component 1</i>
FR	Fator reumatoide
FLS	<i>Fibroblast-like synoviocytes</i>
FXR1	<i>Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1</i>
GWAS	<i>Genome-Wide Association Study</i>
HCV	Hepatitis C
HDAC	Histona deacetylase
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HTLV	<i>human T-lymphotropic virus</i>

I κ B	<i>inhibitor of kappa B</i>
IKK	complexo de subunidades de I κ B kinases
IL	Interleucina
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
Jak	Janus kinase
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LT β R	<i>lymphotoxin-β receptor</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MeCP	<i>methyl-CpG binding protein</i>
Myd88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
miRISC	<i>miRNA-induced silencing complex</i>
miRNA	micro-RNAs
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i>
MTX	Metotrexato
NEMO	NF-kappa-B essential modulator, também chamado de IKK- γ
NF κ B	<i>Fator Nuclear Kappa B</i>
NF κ B1	subunidade do NF κ B aliases: p105 e p50
NF κ B2	subunidade do NF κ B, aliases: p100 e p52
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
P	fosforilação (modificação pós-traducional)
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PCR	Proteína C reativa
Pré-miRNA	miRNA precursor
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
Pri-miRNA	miRNA primário
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
PTPN22	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RelA	subunidade do NF κ B, alias: p65
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SMD	<i>Standardized mean difference</i>

STAT4	<i>Signal transducer and activator of transcription 4</i>
TAB	<i>TAK1-associated binding protein</i>
TET	<i>ten eleven translocation</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TNFAIP3	<i>TNF Alpha Induced Protein 3</i>
<i>TNFα</i>	<i>Fator de Necrose Tumoral α</i>
TRAF1-C5	<i>tumor necrosis factor-receptor associated factor 1/complement component 5</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TRBP	<i>TAR RNA-binding protein</i>
tsDMARD	drogas modificadoras de doença alvo específicas
TSS	<i>transcriptional start site</i>
Ub	ubiquitinação (modificação pós-traducional)
Ubc13	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13</i>
Uev1a	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1</i>
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1	ARTRITE REUMATOIDE.....	22
2.1.1	Diagnóstico	23
2.1.2	Tratamento.....	26
2.1.3	Fatores de risco associados a AR.....	28
2.1.4	Patogênese da AR	31
2.2	O SISTEMA IMUNE NA ARTRITE REUMATOIDE.....	33
2.3	O COMPLEXO MYDDOSSOMA	35
2.3.1	MyD88.....	37
2.3.1.1	Mecanismo de Ação	37
2.3.1.2	Gene MYD88	38
2.3.1.3	MYD88 na Artrite Reumatoide	39
2.3.2	IRAK3.....	40
2.3.2.1	Mecanismo de Ação	40
2.3.2.2	Gene IRAK3	42
2.3.2.3	IRAK3 na Artrite Reumatoide.....	42
2.4	A VIA DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NFKB)	43
2.4.1	TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6).....	44
2.4.1.1	Mecanismos de Ação.....	44
2.4.1.2	Gene TRAF6.....	45
2.4.1.3	TRAF6 na Artrite Reumatoide	46
2.4.2	NFκB1	47
2.4.2.1	Mecanismos de Ação.....	49
2.4.2.2	Gene NFKB1	51
2.4.2.3	NFKB1 na Artrite Reumatoide.....	51
2.5	EPIGENÉTICA	52
2.5.1	Micro-RNAs	53
2.5.1.1	Biogênese e Mecanismos de ação	54
2.5.1.2	miRNAs na Artrite Reumatoide	58
3	OBJETIVOS	60

3.1	OBJETIVO GERAL	60
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	60
4	RESULTADOS	61
4.1	ARTIGO 1 : MYD88, IRAK3 AND RHEUMATOID ARTHRITIS PATHOGENESIS: ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN CD14+ MONOCYTES AND THE INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS	61
4.2	ARTIGO 2: MIRNAS AND NFKB1 AND TRAF6 TARGET GENES: THE INITIAL FUNCTIONAL STUDY IN CD14+ MONOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS	62
5	DISCUSSÃO GERAL	93
6	CONCLUSÕES	96
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
	APÊNDICE A - MYD88, IRAK3 AND RHEUMATOID ARTHRITIS PATHOGENESIS: ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN CD14+ MONOCYTES AND THE INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS	118
	APÊNDICE B - ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	125
	APÊNDICE C - CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO.....	133
	ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS	139
	ANEXO B - CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO	144

1 INTRODUÇÃO

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença complexa e progressiva, caracterizada pela inflamação de tecidos sinoviais e desregulação de diversas citocinas e outras moléculas relacionadas ao processo inflamatório. Modificações epigenéticas podem atuar sobre o controle da expressão desses genes e, portanto, também podem estar relacionadas ao processo inflamatório. O conhecimento do perfil de expressão de genes e modificações epigenéticas de doenças complexas pode ter implicações diretas na prática clínica, uma vez que alterações nesses perfis podem ser utilizadas como biomarcadores de diagnóstico, prognóstico, gravidade da doença e resposta terapêutica.

As alterações na expressão de genes e modificações epigenéticas são célula-específicas, no entanto, ainda são incipientes os estudos que avaliem os genes diferencialmente expressos e o perfil epigenético em tipos celulares específicos do sistema imune, como os monócitos, que podem influenciar significativamente a inflamação e dano tecidual na AR. Muitos mediadores inflamatórios são expressos por monócitos, responsáveis pela defesa primária dos organismos e que representam aproximadamente 10-20% dos leucócitos do sangue periférico. Os monócitos desempenham funções regulatórias e efectoras no processo inflamatório da AR respondendo a diversos mediadores que estão altamente expressos no soro e fluido sinovial dos pacientes, sendo comumente ligados ao dano tecidual da AR.

O Myd88 (do inglês, *Myeloid differentiation primary response 88*) é uma molécula adaptadora relacionada a receptores Toll-like (TLRs) expressa em monócitos e capaz de induzir vias de transdução de sinal, com indução de proteínas como TRAF6 (do inglês, *TNF receptor-associated factor 6*) e o fator de transcrição NFκB (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*) que, por sua vez, aumentam a inflamação, podendo levar a injúria tecidual. Além disto, uma molécula da família IRAK (do inglês, *Interleukin-1 receptor associated kinase*), a IRAK3, produzida principalmente em monócitos, é capaz de promover uma quebra da interação do Myd88 com os fatores *downstream* e pode ter um efeito inibitório no processo inflamatório.

As moléculas MyD88, IRAK3, TRAF6 e NFκB fazem parte de importantes cascatas inflamatórias e foram encontrados em altos títulos na membrana sinovial e sangue periférico de pacientes com AR, no entanto ainda são incipientes os estudos que avaliam o mecanismo dessa desregulação. Desregulação na expressão dessas moléculas podem ser decorrentes de alterações epigenéticas nos genes que as produzem e na sua modulação pós-transcricional. Dessa forma, nossa hipótese é a expressão de micro-RNAs (miRNAs) podem modular a expressão destes genes em monócitos e influenciar a inflamação, além do desenvolvimento e patogênese da

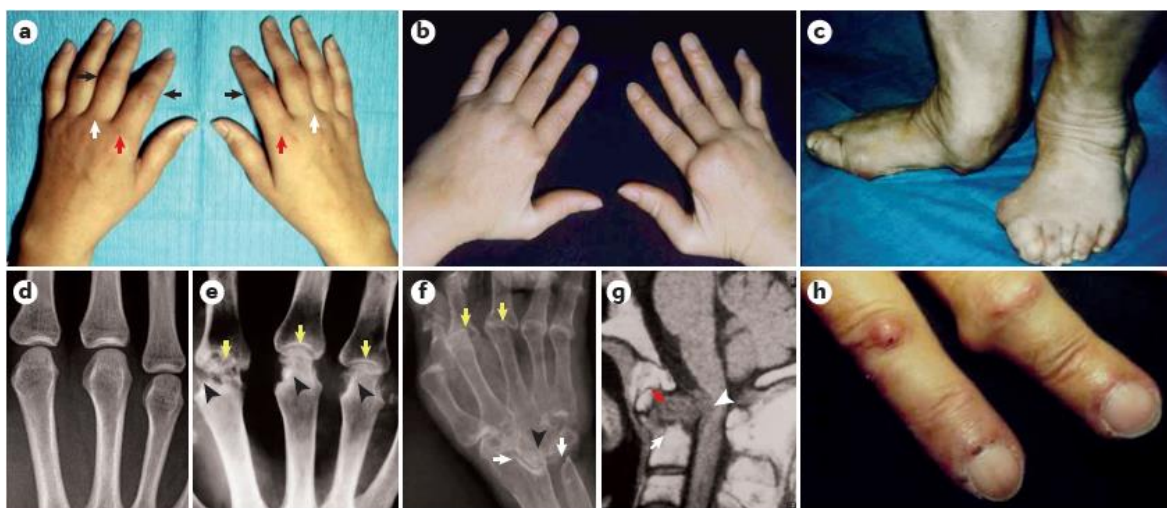
doença. Diante do exposto, o presente estudo avaliou alterações no padrão de expressão dos genes *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* e *NFkB1*, bem como dos miRNAs interferentes nesses genes em pacientes com AR e sua relação com o desenvolvimento e patogênese da doença, além de avaliar a influência desses genes e miRNAs sobre os níveis plasmáticos de citocinas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARTRITE REUMATOIDE

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune, crônica e progressiva caracterizada pela presença de sinovite poliarticular que causa dor, inchaço, rigidez e deformidades nas articulações. As principais características da AR são as inflamações erosivas e simétricas nas articulações (SMOLEN, J. S. *et al.*, 2010; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018) (Figura 1).

Figura 1. Manifestações clínicas da Artrite Reumatoide. a) inchaço nas articulações metacarpofalângicas e interfalângicas proximais; b) diversas deformidades incluindo subluxação das articulações metacarpofalângicas, deformidade de pescoço de cisne em muitos dedos; c) deformidades nas articulações do tornozelo e do pé; d) articulação normal; e) erosão óssea e estreitamento do espaço articular; f) deformidades do tipo *pencil-in-cup*; g) destruição do raio distal e ulna distal; h) presença de nódulos reumatoides.



Fonte: SMOLEN *et al.* (2018)

A AR afeta cerca de 0,5 a 1% da população mundial (TOBÓN; YOUINOU; SARAUX, 2010) e nos Estados Unidos, no ano de 2014, foi estimado que existiam 1,28-1,36 milhões de adultos com a doença (HUNTER *et al.*, 2017). No Brasil, no entanto, a prevalência pode variar de 0,2 a 1%, dependendo da região demográfica (GOELDNER *et al.*, 2011; MARQUES NETO *et al.*, 1993). A prevalência da AR é maior em mulheres com uma taxa média de 3 mulheres afetadas para cada homem afetado (DA ROCHA CASTELAR-PINHEIRO *et al.*, 2018; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018).

No Brasil, um estudo multicêntrico desenvolvido mostrou que o tempo entre o surgimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico da AR varia de 1 a 457 meses (DA ROCHA CASTELAR-PINHEIRO *et al.*, 2018) e o que pode impactar significativamente a qualidade de

vida dos pacientes com a doença, uma vez que os dois primeiros anos são cruciais para impedir o dano articular permanente (SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018).

Estudos estimam que 40-50% dos pacientes com AR desenvolvem limitações que os impede de trabalhar e realizar tarefas cotidianas básicas, causando prejuízos individuais, sociais e econômicos (DE AZEVEDO; FERRAZ; CICONELLI, 2008; GOELDNER *et al.*, 2011). A etiologia da AR não é claramente definida, mas estudos apontam para diversos fatores de risco, como predisposição genética, alterações epigenéticas e influências ambientais (BALLESTAR, 2011; MACGREGOR *et al.*, 2000). A investigação de fatores associados à etiologia e patogênese da doença pode contribuir com terapias mais eficazes, formas mais rápidas de diagnóstico e acompanhamento da progressão da doença, promovendo assim uma melhora da qualidade e expectativa de vida do indivíduo portador da AR (DIOGO; OKADA; PLENGE, 2014; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018).

2.1.1 Diagnóstico

Os critérios de classificação mais comumente utilizados para o diagnóstico da AR são o ACR (*American College of Rheumatology*) (ARNETT *et al.*, 1988) e o EULAR (*European League Against Rheumatism*) (ALETAHA, Daniel *et al.*, 2010). Eles consistem em uma lista com diversos itens que incluem manifestações clínicas associadas à análises bioquímicas, como a detecção de autoanticorpos e proteínas de inflamação de fase aguda (SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018).

Os critérios elaborados pelo ACR levam em conta com sinais e sintomas que podem estar ausentes no início da doença, por isso, a partir de 2010 estão sendo utilizados conjuntamente com os critérios elaborados pelo EULAR, que levam em consideração uma sintomatologia em sua fase inicial e de curta duração, o que possibilitou um diagnóstico mais preciso da doença (ALETAHA, Daniel *et al.*, 2010).

Os critérios do ACR e EULAR estão descritos nas Tabela 1 e 2. Ainda hoje, existe uma busca na eficiência do diagnóstico da AR, principalmente porque as características clínicas avaliadas são similares a outras doenças articulares e, na AR inicial não é frequente encontrar os marcadores séricos específicos, dificultando o diagnóstico (GOELDNER *et al.*, 2011; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018).

Tabela 1 Critérios de diagnóstico da Artrite Reumatoide elaborado pelo ACR (*American College of Rheumatology*)

Critérios para o diagnóstico de Artrite Reumatoide	
1	Rigidez Matinal - Rigidez nas articulações e no seu entorno durante, pelo menos, uma hora até uma melhora completa.
2	Inflamações articulares em três ou mais áreas - Inflamações recorrentes em, pelo menos, três áreas de articulação com edema nas partes moles ou derrame do líquido articular.
3	Inflamações articulares das mãos ou punhos
4	Inflamações articulares simétricas - Inflamação das mesmas articulações nos dois lados do corpo simultaneamente.
5	Nódulos reumatoides - Nódulos subcutâneos localizados sobre proeminências ósseas ou em regiões próximas das articulações.
6	Fator reumatoide (FR) sérico - Grupos de anticorpos característicos presente no sangue da maioria das pessoas com AR.
7	Alterações radiológicas - Evidências radiográficas de erosões ou descalcificações articulares das mãos e dos punhos.
Diagnóstico de Artrite Reumatoide: O indivíduo deve apresentar no mínimo 4 critérios pelo período mínimo de 6 semanas	

Fonte: ARNETT *et al.*, 1988

Tabela 2 Critérios de diagnóstico da Artrite Reumatoide elaborado pelo EULAR (*European League Against Rheumatism*)

Critérios para o diagnóstico de Artrite Reumatoide	
1	Articulações envolvidas 1 Grande articulação = 0 2-10 Grandes articulações = 1 1-3 Pequenas articulações = 3 >10 articulações (com pelo menos 1 pequena articulação) = 4
2	Sorologia FR e Anti-CCP negativo = 0 Baixa positividade de FR ou Anti-CCP = 2 Alta positividade de FR ou Anti-CCP = 3 PCR e VHS normais = 0 PCR ou VHS anormais = 1
3	Duração dos sintomas < 6 semanas = 0 ≥ 6 semanas = 1

Diagnóstico de Artrite Reumatoide: O indivíduo deve apresentar pontuação maior que 6.

FR: Fator reumatoide; Anti-CPP: Anti-Peptídeo cíclico citrulinado; VHS: Velocidade de Hemossedimentação

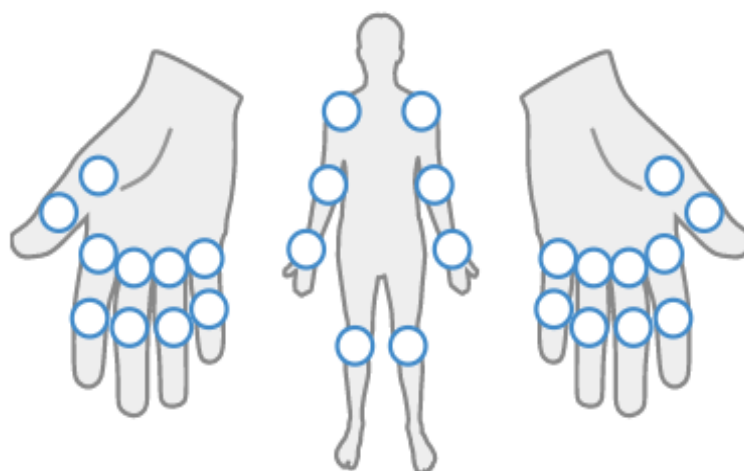
Fonte: ALETAHA *et al.*, 2010

Além do diagnóstico, é muito importante acompanhar a atividade e gravidade da doença, uma vez que a partir disto, é possível adequar terapias e intervenções que melhorem a qualidade de vida do paciente (CHUROV; OLEINIK; KNIP, 2015; CIECHOMSKA; ROSZKOWSKI; MASLINSKI, 2019; SMOLEN, Josef S *et al.*, 2017). Os índices utilizados para avaliar a atividade da doença, mensuram dados como a contagem de articulações (inchadas e dolorosas), níveis séricos de proteínas de fase aguda como PCR (Proteína C reativa) e VHS (Velocidade de Hemossedimentação), e consideram a avaliação global do paciente quanto a seu estado de saúde e avaliação do reumatologista (ALETAHA, D.; SMOLEN, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2015).

Um dos primeiros índices de atividade ainda hoje avaliado é o DAS28 (do inglês, *Disease Activity Score 28 joints*) (PREVOO *et al.*, 1995) que utiliza uma fórmula incluindo raiz quadrada de logaritmo neperiano (MEDEIROS *et al.*, 2015). Felizmente algumas plataformas online realizam o cálculo sem maiores dificuldades como disponibilizado na plataforma Rheumakit “<<https://www.rheumakit.com/en/calculators/das28>>”, que considera 28 articulações dolorosas e edemaciadas, bem como o VHS e avaliação global do paciente, e estratifica os pacientes com atividade da AR em remissão (<2.6), baixa (≥ 2.6 e <3.2), moderada (≥ 3.2 and ≤ 5.1) e alta (>5.1) (PREVOO *et al.*, 1995).

Um outro índice bastante utilizado é o CDAI (do inglês, *Clinical Disease Activity Index*) (ALETAHA, D.; SMOLEN, 2005) onde é feita uma avaliação clínica das mesmas 28 articulações avaliadas no índice DAS28, porém sem os critérios bioquímicos (PCR e VHS) associados. Neste índice é realizada uma contagem direta das articulações, não necessitando de softwares específicos para o cálculo, que podem ser complicados de administrar na prática clínica (SMOLEN *et al.*, 1995). No CDAI, a atividade da doença também é estratificada em remissão (0 a < 2.8), baixa (≥ 2.8 e ≤ 10), moderada (>10 a ≤ 22) e alta (>22). Na figura 2 estão descritas as articulações avaliadas nos pacientes com AR nos índices DAS28 e CDAI.

Figura 2 Articulações avaliadas nos índices de atividade DAS28 (do inglês, *Disease Activity Score 28 joints*) e CDAI (do inglês, *Clinical Disease Activity Index*) de pacientes com artrite reumatoide.



Fonte: Plataforma Rheumakit (<<https://www.rheumakit.com/en/calculators/das28>>).

2.1.2 Tratamento

O tratamento da AR é baseado principalmente em diretrizes do EULAR (SMOLEN, J. S. *et al.*, 2010; SMOLEN, Josef S *et al.*, 2017) e, recentemente a Sociedade Brasileira de Reumatologia também divulgou suas recomendações que são focadas principalmente no gerenciamento da terapia de pacientes brasileiros, o que tem se destacado no cenário mundial (MOTA *et al.*, 2018). Ambas as instituições recomendam que o tratamento da AR deve ser multidisciplinar, isto é, considerando medidas farmacológicas e não farmacológicas, acompanhamento de hábito de vida e outros fatores (MOTA *et al.*, 2018; SMOLEN, J. S. *et al.*, 2010). Entre as medidas não farmacológicas, a fisioterapia e o tratamento cirúrgico podem minimizar os danos causados pela doença (GOELDNER *et al.*, 2011).

Em relação as medidas farmacológicas adotadas, é importante enfatizar que o objetivo é manter o indivíduo em uma remissão clínica sustentada ou com baixos níveis da atividade da doença, mensurados por índices de atividade como DAS28 e CDAI (MOTA *et al.*, 2018; SMOLEN, J. S. *et al.*, 2010; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018). Existem três principais classes de drogas utilizadas no tratamento da doença, entre elas, drogas modificadoras da doença sintéticas convencionais (csDMARD), drogas modificadoras da doença biológicas (bDMARD) e drogas modificadoras de doença alvo específicas (tsDMARD) (MOTA *et al.*, 2018).

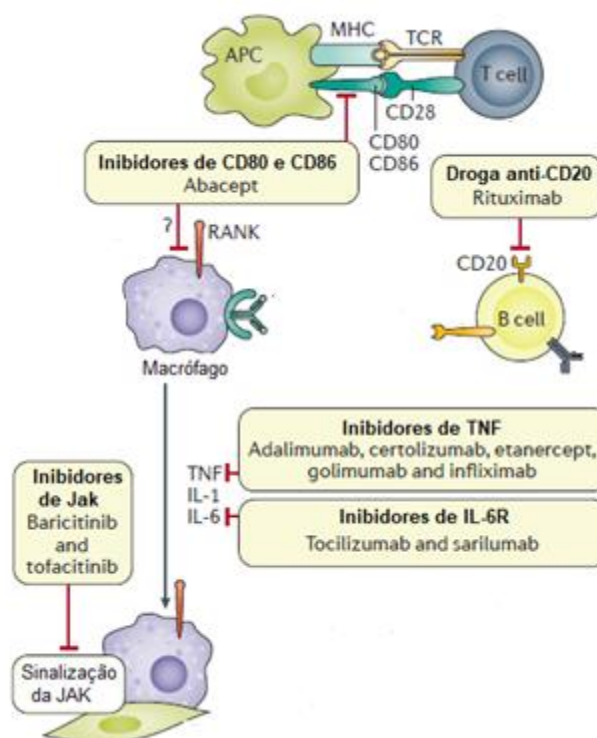
As csDMARDs são pequenas drogas químicas que normalmente tem seu modo de ação pouco conhecido, mas efetivamente diminuem a inflamação (SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018). Entre os csDMARDs, destacam-se o metotrexato (MTX), que inclusive faz parte da primeira estratégia de tratamento pacientes com AR ativa (MOTA *et al.*, 2018; SMOLEN, J. S. *et al.*, 2010), além da leflunomida, sulfassalazina e medicamentos antimaláricos (hidroxicloroquina e cloroquina) (MOTA *et al.*, 2018).

Os bDMARDs normalmente são anticorpos monoclonais que atuam com um alvo biológico específico comumente solúvel no meio extracelular ou associado a membrana celular (SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018). Entre os principais bDMARDs estão inibidores de TNF (adalimumab, certolizumab, etanercept, golimumab, infliximab), moduladores de linfócitos T (abatacept), anti-CD20 (rituximab) e bloqueadores do receptor de IL-6 (tocilizumab) (MOTA *et al.*, 2018). Os bDMARDs têm como alvo as principais citocinas expressas na AR, porém cada droga utilizada pode bloquear apenas uma das citocinas presentes no soro do paciente ou seu receptor, assim, outras citocinas redundantes podem atuar mantendo um grau de inflamação.

A mais recente classe de drogas são os tsDMARDs, que têm como alvo moléculas Janus kinase (Jak), uma importante molécula de sinalização intracelular envolvida na transcrição de diversas proteínas, incluindo muitas citocinas inflamatórias (HODGE *et al.*, 2016). Os tsDMARDs normalmente são usados quando os csDMARDs e bDMARDs falham no controle da doença (SMOLEN, Josef S *et al.*, 2017; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018).

É importante notar também que os DMARDs são associados a corticoides como, prednisona, e podem ser administrados em combinação para uma melhor eficiência do tratamento no paciente (MOTA *et al.*, 2018; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018). Um resumo dos principais modos de ação dos DMARDs está descrito na Figura 3.

Figura 3 Moléculas envolvidas na patogênese da Artrite Reumatoide e as drogas modificadoras da doença (DMARDs). Os medicamentos utilizados estão descritos dentro de caixas de texto e indicam as moléculas onde se ligam e bloqueiam. Inibidores de TNF e inibidores de IL-6R atuam se ligando e bloqueando citocinas plasmáticas; Inibidores de C80, CD86 atuam em macrófagos e impedem a apresentação de antígenos para linfócitos T; Drogas anti-CD20 atuam bloqueando células B e impedindo a produção de autoanticorpos; Inibidores de Jak atuam inibindo a sinalização pela via Janus Kinase principalmente em células residentes da sinovia.



Fonte: Imagem adaptada de Smolen *et al.* (2018).

Devido à gravidade da sintomatologia da AR, o diagnóstico precoce e tratamento eficaz são extremamente importantes para o controle da atividade da doença e dos seus sintomas (ALETAHA, Daniel *et al.*, 2010). Estudos têm sido realizados a fim de compreender inclusive o perfil genético e epigenético dos pacientes que podem impactar a resposta ao tratamento (DOODY; BOTTINI; FIRESTEIN, 2017; FRANK-BERTONCELJ; KLEIN; GAY, 2017; GUO; LI, 2016; TRENKMANN *et al.*, 2010; ZHU, Xiaowei *et al.*, 2019).

2.1.3 Fatores de risco associados a AR

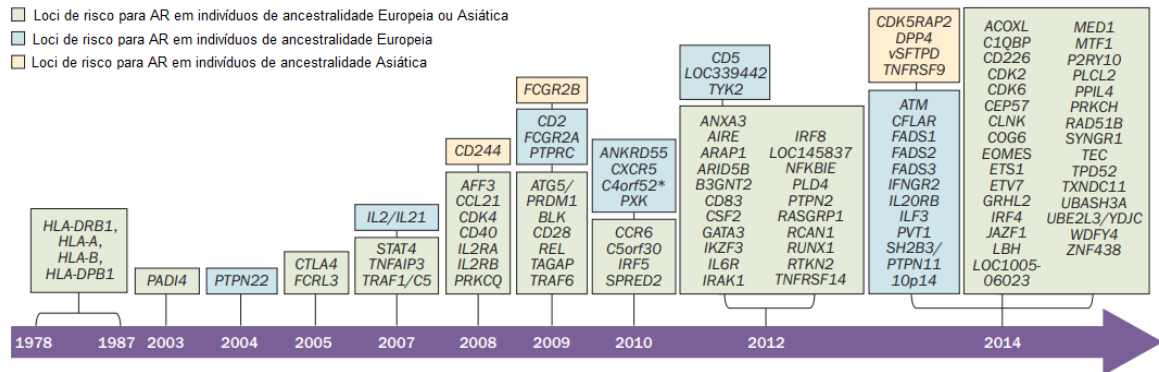
A AR é uma doença multifatorial, sendo assim, diversos gatilhos são responsáveis pelo desencadeamento da doença (SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018). Um dos principais fatores

associados a AR é a predisposição genética. Estudos de herdabilidade, que estimam a contribuição dos componentes genéticos para o desfecho de AR, indicam uma contribuição genética em torno de 60%, embora gêmeos monozigóticos apresentem uma taxa de 12-15%, indicando que outros fatores não codificantes também estão relacionados ao seu desenvolvimento (MACGREGOR *et al.*, 2000; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018; VAN DER WOUDE *et al.*, 2009).

O primeiro componente genético influente na AR descoberto há aproximadamente quatro décadas foi o HLA (do inglês, *Human leukocyte antigen*). O HLA refere-se a moléculas envolvidas no reconhecimento de antígenos e é subdividida em classe Ia, contendo os genes que codificam antígenos “clássicos” do HLA (*HLA-A*, *B* e *C*), já a classe Ib codifica principalmente os genes do *HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G* (GRUEN; WEISSMAN, 1997; SHIINA; INOKO; KULSKI, 2004). A região de classe II compreende os genes *HLA-DR*, *DQ* e *DP*. O *HLA-DRB1* é um gene que possui diferentes alelos associados a AR e estima-se que ele seja responsável por aproximadamente 30-50% do risco genético para o desenvolvimento da doença (GREGERSEN; SILVER; WINCHESTER, 1987; OKADA *et al.*, 2019). Com o avanço das técnicas de sequenciamento e mapeamento genômico, foi possível identificar muito mais genes associados ao desenvolvimento da doença durante as últimas décadas como, por exemplo, o *PTPN22* (do inglês, *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*), o *TNFAIP3* (do inglês, *TNF Alpha Induced Protein 3*), o *TRAF1-C5* (do inglês, *tumor necrosis factor-receptor associated factor 1/complement component 5*), o *STAT4* (do inglês, *Signal transducer and activator of transcription 4*), o *IRAK1* (do inglês, *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) e muitos outros, sendo atualmente identificados mais de 50 genes associados à AR (HA, Eunji; BAE; KIM, 2020; OKADA *et al.*, 2019; STAHL *et al.*, 2012; YAMAMOTO, Kazuhiko *et al.*, 2015).

Considerando os fatores étnicos, é possível verificar que diferentes etnias, como a europeia e asiática, por exemplo, possuem algumas diferenças em componentes genéticos relacionados a AR, embora a maior parte dos estudos GWAS (do inglês, *Genome-Wide Association Study*) relacionem os mesmos genes independente da etnia dos pacientes do estudo (HA, Eunji; BAE; KIM, 2020; ONUORA, 2021; YAMAMOTO, Kazuhiko *et al.*, 2015). Um resumo histórico dos genes relacionados à susceptibilidade da AR foi feito por Yamamoto *et al.* (2015) e está descrito na figura 4.

Figura 4 Linha do tempo indicando os genes cujos alelos estão relacionados a predisposição à susceptibilidade da AR identificados em estudos de GWAS (do inglês, *genome-wide association studies*) em populações de ascendência europeia e asiática.



Fonte: Imagem adaptada de Yamamoto *et al.* (2015).

Em populações latino-americanas, no entanto, são escassos os estudos que avaliam os componentes genéticos relacionados a AR de maneira mais robusta, como análises de GWAS (CASTRO-SANTOS; DÍAZ-PEÑA, 2016). Grande parte do conhecimento sobre variantes genéticas relacionadas a doença nestas populações são provenientes de estudos de associação simples e metanálises (ANGELO *et al.*, 2015; CASTRO-SANTOS; DÍAZ-PEÑA, 2016; GOMES DA SILVA *et al.*, 2017, 2021).

Interessantemente, em estudos GWAS foi possível verificar que apenas 20% dos loci associados a AR são relacionados a variantes que codificam aminoácidos, enquanto que a maior parte dos loci associados são variantes localizadas em regiões regulatórias e que estão relacionados a alterações na expressão gênica (OKADA *et al.*, 2019; WU, Cuiyan *et al.*, 2021), sugerindo que a regulação dos genes é crucial para o desencadeamento da doença.

Além disso, outros fatores não relacionados as variações na sequência de DNA têm desempenhado um importante papel na AR. Estudos indicam que alterações epigenéticas podem modular o comportamento celular devido a interferências nos processos transcricionais e traducionais e estarem relacionados à doença (DOODY; BOTTINI; FIRESTEIN, 2017; FRANK-BERTONCELJ; KLEIN; GAY, 2017; ZHU, Xiaowei *et al.*, 2019).

Muitos estudos têm integrado os resultados de análises genéticas, principalmente GWAS, com alterações epigenéticas e expressão de genes em tecidos e células específicas (DIOGO; OKADA; PLENCE, 2014; GLOSSOP *et al.*, 2016; NAKANO; BOYLE; FIRESTEIN, 2013; WU, Cuiyan *et al.*, 2021). Dentre as alterações epigenéticas, a ação da expressão desregulada de muitos micro-RNAs (miRNAs), que são pequenos RNAs de

interferência, como miRNA-146a e miRNA-155 já foram correlacionados com a progressão da doença, marcadores de diagnóstico e de resposta ao tratamento (DE LA RICA *et al.*, 2013; NEMTSOVA *et al.*, 2019).

Ademais, fatores ambientais agregam-se aos fatores de risco para AR, dentre eles o tabagismo, infecções recorrentes, exposição à radiação UV e produtos xenobióticos (HUNT; EMERY, 2014). O tabagismo é o fator ambiental mais fortemente associado a AR, sendo um agente de predisposição e aumento da mortalidade nos pacientes (HUNT; EMERY, 2014). Os componentes do cigarro atuam acelerando reações de citrulinização (conversão de arginina para citrulina) em proteínas pulmonares e podem gerar CCps (do inglês, *cyclic citrullinated peptides*), um dos principais antígenos associados com a autoimunidade nestes pacientes e que está intimamente ligado a severidade da doença (DE HAIR *et al.*, 2013; HUNT; EMERY, 2014).

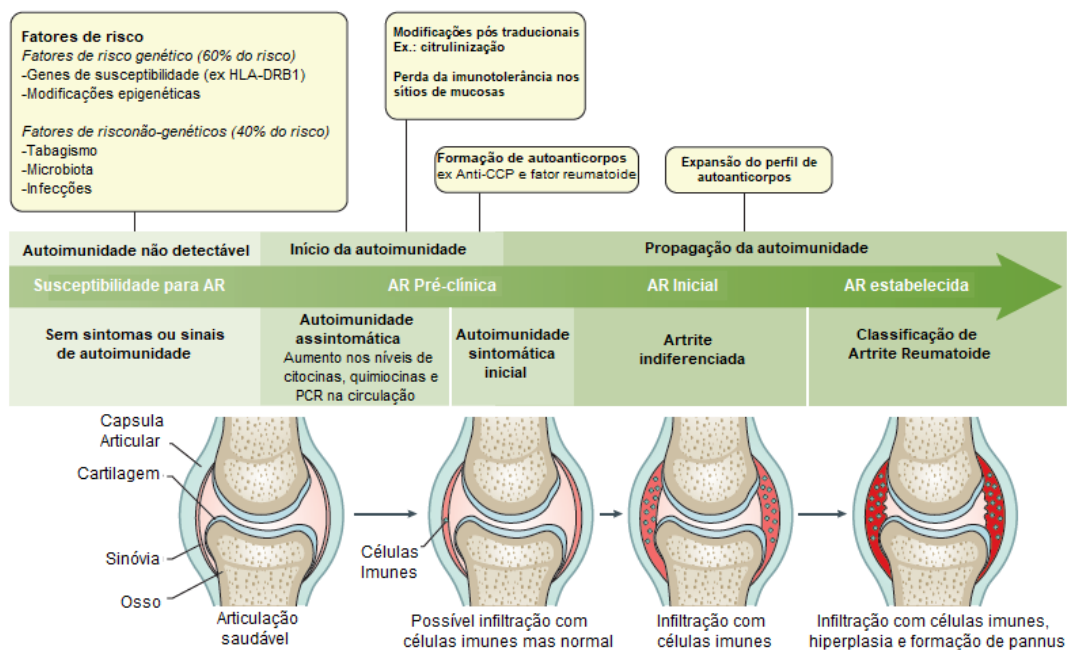
Por fim, as infecções também fazem parte dos fatores desencadeadores da AR, através de um mecanismo conhecido como mimetismo molecular onde agentes patogênicos possuem moléculas com alta homologia com proteínas humanas e desencadeiam a quebra da autotolerância e, conseqüentemente, a produção de autoanticorpos. Infecções por microorganismos virais, bacterianos e fúngicos podem ser considerados artrítogênicos, como o HTLV (do inglês, *human T-lymphotropic virus*), EBV (Epstein-barr virus), HCV (Hepatitis C virus), *Bacillus thuringiensis* e *Salmonella enterica* (ALAM; KIM; CHOI, 2014; BALANDRAUD; ROUDIER, 2018; EGUCHI *et al.*, 1996; IJICHI *et al.*, 1990; MASUKO-HONGO, 2003). Além disso, nos últimos anos, estudos avaliando a relação entre o vírus Chikungunya e o desenvolvimento de AR têm considerado o vírus com alto poder artrítogênico. Este vírus provocou uma epidemia em alguns países emergentes, como o Brasil, sendo responsável por diversos novos casos de AR (BOUQUILLARD; COMBE, 2009; HORCADA; DÍAZ-CALDERÓN; GARRIDO, 2015; RODRIGUEZ-MORALES; VILLAMIL-GÓMEZ; FRANCO-PAREDES, 2016).

2.1.4 Patogênese da AR

O desenvolvimento e progressão da AR está descrito na figura 5 (SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018). Independente dos gatilhos relacionados a doença, o seu desenvolvimento em termos

de aparecimento de autoanticorpos, modificações do tecido sinovial, dano tecidual e deformidades na articulação é bastante similar.

Figura 5 Desenvolvimento e progressão da Artrite Reumatoide.



Fonte: Imagem adaptada de Smolen *et al.* (2018).

O desencadeamento da doença se inicia a partir do reconhecimento de antígenos próprios e apresentação destes antígenos a linfócitos T por meio das células APCs (do inglês, *antigen-presenting cells*) como macrófagos, monócitos e células dendríticas. Os linfócitos T, por sua vez, irão estimular a resposta contra os antígenos, inclusive estimulando os linfócitos B a sintetizar autoanticorpos contra estes autoantígenos. Entre esses autoanticorpos estão o FR (Fator reumatoide) e Anti-CCPs (do inglês, *anti-cyclic citrullinated peptides*) (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018; STEINER, 2007).

A partir desta quebra de autotolerância, ocorre a infiltração de diversos tipos celulares do sistema imunológico como linfócitos, macrófagos, monócitos e células plasmáticas na sinóvia do indivíduo (SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018). Além disso, já foi verificado que há um aumento significativo na presença de MMPs (do inglês, *matrix metalloproteinases*) que são responsáveis por degradar os componentes da matriz celular na sinóvia, além de antígenos nucleares e outros autoantígenos articulares (STEINER, 2007). Posteriormente, ocorre a

formação do pannus invasivo, que é a hiperplasia e destruição da membrana sinovial, cartilagem e tecido ósseo (SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018) (Figura 5).

Além das células imunes presentes nesse processo inflamatório, as células residentes do tecido desempenham um papel importante na inflamação. A sinóvia saudável tem o papel de produzir lubrificação para as superfícies da cartilagem atuarem em um ambiente com pouco atrito e fornecer nutriente para a cartilagem, uma vez que este tecido não possui suprimento sanguíneo e possui basicamente dois tipos de células (sinoviócitos do tipo fibroblastos e sinoviócitos do tipo macrófagos) (SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018). Durante a formação do pannus há um aumento e ativação de ambos os sinoviócitos que levam a um aumento da inflamação local através da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL (Interleucina) -1, IL-6, TNF α (do inglês, *tumor necrosis factor α*) entre outras (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018).

Caso estes processos inflamatórios e destrutivos não sejam controlados por medidas farmacológicas e não farmacológicas, podem ocasionar erosões ósseas e deformidades que ao longo do decorrer da doença tornam a articulação disfuncional, podendo levar a incapacitação do paciente (GOELDNER *et al.*, 2011). Além disso, cerca de 30% dos indivíduos com AR apresentam manifestações extra-articulares decorrentes da inflamação como, por exemplo, nódulos reumatoides, nódulos pulmonares, esclerite, vasculites, pericardite, neuropatias e outras manifestações (SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010; YOUNG; KODURI, 2007). Doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, AVEs (Acidente vascular encefálico), doença vascular periférica e hipertensão, são comorbidades comuns na AR e aumentam a taxa de mortalidade entre os pacientes (GOELDNER *et al.*, 2011; LÉVY *et al.*, 2008; SCOTT; WOLFE; HUIZINGA, 2010).

2.2 O SISTEMA IMUNE NA ARTRITE REUMATOIDE

Como abordado previamente, o surgimento da AR ocorre principalmente devido à quebra da autotolerância do sistema imune que promove uma inflamação exacerbada da resposta celular e humoral e a infiltração de células do sistema imune como linfócitos, macrófagos, monócitos, neutrófilos e células plasmáticas no tecido sinovial do indivíduo (EPSTEIN; HARRIS, 1990; SMOLEN, Josef S. *et al.*, 2018). Sabe-se que diferentes células do sistema imune inato e adaptativo contribuem para a autoimunidade, no entanto poucos estudos

foram realizados com o objetivo de esclarecer a contribuição dos monócitos nesta doença (DIOGO; OKADA; PLENGE, 2014; GLOSSOP *et al.*, 2016; SMILJANOVIC *et al.*, 2018).

Análises de transcriptomas de monócitos de pacientes com AR verificaram significativas desregulações em moléculas relacionadas a sinalização da resposta inflamatória como TNF, CCR2, CXCR4 e ILR2 quando comparadas com pacientes com osteoartrite (SMILJANOVIC *et al.*, 2018). Estas células também são os principais precursores dos osteoclastos, células residentes no tecido sinovial intimamente relacionadas a inflamação e dano tecidual na doença (XUE *et al.*, 2020). Assim, é possível pressupor que desregulações em genes e vias inflamatórias expressas em monócitos podem ser relacionados ao desenvolvimento e patogênese da AR e devem ser investigados.

Os monócitos representam aproximadamente 10-20% dos leucócitos do sangue periférico e desempenham diversas funções regulatórias e efetoras no processo inflamatório, incluindo a expressão de muitos mediadores inflamatórios ligados ao dano tecidual da AR (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Existem três subtipos de monócitos em humanos classificados de acordo com a expressão de marcadores de superfície celular CD (do inglês, *Cluster of differentiation*): clássico (CD14⁺⁺ CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺ CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺ CD16⁺⁺) (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Os três subtipos contribuem para a inflamação e têm sido relacionados a produção de citocinas, especialmente TNF- α e IL-1 β , e outros mediadores inflamatórios (WONG, Kok Loon *et al.*, 2012). Além disso, quando estas células são ativadas, podem induzir respostas em outros tipos celulares como linfócitos T *helper* e amplificar o dano tecidual da doença (EVANS *et al.*, 2009).

Os monócitos, assim como outras APCs, podem promover respostas inflamatórias apropriadas mediante alguns estímulos exógenos como moléculas com padrões imunogênicos expressas por patógenos (PAMPs) (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*) ou estímulos endógenos como moléculas associadas ao dano celular (DAMPs) (do inglês, *Damage-associated molecular patterns*) e expressão de citocinas (ALURI; COOPER; SCHUETTPELZ, 2021; ZHENG *et al.*, 2020). Esses padrões são reconhecidos pelas células através de receptores PRRs (do inglês, *pattern recognition receptors*). Um grupo de importantes PRRs são conhecidos como TLRs (do inglês, *Toll-like receptors*) que pertencem a família de receptores transmembrana tipo 1 e tem um papel essencial no desenvolvimento e manutenção da resposta inflamatória (ALURI; COOPER; SCHUETTPELZ, 2021). No estímulo endógeno, além dos DAMPs, há o reconhecimento de citocinas, especialmente IL-1 e IL-18, através do

receptor de IL-1 (IL-1R) que sinalizam a necessidade de uma resposta inflamatória (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; MOGENSEN, 2009; NGUYEN *et al.*, 2020).

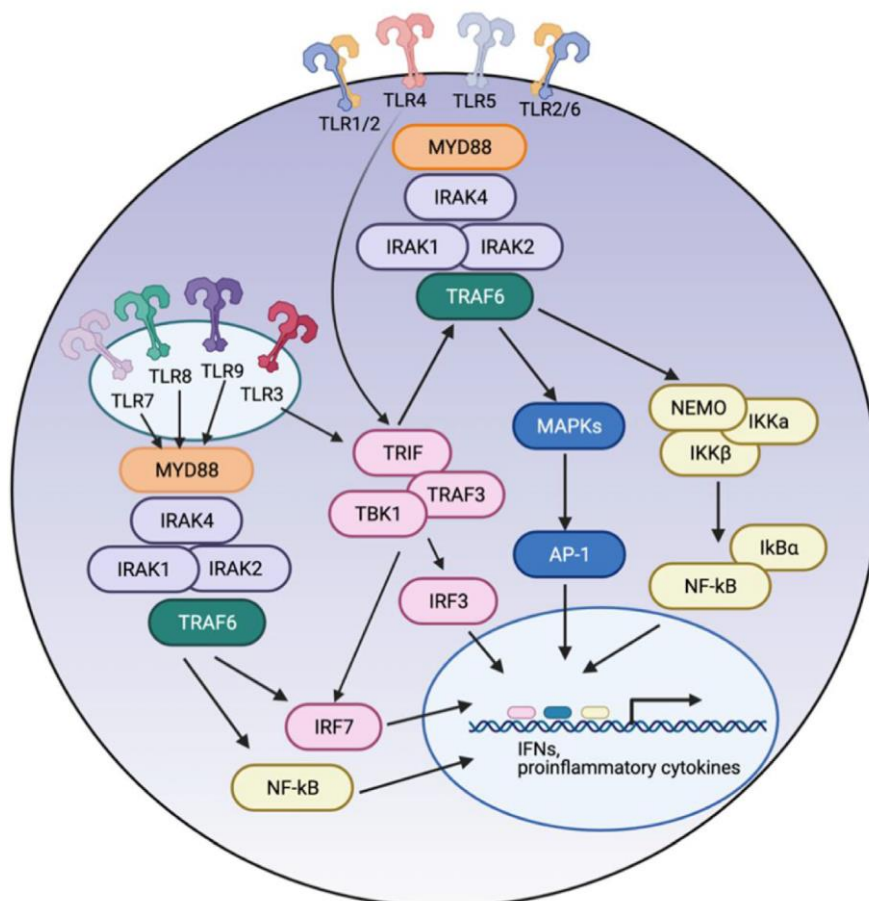
Em sua porção extracelular, os TLRs possuem domínios capazes de se ligar aos PAMPs ou DAMPs e promover uma cascata de sinalização que leva a produção de mediadores da resposta inflamatória, como citocinas e quimiocinas. A família de TLRs é composta por 10 receptores diferentes (TLR1 a TLR10) que se localizam na membrana plasmática ou endossoma (ALURI; COOPER; SCHUETTPELZ, 2021; GAY; GANGLOFF; O'NEILL, 2011).

Em uma condição patológica, como a autoimunidade, em que há quebra da autotolerância, os receptores como TLRs, IL-1R e moléculas associadas podem apresentar desregulações e induzir cascatas de sinalização que geram resposta inflamatória exacerbada, no entanto, ainda são incipientes os estudos que avaliem se moléculas e vias relacionadas estão associados a AR (ALURI; COOPER; SCHUETTPELZ, 2021; NGUYEN *et al.*, 2020).

2.3 O COMPLEXO MYDDOSSOMA

Ambos os receptores de estímulos endógenos e exógenos, TLRs ou IL-1R, possuem um domínio intracelular denominado TIR (do inglês, *Toll/IL-1R Receptor*) capaz de desencadear uma cascata de sinalização que culmina na ativação de fatores de transcrição que, por sua vez, promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias (CASANOVA; ABEL; QUINTANA-MURCI, 2011). A ativação dessas proteínas com domínio TIR se dá por meio de uma mudança na sua conformação que as torna capaz de ligar em moléculas adaptadoras como MyD88 (do inglês, *Myeloid differentiation primary response 88*), uma molécula chave na sinalização de grande parte dos TLRs e IL-1R. A ativação do MyD88 gera a formação do complexo Myddosoma, composto pelo MyD88 e proteínas IRAKs (do inglês, *interleukin-1 receptor-associated kinases*) como IRAK1, IRAK2 e IRAK4 (ALURI; COOPER; SCHUETTPELZ, 2021; GAY; GANGLOFF; O'NEILL, 2011; NGUYEN *et al.*, 2020) como demonstrado na Figura 6. A maior parte dos TLRs possuem sua sinalização dependente do Myddosoma, exceto o TLR3.

Figura 6 Via de sinalização induzida por TLRs (do inglês, *Toll-like receptors*) que levam a ativação do complexo Myddosoma, composto por MyD88 (do inglês, *Myeloid differentiation primary response 88*) e as proteínas IRAK (do inglês, *interleukin-1 receptor-associated kinases*): IRAK1, IRAK2, e IRAK4. Os TLRs ativado leva ao recrutamento do MyD88 e IRAK1, IRAK2 e IRAK4, que recrutam o TRAF6 (do inglês, *E3 ubiquitin ligase tumor necrosis factor TNFR-associated factor 6*) e ativam fatores de transcrição como MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*) e NFκB (do inglês, *nuclear factor kappa B*) e posterior produção de citocinas pro-inflamatórias e interferons.



Fonte: Imagem adaptada de ALURI; COOPER; SCHUETTPELZ, (2021)

Além do Myd88, existem outras moléculas adaptadoras capazes de se ligar no domínio TIR, como TIRAP (do inglês, *TIR-associated protein*), MAL (do inglês, *Myd88-adaptor-like*), TRIF (do inglês, *TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN-B*), TICAM1 (do inglês, *TIR-domain-containing molecule 1*) e TRAM (do inglês, *TRIF-related adaptor molecule*) que também participam de cascatas de sinalização em vias dependentes e independentes do MyD88 (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

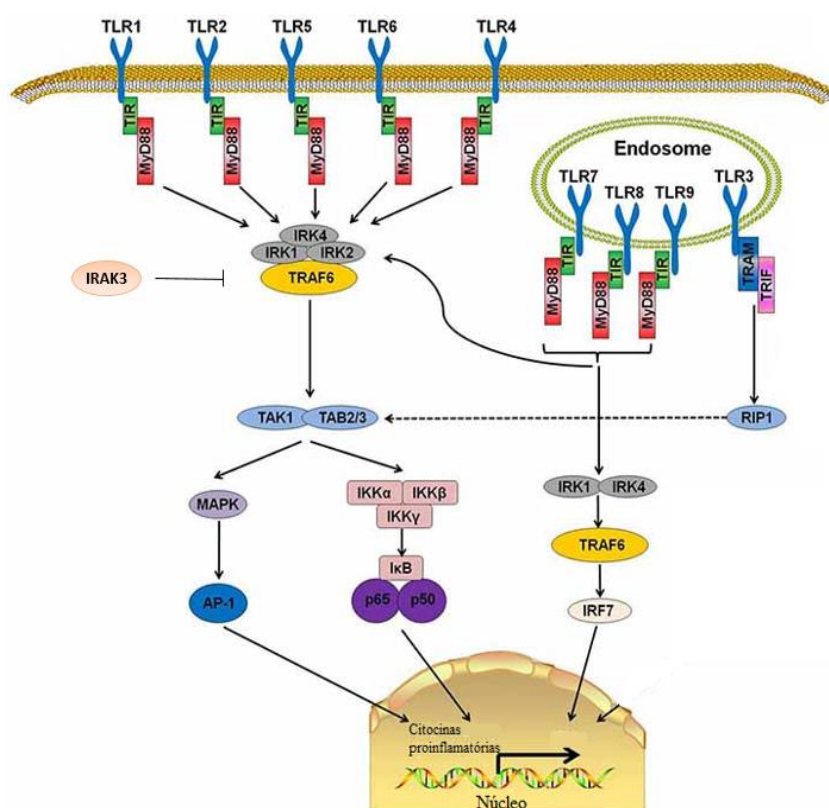
2.3.1 MyD88

2.3.1.1 Mecanismo de Ação

O MyD88, crucial na sinalização de TLRs e IL1R, inicia sua atuação quando há associação com a porção citoplasmática (domínio TIR) destes receptores transmembrana (TLRs e IL1R) (FREIHAT *et al.*, 2019; GAY; GANGLOFF; O'NEILL, 2011; LIN, Su-Chang; LO; WU, 2010). O MYD88 contém um domínio de morte (do inglês, *Death domain* (DD)) que permite a ligação com outras proteínas com o mesmo domínio como membros da família IRAK, como IRAK1, 2 e 4, formando uma estrutura denominada Myddosoma. O myddosoma é composto por 8 moléculas do MyD88 e 4 moléculas do IRAK4 que ativam a transdução de sinal (FREIHAT *et al.*, 2019; GAY; GANGLOFF; O'NEILL, 2011). As proteínas IRAK1 e IRAK2 são recrutadas ao complexo MyD88/IRAK4 e promovem sua fosforilação, resultando em uma mudança de conformação e perda de afinidade pelo complexo do TLRs ou IL1R (WESCHE *et al.*, 1999). Esta mudança conformacional também permite a ligação dessas proteínas IRAKs com moléculas *downstream* como TRAF6 (do inglês, *TNF receptor-associated factor 6*) desencadeando assim a cascata inflamatória por meio da ativação de fatores transcricionais como NFκB e AP-1 que promovem a produção de moléculas inflamatórias (Figura 7) (KOBAYASHI *et al.*, 2002; WESCHE *et al.*, 1999). Ademais, particularmente na ativação do Myddosoma através do TLR2 e TLR4, há o recrutamento do adaptador TIRAP/MAL além do MyD88 no início da cascata (ZHENG *et al.*, 2020).

Além disso, existem duas isoformas do Myd88, uma forma longa (MyD88-L) e uma forma curta (MyD88-S). A forma longa é capaz de ativar o NFκB no final da sua cascata de sinalização, enquanto que a forma curta é transcrita a partir de um splicing alternativo e que não possui um domínio intermediário, tornando-a incapaz de ativar a via do NFKB (JANSSENS *et al.*, 2002).

Figura 7 Via de sinalização dos TLRs (*Toll-like receptors*) que quando estimulados interagem com a proteína MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) e forma o complexo Myddossoma, composto por Myd88 e IRAK4. O complexo Myddossoma recruta o IRAK1 e IRAK2 e resultam na fosforilação de IRAKs. Os IRAKs fosforilados interagem com o TRAF6, induz a ativação do TAK-1 e TAB2/3 e resulta na ativação de I κ B e MAPK, que promovem a translocação do do NF κ B (p65 e p50) e AP-1 para o núcleo. Essa cascata de sinalização promove a produção de citocinas proinflamatórias.



Fonte: Imagem adaptada de Zheng et al. (2020)

2.3.1.2 Gene MYD88

A proteína MyD88 é produzida a partir do gene *MYD88* localizado no braço curto do cromossomo 3 (3p22.2) (ID Ensembl: ENSG00000172936) e coordenadas (GRCh38): 3: 38.138.478 – 38.143.022) (MUZNY *et al.*, 2006). O gene *MYD88* foi descrito com 5 éxons e 4.362 nucleotídeos (BONNERT *et al.*, 1997; MUZNY *et al.*, 2006). Há descrição de 6 isoformas do MYD88 produzidas por splicing alternativo que variam de 146 (15kDa) a 304 aminoácidos (34kDa) correspondentes a proteína em questão (ID UniProt: Q99836) (HARDIMAN *et al.*, 1997; OTA *et al.*, 2004). Além disso, diversas modificações neste gene têm sido encontradas em indivíduos saudáveis e com doenças crônicas e infecciosas (1000

GENOMES PROJECT CONSORTIUM *et al.*, 2010; CAPPARELLI *et al.*, 2013; GOMES DA SILVA *et al.*, 2021; GUO; LI, 2016).

2.3.1.3 MYD88 na Artrite Reumatoide

Sabe-se que receptores TLRs estão ativados cronicamente na AR e o MyD88 tem um papel fundamental nessa ativação uma vez que media a via TLR/NFκB, relacionada a produção de diversas citocinas, inclusive IL-1β (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006; FREIHAT *et al.*, 2019).

A relação entre o MyD88 e a inflamação crônica da AR têm sido observada em diversos estudos. O MyD88 parece estar desregulado em cultura de células de membrana sinovial de pacientes com AR (SACRE *et al.*, 2007; TAMAKI *et al.*, 2011) e parece ser necessário a produção de citocinas como IL-6, IL-8 e TNF-α, além de ser relacionado a produção de MMPs (SACRE *et al.*, 2007). Ademais, níveis mais altos de MyD88 foram verificadas em FLS (do inglês, *Fibroblast-like synoviocytes*) de pacientes com AR quando comparados com pacientes com osteoartrite (GUTIÉRREZ-CAÑAS *et al.*, 2006). A relação entre esta molécula e o desenvolvimento de inflamação na AR também foi observado em ratos com artrite induzida (*Streptococcal cell wall (SCW)-induced arthritis*) (JOOSTEN *et al.*, 2003). Apesar disso, poucos estudos desenvolvidos, até o momento, investigaram a relação entre desregulações do MyD88 e o desenvolvimento e as características clínicas da AR.

Variantes genéticas SNVs (do inglês, *single nucleotide variant*) no gene do MyD88 têm sido relacionadas ao desenvolvimento de AR. Análises do SNV rs6853 que promove a substituição de uma Adenina por uma Guanina na 3'UTR do gene podem diminuir a expressão do MyD88 e, conseqüentemente, a ativação de vias mediadas por esta molécula (FULGIONE *et al.*, 2016). Um estudo desenvolvido pelo nosso grupo verificou o impacto desse SNV na expressão do MYD88 em pacientes com AR de duas populações brasileiras (nordeste e sudeste) e o efeito no nível proteico da IL-1β em cultivo celular de monócitos (GOMES DA SILVA *et al.*, 2021). Foi possível verificar um aumento no risco para o desenvolvimento de AR em portadores do alelo A (OR = 1.60; p = 0.0004) e um aumento dos níveis de IL-1β em indivíduos com genótipo AA quando comparados os monócitos não estimulados e estimulados com LPS (p = 0.021) (GOMES DA SILVA *et al.*, 2021). O SNV rs7744 também tem sido investigado na AR em diferentes populações e foi relacionado ao aumento da susceptibilidade à doença bem como a eficácia terapêutica em tratamento com drogas anti-TNF (POTTER *et al.*, 2010; SODE *et al.*, 2018; ZERVOU *et al.*, 2013).

2.3.2 IRAK3

Como abordado anteriormente, a família IRAK (do inglês, *IL-1 receptor associated kinases*) é composta por quatro membros: IRAK1, IRAK2, IRAK3 e IRAK4. Apenas o IRAK1 e IRAK4 possuem atividade quinase (LYE *et al.*, 2004), embora todos os membros desempenhem um papel na regulação do sistema imune e inflamação (SU; XU; HUANG, 2020).

Todos os membros da família IRAK possuem uma estrutura similar e domínios parecidos como Domínio de morte (DD) (do inglês, *Death domain*), domínio quinase/pseudoquinase, domínio rico em prolina, serina e treonina e outros. O DD é usado principalmente para dimerização e interação com o Myd88, enquanto o domínio C-terminal é crítico para interação com o TRAF6 (SU; XU; HUANG, 2020). A IRAK1 e IRAK2 possuem mais regiões de interação com o TRAF6, enquanto o IRAK3 possui apenas uma região de interação (SU; XU; HUANG, 2020; ZHENG *et al.*, 2020). Diferente dos outros membros da família IRAK, a IRAK3 ou IRAK-M é produzida principalmente por monócitos e macrófagos e não participa do complexo Myddossoma, atuando principalmente com uma regulação negativa do processo inflamatório (SU; XU; HUANG, 2020; ZHENG *et al.*, 2020).

Muitos estudos têm sido feitos para avaliar a relação entre membros da família IRAK e doenças autoimunes e inflamatórias. No entanto, ainda são escassos estudos que verifiquem a relação entre o IRAK3 e a autoimunidade.

2.3.2.1 Mecanismo de Ação

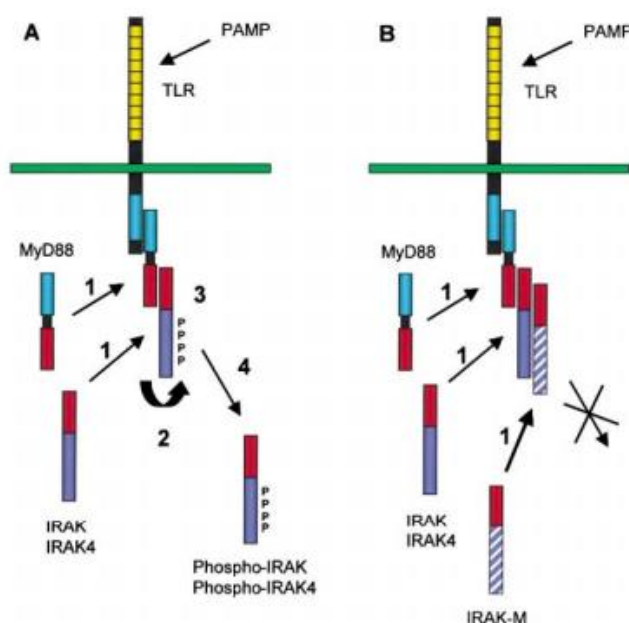
Assim como o MyD88, o IRAK3 possui um domínio DD que permite sua interação com outras proteínas IRAKs e com o próprio MyD88, um domínio de pseudo-quinase e um domínio C terminal relacionado ao TRAF6 com uma região de interação (WESCHE *et al.*, 1999).

O IRAK3 tem um efeito inibitório do Myddosoma atuando de duas formas. Primeiramente, o IRAK3 atua impedindo a fosforilação das proteínas IRAKs e, consequentemente, inibe a dissociação destas proteínas do complexo com TLR e a ligação com o TRAF6 a *downstream* na cascata de sinalização do Myddosoma (FREIHAT *et al.*, 2019; KOBAYASHI *et al.*, 2002). Além disso, o IRAK-3 também parece atuar na estabilização do

complexo TLR/MyD88/IRAK-4 inibindo a sua dissociação, necessária para a continuidade da sinalização na cascata (Figura 8).

O IRAK3 pode ser fracamente fosforilada, embora não apresente atividade quinase como os outros membros da família IRAK. Em contrapartida, diferente do esperado, um estudo verificou uma ativação do NF κ B em células 293T mediada pelo IRAK3 quando induzido a super expressão dessa molécula (WESCHE *et al.*, 1999).

Figura 8 A ativação do TLR por PAMPs induz o recrutamento de proteínas IRAKs e da molécula adaptadora MyD88, formando o complexo Myddossoma. A ligação entre estas moléculas promove a fosforilação das proteínas IRAKs, sua consequente mudança conformacional e dissociação do complexo Myddossoma para seguir adiante na cascata de sinalização. Na presença de IRAK-3 (IRAK-M) a fosforilação das proteínas IRAK é inibida e, como não há mudança conformacional, ocorre a não dissociação do complexo e uma inibição da cascata downstream



Fonte: Imagem adaptada de Kobayashi et al. (2002).

Experimentos conduzidos em macrófagos extraídos a partir de ratos modificados (IRAK-3^{-/-}) estimuladas com diversos PAMPs mostraram um aumento significativo da produção de citocinas inflamatórias como IL-12, IL-6 e TNF- α quando comparados com células de ratos não modificadas (KOBAYASHI *et al.*, 2002). Além disto, foi observado um aumento significativo de moléculas associadas ao estímulo por TLR, como NF κ B, JNK e p38 devido ao

aumento da atividade de moléculas como MyD88 e IRAKs (KOBAYASHI *et al.*, 2002; SU; XU; HUANG, 2020).

O papel do IRAK3 na regulação do sistema imune vai além de um regulador negativo da sinalização por TLR, pois também consiste em garantir a tolerância a endotoxinas e produção constante de citocinas, auxiliando assim, no controle do sistema imune e garantindo uma manutenção da homeostase no sistema imune inato (KOBAYASHI *et al.*, 2002).

2.3.2.2 Gene IRAK3

A proteína IRAK3 é produzida a partir do gene *IRAK3* localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q14.3) (ID Ensembl: ENSG00000090376) e coordenadas (GRCh38): 66.189.195 a 66.254.622). Este gene possui 65.409 nucleotídeos que codificam 12 éxons (BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE HUMAN GENOME SEQUENCING CENTER SEQUENCE PRODUCTION TEAM * *et al.*, 2006; OTA *et al.*, 2004). O gene *IRAK3* pode gerar dois transcritos funcionais com 596 aminoácidos (67 kDa) e 535 aminoácidos (60kDa), respectivamente, relativos a proteína em questão (ID UniProt: Q9Y616) (OTA *et al.*, 2004; WESCHE *et al.*, 1999). Além disso, algumas variantes genéticas como inserções, variações no número de cópias neste gene já foram relacionadas ao desenvolvimento de cancer (1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM *et al.*, 2010; WALTER *et al.*, 2009).

2.3.2.3 IRAK3 na Artrite Reumatoide

Estudos que avaliam o papel de desregulações no IRAK3 e doenças inflamatórias são escassos e o seu papel na autoimunidade permanece pouco compreendido.

O IRAK3 possui expressão frequente apenas em células monocíticas e células relacionadas. No Sistema Nervoso Central, a expressão do IRAK3 ocorre exclusivamente na micróglia, e um estudo verificou a influência deste gene na polarização da microglia em estudo utilizando ratos com esclerose múltipla induzida (*Experimental autoimmune encephalomyelitis* (EAE)) indicando que o IRAK3 pode ser um bom alvo terapêutico na doença (LIU, Baozhu *et al.*, 2019). Liu e colaboradores (2019) também verificaram que ratos IRAK3 *-/-* apresentavam aumento da severidade da doença. Também foi observada a relação entre desregulações do gene IRAK3 e a Diabetes Mellitus autoimune (HAYASHI *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2014). No tecido

pulmonar o IRAK3 também parece ter uma significativa influencia na regulação do trafego de monócitos no pulmão e diferenciação para Mo-AM (do inglês, *Monocyte-derived alveolar macrophages*), além de relação com o desenvolvimento de fibrose pulmonar (READER *et al.*, 2020).

Além disso, em doenças de caráter sistêmico como LES foi observada a relação entre o desenvolvimento da doença e o gene IRAK3, em experimentos com ratos IRAK3 *-/-* onde houve o aumento da expressão de vários genes relacionados a citocinas, interferon, sobrevivência de células plasmáticas e disfunções relacionadas a produção de autoanticorpos (LECH *et al.*, 2011; MURPHY, Michael *et al.*, 2017).

Os estudos conduzidos especialmente em pacientes com AR são escassos e compreendem poucos tipos celulares relacionados a doença. A desregulação do IRAK3 já foi verificada em FLS (do inglês, *fibroblast like synoviocytes*) estimulados com moléculas pro-inflamatórias como PGN (peptideoglicanos) e LPS (lipopolissacardeos) e citocinas como TNF- α (CHO *et al.*, 2007). Além disso, análises de transcriptoma verificaram um aumento na produção de IRAK3 no sangue periférico de pacientes com AR quando comparadas com pacientes com osteoartrite (SMILJANOVIC *et al.*, 2018). Ademais, uma variante genética (rs11541076) no gene IRAK3 já foi associada a resposta terapêutica com anti-TNF em pacientes dinamarqueses com a doença (SODE *et al.*, 2018). No entanto, ainda são incipientes estudos que verifiquem a relação do IRAK3 com o desenvolvimento e patogênese da AR.

2.4 A VIA DO FATOR NUCLEAR KAPPA B (NF κ B)

A ativação de vias dependentes do complexo Myddosoma, geralmente resulta na ativação de moléculas intermediárias como TRAF6 e fatores transcricionais como NF κ B. A via de sinalização do NF κ B está presente em quase todos os tipos celulares e é ativada por diversos receptores diferentes, comumente, agindo na regulação da proliferação, apoptose e diferenciação celular (LIU, Ting *et al.*, 2017). Em alguns tipos celulares, principalmente em células relacionadas ao sistema inato e adaptativo, a via do NF κ B age diretamente aumentando a produção de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, induzindo a expressão de genes pro-inflamatórios e, conseqüentemente levando a inflamação (LAWRENCE, 2009; LIU, Ting *et al.*, 2017).

2.4.1 TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6)

Em células do sistema imune inato (monócitos, macrófagos e células dendríticas) um dos componentes intermediários e ponto chave para ativação da via do NFκB é através de uma proteína adaptadora denominada TRAF6 (LIU, Ting *et al.*, 2017; WALSH; LEE; CHOI, 2015).

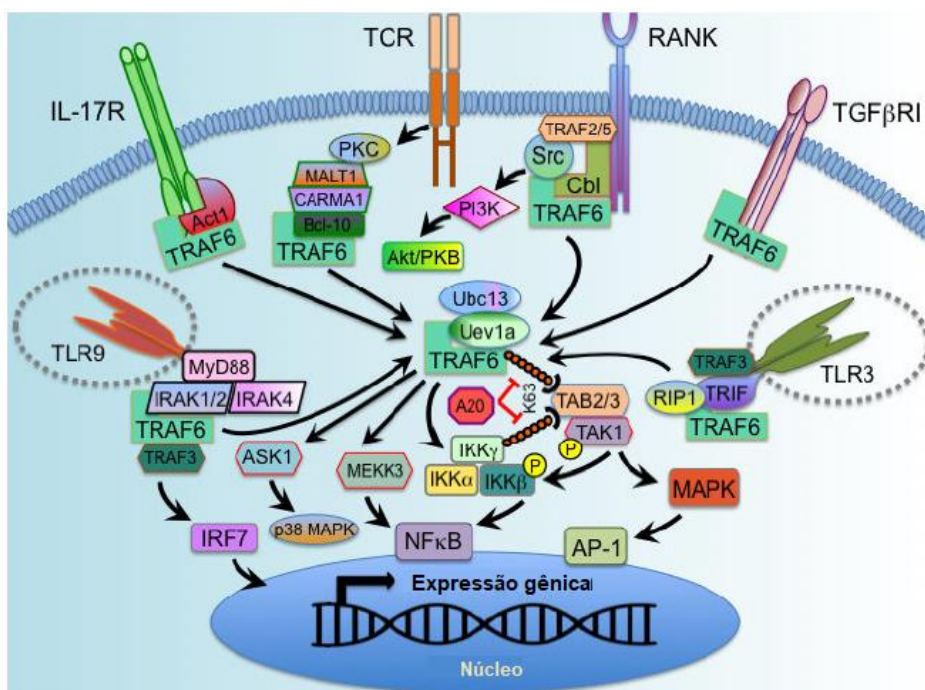
O TRAF6 é uma proteína que possui atividade de ubiquitina ligase, isto é proteína capaz de recrutar enzimas conjugadas a ubiquitina e que transferem essa ubiquitina para uma proteína, induzindo sua ativação ou degradação (ISHIDA *et al.*, 1996). O TRAF6 foi o primeiro mediador conhecido entre a ligação do IL-1R e a via NFκB, além de atuar também em diferentes vias como MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), PI3K (do inglês, *phosphoinositide 3-kinase*) ou IRF (do inglês, *interferon regulatory factor*), todas estas relacionadas com processos inflamatórios (CAO *et al.*, 1996; WALSH; LEE; CHOI, 2015; WONG, Brian R *et al.*, 1999). A ativação do TRAF6 é crucial para o desenvolvimento, homeostase e ativação de diferentes células como linfócitos, macrófagos, monócitos, células dendríticas e osteoclastos (DICKSON; BHAKAR; BARKER, 2004; SUN, Lijun *et al.*, 2004; WALSH; LEE; CHOI, 2015).

2.4.1.1 Mecanismos de Ação

O TRAF6 está envolvido em diversas vias relacionadas a inflamação. A proteína adaptadora pode interagir diretamente com receptores, como os TNFRs e TGFβR, ou através de proteínas intermediárias como Act1 (intermediando o IL-17R), MALT1/CARMA1 e Bcl-10 (intermediando o TCR em linfócitos T), o complexo MyD88/IRAK4/IRAK1 (intermediando alguns TLRs) e outros (DENG *et al.*, 2000; SUN, Lijun *et al.*, 2004; WALSH; LEE; CHOI, 2015; WONG, Brian R *et al.*, 1999). Após a ligação do TRAF6 com esses receptores e sua consequente ativação, o TRAF6 recruta as enzimas Ubc13 (do inglês, *Ubiquitin-conjugating enzyme E2 13*) e Uev1a (do inglês, *Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*) que torna possível a ligação com outras proteínas alvo, como IKK e formação de complexos com proteínas quinases como TABs (do inglês, *TAK1-associated binding protein*) 2 e 3. O complexo TAB2/3, por sua vez, recruta a quinase TAK1 que fosforila proteínas como IKK e MAPK. Essa cascata de sinalização leva a ativação dos fatores de transcrição NFκB e AP-1 (DENG *et al.*,

2000; SUN, Lijun *et al.*, 2004; WALSH; LEE; CHOI, 2015; YE *et al.*, 2002). As vias e proteínas que interagem com o TRAF6 estão descritas na figura 9.

Figura 9 Vias de ativação do TRAF6 e proteínas que interagem levando a indução da expressão de genes associados a inflamação. O TRAF6 liga-se diretamente aos receptores IL-17R, TGF β RI, enquanto ligase através de outras proteínas adaptadoras nos receptores TCR, RANK e alguns TLRs. O TRAF6 é capaz de mediar a sinalização das moléculas ativando fatores de transcrição como NF κ B, AP-1 e MAPK, levando ao aumento na expressão de genes associados a inflamação.



Fonte: Imagem adaptada de Walsh et al. (2015).

2.4.1.2 Gene TRAF6

A proteína TRAF6 é produzida a partir do gene *TRAF6*, localizado no braço curto do cromossomo 11 (11p12) (ID Ensembl: ENSG00000175104) e coordenadas (GRCh38): 11: 36.483.768 – 36.510.312. Possui 9 éxons que podem formar 3 isoformas de transcritos, uma delas não produz proteína (ENST00000529150.1), enquanto duas das isoformas (ENST00000348124.5 e ENST00000526995.6) produzem uma proteína com 522 aminoácidos (ID UniProt: Q9Y4K3) (CUNNINGHAM *et al.*, 2019; YATES *et al.*, 2017). O gene *TRAF6* possui três variantes genéticas em sua sequência não codificante (5'UTR e íntron) (rs5030411, rs5030486 e rs540386) (VIDAL *et al.*, 2007) embora, posteriormente, outras variantes também tenham sido descritas e estão disponíveis no Ensembl (CUNNINGHAM *et al.*, 2019).

2.4.1.3 TRAF6 na Artrite Reumatoide

O TRAF6 tem sido associado a diversas doenças inflamatórias, como AR (ZHU, Lang-Jing *et al.*, 2017, 2012), Lúpus eritematoso sistêmico (LES) (NAMJOU *et al.*, 2012), Diabetes (KOLSETH *et al.*, 2017) e Síndrome de Sjogren (SIPKA *et al.*, 2017).

Estudos mostraram que a expressão do *TRAF6* é aumentada no tecido sinovial de pacientes com AR e é responsável por promover o aumento do número de células inflamatórias na articulação, causando o dano tecidual (ZHU, Lang-Jing *et al.*, 2017, 2012). Além disso, o TRAF6 é crucial para a diferenciação de osteoclastos e inflamação sinovial na AR (KIM *et al.*, 2019; WU, Dennis J. *et al.*, 2016). A expressão do TRAF6 também foi relacionada a migração de FLS (do inglês, *Fibroblast-like synoviocytes*) (WANG, Huiqin *et al.*, 2015; ZHANG, Zimu; ZHANG, 2015) e sua expressão em células residentes no tecido sinovial foi relacionada a severidade da doença (ZHU, Lang-Jing *et al.*, 2012).

Alguns estudos verificaram a eficácia de inibidores do *TRAF6* na diminuição da inflamação na AR. Zhu *et al.* (2017) verificou que a transfecção lentiviral TRAF6-shRNA (do inglês, *short hairpin RNA*), que silencia a expressão do gene, diminuiu a inflamação em FLS (do inglês, *fibroblast-like synoviocytes*) através da diminuição de citocinas próinflamatórias como IL-1 β , IL-6, TNF- α e MMPs, além de diminuir também a proliferação dos FLS. Brenke *et al.* (2018) também utilizaram um composto (C25-140) inibidor da interação do TRAF6 com moléculas associadas, como Ubc13, em modelo de camundongo com artrite induzida por colágeno e verificaram uma melhora significativa na inflamação dos camundongos. Em ambos os estudos, a inibição do TRAF6 no local da inflamação foi sugerida como potencial e promissora terapia para AR (BRENKE *et al.*, 2018; ZHU, Lang-Jing *et al.*, 2017).

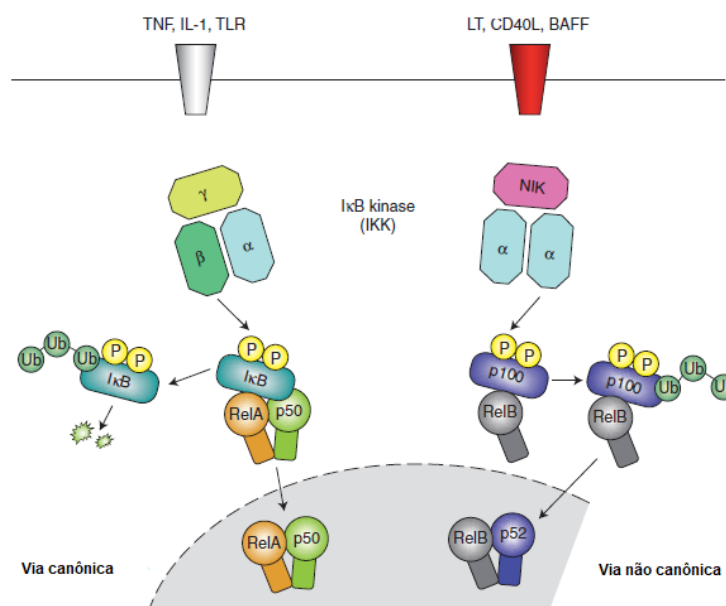
A desregulação do *TRAF6* na AR parece estar relacionada a características genéticas, uma vez que, um estudo recente mostrou uma associação entre a variante genética (rs540386) do gene TRAF6 e a perda da densidade mineral óssea em pacientes com AR (HASSINE *et al.*, 2019). O SNV rs540386, no entanto, não foi associado ao desenvolvimento da AR quando comparado com controles, mas foi considerado como um fator de risco para a perda mineral óssea nos pacientes em uma população da Tunísia (HASSINE *et al.*, 2019).

2.4.2 NFκB1

O NFκB corresponde a uma família de fatores de transcrição que possui cinco membros estruturalmente relacionados: NFκB1 (alias: p105 e p50), NFκB2 (alias: p100 e p52), RelA (alias: p65), RelB e c-Rel (SUN, Shao-Cong, 2012). A função de fator de transcrição do complexo NFκB depende da dimerização de suas subunidades, isto é, os componentes desta família se unem como heterodímeros ou homodímeros para conseguirem ligar ao DNA e induzir sua transcrição (HOFFMANN; NATOLI; GHOSH, 2006).

A cascata de sinalização da qual o NFκB faz parte, depende da ativação de moléculas adaptadoras e da ativação dos seus componentes. A via de sinalização do NFκB pode ocorrer de forma canônica e não canônica (LAWRENCE, 2009; LIU, Ting *et al.*, 2017). A via canônica normalmente é ativada mediante a diversos estímulos, incluindo receptores de citocinas (IL1R), membros da família do TNF (TNFR) e TLRs, isto é, a via canônica é ativada basicamente por citocinas e produtos microbianos (KARIN; DELHASE, 2000; LIU, Ting *et al.*, 2017; YAMAMOTO, Yumi; GAYNOR, 2004). A via não canônica, por sua vez, responde a um grupo específico de receptores e estímulos relacionados a citocinas da família TNF, entre eles, o LTβR (do inglês, *lymphotoxin-β receptor*), BAFFR (do inglês, *B cell-activating factor receptor*), CD40 (do inglês, *Cluster of differentiation 40*) e RANK (do inglês, *Receptor activator of nuclear factor kappa-B*) (LAWRENCE, 2009; LIU, Ting *et al.*, 2017; SUN, Shao-Cong, 2012). A ativação da via canônica e não canônica está descrita na figura 10.

Figura 10 Via canônica e não canônica de ativação do NFκB. A via canônica é desencadeada por TLRs e receptores de citocinas que levam a ativação do RelA/p50 e se deslocam para o núcleo. Já a via não canônica é ativada por citocinas da família TNF (mas não o TNF) e resulta na ativação do heterodímero p52/RelB que se deslocam para o núcleo. As IKKs regulam a ativação das moléculas através da fosforilação (P) e ubiquitinação (Ub) que mediam a degradação das proteínas pelo proteassoma.



Fonte: Imagem adaptada de Lawrence (2009).

Desregulações nas vias do NFκB têm sido associadas a muitas doenças inflamatórias como a AR. O NFκB já foi relacionado a AR tanto em estudos de associação que avaliaram pacientes com a doença quanto em modelos animais (LIU, Ting *et al.*, 2017; ŚWIERKOT *et al.*, 2016).

O NFκB1 corresponde as proteínas p50 e p105, as quais fazem parte da via canônica de ativação do NFκB. Ambas as proteínas são capazes de se ligar em proteínas Rel (RelA, RelB e c-Rel) formando o complexo do NFκB, os quais sofrem ubiquitinações por proteínas quinases (IKKs) que tornam o complexo ativo (LIU, Ting *et al.*, 2017; SUN, Shao-Cong; CHANG; JIN, 2013). Dados na literatura mostraram que o bloqueio na ubiquitinação da p50 inibe a transcrição gênica e limita a resposta de TLRs, mantendo a homeostase e inatividade do sistema imune inato utilizando ratos como modelo animal (CARMODY *et al.*, 2007). Ainda em estudos sobre modelos animais foi verificado que a p105 regula a sinalização da MAPK (do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinase*), uma vez que controla a estabilidade e função de uma quinase, Tp12 (WATERFIELD *et al.*, 2003). Modelos animais knock-out para o gene *NFKB1* apresentaram

falhas nas respostas imunes principalmente envolvendo linfócitos B e respostas inespecíficas contra infecções (SHA *et al.*, 1995).

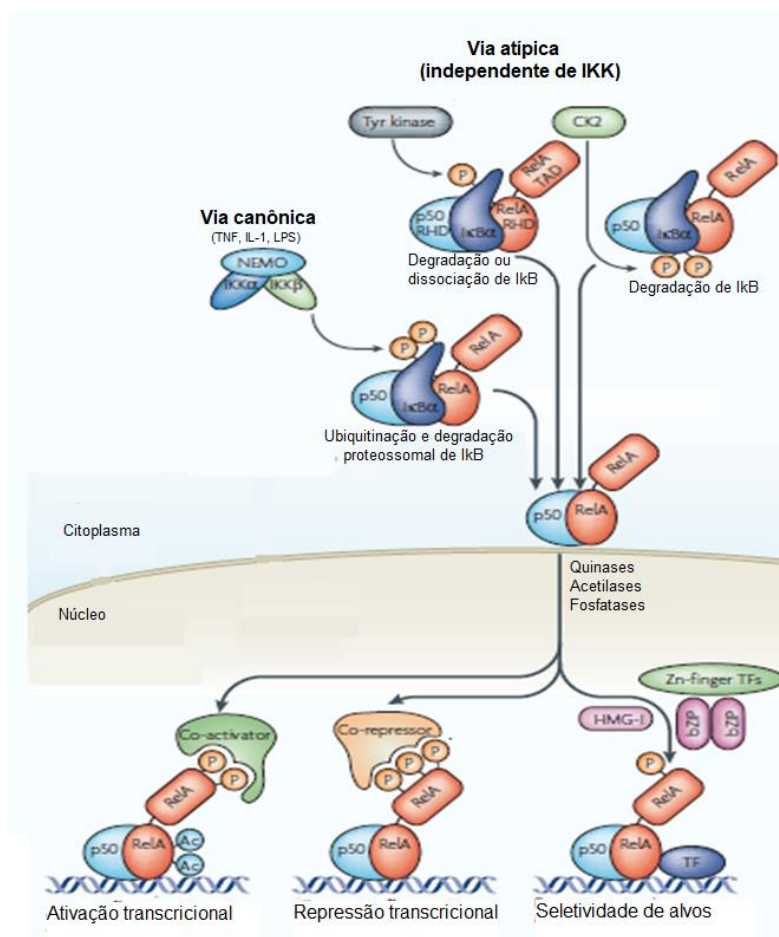
2.4.2.1 Mecanismos de Ação

Ambas as vias de ativação do NF κ B parecem desempenhar um papel importante na inflamação, embora a via canônica seja mais frequente e a via não canônica parece exercer um papel auxiliar, estando presente em células do sistema imune adaptativo (LIU, Ting *et al.*, 2017). Comumente os membros do NF κ B predominantes na via canônica de ativação são os dímeros p50/p65 e p50/c-Rel (LAWRENCE, 2009; LIU, Ting *et al.*, 2017).

A via canônica ocorre principalmente em resposta a sinalização de IL-1 e TNF α , embora diversas vias possam ativar a via canônica (LAWRENCE, 2009; PERKINS, 2007), estas podem ter sua ativação dependente de IKKs (subunidades NEMO (do inglês, *NF-kappa-B essential modulator*), IKK α e IKK β) onde ocorre a modificação pós-traducional (fosforilação/ubiquitinação) das IKKs, que atuam como inibidoras, e consequente degradação pelo proteassoma. Ainda, pode ocorrer a ativação da via canônica de maneira independente de IKK, mas dependente de outras proteínas quinase como ck2 e Tyr quinase. O complexo do NF κ B (p50/RelA) livre pode se deslocar para o núcleo. No núcleo, algumas quinases, acetilases e fosfatases também podem atuar, sendo estes fatores cruciais para a ativação e repressão transcricional, uma vez que podem recrutar ativadores ou repressores da transcrição (Figura 11) (LAWRENCE, 2009; LIU, Ting *et al.*, 2017; PERKINS, 2007).

O complexo p50/RelA é capaz de se ligar ao DNA induzindo a transcrição de diversos genes através da ligação com os motivos: 5-GGGRNNYYCC-3 ou 5-HGGARNYYCC-3), onde R pode ser um nucleotídeo de básica púrica (A ou G), Y representa uma pirimidina (C ou T) enquanto H representa uma A, C ou T (WANG, Yao *et al.*, 2000).

Figura 11 Via de ativação do NFκB e atuação das subunidades p50/RelA no núcleo celular. A via canônica tem ativação das subunidades de IKK (NEMO, IKKα e IKKβ) que atuam induzindo a degradação de inibidores IκBs e tornam ativas as subunidades p50/RelA. A via atípica, por sua vez, parte da ativação de Tyr kinase ou Ck2 que induzem a degradação de inibidores IκBs e tornam ativas as subunidades p50/RelA. Ambas as vias geram a ativação da p50/RelA que podem se unir a co-ativadores (gerando ativação transcricional), co-repressores (gerando repressão transcricional) ou fatores de transcrição *Zn-Finger* que promove uma seletividade de alvos.



Fonte: Imagem adaptada de Perkins (2007).

A via canônica de ativação do NFκB tem sido muito associada a diversas doenças inflamatórias (BOHUSLAV *et al.*, 1998; LAWRENCE, 2009; LIU, Ting *et al.*, 2017). O NFκB também parece ser um importante inibidor da apoptose em macrófagos (PARK, 1995). Além disso, interessante a formação de homodímeros da subunidade p50 podem atuar na repressão de genes e inibindo a inflamação, uma vez que não são capazes de migrar para o núcleo e se ligar ao DNA (BOHUSLAV *et al.*, 1998). Em linfócitos T foi verificada a diminuição na expressão da p50 após a ativação das células, que possivelmente ocorre para que não sejam formados homodímeros e a p50 possa se conjugar a RelA, tornando-se ativa (KANG *et al.*, 1992).

2.4.2.2 Gene NFκB1

A proteína NFκB1 é produzida a partir do gene *NFκB1* localizado no braço longo do cromossomo 4 (4q24) (ID Ensembl: ENSG00000109320) e coordenadas (GRCh38): 4: 102.501.265 – 102.617.301) (CUNNINGHAM *et al.*, 2019; LE BEAU *et al.*, 1992; YATES *et al.*, 2017). O gene *NFκB1* foi descrito com 24 éxons com 156 kb (HÉRON; DELOUKAS; VAN LOON, 1995) e atualmente foi revisado com 27 éxons (CUNNINGHAM *et al.*, 2019). O gene NFκB1 gera as proteínas com 105 kDa e 50kDa de massa molecular que foram identificadas através de ensaios de clonagem (LIN, Li; DEMARTINO; GREENE, 1998; MEYER *et al.*, 2010). O gene NFκB1 possui 14 transcritos descritos, dos quais apenas três (ENST00000226574.9, ENST00000505458.5 e ENST00000394820.8) possuem correspondência com a proteína em questão (ID UniProt: P19838) e esta possui 969 aminoácidos (CUNNINGHAM *et al.*, 2019; YATES *et al.*, 2017).

2.4.2.3 NFκB1 na Artrite Reumatoide

Desregulações no gene NFκB1 já foram associadas em diversas doenças autoimunes, incluindo a AR (ŚWIERKOT *et al.*, 2016). Dados na literatura indicam um aumento na expressão e ativação de componentes do NFκB no tecido sinovial de pacientes e camundongos com artrite induzidas por colágeno (HAN *et al.*, 1998) e já foi verificada sua importância para apoptose e proliferação de células sinoviais (YAMASAKI, 2001). Um estudo com o *NFκB1* verificou um aumento na expressão de locais adjacentes a junção cartilagem/osso e associou sua expressão ao dano tecidual condizente com erosões ósseas (BENITO *et al.*, 2004).

As funções inflamatórias do NFκB podem mediar a produção de citocinas pró-inflamatórias altamente expressas na AR em monócitos e macrófagos (DAVIGNON *et al.*, 2013), bem como auxiliar no recrutamento de células imunes inflamatórias para o local da inflamação, especificamente no tecido sinovial e tecidos adjacentes (SIMMONDS; FOXWELL, 2008). O NFκB também contribui para o aumento da sobrevivência de linfócitos B autorreativos e consequente aumento na produção de autoanticorpos (WEI, Shi-Tong *et al.*, 2015).

As vias canônicas e não canônicas do NFκB também estão associados ao RANK em osteoclastos que promovem a perda óssea associada a AR (YAO; XING; BOYCE, 2009). Além disso, muitos loci gênicos associados com o desenvolvimento da AR, em estudos de GWAS, referem-se a genes relacionados a via de sinalização do NFκB como *REL*, *TNFAIP3* (do inglês, *TNF Alpha Induced Protein 3*) e *TRAF1* (do inglês, *TNF Receptor Associated Factor 1*) (CRISWELL, 2008; DIOGO; OKADA; PLENKE, 2014), enfatizando a importância desta via para a etiopatogênese da doença.

Além disso, um estudo identificou seis variantes genéticas no gene *NFKB1*, entre elas uma variante de inserção/deleção na região promotora (-94ins/delATTG) (KARBAN *et al.*, 2004), associada ao desenvolvimento da AR. Ainda, a mesma variante já foi associada a comorbidades da doença onde foi verificado que a presença da deleção em homozigose era associada ao aumento do risco de doença cardiovascular (LÓPEZ-MEJÍAS *et al.*, 2012) e marcadores da gravidade da doença como DAS28 e Proteína C Reativa (BOGUNIA-KUBIK *et al.*, 2016), indicando que fatores genéticos também podem estar relacionados a sua desregulação.

2.5 EPIGENÉTICA

Epigenética é definida como mudanças herdáveis e transitórias no padrão de expressão gênica que não decorrentes de mudanças na sequência de DNA primária (TRENKMANN *et al.*, 2010). Para alguns, o termo indica as interações entre células e produtos celulares capazes de levar a mudança na morfologia celular, bem como sua diferenciação e ativação (STOTZ; GRIFFITHS, 2016). O termo epigenética foi criado para indicar os processos pelos quais um genótipo dava origem a um fenótipo (HOLLIDAY, 2006; STOTZ; GRIFFITHS, 2016).

Mudanças epigenéticas podem ocorrer em resposta a sinais ambientais, fisiológicos e patológicos (BALLESTAR, 2011). Desordens nos mecanismos epigenéticos tais como, alterações no nível de metilação do DNA, modificação de histonas e RNAs não codificantes, podem interferir na expressão de genes importantes para célula (TRENKMANN *et al.*, 2010).

No que se refere as doenças autoimunes, podem ocorrer falhas no sistema de regulação da expressão gênica devido a desregulações em mecanismos epigenéticos. Estas desregulações podem ser decorrentes de estímulos ambientais e serem relacionadas ao desenvolvimento da

autoimunidade (BALLESTAR, 2011; STOTZ; GRIFFITHS, 2016; TRENKMANN *et al.*, 2010).

Muitos estudos indicam que o início e patogênese da AR podem ter influência direta de fatores epigenéticos, o que tem mostrado seu potencial como biomarcadores eficientes para a doença (NEMTSOVA *et al.*, 2019; TRENKMANN *et al.*, 2010).

2.5.1 Micro-RNAs

Os RNAs não codificantes, isto é, que não são traduzidos em uma proteína, podem ser divididos em housekeeping (RNA transportador e RNA ribossomal) e RNAs não codificantes regulatórios (WEI, Jian-Wei *et al.*, 2017). Os RNAs não codificantes regulatórios podem ser divididos em pequenos RNAs (ex.: micro-RNAs (miRNA) e pequeno RNA de interferência (siRNA)), quando apresentam menos que 200 nucleotídeos e, grandes RNAs que apresentam mais de 200 nucleotídeos (WEI, Jian-Wei *et al.*, 2017; ZARATIEGUI; IRVINE; MARTIENSSSEN, 2007).

Um dos RNAs regulatórios que parecem ser de grande importância para o desenvolvimento e patogênese da AR é a expressão de miRNAs (CHUROV; OLEINIK; KNIP, 2015; PILETIČ; KUNEJ, 2016). miRNAs são RNAs de aproximadamente 22 nucleotídeos provenientes de regiões intragênicas e intergênicas que são processados e exportados para o citoplasma, onde se ligam ao seu transcrito alvo e regulam sua tradução (WEI, Jian-Wei *et al.*, 2017; ZHANG, Zimu; ZHANG, 2015).

Os miRNAs foram descobertos em 1993 por Victor Ambros em estudos com *Caenorhabditis elegans* e seu papel na regulação de mRNAs alvo foi descrita em 1998 (FIRE *et al.*, 1998). No entanto, a relevância dos miRNAs na regulação gênica só foi evidenciada a partir das descobertas dos miRNAs Let-7 e Lin-4, onde foi verificada a conservação destes miRNAs em diferentes organismos e foi reportada a repressão dos seus mRNAs alvo, lin-14 e lin-41 (HAUSSER; ZAVOLAN, 2014; REINHART *et al.*, 2000).

No genoma humano já foram identificados cerca de 2.000 miRNAs que regulam aproximadamente 1/3 dos genes humanos (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005; WEI, Jian-Wei *et al.*, 2017), e diversos mecanismos relacionados a regulação da inflamação, diferenciação

celular e autoimunidade têm sido associados à ação dos miRNAs (CHUROV; OLEINIK; KNIP, 2015; HAUSSER; ZAVOLAN, 2014; REINHART *et al.*, 2000; ZHANG, Lian *et al.*, 2020).

2.5.1.1 Biogênese e Mecanismos de ação

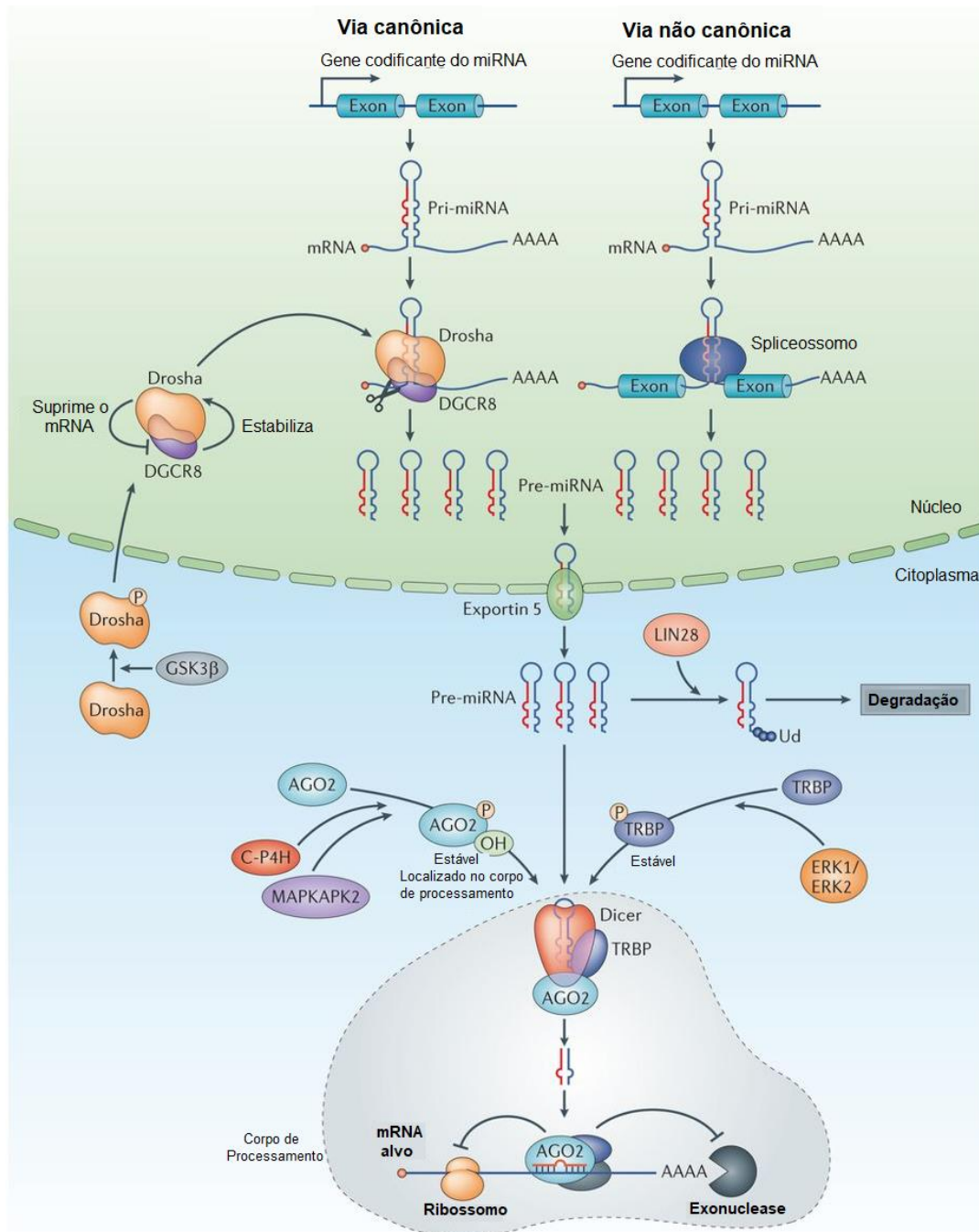
Os miRNAs são codificados a partir de regiões intragênicas e intergênicas que constituem as vias canônicas e não-canônicas de biogênese do miRNA (LI, Zhonghan; RANA, 2014). Na via canônica ocorre a transcrição do miRNA pela RNA polimerase II que produz um transcrito primário longo denominado pri-miRNA (miRNA primário). Este pri-miRNA será processado pelo complexo Drosha-DGCR8 (do inglês, *DiGeorge syndrome critical region 8*) que atuam como endonucleases para gerar um pré-miRNA (miRNA precursor). O pré-miRNA, por sua vez, é transportado ao citoplasma pela *exportin 5* e processado pelo complexo Dicer-TRBP (do inglês, *TAR RNA-binding protein 2*) em um miRNA dupla-fita contendo o miRNA alvo e sua fita complementar, que posteriormente será degradada (HA, Minju; KIM, 2014).

Após o processamento, o miRNA maduro se liga ao complexo de silenciamento contendo AGO2 (*Argonaute 2*), formando o complexo miRISC (do inglês, *miRNA-induced silencing complex*) e é capaz de se ligar e regular o alvo. No caso da via não canônica, há a síntese de um mRNA e no seu processamento há a liberação de regiões intrônicas através do spliceossomo. Devido a origem intrônica do miRNA na via não canônica, este pode ser chamado de mirtrons que são estruturalmente semelhantes a pré-miRNAs (CHUROV; OLEINIK; KNIP, 2015; HA, Minju; KIM, 2014; LI, Zhonghan; RANA, 2014).

A regulação de todas as etapas do processo de biogênese de miRNA é bastante rigorosa, ocorrendo por exemplo a estabilização da TRBP pela fosforilação mediada por enzimas ERK e fosforilação da AGO mediada por enzimas como MAPK e hidroxilação mediada pela enzima C-P4H (CHUROV; OLEINIK; KNIP, 2015; HA, Minju; KIM, 2014; LI, Zhonghan; RANA, 2014) (Figura 12).

Figura 12 Via canônica e não canônica de biogênese de miRNAs. A via canônica ocorre a transcrição do miRNA a partir do seu gene que gera um pri-miRNA com posterior processamento pelo complexo Drosha-DGCR8 e formação do pre-miRNA. Na via não canônica ocorre a síntese de um mRNA que libera regiões intrônicas através

do processo do spliceossomo e são formados os pré-miRNAs. Os pré-miRNAs vão para o citoplasma através da *exportin 5* e podem ser degradados de imediato se sofrerem ubiquitinação ou podem ser processados e ativos pelo complexo Dicer-TRBP-AGO. O TRBP é recrutado mediante a fosforilação por ERK1/2 e a AGO2 é recrutada mediante MAPK e C-P4H. O processamento do miRNA dupla-fita que terá uma das fitas degradadas tornando-se fita única ocorre dentro do Corpo de Processamento, bem como sua ligação no mRNA alvo.



Fonte: Imagem adaptada de Li and Rana (2014).

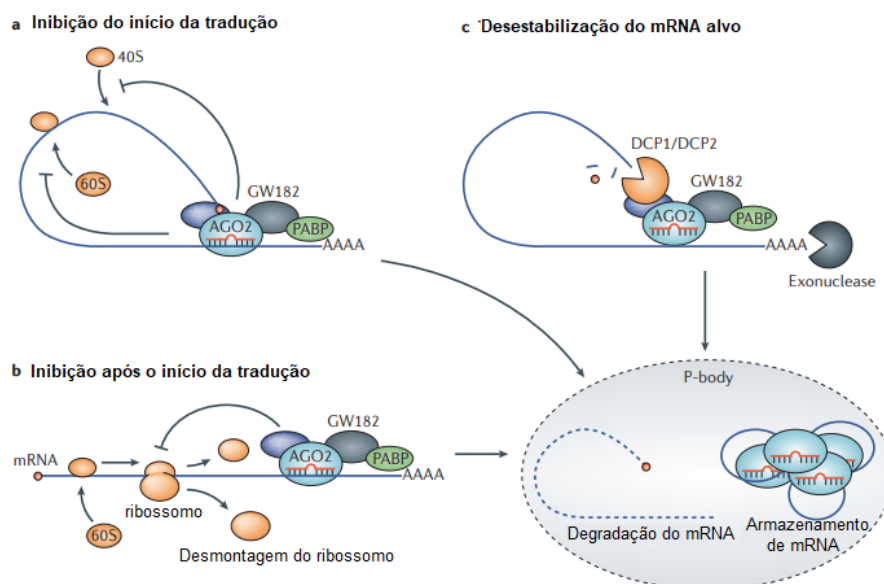
A ligação entre um miRNA e seu mRNA alvo é completa apenas em alguns casos, o comum é ocorrer uma complementariedade parcial, envolvendo 6 a 7 nucleotídeos localizados na extremidade 5' do miRNA e, esta região é denominada região semente que se ligará a uma

sequência complementar do mRNA alvo em sua região 3'UTR. A região semente é o fator decisivo na ligação do alvo e, devido ao seu tamanho limitado, estima-se que um mesmo miRNA possa regular centenas de genes diferentes (WEI, Jian-Wei *et al.*, 2017). Alguns locais de ligação em regiões 5'UTR e regiões codificantes do mRNA também podem ser alvo de miRNAs, embora com uma frequência bem menor (XU *et al.*, 2014).

A maior parte das evidências científicas indicam que os miRNAs atuam como reguladores negativos, isto é, reprimindo a expressão dos seus mRNAs alvo e isto pode ocorrer mediante a adenilação do mRNA alvo, degradação deste mRNA ou inibição da tradução. No entanto, em certas condições e contextos celulares estes miRNAs podem servir como reguladores positivos da expressão gênica (CHUROV; OLEINIK; KNIP, 2015; FURER *et al.*, 2010; HA, Minju; KIM, 2014).

Ao ligar-se ao alvo, o miRNA pode inibir o início da tradução impedindo o reconhecimento de fatores de iniciação da tradução, como eIF4F e a montagem do complexo ribossômico 80S. Alguns mRNAs que tem seu início de tradução inibido, podem ser armazenados em corpos de processamento para que sua tradução seja ativada quando necessário. A repressão do mRNA também pode ocorrer após o início da tradução através da inibição do alongamento da tradução facilitando a degradação dos peptídeos recém-sintetizados e degradação do mRNA. Além disso, a repressão da tradução pode ocorrer devido a desestabilização do mRNA através da clivagem do CAP 5' e cauda poli-A ou ainda, promovendo a ubiquitinação do mRNA para posterior degradação (HA, Minju; KIM, 2014; O'BRIEN *et al.*, 2018) (Figura 13).

Figura 13 Mecanismos de silenciamento gênico pós-transcricional mediado por miRNAs onde pode ocorrer a degradação do mRNA ou armazenamento do mesmo através de impedimento traducional. A) A inibição do início da tradução ocorre devido ao impedimento na montagem das subunidades de ribossomos; B) O silenciamento gênico ocorre devido a indução da desmontagem do ribossomo; C) O silenciamento ocorre devido a desestabilização do mRNA e indução da sua degradação.



Fonte: Imagem adaptada de Ha and Kim (2014).

miRNAs também parecem exercer funções na regulação positiva de determinados genes, especificamente em contextos celulares e condições específicas (NI; LENG, 2016; O'BRIEN *et al.*, 2018). A ativação traducional mediada por miRNAs não tem um mecanismo molecular completamente elucidado, mas evidências indicam que este processo envolve a proteína FXR1 (do inglês, *Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1*) que se complexa com a AGO2 em vez da nuclease GW182 (BUKHARI *et al.*, 2016; O'BRIEN *et al.*, 2018; VASUDEVAN, S.; TONG; STEITZ, 2007).

Os miRNAs também podem atuar no núcleo ligando-se a regiões promotoras e proteínas de modificação de histonas, tornando determinadas regiões gênicas acessíveis a maquinaria transcricional, embora ainda não se sabe ao certo como esse processo ocorre e se os miRNAs possuem outras funções dentro do núcleo (O'BRIEN *et al.*, 2018; VASUDEVAN, Shobha, 2012). Alguns miRNAs parecem afetar diretamente a transcrição gênica através da ligação com proteínas ligadoras de metil-CpG e proteínas HDAC, embora este mecanismo precise ser melhor investigado (TUDDENHAM *et al.*, 2006; WEI, Jian-Wei *et al.*, 2017; ZARATIEGUI; IRVINE; MARTIENSSEN, 2007).

A ativação de mRNAs específicos por miRNAs também já foi descrita em células com condições de quiescência, como oócitos (VASUDEVAN, Shobha, 2012). Alguns genes como IL-10 e KappaB-Ras2 parecem ser regulados positivamente em macrófagos pelo miR-466l e miR-125b, respectivamente (MA, Feng *et al.*, 2010; MURPHY, Amy J.; GUYRE; PIOLI, 2010).

De toda forma, os miRNAs parecem exercer uma importante regulação na expressão dos seus genes alvos e podem agir na modulação da inflamação, manutenção da homeostase e defesa do hospedeiro contra antígenos, sendo assim relacionados à etiopatogênese da AR (ZHANG, Zimu; ZHANG, 2015; ZHU, Xiaowei *et al.*, 2019).

2.5.1.2 miRNAs na Artrite Reumatoide

Muitos miRNAs que atuam sobre genes importantes para resposta imunológica já foram observados com expressão desregulada em doenças inflamatórias como AR, LES, Síndrome de Sjogren, Esclerose Múltipla e Diabetes Tipo I e outros (PILETIČ; KUNEJ, 2016; ZHANG, Zimu; ZHANG, 2015).

Desregulações nos miRNAs miR-21, miR-146a, miR-125b, miR-499 foram reportados em diferentes estudos no sangue e FLS de pacientes com AR, sendo que a maioria desses estudos foram realizados em PBMCs (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) (BOGUNIA-KUBIK *et al.*, 2016; PAULEY *et al.*, 2008; PEREZ-SANCHEZ *et al.*, 2018). A avaliação de miRNAs em PBMCs de pacientes com AR com o objetivo de detectar possíveis marcadores para a gravidade da AR também tem sido estudado, observando-se por exemplo, que o aumento da expressão dos miR-221 e miR-222 foram correlacionados com a atividade da doença (ABO ELATTA *et al.*, 2019). Além disso, alguns estudos foram realizados em células específicas como miR-146a, miR-26, miR-16 e miR-155 em linfócitos CD4, linfócitos B (NIIMOTO *et al.*, 2010) ou monócitos (RAJASEKHAR *et al.*, 2017).

No contexto da sinóvia, estudos também verificaram que desregulações em diversos miRNAs têm papéis importantes em funções inflamatórias, como produção de citocinas, e catabólicas, como produção de proteases que degradam a matriz óssea (MMPs), na articulação (DOODY; BOTTINI; FIRESTEIN, 2017; STANCZYK *et al.*, 2008; VICENTE *et al.*, 2016).

O aumento da expressão de alguns miRNAs como miR-221, miR-323-3p e outros, parecem ter um efeito significativo sobre a produção de citocinas e quimiocinas, proliferação de células sinoviais como FLSs, e consequente dano tecidual da AR (DOODY; BOTTINI; FIRESTEIN, 2017; VICENTE *et al.*, 2016). Um estudo de meta-análise baseado em SMD (do inglês, *Standardized Mean Difference*) reportou o aumento significativo da expressão de miRNAs como, miR-16, miR-24, miR-26a, miR155 e miR-223, que desempenham um papel importante na membrana sinovial e estão relacionados ao processo de osteoclastogênese, bem como a destruição óssea e cartilaginosa (ZHANG, Lian *et al.*, 2020).

De acordo com essas informações, sabe-se que os genes *MYD88*, *IRAK3*, *NFKB1* e *TRAF6* estão desregulados na AR e possuem um significado clínico importante para doença, devido aos seus papéis chaves na inflamação. No entanto, não é claramente elucidado quais células são responsáveis por essa desregulação. A partir disto, nós hipotetizamos que a expressão desses genes pode estar desregulada em monócitos de pacientes com AR e que fatores epigenéticos como a ação de miRNAs poderiam estar atuando em seus genes alvos, o que poderia estar envolvido no desenvolvimento e patogênese da doença.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos genes *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* e *NFKB1* e miRNAs regulatórios em monócitos CD14⁺ e sua relação com o desenvolvimento e patogênese da Artrite Reumatoide e inflamação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a relação entre a expressão dos genes *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* e *NFKB1* em monócitos de pacientes com AR e controles saudáveis com o desenvolvimento e gravidade da doença;
2. Identificar, *in silico*, miRNAs com possível função regulatória sobre os genes *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* e *NFKB1*.
3. Verificar a relação entre a expressão dos miRNAs preditos (miR-194-5p, miR-124a-3p, miR-9-5p e miR-340-5p) em monócitos de pacientes com AR e controles saudáveis com o desenvolvimento e gravidade da doença;
4. Avaliar a correlação entre a expressão dos miRNAs e a expressão dos genes em monócitos;
5. Analisar a influência desses genes e miRNAs sobre a inflamação mediante análise de correlação entre a expressão dos genes e miRNAs e os níveis plasmáticos de citocinas (TNF- α , IL-6, IL-2, IL-4, IFN- γ e IL-10).

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 : MYD88, IRAK3 AND RHEUMATOID ARTHRITIS PATHOGENESIS: ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN CD14+ MONOCYTES AND THE INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS

Artigo publicado na revista *Immunobiology* com Fator de Impacto de 3.144. Vide Apêndice A

4.2 ARTIGO 2: MIRNAS AND NFKB1 AND TRAF6 TARGET GENES: THE INITIAL FUNCTIONAL STUDY IN CD14+ MONOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS

Artigo submetido na revista “Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis” com Fator de Impacto de 4.291.

TITLE: miRNAs and *NFKB1* and *TRAF6* target genes: the initial functional study in CD14+ monocytes in Rheumatoid arthritis patients

RUNNING TITLE: NFKB1, TRAF6 and miRNAs expression in RA

ARTICLE TYPE: Original research articles - Full length article

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva; Denise de Queiroga Nascimento; Alexandre Domingues Barbosa; Fabricio Oliveira Souto; Maria de Mascena Diniz Maia; Sergio Crovella; Paulo Roberto Eleuterio de Souza; Paula Sandrin-Garcia.

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva
PostGraduate Program in Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Recife, Pernambuco, Brazil
Orcid Number: 0000-0002-6188-8483

Denise de Queiroga Nascimento
PostGraduate Program in Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Recife, Pernambuco, Brazil

Alexandre Domingues Barbosa
Policlínica Jamacy de Medeiros; Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil
Hospital das Clínicas of Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Fabricio Oliveira Souto
Center of Agreste Region, Federal University of Pernambuco, Caruaru, Pernambuco, Brazil.
Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Recife, Pernambuco, Brazil

Maria de Mascena Diniz Maia
Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Sergio Crovella
Department of Biological and Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, P.O. Box: 2713, Doha, Qatar.

Paulo Roberto Eleutério de Souza
Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Paula Sandrin-Garcia
Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.
Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Recife, Pernambuco, Brazil

Correspondence to: Msc Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil
Address: Rua Prof Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária – CEP: 50670-901, Recife-Pernambuco - Brazil.
E-mail: iisauragomes@gmail.com
Telephone number: +55 (81) 2126-8520

Abstract

Purpose: We predicted miRNAs with regulatory impact on *NFKB1* and *TRAF6* gene expression and performed miRNAs and mRNAs expression analyses on CD14⁺ monocytes from RA patients and healthy controls. Additionally, we evaluated the influence of genes and miRNAs expression on cytokine levels and clinical features of RA patients.

Methods: We selected the miR-194-5p, miR-124-3p, miR-9-5p and miR-340-5p to conduct the analyses. The CD14⁺ monocytes from RA patients and healthy controls was purified using positive sorting with Dynabeads CD14. Genes and miRNAs expression was assessed by qRT-PCR, while cytokine levels was assessed by flow cytometer.

Results: No difference was observed in relation to genes or miRNAs expression when compared healthy controls and RA patients or clinical parameters. However, the treatment with prednisone seems to influence the miR-194-5p and miR-9-5p levels (FC=-2.31;p=0.031; FC=-3.05;p=0.031, respectively). To identify the strength of relationship between expression data and cytokine plasma levels, we conducted correlation analyses. We observed a moderate positive correlation between miR-124-3p expression and IL-6 plasma levels ($r=0.46$; $p=0.033$). In addition, overexpression of miRNAs was concomitant to overexpression of its target genes as indicated by correlation analyses: *TRAF6* and miR-194-5p ($r=0.60$; $p<0.001$) and miR-9-5p ($r=0.63$; $p<0.001$) and *NFKB1* and miR-194-5p ($r=0.72$; $p<0.001$), miR-9-5p ($r=0.72$; $p<0.001$) and miR-340-5p ($r=0.61$; $p<0.001$).

Conclusions: *NFKB1* and *TRAF6* genes and miRNAs appear to be influenced by the RA therapy, however not influence in the development or pathogenesis of RA. In addition, increased levels of miRNAs can be linked to concomitant overexpression of *TRAF6* and *NFKB1* in monocytes and acts as its regulators.

Keywords: miR-194; miR-124; miR-9, miR-340; *NFKB1*; *TRAF6*.

Declarations

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflicts of interest/Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Availability of data and material

Not applicable

Code availability

Not applicable

Author contributions

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

Ethics approval

This study was approved by Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (CAAE 10035418.4.0000.5208)).

Consent to participate

All participants signed a written informed consent according to the Declaration of Helsinki.

Consent for publication

Not applicable

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a complex and autoimmune disease that affects joints and can promote irreversible disability to patients (Smolen et al. 2018). RA can be triggered by genetic, epigenetic and environmental factors, however, its etiology is not fully understood. miRNAs can be related to RA trigger and its pathogenesis once it can influence gene regulation thus leading to increased cytokines, chemokines and autoantibodies and promoting tissue damage (de la Rica et al. 2013).

In addition, until now, the role of innate immunity cells is not clear in the etiology or pathogenesis of the disease, besides, evidence is emerging to support the influence of monocytes on the RA (Evans et al. 2009; Stuhlmüller et al. 2010; Tsukamoto et al. 2017; Smiljanovic et al. 2018). Literature data indicates that biomarkers on monocytes could help to predict therapeutic response in RA or indicate disease activity in other autoimmune diseases as Systemic lupus erythematosus (SLE) (Stuhlmüller et al. 2010; Abd-Elhamid et al. 2017; Smiljanovic et al. 2018).

Transcriptome analysis of monocytes from RA patients indicated a dysregulation of inflammatory molecules when compared osteoarthritis (OA) patients and healthy controls and among these the NFκB pathway being the most important (Smiljanovic et al. 2018). The NFκB pathway is related to inflammation due participation in the processes of activation, differentiation and homeostasis of immune cells, and secretion of pro-inflammatory cytokines (Sun et al. 2013; Liu et al. 2017). The NFκB family is a complex formed by two subunits (homodimer or heterodimer) composed by NFκB1, NFκB2, RelA, RelB and c-Rel (Sun et al. 2013; Liu et al. 2017). The heterodimer composed by NFκB1/ RelA or NFκB1/c-Rel is predominant in different immune cells and to play a role in autoimmunity (Lawrence 2009; Sun et al. 2013). In addition, a key molecule for NFκB activation is the tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6) (Walsh et al. 2015). TRAF6 is a cytoplasmatic adaptor protein responsible for promoting a signal transduction induced mainly by TNFR and IL1R, which leads to activation of NFκB pathway (Walsh et al. 2015). TRAF6 also mediates signals of various cellular receptors and acts in immunoregulatory functions, development, homeostasis, and activation of immune and non-immune cells (Wang et al. 2015a; Walsh et al. 2015; Zhu et al. 2017).

The expression increase of TRAF6 and NFκB1 in RA patients synovium promotes a higher concentration of inflammatory cells in the joint, and consequently tissue damage in synovium (Zhu et al. 2012; Świerkot et al. 2016; Liu et al. 2017; Puchner et al. 2018). However,

there is still no consensus of the monocytes participation in this TRAF6 and NFKB1 genes deregulation and which factors are responsible for this (Smolen et al. 2018).

Some studies verified the interference of miRNAs on the regulation of the *NFKB1* and *TRAF6* genes in cancer (Huang et al. 2016; Wu et al. 2018; Zhu et al. 2020) and cardiovascular diseases (Liang et al. 2019). Specifically in autoimmune diseases only Yue et al (Yue et al. 2019) observed a negative regulation of *NFKB1* mediated by miR-9-5p in BV2 cells in study with multiple sclerosis. Thus, cell assays using monocytes can allow new insights into the pathogenesis of RA and be particularly promising for personalized medicine in the disease (Evans et al. 2009; Davignon et al. 2013; Puchner et al. 2018).

The present study aimed predicting the functional impact of miRNAs on *NFKB1* and *TRAF6* gene expression and performing microRNAs and mRNAs expression analyses in monocytes from RA patients and healthy controls. We also evaluated the influence of genes and miRNAs expression on cytokine levels and the possible clinical significance of these findings in RA pathogenesis.

Materials and Methods

Study participants

Twenty RA patients diagnosed according to the 2010 classification criteria of the American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) (Smolen et al. 2010b) from at the Policlínica Doutor Jamacy de Medeiros and Hospital das Clínicas of Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil was enrolled in our study. Demographics data and clinical features were collected in appropriate questionnaires during clinical care. Biochemical analyses (C reactive protein (CRP), erythrocyte sedimentation rate (ESR), rheumatoid factor (RF)) were evaluated from peripheral blood of each individual participating in the study. Patients included were women naïve for treatment or treated only with glucocorticoid and/or disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) synthetic (methotrexate, leflunomide, sulfasalazine or hydroxychloroquine). The RA patients who received any biological agents were excluded from the study. The RA patients were divided in three subgroups: naïve (untreated patients); monotherapy (RA patients on monotherapy of synthetic DMARDs (methotrexate, leflunomide or hydroxychloroquine)) and combined treatment (RA patients on combined therapy with methotrexate plus hydroxychloroquine or

methotrexate plus sulfasalazine)) for evaluate the relation of the *TRAF6*, *NFKB1* and miRNAs with the treatment strategies. Besides this, we also stratified RA patients according to use of glucocorticoid (prednisone users and non-prednisone users).

The healthy control group consisted of eighteen individuals matched by gender, age, BMI (Body Mass Index) and geographic region. We also performed biochemical analysis (ESR) and excluded individuals with a significant level of inflammation (ESR >30mm/h) and with autoimmune, chronic or infectious diseases. This study was approved by the Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (CAAE 10035418.4.0000.5208) and all subjects signed consent form before enrollment.

miRNA prediction analysis

The miRNAs were chosen using four prediction tools available online (TargetScan 7.1 (Agarwal et al. 2015); DIANA-MicroT (Paraskevopoulou et al. 2013); miRanda-mirSVR (Betel et al. 2010) and PicTar (Krek et al. 2005)). The miRNAs selected for study were predicted at least in three tools are more likely to have an impact on *NFKB1* (Ensembl: ENSG00000109320) or *TRAF6* (Ensembl: ENSG00000175104) gene expression.

Cell Isolation

The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation was performed of peripheral blood collected in vacutainer tubes containing heparin according standard density gradient centrifugation with Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, USA). Subsequently, 1×10^7 cells were used from each individual to purify CD14⁺ monocytes using positive sorting with Dynabeads CD14 (Invitrogen, USA). Posteriorly, cells were labeled with anti-CD14-FITC (BD Biosciences, USA) and anti-CD3-PE-Cy5.5 (BD Biosciences, USA) and incubated for 30 min at 4°C to perform the immunofluorescence analysis in the flow cytometry Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA).

RNA isolation and determination of TRAF6 gene and miRNAs expression

The total RNA from monocytes was extracted using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, USA). The reverse transcription was performed by GoScript Reverse Transcription System (Promega, USA) according to the manufacturer's protocol starting from 500ng of RNA. We performed a quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) using TaqMan probes as

follow: *NFKB1* (ID assay: Hs00765730), *TRAF6* (ID assay: Hs00939742) *GAPDH* (ID assay: Hs03929097), *ACTB* (ID assay: Hs99999903), *18S* (ID assay: Hs03003631). *RPLP0* gene expression also was assessed using SYBR Green assay using 1X SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) and 10 μ M of PCR primers previously validated (de Lima et al. 2019). *NFKB1* and *TRAF6* gene expression was normalized by *GAPDH*, *ACTB*, *18S* and *RPLP0* reference genes.

The TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) was used to perform cDNA of miRNAs analyzed using an input of 10ng of total RNA. Small RNAs analyses were performed with the probes miR-194-5p (ID assay: 000493), miR-124-3p (ID assay: 001182), miR-9-5p (ID assay: 000583), miR-340-5p (ID assay: 002258), *RNU6B* (ID assay: 001093) and *RNU48* (ID Assay: 001006). miRNAs expression was normalized by *RNU48* and *RNU6B* reference small RNAs.

All analyzes were performed in triplicate using ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific, USA). The relative gene expression and miRNA expression was conducted following the Vandesompele method (Vandesompele et al. 2002) and MIQE guidelines (Bustin et al. 2009).

Cytokine Levels

Plasma samples were obtained from 25 individuals (16 RA patients and 9 healthy controls) during PBMC isolation after standard density gradient centrifugation and stored at -80°C until cytokine quantification. Cytokine levels (TNF- α , IL-6, IL-2 and IL-10) were measured using BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II. All analyzes were performed in Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA).

Statistical Analyses

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation to quantitative variables or percentage and number to categorical variables. Relative expression levels were calculated using normalized data (Vandesompele et al. 2002). The normal distribution was tested according to Shapiro-Wilk test and parametric (ANOVA or T Student) or nonparametric (Kruskal-Wallis or Mann–Whitney *U*) tests were used as appropriate. Correlations between two continuous variables were measured using Pearson or Spearman's correlation coefficient (*r*). P values <

0.05 were considered statistically significant. GraphPad Prism 6.0 software was employed for data analysis.

Results

Subjects of study

The demographic and clinical characteristics of RA patients and healthy controls are shown in Table 1. Both group of patients and healthy controls were females with a mean age of 53.20 ± 7.96 years and 53.83 ± 4.54 years, respectively. RA group had mean disease duration of 79.0 ± 81.99 months and presented an active RA (DAS28-ESR: 5.41 ± 1.20 ; CDAI: 28.99 ± 12.97). Three patients were untreated, while nine patients received methotrexate, leflunomide or hydroxychloroquine as monotherapy or in combination with prednisone and eight patients were under treatment with combined synthetic DMARDs (methotrexate plus hydroxychloroquine or methotrexate plus sulfasalazine).

miR-194-5p and miR-124-3p, miR-9-5p and miR-340-5p directly target the 3'UTR of TRAF6 and NFKB1 genes, respectively, according to in silico approach

We identified 87 miRNAs predicted by DIANA-MicroT, 13 miRNAs predicted by TargetScan, 21 miRNAs predicted by miRanda-mirSVR and 2 miRNAs predicted by PicTar how potential binding site of TRAF6. We also considered different scores (DIANA-MicroT: miTG score; TargetScan: context score and Pct score; and miRanda-SVR: miSVR score) to indicate a possible impact on TRAF6 expression and selected the miR-194-5p and miR-124-3p to conduct the assays. Likewise, we found miRNAs with potential binding site in the *NFKB1* predicted by TargetScan (n=16), DIANA-MicroT (n=41), miRanda-mirSVR (n=17) and PicTar (n=1). The miR-9-5p and miR-340-5p were selected for analysis.

TRAF6, NFKB1 and miRNAs expression are not related to development and clinical parameters but are influenced by the RA treatment strategy

We evaluated the *TRAF6* and *NFKB1* genes and miRNAs expression in monocytes from RA patients and healthy controls. Relative expression data did not show significant difference when comparing RA patients with healthy controls to both genes *TRAF6* (FC (Fold Change)=-1.227; p=0.404) and *NFKB1* (FC=-1.013; p=0.798). Likewise miRNA expression data also did not show significant difference when comparing RA patients with healthy controls for miR-

194-5p (FC=-1.042; p=0.796), miR-124-3p (FC=-1.126; p=0.910), miR-9-5p (FC=-1.200; p=0.378) and miR-340-5p (FC=1.482; p=0.448). Data are shown in Figure 1.

In addition, we evaluated the correlations between genes and miRNAs expression with clinical characteristics of RA patients. We did not observe correlations between *TRAF6*, *NFKB1* and miRNAs expression and disease duration, activity disease parameters (DAS28 and CDAI) or biochemical features (ESR and CRP). Furthermore, no significant correlation was found in the inflamed joint counts TJC (tender joints count), SJC (swollen joint count) or disability index, measured by HAQ. Correlations data are shown in Table 2.

Finally, we evaluated the RA therapy influences genes and miRNAs expression. RA patients were stratified according to use of glucocorticoid (prednisone) and we observed that non-prednisone users showed significant lower miR-194-5p expression when compared to prednisone users (FC=-2.31; p=0.031). Similarly, non-prednisone users showed lower miR-9-5p levels when compared to prednisone users (FC=-3.05; p=0.031) (Table 3).

We also stratified RA patients according to use of synthetic DMARDs: RA patients untreated (naive), RA patients on monotherapy of synthetic DMARDs (methotrexate, leflunomide or hydroxychloroquine) and RA patients with combined DMARDs (methotrexate plus hydroxychloroquine or methotrexate plus sulfasalazine). However, we did not observe significant differences among these groups.

miR-124-3p expression in monocytes is positively correlated to IL-6 plasma levels

We performed correlation analyses to verify the influence of *TRAF6* and *NFKB1* genes and miRNAs expression in the TNF- α , IL-6, IL-2 and IL-10 plasma cytokines levels. Correlation data are shown in Table 4. We observed a moderate positive correlation between miR-124-3p expression and IL-6 plasma levels (r=0.46 p=0.033). Besides this, the results indicate a tendency of correlation between *TRAF6* gene expression and IL-10 plasma levels (r = 0.40; p = 0.051). In addition, no significant correlation was observed among genes and miRNAs expression with other plasma cytokines levels.

TRAF6 and NFKB1 genes expression are strongly correlated in monocytes

NFKB1 and *TRAF6* are closely related in many pathways and we decided to assess whether the overexpression of *NFKB1* is concomitant to overexpression of *TRAF6* in

monocytes. Analysis using all individuals of study (RA patients plus healthy controls) showed a strong positive correlation between *NFKB1* and *TRAF6* genes ($r=0.820$; $p<0.001$) (Figure 2a). In the same way, in the subgroup analyses a strong positive correlation was observed in the RA patients group ($r=0.836$, $p<0.001$) and healthy control group ($r=0.831$, $p<0.001$), suggesting that both are related in the inflammatory and non-inflammatory context.

miR-194-5p, miR-9-5p and miR-340-5p may act as regulators of TRAF6 and NFKB1 genes in monocytes

To explore the potential role of miR-194-5p, miR-124-3p, miR-9-5p and miR-340-5p on *TRAF6* and *NFKB1* gene expression we conducted correlation analyses.

A significant correlation was observed between *TRAF6* gene expression and miR-194-5p indicating a moderate positive correlation ($r=0.603$; $p<0.001$) (Figure 2b), which was maintained in the subgroups analysis (RA patients group: $r=0.721$; $p<0.001$; control group: $r=0.521$; $p=0.041$). A positive correlation also was observed between miR-9-5p and *TRAF6* gene ($r=0.636$; $p<0.001$) (Figure 2c) and in the subgroup analyses (RA patients group: $r=0.552$, $p=0.018$; control group: $r=0.723$, $p=0.004$).

On the other hand, we did not find the correlation of *TRAF6* gene expression and miR-124-3p levels in the total individuals ($r=-0.105$; $p=0.562$) or in the subgroups analyzed (RA patients group: $r=0.154$, $p=0.553$; control group: $r=-0.159$, $p=0.556$). Likewise, we did not observe correlation between miR-340-5p and *TRAF6* gene expression in the analysis including total individuals ($r=0.455$; $p=0.149$) or the subgroups analyzed (RA patients group: $r=0.417$, $p=0.098$ and control group: $r=0.573$, $p=0.071$).

Concerning *NFKB1*, the analysis using total subjects showed a strong positive correlation between *NFKB1* and miR-194-5p ($r=0.718$; $p<0.001$) (Figure 2d). Similarly, the subgroups analyzed showed the same findings (RA patients group: $r=0.849$; $p<0.001$; control group: $r=0.642$; $p=0.006$). We also observed a positive and strong correlation between *NFKB1* gene expression and miR-9-5p ($r=0.719$; $p<0.001$) (Figure 2e) and the analysis of the subgroups RA patients ($r=0.719$; $p<0.001$) or controls ($r=0.750$; $p=0.002$). Likewise, a positive correlation also was found between *NFKB1* gene and miR-340-5p ($r=0.606$; $p<0.001$) (Figure 2f) and in the subgroup analyses (RA patients group: $r=0.534$, $p=0.029$; control group: $r=0.727$, $p=0.014$). On the other hand, the *NFKB1* gene expression and miR-124-3p were not correlated in the

group of total individuals ($r=-0.257$; $p=0.142$) or the subgroups (RA patients group: $r=-0.194$, $p=0.454$; control group: $r=-0.306$, $p=0.231$).

Interestingly, our results also indicate strong correlation between all the analyzed miRNAs suggesting that their expression is similar in monocytes (miR-194-5p and miR-9-5p: $r=0.819$ $p<0.001$; miR-194-5p and miR-340-5p: $r=0.661$ $p<0.001$; miR-9-5p and miR-340: $r=0.765$ $p<0.001$).

Discussion

In this study we assessed four main topics related to *TRAF6* and *NFKB1* genes expression and its relationship with inflammation and RA. Firstly, our study evaluated miRNAs with a possible effect on *TRAF6* and *NFKB1* expression through an *in silico* approach. Secondly, we conducted an mRNA and miRNA expression analyses of RA patients and healthy controls in monocytes to assess the clinical significance of these findings to RA. Thirdly, we verified the influence of genes and miRNAs expression on plasma cytokine levels. Fourthly, we verified the correlation of mRNAs and miRNAs expression.

Our results *in silico* showed that miR-9-5p and miR-340-5p seemed to be promising as regulatory factors of *NFKB1*, while miR-194-5p and miR-124-3p can potentially regulate *TRAF6* gene expression. In the supplementary material (SM1), we summarize the main results of published studies on expression of *TRAF6* and *NFKB1* and miR-194-5p, miR-124-3p, miR-9-5p and miR-340-5p and its implication for Rheumatoid arthritis.

In relation to *TRAF6* and *NFKB1* and miRNAs expression in monocytes and RA development or clinical features we did not observe differences in genes and miRNAs expression between RA patients and healthy controls or in relation to clinical features of RA patients (clinical activity indices, serological parameters or treatment). Similar to our findings, no statistical differences was observed by Zhu et al. (2012) when evaluated the relationship among *TRAF6* expression in synovial tissue and clinical features of RA patients, although studies indicated a overexpression of *TRAF6* in synovial of RA and RA-fibroblast-like synoviocytes (RA-FLSs) (Zhu et al. 2012; Wang et al. 2015b). The expression of *NFKB1* gene seems to be relevant to RA severity as observed by Sarmiento Salinas et al. (2018) since the authors reported an upregulation of *NFKB1* in active RA compared to inactive RA patients. In relation to miRNAs expression, we also did not observe statistical differences with development

or clinical parameters of the RA patients. Low levels of miR-9-5p, miR-124-3p and miR-340-5p in plasma or serum of RA patients as compared with controls were observed by Wang et al. (2015b); Goldbergová et al. (2018); Zhang et al. (2020). Likewise, it was observed by De la Rosa et al. (2020) in neutrophils from peripheral blood of RA patients as compared to healthy controls, although no relation was observed in RA severity or biochemical markers in none of these studies. On the other hand, Fernandez-Ruiz et al observed that miR-194-5p was overexpressed in whole blood of RA flare-up patients as compared to sustained remission RA (Fernández-Ruiz et al. 2018).

Interestingly, our findings showed that miR-194-5p can be altered by prednisone therapy since patients using prednisone showed a 2.31-fold increase in levels of this miRNA, while miR-9-5p showed a 3.05-fold increase in its levels in prednisone users. The relation of miR-194-5p and treatment with prednisone was not tested previously, however, a study conducted by Fernández-Ruiz et al. (2018) failed to detect relation between treatment with tofacitinib and miR-194-5p in RA patients. Moreover, to our knowledge, the miR-9-5p levels was not tested for any RA treatment strategies until now. Thus, we suggest that the expression of miR-194-5p and miR-9-5p in monocytes can be important to understand the effect of therapy in RA patients.

Our findings also showed that miR-124-3p levels presented a significant positive correlation with IL-6 levels, while *TRAF6* expression showed a borderline correlation with IL-10 levels ($p = 0.051$). Similarly, miR-124a-3p overexpression promoted a upregulation of TNF- α , IL-6, and IL-1 β production in human cardiac myocyte (HCM) cell line (Liang et al. 2019). On the other hand, in murine macrophage RAW264.7 cell line, the miR-124-3p levels was associated with decreased of TNF α , IL-6 and IL-1 β (Ma et al. 2014) while in serum of RA patients no significant correlation was found between miR-124-3p and IL-6, TNF α or IL-8 cytokine levels (Goldbergová et al. 2018). The miR-194-5p and miR-340-5p levels were related to a downregulation of TNF- α , IL-6 and IL-1 β cytokine levels in mice nucleus pulposus cells and RA-fibroblast-like synoviocytes induced with lipopolysaccharides (Kong et al. 2018; Zhang et al. 2020b) while miR-9-5p plasma levels of RA patients showed no correlation with IL-6, IL-1 β and TNF- α levels (Wang et al. 2015b). Considering the discrepancies of different studies in different cells, we suggested that the influence of these genes and miRNAs expression on cytokine production depends on cellular type and it should be studied in each specific cellular context.

In addition, we verified the correlation between mRNAs and miRNAs expression. Our results showed a very strong positive correlation between *TRAF6* and *NFKB1* genes expression in monocytes. Both genes and its proteins act together to activate NFκB pathway (Walsh et al. 2015; Liu et al. 2017) and probably show a co-expression to promote the inflammation. It is important to note that the closely relationship between both molecules can be explored in personalized medicine as a new approach to diseases that present dysregulation of *TRAF6* or *NFKB1*.

Considering that *TRAF6* and *NFKB1* genes were positively correlated in monocytes, we decided to assess the correlation of all miRNAs (miR-194-5p, miR-124-3p, miR-9-5p and miR-340-5p) and both genes. We observed a strong positive correlation between *TRAF6* with miR-194-5p and miR-9-5p and also *NFKB1* with miR-194-5p, miR-9-5p and miR-340-5p. In contrast with our findings, studies showed that miR-194-5p plays a role in the *TRAF6* suppression in mice nucleus pulposus cells (Kong et al. 2018) and in THP-1 cells (Tian et al. 2015). In relation to *NFKB1*, Bazzoni et al. (2009) found similar results since the *NFKB1* active by TLR4 enhanced miR-9-5p levels in human monocytes. On the other hand, Gu et al. (2016) also found the suppression of *NFKB1* mediated by miR-9-5p in human primary chondrocytes of osteoarthritis patients. Regarding miR-340-5p, Li et al. (2016) found a *NFKB1* downregulation mediated by miR-340 in ovarian cancer cells. Our study and literature data agree that these miRNAs act as regulators of the *TRAF6* and *NFKB1* genes although this regulation appears to occur in different ways in different cell types. miRNAs commonly promote a downregulation of target genes but the opposite effect on specific cellular contexts had been seen (Vasudevan et al. 2007; Vasudevan 2012; Ni and Leng 2016; O'Brien et al. 2018). These studies suggested that miRNA can affect the mRNA translate activation promoting mRNA inactive to translation but not causing its degradation, which can lead to an increase in the number of mRNAs molecules in a specific cellular type (Vasudevan 2012; Ni and Leng 2016). According to this, we suggested that these miRNAs (miR-194-5p, miR-9-5p and miR-340-5p) binds in the 3'UTR region of their target genes (*TRAF6* and *NFKB1*) and blocking its translation through a mechanism in which the cell stores mRNAs ready for translation if needs. Although, in this study a functional analysis between miRNAs and mRNAs was not performed, we provide insights that may encourage future studies to test this hypothesis.

In conclusion, our study showed that expression of the *TRAF6* and *NFKB1* genes and miRNAs in monocytes not play a role in the development and pathogenesis of RA, although miR-194-5p and miR-9-5p levels appear to be influenced by the RA treatment strategy. In addition, we observed a significant correlation between genes and miRNAs analyzed and confirmed the role of miRNAs as regulators of the *TRAF6* and *NFKB1* in monocytes.

Acknowledgements

We would like to thank the Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz Pernambuco) for use its facilities.

Reference

- Abd-Elhamid YA, Eltanawy RM, Fawzy RM, et al (2017) Expression of CD64 on Surface of Circulating Monocytes in Systemic Lupus Erythematosus Patients: Relation to Disease Activity and Lupus Nephritis. *Egypt J Immunol* 24:67–78
- Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife* 4:. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Bazzoni F, Rossato M, Fabbri M, et al (2009) Induction and regulatory function of miR-9 in human monocytes and neutrophils exposed to proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci* 106:5282–5287. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810909106>
- Betel D, Koppal A, Agius P, et al (2010) Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 11:R90. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-8-r90>
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 55:611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Davignon J-L, Hayder M, Baron M, et al (2013) Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 52:590–598. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes304>
- de la Rica L, Urquiza JM, Gómez-Cabrero D, et al (2013) Identification of novel markers in rheumatoid arthritis through integrated analysis of DNA methylation and microRNA expression. *J Autoimmun* 41:6–16. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.12.005>
- De la Rosa IA, Perez-Sanchez C, Ruiz-Limon P, et al (2020) Impaired microRNA processing in neutrophils from rheumatoid arthritis patients confers their pathogenic profile. Modulation by biological therapies. *Haematologica* 105:2250–2261. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.205047>

de Lima CAD, de Lima SC, Barbosa AD, et al (2019) Postmenopausal Osteoporosis reference genes for qPCR expression assays. *Sci Rep* 9:. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52612-9>

Evans HG, Gullick NJ, Kelly S, et al (2009) In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. *Proc Natl Acad Sci* 106:6232–6237. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808144106>

Fernández-Ruiz JC, Ramos-Remus C, Sánchez-Corona J, et al (2018) Analysis of miRNA expression in patients with rheumatoid arthritis during remission and relapse after a 5-year trial of tofacitinib treatment. *Int Immunopharmacol* 63:35–42. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.07.028>

Goldbergová MP, Lipková J, Fedorko J, et al (2018) Relationship of epigenetic variability of miR-124 to extracellular matrix remodelling and age-related MMP-3 expression in rheumatoid arthritis. *Gen Physiol Biophys* 37:703–710. https://doi.org/10.4149/gpb_2018024

Gu R, Liu N, Luo S, et al (2016) MicroRNA-9 regulates the development of knee osteoarthritis through the NF-kappaB1 pathway in chondrocytes: *Medicine (Baltimore)* 95:e4315. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000004315>

Huang T, Kang W, Zhang B, et al (2016) miR-508-3p concordantly silences NFKB1 and RELA to inactivate canonical NF-κB signaling in gastric carcinogenesis. *Mol Cancer* 15:. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0493-7>

Kong L, Sun M, Jiang Z, et al (2018) MicroRNA-194 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6). *Med Sci Monit* 24:3056–3067. <https://doi.org/10.12659/MSM.907280>

Krek A, Grün D, Poy MN, et al (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37:495–500. <https://doi.org/10.1038/ng1536>

Lawrence T (2009) The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001651–a001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>

Li P, Sun Y, Liu Q (2016) MicroRNA-340 Induces Apoptosis and Inhibits Metastasis of Ovarian Cancer Cells by Inactivation of NF-κB1. *Cell Physiol Biochem* 38:1915–1927. <https://doi.org/10.1159/000445553>

Liang Y-P, Liu Q, Xu G-H, et al (2019) The lncRNA ROR/miR-124-3p/TRAF6 axis regulated the ischaemia reperfusion injury-induced inflammatory response in human cardiac myocytes. *J Bioenerg Biomembr* 51:381–392. <https://doi.org/10.1007/s10863-019-09812-9>

Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C (2017) NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther* 2:17023. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>

Ma C, Li Y, Li M, et al (2014) microRNA-124 negatively regulates TLR signaling in alveolar macrophages in response to mycobacterial infection. *Mol Immunol* 62:150–158. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.06.014>

Ni W-J, Leng X-M (2016) miRNA-Dependent Activation of mRNA Translation. *MicroRNA* 5:83–86. <https://doi.org/10.2174/2211536605666160825151201>

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C (2018) Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>

Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Kostoulas N, et al (2013) DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Res* 41:W169–W173. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt393>

Puchner A, Saferding V, Bonelli M, et al (2018) Non-classical monocytes as mediators of tissue destruction in arthritis. *Ann Rheum Dis* annrheumdis-2018-213250. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213250>

Sarmiento Salinas FL, Santillán Benítez JG, Hernández Navarro MD, Mendieta Zerón H (2018) NF- κ B1/IKK ϵ Gene Expression and Clinical Activity in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Lab Med* 49:11–17. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmx033>

Smiljanovic B, Radzikowska A, Kuca-Warnawin E, et al (2018) Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Ann Rheum Dis* 77:300–308. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211649>

Smolen JS, Aletaha D, Barton A, et al (2018) Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primer* 4:. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>

Smolen JS, Landewe R, Breedveld FC, et al (2010) EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis* 69:964–975. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.126532>

Stuhlmüller B, Häupl T, Hernandez MM, et al (2010) CD11c as a Transcriptional Biomarker to Predict Response to Anti-TNF Monotherapy With Adalimumab in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Clin Pharmacol Ther* 87:311–321. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.244>

Sun S-C, Chang J-H, Jin J (2013) Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol* 34:282–289. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.01.004>

Świerkot J, Nowak B, Czarny A, et al (2016) The Activity of JAK/STAT and NF- κ B in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Adv Clin Exp Med* 25:709–717. <https://doi.org/10.17219/acem/61034>

Tian H, Liu C, Zou X, et al (2015) MiRNA-194 Regulates Palmitic Acid-Induced Toll-Like Receptor 4 Inflammatory Responses in THP-1 Cells. *Nutrients* 7:3483–3496. <https://doi.org/10.3390/nu7053483>

Tsukamoto M, Seta N, Yoshimoto K, et al (2017) CD14^{bright}CD16⁺ intermediate monocytes are induced by interleukin-10 and positively correlate with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 19:. <https://doi.org/10.1186/s13075-016-1216-6>

Vandesompele J, Preter KD, Roy NV, Paepe AD (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 12

Vasudevan S (2012) Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs: Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3:311–330. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* 318:1931–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>

Walsh MC, Lee J, Choi Y (2015) Tumor necrosis factor receptor- associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev* 266:72–92. <https://doi.org/10.1111/imr.12302>

Wang H, Chen W, Wang L, et al (2015a) Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 promotes migration of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Mol Med Rep* 11:2761–2766. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3104>

Wang W, Zhang Y, Zhu B, et al (2015b) Plasma microRNA expression profiles in Chinese patients with rheumatoid arthritis. *Oncotarget* 6:. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6449>

Wu J, Ding J, Yang J, et al (2018) MicroRNA Roles in the Nuclear Factor Kappa B Signaling Pathway in Cancer. *Front Immunol* 9:. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00546>

Yue P, Jing L, Zhao X, et al (2019) Down-regulation of taurine-up-regulated gene 1 attenuates inflammation by sponging miR-9-5p via targeting NF- κ B1/p50 in multiple sclerosis. *Life Sci* 233:116731. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.116731>

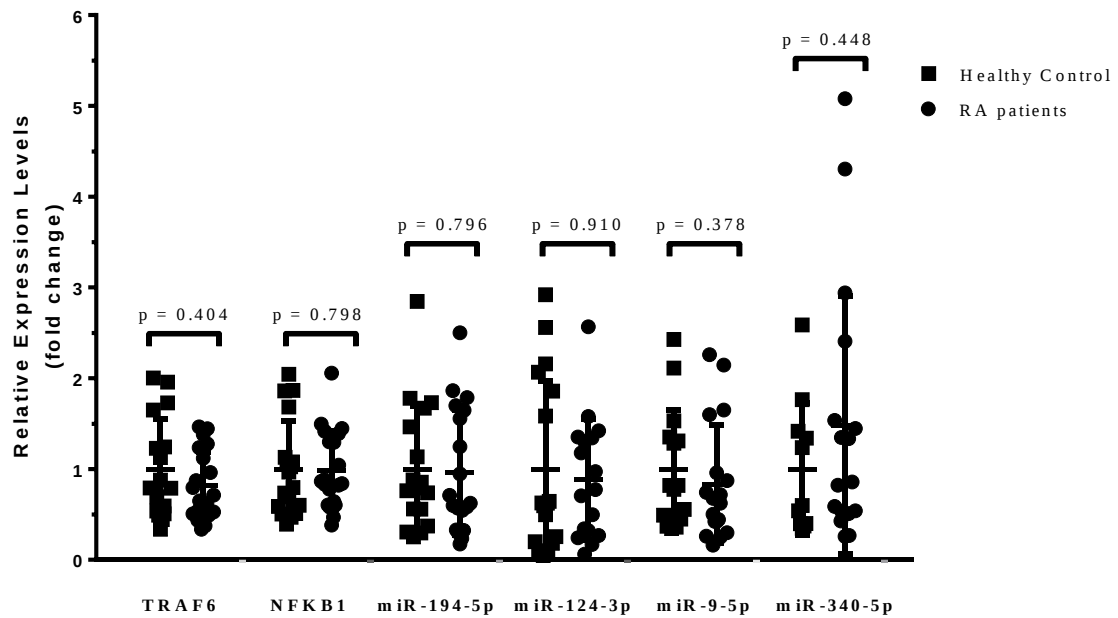
Zhang S, Meng T, Tang C, et al (2020) MicroRNA-340-5p suppressed rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation and induces apoptotic cell number by targeting signal transducers and activators of transcription 3. *Autoimmunity* 53:314–322. <https://doi.org/10.1080/08916934.2020.1793134>

Zhu G, Lin C, Cheng Z, et al (2020) TRAF6-Mediated Inflammatory Cytokines Secretion in LPS-induced Colorectal Cancer Cells Is Regulated by miR-140. *Cancer Genomics - Proteomics* 17:23–33. <https://doi.org/10.21873/cgp.20164>

Zhu L-J, Dai L, Zheng D-H, et al (2012) Upregulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 correlated with synovitis severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 14:R133. <https://doi.org/10.1186/ar3866>

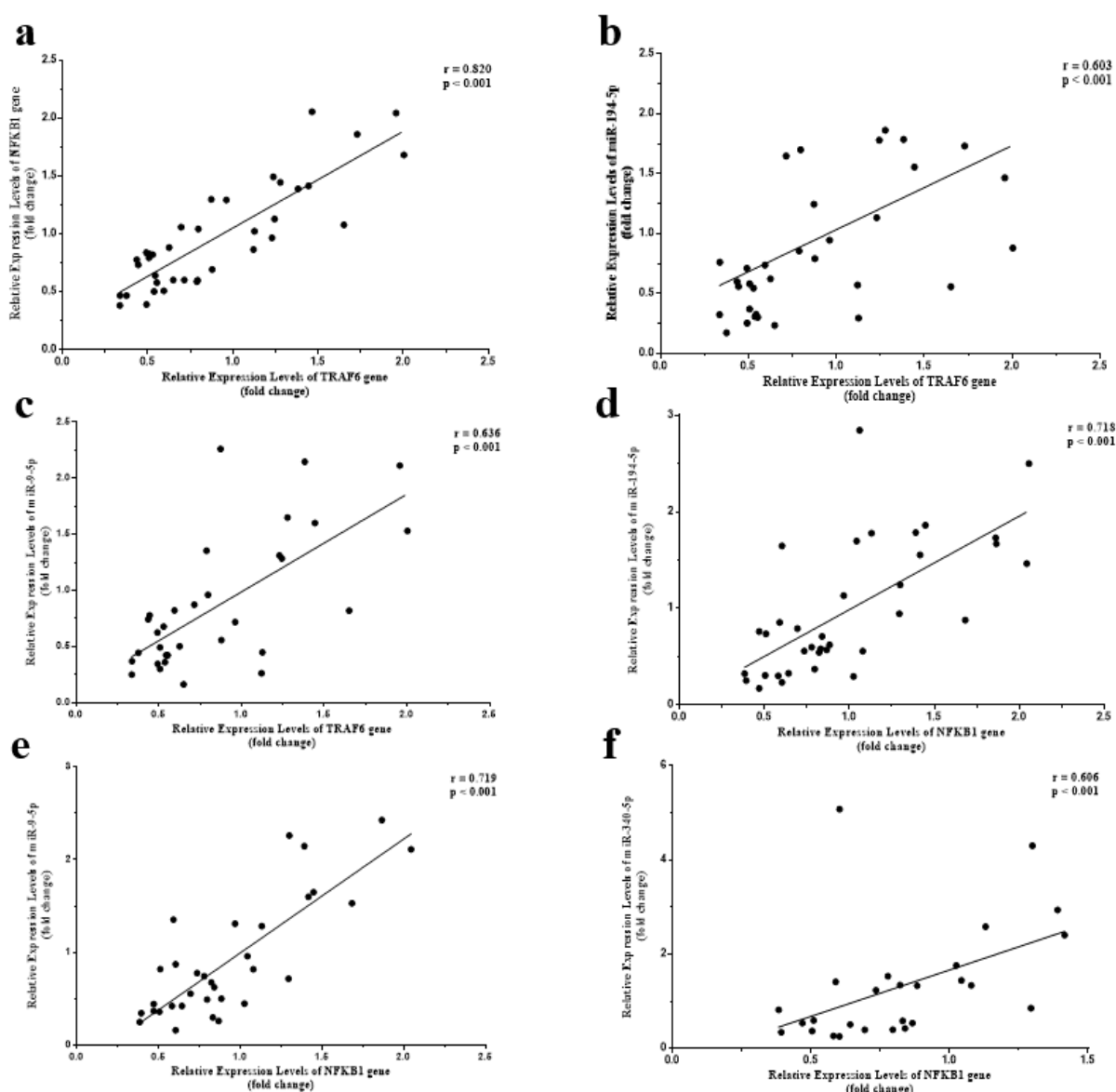
Zhu L-J, Yang T-C, Wu Q, et al (2017) Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 inhibition mitigates the pro-inflammatory roles and proliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Cytokine* 93:26–33. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.001>

Figure 1. Relative expression levels of *TRAF6* and *NFKB1* and miRNAs in monocytes of RA patients and healthy controls. Statistical difference was tested with the non-parametric Mann-Whitney test. Data are presented as mean (central line) and standard deviation (top and bottom of the line).



Fonte: A autora (2021)

Figure 2. Scatter plot demonstrating correlations of mRNAs and miRNAs gene expression (fold change) in monocytes from RA patients and controls using Spearman's correlation analyses. **a** - Correlation between *TRAF6* and *NFKB1* gene expression; **b** – Correlation between *TRAF6* gene expression and miR-194-5p expression; **c** – Correlation between *TRAF6* gene expression and miR-9-5p expression; **d** – Correlation between *NFKB1* gene expression and miR-194-5p expression; **e** – Correlation between *NFKB1* gene expression and miR-9-5p expression; **f** – Correlation between *NFKB1* gene expression and miR-340-5p expression.



Fonte: A autora (2021)

Table 1. Demographic data and clinical parameters features of patients with rheumatoid arthritis and healthy controls

Variable	RA patients (N=20)	Healthy controls (N=18)
Age; mean $\pm$ SD years	53.20 $\pm$ 7.96	53.83 $\pm$ 4.54
BMI; mean $\pm$ SD	27.37 $\pm$ 5.91	26.28 $\pm$ 3.90
ESR, mean $\pm$ SD mm/h	29.40 $\pm$ 11.19	18.47 $\pm$ 7.42
CRP, mean $\pm$ SD mg/L	1.60 $\pm$ 2.09	
Age at RA onset; mean $\pm$ SD years	46.60 $\pm$ 9.48	
Disease duration, mean $\pm$ SD months	79.08 $\pm$ 81.99	
DAS28, mean $\pm$ SD	5.41 $\pm$ 1.20	
CDAI; mean $\pm$ SD	28.39 $\pm$ 12.97	
HAQ; mean $\pm$ SD	0.86 $\pm$ 0.73	
TJC; mean $\pm$ SD	11.05 $\pm$ 9.26	
SJC; mean $\pm$ SD	4.65 $\pm$ 4.73	
Rheumatoid factor positive ^a , n (%)	7 (53.85)	
Joint space narrowing presence ^b , n (%)	8 (80.00)	
Treatment		
Without treatment n (%)	3 (15.00)	
Corticosteroids, n (%)	11 (55.00)	
Methotrexate, n (%)	12 (60.00)	
Hydroxychloroquine, n (%)	9 (45.00)	
Leflunomide, n (%)	2 (10.00)	
Sulfasalazine, n (%)	1 (5.00)	
Hypertension	11 (55.00)	

^a- Data available for 13 patients; ^b- Data available for 10 patients; SD: Standard deviation; BMI: Body Mass Index; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; DAS28: RA disease activity score 28 joint; CDAI: Clinical Disease Activity Index; HAQ: Health Assessment Questionnaire; TJC: Tender joint count; SJC: Swollen joint count.

Fonte: A autora (2021)

Table 2. Correlation between *TRAF6*, *NFKB1* and miRNAs expression in CD14+ monocytes and clinical characteristics of RA patients

Variables	NFKB1 gene		TRAF6 gene		miR-194-5p		miR-124-3p		miR-9-5p		miR-340-5p	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value	R	p-value	r	p-value
Disease duration	0.18	0.450 ^b	-0.02	0.944 ^b	0.12	0.601 ^b	-0.10	0.684 ^b	0.28	0.262 ^b	0.04	0.888 ^b
DAS28	-0.23	0.321 ^a	-0.14	0.567 ^b	-0.29	0.208 ^b	-0.20	0.448 ^a	-0.14	0.578 ^b	-0.29	0.254 ^b
CDAI	-0.26	0.276 ^a	-0.24	0.299 ^b	-0.34	0.139 ^b	-0.20	0.453 ^a	-0.18	0.485 ^b	-0.37	0.141 ^b
HAQ	-0.15	0.516 ^b	-0.30	0.195 ^b	-0.13	0.571 ^b	-0.37	0.145 ^b	-0.11	0.671 ^b	-0.32	0.204 ^b
ESR	-0.18	0.458 ^a	0.10	0.859 ^b	-0.01	0.992 ^b	0.28	0.270 ^a	-0.28	0.253 ^b	-0.11	0.664 ^b
CRP	-0.19	0.517 ^b	0.05	0.859 ^b	-0.21	0.470 ^b	0.31	0.359 ^b	-0.29	0.357 ^b	0.11	0.739 ^b
TJC	-0.19	0.432 ^b	-0.06	0.791 ^b	-0.11	0.638 ^b	-0.09	0.720 ^b	0.04	0.874 ^b	-0.18	0.485 ^b
SJC	0.33	0.166 ^b	0.15	0.530 ^b	0.19	0.436 ^b	-0.29	0.281 ^a	0.11	0.671 ^b	0.06	0.822 ^b

r: correlation coefficient; DAS28: Disease Activity Score 28-joint; CDAI: Clinical Disease Activity Index; HAQ: Health Assessment Questionnaire; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; TJC: Tender joint count; SJC: Swollen joint count;

^a- Correlations was tested using Pearson's correlation test; ^b- Correlations was tested using Spearman's correlation test.

Fonte: A autora (2021)

Table 3. Normalized quantitative expression of *TRAF6* and *NFKB1* genes and miRNAs expression in CD14+ monocytes from RA patients in different treatment strategies.

Variables	NFKB1 gene Mean (SD)	TRAF6 gene Mean (SD)	miR-194-5p Mean (SD)	miR-124-3p Mean (SD)	miR-9-5p Mean (SD)	miR-340-5p Mean (SD)
Treatment strategies						
Naïve (N = 3)	1.107 ± 0.198	1.423 ± 0.679	0.277 ± 0.120	1.346 ± 1.215	0.212 ± 0.169	0.130 ± 0.111
DMARDs as monotherapy (N = 9)	1.531 ± 0.484	1.632 ± 0.703	0.592 ± 0.351	1.480 ± 2.927	0.576 ± 0.413	0.270 ± 0.222
DMARDs combined (N = 8)	1.511 ± 0.869	1.578 ± 0.862	0.845 ± 0.704	1.091 ± 1.464	0.980 ± 1.159	0.782 ± 0.792
P-value	0.606 ^a	0.961 ^a	0.269 ^a	0.756 ^b	0.267 ^b	0.102 ^a
Use of glucocorticoid						
Prednisone user (N= 11)	1.656 ± 0.682	1.744 ± 0.793	0.867 ± 0.575	0.836 ± 1.255	0.979 ± 0.984	0.631 ± 0.679
No Prednisone user (N = 9)	1.218 ± 0.509	1.377 ± 0.634	0.376 ± 0.302	1.877 ± 2.872	0.321 ± 0.246	0.237 ± 0.338
P-value	0.128 ^a	0.277 ^a	0.031 ^b	0.228 ^b	0.031 ^b	0.0941 ^a

SD: Standard deviation; DMARDs; Naïve: RA patients untreated; DMARDs as monotherapy: RA patients treated with methotrexate, leflunomide or hydroxychloroquine as monotherapy; DMARDs combined: RA patients treated with combined therapy (methotrexate plus hydroxychloroquine or methotrexate plus sulfasalazine). Bold means significant

^a- Statistic was tested using parametric tests (Unpaired t test or ANOVA); ^b- Statistic was tested using non-parametric tests (Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests).

Fonte: A autora (2021)

Table 4. Correlation between *TRAF6*, *NFKB1* and miRNAs expression in CD14+ monocytes and TNF- α , IL-6, IL-2 and IL-10 plasma cytokines levels from RA patients and healthy controls.

Variables	NFKB1 gene		TRAF6 gene		miR-194-5p		miR-124-3p		miR-9-5p		miR-340-5p	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value	R	p-value	r	p-value
TNF- α	0.12	0.556	0.14	0.515	-0.05	0.821	-0.05	0.824	0.04	0.859	-0.09	0.713
IL-6	0.19	0.373	0.25	0.247	0.20	0.367	0.46	0.033	0.01	0.984	-0.01	0.981
IL-2	0.31	0.134	0.23	0.276	0.33	0.125	-0.01	0.986	0.29	0.187	0.23	0.373
IL-10	0.34	0.093	0.40	0.051	0.17	0.441	0.08	0.719	-0.03	0.899	-0.2	0.951

r: correlation coefficient; BMI: Body Mass Index; DAS28: Disease Activity Score 28-joint; CDAI: Clinical Disease Activity Index; HAQ: Health Assessment Questionnaire; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; TJC: Tender joint count; SJC: Swollen joint count.

Correlations was tested using Spearman's correlation test. Bold means significant.

Fonte: A autora (2021)

Supplementary material: Table summarizing results of the main published studies on expression of TRAF6 and NFKB1 genes and miR-194-5p, miR-124-3p, miR-9-5p and miR-340-5p its implication for Rheumatoid arthritis

Genes and miRNAs	Author(s) and Year	Type of sample	Findings
TRAF6	(Zhu et al. 2012)	RA synovium	TRAF6 was overexpressed in RA synovium as compared to osteoarthritis and orthopedic arthropathies patients. It was observed a positive correlation between TRAF6 expression and synovitis score and inflammatory cell infiltration, although no significant difference in RA clinical features (DAS28-CRP, ESR, CRP, RF, ACPA, TJC, SJC, HAQ and erosion) was seen.
	(Wang et al. 2015a)	Mouse collagen-induced arthritis (CIA) Human RA- fibroblast-like synoviocytes (RA-FLSs)	TRAF6 was overexpressed in CIA joints as compared to normal DBA/1 mice and human RA-FLSs as compared to osteoarthritis-FLSs. In addition, TRAF6 inhibition by siTRAF6 reduced the severity of RA, joint inflammation and matrix metalloproteinase in mice. TRAF6 inhibition by Anti-TRAF6mAb in human RA-FLSs reduced IL-1 β -stimulated migration, invasion and MMP-1, MMP-3 and MMP-9 secretion.
	(Zhang et al. 2015)	RA- fibroblast-like synoviocytes (RA-FLSs)	Sinomenine treatment in RA-FLSs reduced gene and protein expression of TRAF6 and promotes reduction in RA-FLS proliferation, prevention of cartilage and subchondral bone destruction
	(Wu et al. 2016)	WDFY3 transgenic Mice	WDFY3-deficient bone marrow-derived macrophages showed an increased levels of TRAF6 mRNA and protein as compared to bone marrow-derived macrophages wild type and the osteoclastogenesis in WDFY3-deficient cells is TRAF6 dependent.
	(Zhu et al. 2017)	RA- fibroblast-like synoviocytes (RA-FLSs)	TRAF6 was overexpressed in RA-FLSs as compared to osteoarthritis-FLSs. In addition, TRAF6 inhibition by lentiviral transfection reduced

		secretion of cytokines (IL-1 β , IL-8, IL-6, TNF- α) and matrix metalloproteinase (MMP-13, and MMP-3) and reduced RA-FLSs proliferation.
	(Brenke et al. 2018)	Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) Mouse collagen-induced arthritis (CIA)
	(Puchner et al. 2018)	Mouse monocytes
	(Liu et al. 2019b)	Mouse collagen-induced arthritis (CIA)
	(Han et al. 1998)	RA synovial tissue Mouse collagen-induced arthritis (CIA)
NFKB1	(Campbell et al. 2000)	Mouse collagen-induced arthritis (CIA)
	(Benito et al. 2004)	RA synovial tissue

A small-molecule modulator (C25-140) reduced the TRAF6–Ubc13 protein interaction and promoted a reduction of TNF- α , IL-6 and IL-1 β production in PBMCs and murine cells. In addition, in CIA model the treatment promoted ameliorated of arthritic index and symptoms of RA

TRAF6 (mRNA and protein levels) was overexpressed in RA non-classical monocytes subset (Ly6C-) compared with classical monocytes subsets (Ly6C+) in mice.

A histone modification (neddylation at Lys124) of TRAF6 gene regulates IL-17A-induced NF- κ B activation.

NF κ B1 was overexpressed in RA synovial tissue as compared to normal synovial tissue although no difference was seen when compared to osteoarthritis. In addition, the ability of NF κ B1 to bind to DNA was increased in RA patients as compared to osteoarthritis and in mice CIA

NFKB1 $-/-$ mice showed a decrease of incidence and severity of arthritis in CIA. In addition, the synovial cells in acute arthritis showed a higher nuclear translocation of p50 (NF κ B1 isoform)

RA patients showed a overexpression of NF κ B1 in cartilage-pannus junction as compared to synovial tissue of psoriatic arthritis and osteoarthritis

MiR-194-5p

(Ahmed et al. 2018)	Synovial membrane and articular cartilage of osteoarthritis (OA) patients	There was not significant differences in NFKB1 gene expression in articular cartilage and synovial membrane when compared OA patients and postmortem controls. In addition, there was not correlation between NFKB1 expression and <i>IL-8</i> , <i>IL-6</i> , or <i>MMP3</i> gene expression
(Sarmiento Salinas et al. 2018)	Leukocytes from peripheral blood	NFBK1 was upregulated in active RA compared as inactive RA and the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs also affect the expression.
(Zhang et al. 2018)	RA- fibroblast-like synoviocytes (RA-FLSs)	Aspirin reduces p-P50 (phosphorylated NFκB1 isoform) levels in RA-FLSs, however, remained unchanged levels of other NFκB1 isoforms (P50, p-P105 and P105). In addition, aspirin promoted apoptosis and inhibit the proliferation of RA-FLS.
(Sabir et al. 2019)	RA synovial tissue	NFBK1 was upregulated in RA synovial tissue as compared to healthy controls
(Xu et al. 2012)	human adipose derived stem cells (hASCs) primary chondrocytes of osteoarthritis (OA)	MiR-194-5p downregulation enhanced the chondrogenic differentiation in human adipose derived stem cells (hASCs). In addition, miR-194-5p was overexpressed in IL-1β induced – primary chondrocytes of osteoarthritis patients.
(Tian et al. 2015)	THP-1 cell line	MiR-194-5p promotes a downregulation of <i>TRAF6</i> gene and TNF-α production in THP-1 cells stimulated by saturated fatty acid palmitic acid (PA)
(Meng et al. 2015)	whole blood of women with postmenopausal osteoporosis	MiR-194-5p was overexpressed in postmenopausal women with osteoporosis as compared to postmenopausal women with osteopenia or postmenopausal women with normal bone mineral density

MiR-124-3p	(Fernández-Ruiz et al. 2018)	Whole blood of RA patients	miR-194-5p was overexpressed in RA flare-up patients as compared to sustained remission RA patients. In addition, treatment with tofacitinib does not affect miR194-5p expression.
	(Kong et al. 2018)	mice nucleus pulposus cells	miR-194-5p was downregulated in nucleus pulposus cells induced by LPS and miR-194-5p mimics assay promotes a downregulation of inflammatory cytokines genes expression (TNF- α , IL-1 β and IL-6), In addition, miR-194-5p overexpression reduced TRAF6 gene expression.
	(Shen et al. 2019)	Whole blood of intervertebral disc degeneration (IDD) patients	miR-194-5p was downregulated in patients with intervertebral disc degeneration as compared to healthy controls
	(De la Rosa et al. 2020)	Neutrophils of RA patients	miR-194-5p was downregulated in neutrophils from peripheral blood of RA patients as compared to healthy controls
	(Nakamachi et al. 2009)	RA synoviocytes	MiR-124a-3p was downregulated in RA synoviocytes as compared to osteoarthritis synoviocytes and inhibited the proliferation of RA synoviocytes
	(Ma et al. 2014)	peripheral leukocytes of patients with pulmonary tuberculosis murine macrophage RAW264.7 cell line	MiR-124-3p is overexpressed in the peripheral leukocytes of patients with pulmonary tuberculosis as compared to controls and it downregulated TRAF6 expression in murine macrophage RAW264.7 cells. In addition, miR-124a-3p overexpression promoted a downregulation of IL-6 and TNF- α levels.
	(Qiu et al. 2015)	Mice microglial cells (BV2 cells) HEK293T cell line	MiR-124-3p overexpression promotes a decreased in TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in BV2 cells. In addition, miR-124a-3p promotes a downregulation of TRAF6 gene and protein in HEK293T cells.

MiR-9-5p	(Nakamachi et al. 2016)	adjuvant-induced arthritis (AIA) mice	miR-124a-3p promotes a inhibition of RA synoviocytes proliferation, leucocyte infiltration and cartilage or bone damage in adjuvant-induced arthritis (AIA) mice of RA synoviocytes, In addition, miR-124 decreased osteoclast differentiation in AIA mice.
	(Goldbergová et al. 2018)	Serum of RA patients	MiR-124a-3p was downregulated in serum of RA patients as compared to controls and it was not correlated to clinical disease (DAS28, radiographic progression, autoantibodies ACPA and RF). In addition, miR-124-3p was not correlated to IL-6, TNF-a, IL-8, IL-13, IL-15 but it is correlated to MMP-3 levels.
	(Li et al.)	RA synovial fibroblasts	MiR-124a-3p was downregulated in RA synovial tissue as compared to osteoarthritis and joint trauma patients. In addition, miR-124a-3p inhibited the proliferation and invasion of RA synovial fibroblasts and promoted a downregulation in genes and proteins of MMP3, MMP13 and IL-1 β .
	(Liang et al. 2019)	human cardiac myocytes cell line	Overexpression of miR-124-3p promotes downregulation of <i>TRAF6</i> gene and upregulation of TNF- α , IL-6, and IL-1 β production in human cardiac myocyte (HCM) cell line.
	(Wei et al. 2019)	SW480 cell line	Overexpression of miR-124-3p promotes downregulation of <i>TRAF6</i> gene in SW480 cells.
	(Bazzoni et al. 2009)	human monocytes and neutrophils	MiR-9-5p was overexpressed in human monocytes and neutrophils stimulated by LPS and induced the TNF- α and IL-1 β production. In addition, the NFKB1 active by TLR4 enhanced miR-9-5p levels.
	(Guo et al. 2009)	Ovarian cancer cells	MiR-9-5p promoted a downregulation of mRNA and protein levels of NFKB1 in ovarian cancer cells.

(Chen et al. 2009)	Human primary peripheral blood monocytes	miR-9-5p was overexpressed in Human primary peripheral blood monocytes stimulated by oxidized low-density lipoprotein (oxLDL)
(Wang et al. 2015b)	Plasma of RA patients	MiR-9-5p was downregulated in plasma of RA patients as compared to healthy controls, systemic lupus erythematosus or Graves' disease. It was not observe correlation between miR-9-5p and RA severity (DAS28, SJC and TJC) or biochemical markers (CRP and ESR). In addition, it was observed a positive correlation between miR-9-5p plasma levels and TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-4 and CXCL9 levels.
(Magner et al. 2016)	Whole blood of multiple sclerosis patients	MiR-9-5p was overexpressed in relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS) patients as compared to healthy controls
(Gu et al. 2016)	human primary chondrocytes of osteoarthritis (OA)	MiR-9-5p is downregulated in knee osteoarthritis cartilage as compared to healthy controls. In addition, miR-9-5p downregulated NFKB1 and promotes chondrocytes proliferation
(Oka 2017)	Plasma of RA patients	MiR-9-5p levels is not associated to RA associated - interstitial lung disease (RA-ILD)
(Wang et al. 2017)	THP-1 derived macrophage cells Human primary peripheral blood monocytes	MiR-9-5p overexpression promotes a downregulation of IL-1 β and inflammasome activation in THP-1 derived macrophages stimulated by LPS, Alum or oxidized low-density lipoprotein (oxLDL). In addition, the human primary peripheral blood monocytes stimulated by oxLDL also promotes a downregulation of IL-1 β and NLRP3 expression.
Yue et al (Yue et al. 2019)	Mice microglial cells (BV2 cells)	A downregulation of miR-9-5p was observed in BV2 cells stimulated by LPS. In addition, the miR-9-5p overexpression in LPS-induced BV2 cells promotes a downregulation of NFKB1 and TNF- α and IL-6 production.

MiR-340-5p	(Li et al. 2019)	Serum of RA patients	miR-9-5p was downregulated in RA-induced peripheral neuropathy as compared to RA patients without this condition
	(Ma et al. 2016)	Mice Bone marrow macrophages Mice OVX-induced osteoporosis	MiR-340-5p was downregulated during osteoclast differentiation
	(Li et al. 2016)	Ovarian cancer cells	MiR-340-5p promoted a downregulation of mRNA and protein levels of NFKB1 in ovarian cancer cells.
	(De la Rosa et al. 2020)	Neutrophils of RA patients	MiR-340-5p was downregulated in neutrophils from peripheral blood of RA patients as compared to healthy controls
	(Zhang et al. 2020b)	serum, synovial tissues, and fibroblast-like synoviocytes (FLSs) of RA patients	MiR-340-5p was downregulated in serum, synovial tissue and RA-FLSs as compared to healthy controls. In addition, microRNA-340-5p-mimic reduced the RA-FLSs proliferation, cytokines (TNF-a, IL-1b, IL-6 and IL-8) production in RA-FLSs

ESR: Erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; DAS28: RA disease activity score 28 joint; CDAI: Clinical Disease Activity Index; HAQ: Health Assessment Questionnaire; TJC: Tender joint count; SJC: Swollen joint count.

Fonte: A autora (2021)

5 DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo foi dividido em quatro abordagens principais. Inicialmente avaliamos o envolvimento dos genes *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* e *NFKB1* no desenvolvimento e patogênese da Artrite Reumatoide (AR) analisando a expressão gênica diferencial em monócitos CD14+. Avaliamos, in silico, miRNAs com possível efeito regulatório sobre a expressão dos genes *MYD88*, *IRAK3*, *TRAF6* e *NFKB1*. Em seguida, verificamos a influência da expressão dos miRNAs preditos (miR-194-5p, miR-124a-3p, miR-9-5p e miR-340-5p) sobre a expressão dos genes *TRAF6* e *NFKB1* e avaliamos a expressão diferencial dos miRNAs em monócitos CD14+ a fim de verificar seu envolvimento na AR. Por fim, verificamos a correlação entre a expressão destes genes e miRNAs em monócitos CD14+ com os níveis plasmáticos de citocinas como IL-6, IL-2, TNF- α e IL-10.

Este é o primeiro estudo que avalia estes genes em uma análise comparativa entre pacientes com AR e controles saudáveis. Nossos resultados indicaram uma diminuição dos níveis de expressão do gene *IRAK3* em pacientes com AR quando comparados com controles saudáveis. Nós hipotetizamos que a diminuição dos níveis de *IRAK3* nos monócitos de pacientes com AR pode estar relacionada ao desenvolvimento da doença, uma vez que o *IRAK3* atua como um repressor de cascatas de sinalização relacionadas a inflamação (FREIHAT *et al.*, 2019). Até o momento, apenas Smiljanovic *et al.* (2018) avaliaram o transcriptoma de monócitos de pacientes com AR reportando uma expressão diferencial quando comparados com pacientes com osteoartrite. Além disso, o *IRAK3* parece ter alguma relação com a gravidade da doença, uma vez que observamos uma diminuição significativa da expressão deste gene em pacientes com alta atividade da doença, quando comparados com pacientes com baixa atividade da doença.

Além disso, nós não observamos diferenças nas análises de expressão dos genes *MYD88*, *TRAF6* e *NFKB1* em monócitos de pacientes e controles. A relação entre o *MYD88* e AR, contrariamente, foi evidenciada em estudos anteriores realizados em diferentes modelos celulares ou com diferentes abordagens de análise, como a análise comparativa entre AR e osteoartrite (GOMES DA SILVA *et al.*, 2021; GUTIÉRREZ-CAÑAS *et al.*, 2006; SACRE *et al.*, 2007). A relação entre o gene *TRAF6* e a AR ainda é bastante controversa, Zhu *et al.* (2012) não observaram relação entre a expressão deste gene no tecido sinovial e os parâmetros clínicos da doença, contudo estudos mostraram uma super expressão do *TRAF6* em fibroblastos similares a sinoviócitos (WANG, Wenhong *et al.*, 2015). Da mesma forma, a relação entre o *NFKB1* e a AR foi avaliada por Sarmiento Salinas

et al. (2018) que reportaram uma super expressão do gene em leucócitos de sangue periférico de pacientes com AR ativa comparados a pacientes com AR inativa.

Similarmente, nós não observamos diferenças significativas na expressão dos miRNAs em monócitos relacionadas ao desenvolvimento e patogênese da AR. Diferentemente, dados da literatura indicam uma diminuição nos níveis de miR-9-5p, miR-124a-3p e miR-340-5p no plasma ou soro de pacientes com AR quando comparados com controles (GOLDBERGOVÁ *et al.*, 2018; WANG, Wenhong *et al.*, 2015; ZHANG, Lian *et al.*, 2020), assim como em células específicas, como em neutrófilos (DE LA ROSA *et al.*, 2020). Além disso, o miR-194-5p foi super expresso no sangue total de pacientes com flare-up (entram em atividade da doença constantemente) quando comparados com pacientes com remissão sustentada (FERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2018). Esses estudos também não evidenciaram relação entre a expressão desses miRNAs e os parâmetros clínicos da AR (GOLDBERGOVÁ *et al.*, 2018; WANG, Wenhong *et al.*, 2015; ZHANG, Lian *et al.*, 2020). Ademais, nós verificamos um aumento na expressão do miR-194-5p e miR-340-5p em pacientes tratados com prednisona, indicando que este medicamento pode modular a expressão desses miRNAs. A relação entre o medicamento e esses miRNAs não foi testada anteriormente embora um estudo tenha analisado a expressão do miR-194-5p no tratamento com tofacitinib mas sem observar diferenças significativas (FERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2018).

Em relação à avaliação dos níveis de citocinas de perfil Th1 e Th2 (IL-6, IL-2, TNF-alfa e IL-10) no plasma dos indivíduos a fim de verificar o status inflamatório e a relação com os genes e miRNAs analisados, nós observamos uma correlação moderada entre a expressão do miR-124a-3p e os níveis de IL-6 e uma correlação borderline do gene *TRAF6* e IL-10. Não houve correlação significativa entre os outros genes e miRNAs analisados e as citocinas mensuradas. A expressão do miR-124a-3p não foi associada com o aumento nos níveis de IL-6, IL-1B e TNF- α em linhagem celular de cardiomiocitos (LIANG *et al.*, 2019) enquanto foi associado a uma diminuição na expressão dessas mesmas citocinas em linhagem celular de macrófagos de murinos (MA, Chunyan *et al.*, 2014), indicando que o efeito desse miRNA pode ser dependente do tipo celular e outros estudos devem ser feitos em cada contexto celular específico.

No que se refere a análise de miRNAs, ferramentas de predição indicaram a influência do miR-155-3p sobre a expressão dos genes *MYD88* e *IRAK3*, no entanto os experimentos realizados mostraram níveis indetectáveis deste miRNA nos monócitos de

ambos os grupos analisados: pacientes com AR e controles saudáveis. Sendo assim, as análises de miRNA restringiram-se aos genes *TRAF6* e *NFKB1*. As análises *in silico* mostraram que o miR-9-5p e miR-340-5p parecem ser fatores reguladores do gene *NFKB1*, enquanto o miR-194-5p e miR-124a-3p parece ter uma função regulatória do gene *TRAF6*.

Além disso, a expressão dos genes *TRAF6* e *NFKB1* foi fortemente correlacionada em monócitos e, por isso, decidimos averiguar a correlação com todos os miRNAs preditos. Verificamos uma correlação forte e positiva entre a expressão do gene *TRAF6* e miR-194-5p e miR-9-5p, bem como a correlação forte e positiva entre a expressão do gene *NFKB1* e miR-194-5p, miR-9-5p e miR-340-5p. Diferente dos nossos resultados, estudos mostraram uma supressão do *TRAF6* mediada pelo miR-194-5p em células de núcleo pulposo de ratos (KONG *et al.*, 2018) e linhagem celular de THP-1 (TIAN *et al.*, 2015). Em relação ao *NFKB1*, Bazzoni *et al.* (2009) encontraram resultados similares aos nossos uma vez que verificaram que o *NFKB1* ativo por TLR4 pode induzir o aumento do miR-9-5p em monócitos humanos. Por outro lado, Gu *et al.* (2016) verificaram uma supressão do *NFKB1* mediada pelo miR-9-5p em condrócitos humanos de pacientes com osteoartrite. De forma similar, o miR-340-5p induziu uma supressão do *NFKB1* em células de cancer de ovário (LI, Peiquan; SUN; LIU, 2016). Nossos resultados concordam com os dados publicados na literatura que esses miRNAs atuam como reguladores dos genes *TRAF6* e *NFKB1* embora essa regulação ocorra de diferentes maneiras em diferentes tipos celulares.

Em suma, a expressão destes genes parece ter um efeito no desenvolvimento da AR quando avaliadas em alguns tipos celulares específicos. Nós não observamos um papel significativo da expressão destes genes em monocitos CD14⁺ e a AR, no entanto mais estudos devem ser feitos para elucidar a função destes genes no desenvolvimento e gravidade da AR.

6 CONCLUSÕES

A expressão do gene *IRAK3* foi diminuída em monócitos de pacientes com Artrite Reumatoide quando comparados a controles saudáveis e em pacientes com alta atividade da doença quando comparados com pacientes com baixa atividade, indicando um papel deste gene no desenvolvimento e gravidade da doença. Não houve diferenças de expressão dos genes *MYD88*, *TRAF6* e *NFKB1* em monócitos de pacientes com Artrite Reumatoide e controles saudáveis.

Nós identificamos os miR-194-5p e miR-124a-3p com possível função regulatória no gene *TRAF6*, enquanto o miR-9-5p e miR-340-5p foi predito como potencialmente regulatório do gene *NFKB1*. O miR-155-3p foi um potencial miRNA regulatório para os genes *MYD88* e *IRAK3*, no entanto os experimentos realizados mostraram níveis indetectáveis deste miRNA nos monócitos de pacientes com AR e controles saudáveis.

A expressão do miR-194-5p e miR-9-5p foi aumentada em pacientes tratados com prednisona quando comparados a pacientes não tratados, indicando que essa medicação pode modular os níveis destes miRNAs. No entanto, não houve diferenças de expressão dos miRNAs miR-194-5p, miR-124a-3p, miR-9-5p e miR-340-5p em monócitos de pacientes com Artrite Reumatoide e controles saudáveis ou outros parâmetros clínicos da doença.

Foi possível observar também uma super expressão dos genes *TRAF6* e *NFKB1* concomitante à super expressão dos miRNAs miR-194-5p, miR-9-5p e miR-340-5p em monócitos. A forte correlação observada indica que estes miRNAs atuam como reguladores destes genes e levanta a hipótese que a atuação destes possa provocar um bloqueio traducional que favorece um aumento no número de cópias de mRNAs na célula, embora estudos celulares e funcionais sejam necessários para confirmar esta hipótese.

Os níveis das citocinas IL-6, IL2, TNF- α e IL-10 no plasma dos indivíduos não foram correlacionados com a expressão dos genes *IRAK3*, *MYD88*, *TRAF6*, *NFKB1* e miRNAs (miR-194-5p, miR-9-5p e miR-340-5p) em monócitos, embora uma correlação positiva moderada entre os níveis de IL-6 e miR-124a-3p tenha sido observada. Os níveis de IL-4 e IFN- γ ficaram abaixo do limite de detecção nas amostras analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM; ABECASIS, Gonçalo R.; ALTSHULER, David; AUTON, Adam; BROOKS, Lisa D.; DURBIN, Richard M.; GIBBS, Richard A.; HURLES, Matt E.; MCVEAN, Gil A. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature**, v. 467, n. 7319, p. 1061–1073, 28 out. 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09534>.

ABO ELATTA, Amira S.; ALI, Yasser B. M.; BASSYOUNI, Iman H.; TALAAT, Roba M. Upregulation of miR-221/222 expression in rheumatoid arthritis (RA) patients: correlation with disease activity. **Clinical and Experimental Medicine**, v. 19, n. 1, p. 47–53, fev. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10238-018-0524-3>.

AKIRA, Shizuo; UEMATSU, Satoshi; TAKEUCHI, Osamu. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, fev. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>.

ALAM, Jehan; KIM, Yong Chul; CHOI, Youngnim. Potential Role of Bacterial Infection in Autoimmune Diseases: A New Aspect of Molecular Mimicry. **Immune Network**, v. 14, n. 1, p. 7, 2014. <https://doi.org/10.4110/in.2014.14.1.7>.

ALETAHA, D.; SMOLEN, J. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 23, n. 5 Suppl 39, p. S100-108, out. 2005. .

ALETAHA, Daniel; NEOGI, Tuhina; SILMAN, Alan J.; FUNOVITS, Julia; FELSON, David T.; BINGHAM, Clifton O.; BIRNBAUM, Neal S.; BURMESTER, Gerd R.; BYKERK, Vivian P.; COHEN, Marc D.; COMBE, Bernard; COSTENBADER, Karen H.; DOUGADOS, Maxime; EMERY, Paul; FERRACCIOLI, Gianfranco; HAZES, Johanna M. W.; HOBBS, Kathryn; HUIZINGA, Tom W. J.; KAVANAUGH, Arthur; ... HAWKER, Gillian. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis & Rheumatism**, v. 62, n. 9, p. 2569–2581, set. 2010. <https://doi.org/10.1002/art.27584>.

ALURI, Jahnavi; COOPER, Megan A.; SCHUETTPELZ, Laura G. Toll-Like Receptor Signaling in the Establishment and Function of the Immune System. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1374, 2 jun. 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10061374>.

ANGELO, H. D.; GOMES SILVA, I. I. F.; OLIVEIRA, R. D. R.; LOUZADA-JÚNIOR, P.; DONADI, E. A.; CROVELLA, S.; MAIA, M. M. D.; DE SOUZA, P. R. E.; SANDRIN-GARCIA, P. Interleukin-18, interleukin-12B and interferon- γ gene polymorphisms in Brazilian patients with rheumatoid arthritis: a pilot study: IL-18, IL-12B and IFN- γ gene polymorphisms and rheumatoid arthritis. **Tissue Antigens**, v. 86, n. 4, p. 276–278, out. 2015. <https://doi.org/10.1111/tan.12645>.

ARNETT, F. C.; EDWORTHY, S. M.; BLOCH, D. A.; MCSHANE, D. J.; FRIES, J. F.; COOPER, N. S.; HEALEY, L. A.; KAPLAN, S. R.; LIANG, M. H.; LUTHRA, H. S. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 31, n. 3, p. 315–324, mar. 1988. .

BALANDRAUD, Nathalie; ROUDIER, Jean. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine**, v. 85, n. 2, p. 165–170, mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2017.04.011>.

BALLESTAR, Esteban. Epigenetic alterations in autoimmune rheumatic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 5, p. 263–271, maio 2011. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.16>.

BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE HUMAN GENOME SEQUENCING CENTER SEQUENCE PRODUCTION TEAM*; SCHERER, Steven E.; MUZNY, Donna M.; BUHAY, Christian J.; CHEN, Rui; CREE, Andrew; DING, Yan; DUGAN-ROCHA, Shannon; GILL, Rachel; GUNARATNE, Preethi; HARRIS, R. Alan; HAWES, Alicia C.; HERNANDEZ, Judith; HODGSON, Anne V.; HUME, Jennifer; JACKSON, Andrew; KHAN, Ziad Mohid; KOVAR-SMITH, Christie; LEWIS, Lora R.; ... GIBBS, Richard A. The finished DNA sequence of human chromosome 12. **Nature**, v. 440, n. 7082, p. 346–351, mar. 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04569>.

BENITO, Maria J.; MURPHY, Eithne; MURPHY, Evelyn P.; VAN DEN BERG, Wim B.; FITZGERALD, Oliver; BRESNIHAN, Barry. Increased synovial tissue NF- κ B1 expression at sites adjacent to the cartilage-pannus junction in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 6, p. 1781–1787, jun. 2004. <https://doi.org/10.1002/art.20260>.

BOGUNIA-KUBIK, Katarzyna; WYSOCZAŃSKA, Barbara; PIĄTEK, Dagmara; IWASZKO, Milena; CIECHOMSKA, Marzena; ŚWIERKOT, Jerzy. Significance of Polymorphism and Expression of miR-146a and NF κ B1 Genetic Variants in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 64, n. S1, p. 131–136, dez. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00005-016-0443-5>.

BOHUSLAV, J; KRAVCHENKO, V V; PARRY, G C; ERLICH, J H; GERONDAKIS, S; MACKMAN, N; ULEVITCH, R J. Regulation of an essential innate immune response by the p50 subunit of NF-kappaB. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 9, p. 1645–1652, 1 nov. 1998. <https://doi.org/10.1172/JCI3877>.

BONNERT, Timothy P; GARKA, Kirsten E; PARNET, Patricia; SONODA, Gonosuke; TESTA, Joseph R; SIMS, John E. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. **FEBS Letters**, v. 402, n. 1, p. 81–84, 3 fev. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01506-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01506-2).

BOUQUILLARD, Éric; COMBE, Bernard. A report of 21 cases of rheumatoid arthritis following Chikungunya fever. A mean follow-up of two years. **Joint Bone Spine**, v. 76, n. 6, p. 654–657, dez. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2009.08.005>.

BRENKE, Jara K.; POPOWICZ, Grzegorz M.; SCHORPP, Kenji; ROTHENAIGNER, Ina; ROESNER, Manfred; MEININGER, Isabel; KALINSKI, Cédric; RINGELSTETTER, Larissa; R'KYEK, Omar; JÜRJENS, Gerrit; VINCENDEAU, Michelle; PLETTENBURG, Oliver; SATTLER, Michael; KRAPPMANN, Daniel; HADIAN, Kamyar. Targeting TRAF6 E3 ligase activity with a small-molecule inhibitor combats autoimmunity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 34, p. 13191–13203, 24 ago. 2018. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002649>.

BUKHARI, Syed I.A.; TRUEDELL, Samuel S.; LEE, Sooncheol; KOLLU, Swapna; CLASSON, Anthony; BOUKHALI, Myriam; JAIN, Esha; MORTENSEN, Richard D.; YANAGIYA, Akiko; SADREYEV, Ruslan I.; HAAS, Wilhelm; VASUDEVAN, Shobha. A Specialized Mechanism of Translation Mediated by FXR1a-Associated MicroRNP in Cellular Quiescence. **Molecular Cell**, v. 61, n. 5, p. 760–773, mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.013>.

CAO, Zhaodan; XIONG, Jessie; TAKEUCHI, Masahiro; KURAMA, Takeshi; GOEDDEL, David V. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. **Nature**, v. 383, n. 6599, p. 443–446, out. 1996. <https://doi.org/10.1038/383443a0>.

CAPPARELLI, R; DE CHIARA, F; DI MATTEO, A; MEDAGLIA, C; IANNELLI, D. The MyD88 rs6853 and TIRAP rs8177374 polymorphic sites are associated with resistance to human pulmonary tuberculosis. **Genes & Immunity**, v. 14, n. 8, p. 504–511, dez. 2013. <https://doi.org/10.1038/gene.2013.48>.

CARMODY, R. J.; RUAN, Q.; PALMER, S.; HILLIARD, B.; CHEN, Y. H. Negative Regulation of Toll-Like Receptor Signaling by NF- B p50 Ubiquitination Blockade. **Science**, v. 317, n. 5838, p. 675–678, 3 ago. 2007. <https://doi.org/10.1126/science.1142953>.

CASANOVA, Jean-Laurent; ABEL, Laurent; QUINTANA-MURCI, Lluís. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p. 447–491, 2011. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101335>.

CASTRO-SANTOS, Patricia; DÍAZ-PEÑA, Roberto. Genética da artrite reumatoide: é necessário um novo impulso em populações latino-americanas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, n. 2, p. 171–177, mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rbr.2015.08.009>.

CHO, Mi-La; JU, Ji-Hyeon; KIM, Hae-Rim; OH, Hye-Joa; KANG, Chang-Min; JHUN, Joo-Yeon; LEE, Seon-Yeong; PARK, Mi-Kyung; MIN, Jun-Ki; PARK, Sung-Hwan; LEE, Sang-Heon; KIM, Ho-Youn. Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. **Immunology Letters**, v. 108, n. 2, p. 121–128, fev. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.11.005>.

CHUROV, Alexey V.; OLEINIK, Eugenia K.; KNIP, Mikael. MicroRNAs in rheumatoid arthritis: Altered expression and diagnostic potential. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 11, p. 1029–1037, nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.07.005>.

CIECHOMSKA, Marzena; ROSZKOWSKI, Leszek; MASLINSKI, Włodzimierz. DNA Methylation as a Future Therapeutic and Diagnostic Target in Rheumatoid Arthritis. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 953, 22 ago. 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8090953>.

CRISWELL, Lindsey A. The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. **Bulletin of the NYU hospital for joint diseases**, v. 66, n. 3, p. 176–183, 2008. .

CUNNINGHAM, Fiona; ACHUTHAN, Premanand; AKANNI, Wasiu; ALLEN, James; AMODE, M Ridwan; ARMEAN, Irina M; BENNETT, Ruth; BHAI, Jyothish; BILLIS, Konstantinos; BODDU, Sanjay; CUMMINS, Carla; DAVIDSON, Claire; DODIYA,

Kamalkumar Jayantilal; GALL, Astrid; GIRÓN, Carlos García; GIL, Laurent; GREGO, Tiago; HAGGERTY, Leanne; HASKELL, Erin; ... FLICEK, Paul. Ensembl 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D745–D751, 8 jan. 2019. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1113>.

DA ROCHA CASTELAR-PINHEIRO, Geraldo; VARGAS-SANTOS, Ana Beatriz; DE ALBUQUERQUE, Cleandro Pires; BÉRTOLO, Manoel Barros; JÚNIOR, Paulo Louzada; GIORGI, Rina Dalva Neubarth; RADOMINSKI, Sebastião Cezar; RESENDE GUIMARÃES, Maria Fernanda B.; BONFIGLIOLI, Karina Rossi; SAUMA, Maria de Fátima Lobato da Cunha; PEREIRA, Ivânio Alves; BRENOL, Claiton Viegas; COUTINHO, Evandro Silva Freire; DA MOTA, Licia Maria Henrique. The REAL study: a nationwide prospective study of rheumatoid arthritis in Brazil. **Advances in Rheumatology**, v. 58, n. 1, dez. 2018. DOI 10.1186/s42358-018-0017-9. Disponível em: <https://advancesinrheumatology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42358-018-0017-9>. Acesso em: 14 jan. 2020.

DAVIGNON, J.-L.; HAYDER, M.; BARON, M.; BOYER, J.-F.; CONSTANTIN, A.; APPARAILLY, F.; POUPOT, R.; CANTAGREL, A. Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 52, n. 4, p. 590–598, 1 abr. 2013. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes304>.

DE AZEVEDO, Ana Beatriz Cordeiro; FERRAZ, Marcos Bosi; CICONELLI, Rozana Mesquita. Indirect Costs of Rheumatoid Arthritis in Brazil. **Value in Health**, v. 11, n. 5, p. 869–877, set. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4733.2008.00332.x>.

DE HAIR, Maria J H; LANDEWÉ, Robert B M; VAN DE SANDE, Marleen G H; VAN SCHAARDENBURG, Dirkjan; VAN BAARSEN, Lisa G M; GERLAG, Danielle M; TAK, Paul P. Smoking and overweight determine the likelihood of developing rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 72, n. 10, p. 1654–1658, out. 2013. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-202254>.

DE LA RICA, Lorenzo; URQUIZA, José M.; GÓMEZ-CABRERO, David; ISLAM, Abul B.M.M.K.; LÓPEZ-BIGAS, Nuria; TEGNÉR, Jesper; TOES, René E.M.; BALLESTAR, Esteban. Identification of novel markers in rheumatoid arthritis through integrated analysis of DNA methylation and microRNA expression. **Journal of Autoimmunity**, v. 41, p. 6–16, mar. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.12.005>.

DE LA ROSA, Ivan Arias; PEREZ-SANCHEZ, Carlos; RUIZ-LIMON, Patricia; PATIÑO-TRIVES, Alejandra; TORRES-GRANADOS, Carmen; JIMENEZ-GOMEZ, Yolanda; DEL CARMEN ABALOS-AGUILERA, Maria; CECCHI, Irene; ORTEGA, Rafaela; CARACUEL, Miguel Angel; CALVO-GUTIERREZ, Jerusalem; ESCUDERO-CONTRERAS, Alejandro; COLLANTES-ESTEVEZ, Eduardo; LOPEZ-PEDRERA, Chary; BARBARROJA, Nuria. Impaired microRNA processing in neutrophils from rheumatoid arthritis patients confers their pathogenic profile. Modulation by biological therapies. **Haematologica**, v. 105, n. 9, p. 2250–2261, 5 jun. 2020. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.205047>.

DENG, Li; WANG, Chen; SPENCER, Erika; YANG, Liyong; BRAUN, Amy; YOU, Jianxin; SLAUGHTER, Clive; PICKART, Cecile; CHEN, Zhijian J. Activation of the IκB Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex

and a Unique Polyubiquitin Chain. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 351–361, out. 2000.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00126-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00126-4).

DICKSON, Kathleen M.; BHAKAR, Asha L.; BARKER, Philip A. TRAF6-dependent NF- κ B transcriptional activity during mouse development. **Developmental Dynamics**, v. 231, n. 1, p. 122–127, set. 2004. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20110>.

DIOGO, Dorothée; OKADA, Yukinori; PLENGE, Robert M. Genome-wide association studies to advance our understanding of critical cell types and pathways in rheumatoid arthritis: recent findings and challenges. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 85–92, jan. 2014. <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000012>.

DOODY, Karen M; BOTTINI, Nunzio; FIRESTEIN, Gary S. Epigenetic alterations in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Epigenomics**, v. 9, n. 4, p. 479–492, abr. 2017. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0151>.

EGUCHI, Katsumi; ORIGUCHI, Tomoki; TAKASHIMA, Hiroyuki; IWATA, Kokichi; KATAMINE, Shigeru; NAGATAKI, Shigenobu. High seroprevalence of anti-HTLV-I antibody in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 39, n. 3, p. 463–466, mar. 1996. <https://doi.org/10.1002/art.1780390314>.

EPSTEIN, Franklin H.; HARRIS, Edward D. Rheumatoid Arthritis: Pathophysiology and Implications for Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 18, p. 1277–1289, 3 maio 1990. <https://doi.org/10.1056/NEJM199005033221805>.

EVANS, H. G.; GULLICK, N. J.; KELLY, S.; PITZALIS, C.; LORD, G. M.; KIRKHAM, B. W.; TAAMS, L. S. In vivo activated monocytes from the site of inflammation in humans specifically promote Th17 responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 15, p. 6232–6237, 14 abr. 2009.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808144106>.

FERNÁNDEZ-RUIZ, Julio C.; RAMOS-REMUS, Cesar; SÁNCHEZ-CORONA, José; CASTILLO-ORTIZ, José D.; CASTAÑEDA-SÁNCHEZ, José J.; BASTIAN, Yadira; ROMO-GARCÍA, María F.; OCHOA-GONZÁLEZ, Fátima; MONSIVAIS-URENDA, Adriana E.; GONZÁLEZ-AMARO, Roberto; ENCISO-MORENO, José A.; CASTAÑEDA-DELGADO, Julio E. Analysis of miRNA expression in patients with rheumatoid arthritis during remission and relapse after a 5-year trial of tofacitinib treatment. **International Immunopharmacology**, v. 63, p. 35–42, out. 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.07.028>.

FIRE, Andrew; XU, SiQun; MONTGOMERY, Mary K.; KOSTAS, Steven A.; DRIVER, Samuel E.; MELLO, Craig C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 806–811, fev. 1998.
<https://doi.org/10.1038/35888>.

FRANK-BERTONCELJ, Mojca; KLEIN, Kerstin; GAY, Steffen. Interplay between genetic and epigenetic mechanisms in rheumatoid arthritis. **Epigenomics**, v. 9, n. 4, p. 493–504, abr. 2017. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0142>.

FREIHAT, L. A.; WHEELER, J. I.; WONG, A.; TUREK, I.; MANALLACK, D. T.; IRVING, H. R. IRAK3 modulates downstream innate immune signalling through its

guanylate cyclase activity. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 15468, dez. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51913-3>.

FULGIONE, Andrea; DI MATTEO, Antonio; CONTALDI, Felice; MANCO, Rosanna; IANNIELLO, Flora; INCERTI, Guido; DE SETA, Massimiliano; ESPOSITO, Nicolino; CRASTO, Antonio; IANNELLI, Domenico; CAPPARELLI, Rosanna. Epistatic interaction between *MyD88* and *TIRAP* against *Helicobacter pylori*. **FEBS Letters**, v. 590, n. 14, p. 2127–2137, jul. 2016. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12252>.

FURER, Victoria; GREENBERG, Jeffrey D.; ATTUR, Mukundan; ABRAMSON, Steven B.; PILLINGER, Michael H. The role of microRNA in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. **Clinical Immunology**, v. 136, n. 1, p. 1–15, jul. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.02.005>.

GAY, Nicholas J.; GANGLOFF, Monique; O'NEILL, Luke A.J. What the Myddosome structure tells us about the initiation of innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 3, p. 104–109, mar. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.it.2010.12.005>.

GLOSSOP, John R; EMES, Richard D; NIXON, Nicola B; PACKHAM, Jon C; FRYER, Anthony A; MATTEY, Derek L; FARRELL, William E. Genome-wide profiling in treatment-naïve early rheumatoid arthritis reveals DNA methylome changes in T and B lymphocytes. **Epigenomics**, v. 8, n. 2, p. 209–224, fev. 2016. <https://doi.org/10.2217/epi.15.103>.

GOELDNER, Isabela; SKARE, Thelma L; REASON, Iara T. de Messias; UTIYAMA, Shirley Ramos da Rosa. Artrite reumatoide: uma visão atual. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 5, p. 495–503, out. 2011. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000500002>.

GOLDBERGOVÁ, Monika Pávková; LIPKOVÁ, Jolana; FEDORKO, Jan; NĚMEC, Petr; GATTEROVÁ, Jindřiška; VÁLKOVÁ, Lucie; VAŠKŮ, Jana Ševčíková, Anna. Relationship of epigenetic variability of miR-124 to extracellular matrix remodelling and age-related MMP-3 expression in rheumatoid arthritis. **General physiology and biophysics**, v. 37, n. 06, p. 703–710, 2018. https://doi.org/10.4149/gpb_2018024.

GOMES DA SILVA, Isaura Isabelle Fonseca; ANGELO, Hildson Dornelas; RUSHANSKY, Eliezer; MARIANO, Maria Helena; MAIA, Maria de Mascena Diniz; DE SOUZA, Paulo Roberto Eleuterio. Interleukin (IL)-23 Receptor, IL-17A and IL-17F Gene Polymorphisms in Brazilian Patients with Rheumatoid Arthritis. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 6, p. 537–543, dez. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00005-017-0473-7>.

GOMES DA SILVA, Isaura Isabelle Fonseca; LIMA, Camilla Albertina Dantas; SILVA, José Eduardo Adelino; RUSHANSKY, Eliezer; MARIANO, Maria Helena Queiroz Araujo; ROLIM, Patrícia; OLIVEIRA, Renê Donizeti Ribeiro; LOUZADA-JÚNIOR, Paulo; SOUTO, Fabricio Oliveira; CROVELLA, Sergio; DE AZEVÊDO SILVA, Jaqueline; SANDRIN-GARCIA, Paula. Is there an Inflammation Role for MYD88 in Rheumatoid Arthritis? **Inflammation**, 6 jan. 2021. DOI 10.1007/s10753-020-01397-5. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10753-020-01397-5>. Acesso em: 25 fev. 2021.

GREGERSEN, Peter K.; SILVER, Jack; WINCHESTER, Robert J. The shared epitope hypothesis. an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 30, n. 11, p. 1205–1213, nov. 1987. <https://doi.org/10.1002/art.1780301102>.

GRUEN, J. R.; WEISSMAN, S. M. Evolving views of the major histocompatibility complex. **Blood**, v. 90, n. 11, p. 4252–4265, 1 dez. 1997. .

GUO, Jianping; LI, Zhanguo. Genetic markers and clinical relevance in rheumatoid arthritis. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 19, n. 2, p. 109–113, fev. 2016. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.12812>.

GUTIÉRREZ-CAÑAS, I.; JUARRANZ, Y.; SANTIAGO, B.; ARRANZ, A.; MARTINEZ, C.; GALINDO, M.; PAYÁ, M.; GOMARIZ, R. P.; PABLOS, J. L. VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. **Rheumatology**, v. 45, n. 5, p. 527–532, 1 maio 2006. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei219>.

HA, Eunji; BAE, Sang-Cheol; KIM, Kwangwoo. 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**, , p. annrheumdis-2020-219065, 11 dez. 2020. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-219065>.

HA, Minju; KIM, V. Narry. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, ago. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.

HAN, Zuoning; BOYLE, D. L.; MANNING, A. M.; FIRESTEIN, G. S. AP-1 and NF-κB Regulation in Rheumatoid Arthritis and Murine Collagen-Induced Arthritis. **Autoimmunity**, v. 28, n. 4, p. 197–208, jan. 1998. <https://doi.org/10.3109/08916939808995367>.

HARDIMAN, Gary; JENKINS, Nancy A.; COPELAND, Neal G.; GILBERT, Debra J.; GARCIA, Dawn K.; NAYLOR, Susan L.; KASTELEIN, Robert A.; BAZAN, J.Fernando. Genetic Structure and Chromosomal Mapping of MyD88. **Genomics**, v. 45, n. 2, p. 332–339, out. 1997. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4940>.

HASSINE, Hana Ben; ZEMNI, Ramzi; NACEF, Imen Ben; BOUMIZA, Asma; SLAMA, Foued; BACCOUCHE, Khadija; AMRI, Najla; MELAYAH, Sarra; SHAKOOR, Zahid; ALMOGREN, Adel; BOUAJINA, Elyes; SGHIRI, Rim. A TRAF6 genetic variant is associated with low bone mineral density in rheumatoid arthritis. **Clinical Rheumatology**, v. 38, n. 4, p. 1067–1074, abr. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-4362-1>.

HAUSSER, Jean; ZAVOLAN, Mihaela. Identification and consequences of miRNA–target interactions — beyond repression of gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 9, p. 599–612, set. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrg3765>.

HAYASHI, Tomoko; GRAY, Christine S.; CHAN, Michael; TAWATAO, Rommel I.; RONACHER, Lisa; MCGARGILL, Maureen A.; DATTA, Sandip K.; CARSON, Dennis A.; CORR, Maripat. Prevention of autoimmune disease by induction of tolerance to Toll-

like receptor 7. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 8, p. 2764–2769, 24 fev. 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813037106>.

HÉRON, Elke; DELOUKAS, Panagiotis; VAN LOON, Adolphus P.G.M. The Complete Exon-Intron Structure of the 156-kb Human Gene NFKB1, Which Encodes the p105 and p50 Proteins of Transcription Factors NF- κ B and I κ B- γ : Implications for NF- κ B-Mediated Signal Transduction. **Genomics**, v. 30, n. 3, p. 493–505, dez. 1995. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1270>.

HODGE, Jennifer A.; KAWABATA, Thomas T.; KRISHNASWAMI, Sriram; CLARK, James D.; TELLIEZ, Jean-Baptiste; DOWTY, Martin E.; MENON, Sujatha; LAMBA, Manisha; ZWILLICH, Samuel. The mechanism of action of tofacitinib - an oral Janus kinase inhibitor for the treatment of rheumatoid arthritis. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 34, n. 2, p. 318–328, abr. 2016. .

HOFFMANN, A; NATOLI, G; GHOSH, G. Transcriptional regulation via the NF- κ B signaling module. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6706–6716, out. 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209933>.

HOLLIDAY, Robin. Epigenetics: A Historical Overview. **Epigenetics**, v. 1, n. 2, p. 76–80, abr. 2006. <https://doi.org/10.4161/epi.1.2.2762>.

HORCADA, M. Loreto; DÍAZ-CALDERÓN, Carlos; GARRIDO, Laura. Fiebre chikungunya. Manifestaciones reumáticas de una infección emergente en Europa. **Reumatología Clínica**, v. 11, n. 3, p. 161–164, maio 2015. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2014.07.005>.

HUNT, Laura; EMERY, Paul. Defining populations at risk of rheumatoid arthritis: the first steps to prevention. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 9, p. 521–530, set. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.82>.

HUNTER, Theresa M.; BOYTSOV, Natalie N.; ZHANG, Xiang; SCHROEDER, Krista; MICHAUD, Kaleb; ARAUJO, Andre B. Prevalence of rheumatoid arthritis in the United States adult population in healthcare claims databases, 2004–2014. **Rheumatology International**, v. 37, n. 9, p. 1551–1557, set. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00296-017-3726-1>.

IJICHI, S; MATSUDA, T; MARUYAMA, I; IZUMIHARA, T; KOJIMA, K; NIIMURA, T; MARUYAMA, Y; SONODA, S; YOSHIDA, A; OSAME, M. Arthritis in a human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) carrier. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 49, n. 9, p. 718–721, 1 set. 1990. <https://doi.org/10.1136/ard.49.9.718>.

ISHIDA, Takaomi; MIZUSHIMA, Sei-ichi; AZUMA, Sakura; KOBAYASHI, Norihiko; TOJO, Tadashi; SUZUKI, Kimie; AIZAWA, Shigemi; WATANABE, Toshiki; MOSIALOS, George; KIEFF, Elliott; YAMAMOTO, Tadashi; INOUE, Jun-ichiro. Identification of TRAF6, a Novel Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor Protein That Mediates Signaling from an Amino-terminal Domain of the CD40 Cytoplasmic Region. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 46, p. 28745–28748, 15 nov. 1996. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28745>.

JANSSENS, Sophie; BURNS, Kim; TSCHOPP, Jurg; BEYAERT, Rudi. Regulation of Interleukin-1- and Lipopolysaccharide-Induced NF- κ B Activation by Alternative Splicing

of MyD88. **Current Biology**, v. 12, n. 6, p. 467–471, mar. 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00712-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00712-1).

JOOSTEN, Leo A. B.; RADSTAKE, Timothy R. D.; LUBBERTS, Erik; VAN DEN BERSSELAAR, Liduine A. M.; VAN RIEL, Piet L. C. M.; VAN LENT, Peter L. E. M.; BARRERA, Pilar; VAN DEN BERG, Wim B. Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1 β and tumor necrosis factor α in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 48, n. 2, p. 339–347, fev. 2003. <https://doi.org/10.1002/art.10814>.

KANG, S.; TRAN, A.; GRILLI, M; LENARDO, M. NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4 $^{+}$ T lymphocytes. **Science**, v. 256, n. 5062, p. 1452–1456, 5 jun. 1992. <https://doi.org/10.1126/science.1604322>.

KARBAN, Amir S.; OKAZAKI, Toshihiko; PANHUYSEN, Carolien I.M.; GALLEGOS, Thomas; POTTER, James J.; BAILEY-WILSON, Joan E.; SILVERBERG, Mark S.; DUERR, Richard H.; CHO, Judy H.; GREGERSEN, Peter K.; WU, Yuqiong; ACHKAR, Jean-Paul; DASSOPOULOS, Themistocles; MEZEY, Esteban; BAYLESS, Theodore M.; NOUVET, Franklin J.; BRANT, Steven R. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 1, p. 35–45, 1 jan. 2004. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh008>.

KARIN, Michael; DELHASE, Mireille. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling. **Seminars in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 85–98, fev. 2000. <https://doi.org/10.1006/smim.2000.0210>.

KIM, Kyoung-Woon; KIM, Bo-Mi; WON, Ji-Yeon; LEE, Kyung-Ann; KIM, Hae-Rim; LEE, Sang-Heon. Toll-like receptor 7 regulates osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. **The Journal of Biochemistry**, v. 166, n. 3, p. 259–270, 1 set. 2019. <https://doi.org/10.1093/jb/mvz033>.

KOBAYASHI, Koichi; HERNANDEZ, Lorraine D.; GALÁN, Jorge E.; JANEWAY, Charles A.; MEDZHITOV, Ruslan; FLAVELL, Richard A. IRAK-M Is a Negative Regulator of Toll-like Receptor Signaling. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 191–202, jul. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00827-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00827-9).

KOLSETH, Ingrid Benedicte Moss; REINE, Trine Marita; PARKER, Krystina; SUDWORTH, Amanda; WITCZAK, Bartłomiej J.; JENSSEN, Trond Geir; KOLSET, Svein Olav. Increased levels of inflammatory mediators and proinflammatory monocytes in patients with type I diabetes mellitus and nephropathy. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 31, n. 1, p. 245–252, jan. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.06.029>.

KONG, Lili; SUN, Mingxiao; JIANG, Zhaofu; LI, Liming; LU, Bing. MicroRNA-194 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in Nucleus Pulposus Cells of the Intervertebral Disc by Targeting TNF Receptor-Associated Factor 6 (TRAF6). **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 3056–3067, 10 maio 2018. <https://doi.org/10.12659/MSM.907280>.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. a001651–a001651, 1 dez. 2009. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.

LE BEAU, Michelle M.; ITO, Caryn; COGSWELL, Patricia; ESPINOSA, Rafael; FERNALD, Anthony A.; BALDWIN, Albert S. Chromosomal localization of the genes encoding the p50/p105 subunits of NF- κ B (NFKB2) and the I κ B/MAD-3 (NFKBI) inhibitor of NF- κ B to 4q24 and 14q13, respectively. **Genomics**, v. 14, n. 2, p. 529–531, out. 1992. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(05\)80261-7](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(05)80261-7).

LECH, M.; KANTNER, C.; KULKARNI, O. P.; RYU, M.; VLASOVA, E.; HEESEMANN, J.; ANZ, D.; ENDRES, S.; KOBAYASHI, K. S.; FLAVELL, R. A.; MARTIN, J.; ANDERS, H.-J. Interleukin-1 receptor-associated kinase-M suppresses systemic lupus erythematosus. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 70, n. 12, p. 2207–2217, 1 dez. 2011. <https://doi.org/10.1136/ard.2011.155515>.

LÉVY, L.; FAUTREL, B.; BARNETCHE, T.; SCHAEVERBEKE, T. Incidence and risk of fatal myocardial infarction and stroke events in rheumatoid arthritis patients. A systematic review of the literature. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 26, n. 4, p. 673–679, ago. 2008. .

LEWIS, Benjamin P.; BURGE, Christopher B.; BARTEL, David P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15–20, jan. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>.

LI, Peiquan; SUN, Yuxin; LIU, Qing. MicroRNA-340 Induces Apoptosis and Inhibits Metastasis of Ovarian Cancer Cells by Inactivation of NF- κ B1. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1915–1927, 2016. <https://doi.org/10.1159/000445553>.

LI, Zhonghan; RANA, Tariq M. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 8, p. 622–638, ago. 2014. <https://doi.org/10.1038/nrd4359>.

LIANG, Ying-Ping; LIU, Qin; XU, Guo-Hai; ZHANG, Jing; CHEN, Yong; HUA, Fu-Zhou; DENG, Chang-Qing; HU, Yan-Hui. The lncRNA ROR/miR-124-3p/TRAF6 axis regulated the ischaemia reperfusion injury-induced inflammatory response in human cardiac myocytes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 51, n. 6, p. 381–392, dez. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10863-019-09812-9>.

LIN, Li; DEMARTINO, George N; GREENE, Warner C. Cotranslational Biogenesis of NF- κ B p50 by the 26S Proteasome. **Cell**, v. 92, n. 6, p. 819–828, mar. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81409-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81409-9).

LIN, Su-Chang; LO, Yu-Chih; WU, Hao. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. **Nature**, v. 465, n. 7300, p. 885–890, jun. 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09121>.

LIU, Baozhu; GU, Yong; PEI, Shanshan; PENG, Yu; CHEN, Jinyu; PHAM, Lan V.; SHEN, Hai-Ying; ZHANG, Jun; WANG, Honghao. Interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK)-M -mediated type 2 microglia polarization ameliorates the severity of

experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Journal of Autoimmunity**, v. 102, p. 77–88, ago. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.04.020>.

LIU, Ting; ZHANG, Lingyun; JOO, Donghyun; SUN, Shao-Cong. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, p. 17023, 14 jul. 2017. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.

LÓPEZ-MEJÍAS, Raquel; GARCÍA-BERMÚDEZ, Mercedes; GONZÁLEZ-JUANATEY, Carlos; CASTAÑEDA, Santos; MIRANDA-FILLOY, José A.; GÓMEZ-VAQUERO, Carmen; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, Benjamín; Balsa, Alejandro; PASCUAL-SALCEDO, Dora; BLANCO, Ricardo; GONZÁLEZ-ÁLVARO, Isidoro; LLORCA, Javier; MARTÍN, Javier; GONZÁLEZ-GAY, Miguel A. NFKB1-94ATTG ins/del polymorphism (rs28362491) is associated with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 2, p. 426–429, out. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.06.008>.

LYE, Elizabeth; MIRTOS, Christine; SUZUKI, Nobutaka; SUZUKI, Shinobu; YEH, Wen-Chen. The Role of Interleukin 1 Receptor-associated Kinase-4 (IRAK-4) Kinase Activity in IRAK-4-mediated Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 39, p. 40653–40658, set. 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402666200>.

MA, Chunyan; LI, Yong; LI, Min; DENG, Guangcun; WU, Xiaoling; ZENG, Jin; HAO, Xiuqing; WANG, Xiaoping; LIU, Jing; CHO, William C.S.; LIU, Xiaoming; WANG, Yujiong. microRNA-124 negatively regulates TLR signaling in alveolar macrophages in response to mycobacterial infection. **Molecular Immunology**, v. 62, n. 1, p. 150–158, nov. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.06.014>.

MA, Feng; LIU, Xingguang; LI, Dong; WANG, Pin; LI, Nan; LU, Liwei; CAO, Xuetao. MicroRNA-466l Upregulates IL-10 Expression in TLR-Triggered Macrophages by Antagonizing RNA-Binding Protein Tristetraprolin-Mediated IL-10 mRNA Degradation. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 11, p. 6053–6059, 1 jun. 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902308>.

MACGREGOR, Alexander J.; SNIEDER, Harold; RIGBY, Alan S.; KOSKENVUO, Markku; KAPRIO, Jaakko; AHO, Kimmo; SILMAN, Alan J. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 1, p. 30–37, jan. 2000. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200001\)43:1<30::AID-ANR5>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200001)43:1<30::AID-ANR5>3.0.CO;2-B).

MARQUES NETO, JF; GONÇALVES, ET; BARROS, EFO; CUNHA, MFL; RADOMINSKI, R; OLIVEIRA, SM. Estudo multicêntrico da prevalência da artrite reumatóide do adulto em amostras da população brasileira. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 33, n. 5, p. 169–73, 1993. .

MASUKO-HONGO, K. Virus-associated arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 17, n. 2, p. 309–318, abr. 2003. [https://doi.org/10.1016/S1521-6942\(03\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S1521-6942(03)00004-4).

MEDEIROS, Marta Maria das Chagas; OLIVEIRA, Brenda Maria Gurgel Barreto de; CERQUEIRA, João Victor Medeiros de; QUIXADÁ, Raquel Telles de Souza; OLIVEIRA, Ídila Mont’Alverne Xavier de. Correlação dos índices de atividade da artrite

reumatoide (Disease Activity Score 28 medidos com VHS, PCR, Simplified Disease Activity Index e Clinical Disease Activity Index) e concordância dos estados de atividade da doença com vários pontos de corte numa população do nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 55, n. 6, p. 477–484, nov. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.rbr.2014.12.005>.

MEYER, Pieter W. A.; HODKINSON, Bridget; ALLY, Mahmood; MUSENGE, Eustasius; WADEE, Ahmed A.; FICKL, Heidi; TIKLY, Mohammed; ANDERSON, Ronald. Circulating Cytokine Profiles and Their Relationships with Autoantibodies, Acute Phase Reactants, and Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 1–10, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/158514>.

MOGENSEN, Trine H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, p. 240–273, abr. 2009. <https://doi.org/10.1128/CMR.00046-08>.

MOTA, Licia Maria Henrique da; KAKEHASI, Adriana Maria; GOMIDES, Ana Paula Monteiro; DUARTE, Angela Luzia Branco Pinto; CRUZ, Bóris Afonso; BRENOL, Claiton Viegas; DE ALBUQUERQUE, Cleandro Pires; CASTELAR PINHEIRO, Geraldo da Rocha; LAURINDO, Ieda Maria Magalhães; PEREIRA, Ivanio Alves; BERTOLO, Manoel Barros; UBIRAJARA SILVA DE SOUZA, Mariana Peixoto Guimarães; DE FREITAS, Max Vitor Carioca; LOUZADA-JÚNIOR, Paulo; XAVIER, Ricardo Machado; GIORGI, Rina Dalva Neubarth. 2017 recommendations of the Brazilian Society of Rheumatology for the pharmacological treatment of rheumatoid arthritis. **Advances in Rheumatology**, v. 58, n. 1, p. 2, 24 maio 2018. <https://doi.org/10.1186/s42358-018-0005-0>.

MURPHY, Amy J.; GUYRE, Paul M.; PIOLI, Patricia A. Estradiol Suppresses NF- κ B Activation through Coordinated Regulation of let-7a and miR-125b in Primary Human Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 9, p. 5029–5037, 1 maio 2010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903463>.

MURPHY, Michael; PATTABIRAMAN, Goutham; MANAVALAN, Tissa T.; MEDVEDEV, Andrei E. Deficiency in IRAK4 activity attenuates manifestations of murine Lupus. **European Journal of Immunology**, v. 47, n. 5, p. 880–891, maio 2017. <https://doi.org/10.1002/eji.201646641>.

MUZNY, Donna M.; SCHERER, Steven E.; KAUL, Rajinder; WANG, Jing; YU, Jun; SUDBRAK, Ralf; BUHAY, Christian J.; CHEN, Rui; CREE, Andrew; DING, Yan; DUGAN-ROCHA, Shannon; GILL, Rachel; GUNARATNE, Preethi; HARRIS, R. Alan; HAWES, Alicia C.; HERNANDEZ, Judith; HODGSON, Anne V.; HUME, Jennifer; JACKSON, Andrew; ... GIBBS, Richard A. The DNA sequence, annotation and analysis of human chromosome 3. **Nature**, v. 440, n. 7088, p. 1194–1198, abr. 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04728>.

NAKANO, Kazuhisa; BOYLE, David L.; FIRESTEIN, Gary S. Regulation of DNA Methylation in Rheumatoid Arthritis Synovialocytes. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 3, p. 1297–1303, 1 fev. 2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202572>.

NAMJOU, Bahram; CHOI, Chan-Bum; HARLEY, Isaac T. W.; ALARCÓN-RIQUELME, Marta E.; BIOLUPUS NETWORK; KELLY, Jennifer A.; GLENN, Stuart B.; OJWANG,

Joshua O.; ADLER, Adam; KIM, Kwangwoo; GALLANT, Caroline J.; BOACKLE, Susan A.; CRISWELL, Lindsey A.; KIMBERLY, Robert P.; BROWN, Elizabeth E.; EDBERG, Jeffrey; ALARCÓN, Graciela S.; STEVENS, Anne M.; JACOB, Chaim O.; ... BAE, Sang-Cheol. Evaluation of *TRAF6* in a large multiancestral lupus cohort. **Arthritis & Rheumatism**, v. 64, n. 6, p. 1960–1969, jun. 2012. <https://doi.org/10.1002/art.34361>.

NEMTSOVA, Marina V.; ZALETAEV, Dmitry V.; BURE, Irina V.; MIKHAYLENKO, Dmitry S.; KUZNETSOVA, Ekaterina B.; ALEKSEEVA, Ekaterina A.; BELOUKHOVA, Marina I.; DEVIATKIN, Andrei A.; LUKASHEV, Alexander N.; ZAMYATNIN, Andrey A. Epigenetic Changes in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 14 jun. 2019. DOI 10.3389/fgene.2019.00570. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00570/full>. Acesso em: 3 set. 2019.

NGUYEN, Trang Hong; TUREK, Ilona; MEEHAN-ANDREWS, Terri; ZACHARIAS, Anita; IRVING, Helen. Analysis of interleukin-1 receptor associated kinase-3 (IRAK3) function in modulating expression of inflammatory markers in cell culture models: A systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, p. e0244570, 31 dez. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244570>.

NI, Wen-Juan; LENG, Xiao-Min. miRNA-Dependent Activation of mRNA Translation. **MicroRNA**, v. 5, n. 2, p. 83–86, 8 nov. 2016. <https://doi.org/10.2174/2211536605666160825151201>.

NIIMOTO, Takuya; NAKASA, Tomoyuki; ISHIKAWA, Masakazu; OKUHARA, Atsushi; IZUMI, Bunichiro; DEIE, Masataka; SUZUKI, Osami; ADACHI, Nobuo; OCHI, Mitsuo. MicroRNA-146a expresses in interleukin-17 producing T cells in rheumatoid arthritis patients. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 11, n. 1, dez. 2010. DOI 10.1186/1471-2474-11-209. Disponível em: <http://bmcmusculoskeletaldisord.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2474-11-209>. Acesso em: 20 jan. 2020.

O'BRIEN, Jacob; HAYDER, Heyam; ZAYED, Yara; PENG, Chun. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 3 ago. 2018. DOI 10.3389/fendo.2018.00402. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2018.00402/full>. Acesso em: 10 jan. 2020.

OKADA, Yukinori; EYRE, Stephen; SUZUKI, Akari; KOCHI, Yuta; YAMAMOTO, Kazuhiko. Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 78, n. 4, p. 446–453, abr. 2019. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2018-213678>.

ONUORA, Sarah. New insights into RA genetics from GWAS meta-analysis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 17, n. 3, p. 128–128, mar. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41584-021-00580-8>.

OTA, Toshio; SUZUKI, Yutaka; NISHIKAWA, Tetsuo; OTSUKI, Tetsuji; SUGIYAMA, Tomoyasu; IRIE, Ryotaro; WAKAMATSU, Ai; HAYASHI, Koji; SATO, Hiroyuki; NAGAI, Keiichi; KIMURA, Kouichi; MAKITA, Hiroshi; SEKINE, Mitsuo; OBAYASHI, Masaya; NISHI, Tatsunari; SHIBAHARA, Toshikazu; TANAKA, Toshihiro; ISHII, Shizuko; YAMAMOTO, Jun-ichi; ... SUGANO, Sumio. Complete sequencing and

characterization of 21,243 full-length human cDNAs. **Nature Genetics**, v. 36, n. 1, p. 40–45, jan. 2004. <https://doi.org/10.1038/ng1285>.

PARK, M. S. Expression of human RAD52 confers resistance to ionizing radiation in mammalian cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 26, p. 15467–15470, 30 jun. 1995. .

PAULEY, Kaleb M; SATOH, Minoru; CHAN, Annie L; BUBB, Michael R; REEVES, Westley H; CHAN, Edward KL. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, n. 4, p. R101, 2008. <https://doi.org/10.1186/ar2493>.

PEREZ-SANCHEZ, Carlos; FONT-UGALDE, Pilar; RUIZ-LIMON, Patricia; LOPEZ-PEDRERA, Chary; CASTRO-VILLEGAS, Maria C; ABALOS-AGUILERA, Maria C; BARBARROJA, Nuria; ARIAS-DE LA ROSA, Ivan; LOPEZ-MONTILLA, Maria D; ESCUDERO-CONTRERAS, Alejandro; LOPEZ-MEDINA, Clementina; COLLANTES-ESTEVEZ, Eduardo; JIMENEZ-GOMEZ, Yolanda. Circulating microRNAs as potential biomarkers of disease activity and structural damage in ankylosing spondylitis patients. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. 5, p. 875–890, 1 mar. 2018. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy008>.

PERKINS, Neil D. Integrating cell-signalling pathways with NF- κ B and IKK function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 1, p. 49–62, jan. 2007. <https://doi.org/10.1038/nrm2083>.

PILETIČ, Klara; KUNEJ, Tanja. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2405–2419, out. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1815-7>.

POTTER, C.; CORDELL, H. J.; BARTON, A.; DALY, A. K.; HYRICH, K. L.; MANN, D. A.; MORGAN, A. W.; WILSON, A. G.; AND THE BIOLOGICS IN RHEUMATOID ARTHRITIS GENETICS AND GENOMICS STUDY SYNDICATE (BRAGGSS); ISAACS, J. D. Association between anti-tumour necrosis factor treatment response and genetic variants within the TLR and NF B signalling pathways. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 7, p. 1315–1320, 1 jul. 2010. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.117309>.

PREVOO, M. L.; VAN 'T HOF, M. A.; KUPER, H. H.; VAN LEEUWEN, M. A.; VAN DE PUTTE, L. B.; VAN RIEL, P. L. Modified disease activity scores that include twenty-eight-joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 38, n. 1, p. 44–48, jan. 1995. .

RAJASEKHAR, Megha; OLSSON, Anton M.; STEEL, Kathryn J.A.; GEORGOULI, Mirella; RANASINGHE, Ushan; BRENDER READ, Christine; FREDERIKSEN, Klaus S.; TAAMS, Leonie S. MicroRNA-155 contributes to enhanced resistance to apoptosis in monocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity**, v. 79, p. 53–62, maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.01.002>.

READER, Brenda F.; SETHURAMAN, Shruthi; HAY, Bryan R.; THOMAS BECKET, Rose Viguna; KARPURAPU, Manjula; CHUNG, Sangwoon; LEE, Yong Gyu; CHRISTMAN, John W.; BALLINGER, Megan N. IRAK-M Regulates Monocyte

Trafficking to the Lungs in Response to Bleomycin Challenge. **The Journal of Immunology**, v. 204, n. 10, p. 2661–2670, 15 maio 2020. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900466>.

REINHART, Brenda J.; SLACK, Frank J.; BASSON, Michael; PASQUINELLI, Amy E.; BETTINGER, Jill C.; ROUGVIE, Ann E.; HORVITZ, H. Robert; RUVKUN, Gary. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901–906, fev. 2000. <https://doi.org/10.1038/35002607>.

RODRIGUEZ-MORALES, Alfonso J.; VILLAMIL-GÓMEZ, Wilmer E.; FRANCO-PAREDES, Carlos. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 3, p. 177–179, maio 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.05.004>.

SACRE, Sandra M.; ANDREAKOS, Evangelos; KIRIAKIDIS, Serafim; AMJADI, Parisa; LUNDBERG, Anna; GIDDINS, Grey; FELDMANN, Marc; BRENNAN, Fionula; FOXWELL, Brian M. The Toll-Like Receptor Adaptor Proteins MyD88 and Mal/TIRAP Contribute to the Inflammatory and Destructive Processes in a Human Model of Rheumatoid Arthritis. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 518–525, fev. 2007. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060657>.

SCOTT, David L; WOLFE, Frederick; HUIZINGA, Tom WJ. Rheumatoid arthritis. **The Lancet**, v. 376, n. 9746, p. 1094–1108, set. 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60826-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60826-4).

SHA, William C; LIOU, Hsiou-Chi; TUOMANEN, Elaine I; BALTIMORE, David. Targeted disruption of the p50 subunit of NF- κ B leads to multifocal defects in immune responses. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 321–330, jan. 1995. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90415-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90415-8).

SHIINA, T.; INOKO, H.; KULSKI, J.K. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 6, p. 631–649, dez. 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2004.00327.x>.

SIMMONDS, R. E.; FOXWELL, B. M. Signalling, inflammation and arthritis: NF- B and its relevance to arthritis and inflammation. **Rheumatology**, v. 47, n. 5, p. 584–590, 29 jan. 2008. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kem298>.

SIPKA, Sándor; ZILAHÍ, Erika; PAPP, Gábor; CHEN, Ji-Qing; NAGY, Andrea; HEGYI, Katalin; KÓNYA, József; ZEHER, Margit. Down-regulation of increased TRAF6 expression in the peripheral mononuclear cells of patients with primary Sjögren's syndrome by an EBV-EBER1-specific synthetic single-stranded complementary DNA molecule. **International Journal of Rheumatic Diseases**, v. 20, n. 5, p. 614–621, maio 2017. <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13087>.

SMILJANOVIC, Biljana; RADZIKOWSKA, Anna; KUCA-WARNAWIN, Ewa; KUROWSKA, Weronika; GRÜN, Joachim R; STUHLMÜLLER, Bruno; BONIN, Marc; SCHULTE-WREDE, Ursula; SÖRENSEN, Till; KYOGOKU, Chieko; BRUNS, Anne; HERMANN, Sandra; OHRNDORF, Sarah; AUPPERLE, Karlfried; BACKHAUS, Marina; BURMESTER, Gerd R; RADBRUCH, Andreas; GRÜTZKAU, Andreas; MASLINSKI,

Włodzimierz; HÄUPL, Thomas. Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 77, n. 2, p. 300–308, fev. 2018. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211649>.

SMOLEN, J. S.; LANDEWE, R.; BREEDVELD, F. C.; DOUGADOS, M.; EMERY, P.; GAUJOUX-VIALA, C.; GORTER, S.; KNEVEL, R.; NAM, J.; SCHOELS, M.; ALETAHA, D.; BUCH, M.; GOSSEC, L.; HUIZINGA, T.; BIJLSMA, J. W. J. W.; BURMESTER, G.; COMBE, B.; CUTOLO, M.; GABAY, C.; ... VAN DER HEIJDE, D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 69, n. 6, p. 964–975, 1 jun. 2010. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.126532>.

SMOLEN, Josef S.; ALETAHA, Daniel; BARTON, Anne; BURMESTER, Gerd R.; EMERY, Paul; FIRESTEIN, Gary S.; KAVANAUGH, Arthur; MCINNES, Iain B.; SOLOMON, Daniel H.; STRAND, Vibeke; YAMAMOTO, Kazuhiko. Rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, jun. 2018. DOI 10.1038/nrdp.2018.1. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrdp20181>. Acesso em: 4 jan. 2020.

SMOLEN, Josef S.; LANDEWÉ, Robert; BIJLSMA, Johannes; BURMESTER, Gerd; CHATZIDIONYSIOU, Katerina; DOUGADOS, Maxime; NAM, Jackie; RAMIRO, Sofia; VOSHAAR, Marieke; VAN VOLLENHOVEN, Ronald; ALETAHA, Daniel; ARINGER, Martin; BOERS, Maarten; BUCKLEY, Chris D; BUTTGEREIT, Frank; BYKERK, Vivian; CARDIEL, Mario; COMBE, Bernard; CUTOLO, Maurizio; ... VAN DER HEIJDE, Désirée. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 76, n. 6, p. 960–977, jun. 2017. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210715>.

SODE, J; VOGEL, U; BANK, S; ANDERSEN, P S; HETLAND, M L; LOCHT, H; HEEGAARD, N H H; ANDERSEN, V. Confirmation of an IRAK3 polymorphism as a genetic marker predicting response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 18, n. 1, p. 81–86, jan. 2018. <https://doi.org/10.1038/tpj.2016.66>.

STAHL, Eli A; WEGMANN, Daniel; TRYNKA, Gosia; GUTIERREZ-ACHURY, Javier; DO, Ron; VOIGHT, Benjamin F; KRAFT, Peter; CHEN, Robert; KALLBERG, Henrik J; KURREEMAN, Fina A S; KATHIRESAN, Sekar; WIJMENGA, Cisca; GREGERSEN, Peter K; ALFREDSSON, Lars; SIMINOVITCH, Katherine A; WORTHINGTON, Jane; DE BAKKER, Paul I W; RAYCHAUDHURI, Soumya; PLENGE, Robert M. Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. **Nature Genetics**, v. 44, n. 5, p. 483–489, maio 2012. <https://doi.org/10.1038/ng.2232>.

STANCZYK, Joanna; PEDRIOLI, Deena M. Leslie; BRENTANO, Fabia; SANCHEZ-PERNAUTE, Olga; KOLLING, Christoph; GAY, Renate E.; DETMAR, Michael; GAY, Steffen; KYBURZ, Diego. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 58, n. 4, p. 1001–1009, abr. 2008. <https://doi.org/10.1002/art.23386>.

STEINER, Günter. Auto-antibodies and autoreactive T-cells in rheumatoid arthritis: Pathogenetic players and diagnostic tools. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 32, n. 1, p. 23–35, fev. 2007. <https://doi.org/10.1007/BF02686079>.

STOTZ, Karola; GRIFFITHS, Paul. Epigenetics: ambiguities and implications. **History and Philosophy of the Life Sciences**, v. 38, n. 4, dez. 2016. DOI 10.1007/s40656-016-0121-2. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s40656-016-0121-2>. Acesso em: 17 jan. 2020.

SU, Lin-Chong; XU, Wang-Dong; HUANG, An-Fang. IRAK family in inflammatory autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 3, p. 102461, mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2020.102461>.

SUN, Lijun; DENG, Li; EA, Chee-Kwee; XIA, Zong-Ping; CHEN, Zhijian J. The TRAF6 Ubiquitin Ligase and TAK1 Kinase Mediate IKK Activation by BCL10 and MALT1 in T Lymphocytes. **Molecular Cell**, v. 14, n. 3, p. 289–301, maio 2004. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00236-9).

SUN, Shao-Cong. The noncanonical NF- κ B pathway: The noncanonical NF- κ B signaling pathway. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 125–140, mar. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01088.x>.

SUN, Shao-Cong; CHANG, Jae-Hoon; JIN, Jin. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 6, p. 282–289, jun. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.01.004>.

ŚWIERKOT, Jerzy; NOWAK, Beata; CZARNY, Anna; ZACZYŃSKA, Ewa; SOKOLIK, Renata; MADEJ, Marta; KORMAN, Lucyna; SEBASTIAN, Agata; WOJTAŁA, Patryk; LUBIŃSKI, Łukasz; WILAND, Piotr. The Activity of JAK/STAT and NF- κ B in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 25, n. 4, p. 709–717, 2016. <https://doi.org/10.17219/acem/61034>.

TAMAKI, Yasunobu; TAKAKUBO, Yuya; HIRAYAMA, Tomoyuki; KONTTINEN, Yrjö T.; GOODMAN, Stuart B.; YAMAKAWA, Mitsunori; TAKAGI, Michiaki. Expression of Toll-like Receptors and Their Signaling Pathways in Rheumatoid Synovitis. **The Journal of Rheumatology**, v. 38, n. 5, p. 810–820, maio 2011. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100732>.

TAN, Qiyuan; MAJEWSKA-SZCZEPANIK, Monika; ZHANG, Xiaojun; SZCZEPANIK, Marian; ZHOU, Zhiguang; WONG, F. Susan; WEN, Li. IRAK-M Deficiency Promotes the Development of Type 1 Diabetes in NOD Mice. **Diabetes**, v. 63, n. 8, p. 2761–2775, 1 ago. 2014. <https://doi.org/10.2337/db13-1504>.

TIAN, Huiqun; LIU, Chaoqi; ZOU, Xiaohua; WU, Wei; ZHANG, Changcheng; YUAN, Ding. MiRNA-194 Regulates Palmitic Acid-Induced Toll-Like Receptor 4 Inflammatory Responses in THP-1 Cells. **Nutrients**, v. 7, n. 5, p. 3483–3496, 13 maio 2015. <https://doi.org/10.3390/nu7053483>.

TOBÓN, Gabriel J.; YOUINOU, Pierre; SARAUX, Alain. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: Rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews**, v. 9, n. 5, p. A288–A292, mar. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.019>.

TOLKIEN, J R R; O senhor dos anéis - A sociedade do anel. São Paulo: Martins Fontes, 2001.

TRENKMANN, Michelle; BROCK, Matthias; OSPELT, Caroline; GAY, Steffen. Epigenetics in Rheumatoid Arthritis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 39, n. 1, p. 10–19, ago. 2010. <https://doi.org/10.1007/s12016-009-8166-6>.

TUDDENHAM, Lee; WHEELER, Guy; NTOUNIA-FOUSARA, Sofia; WATERS, Jasmine; HAJIHOSSEINI, Mohammad K.; CLARK, Ian; DALMAY, Tamas. The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells. **FEBS Letters**, v. 580, n. 17, p. 4214–4217, 24 jul. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.06.080>.

VAN DER WOUDE, Diane; HOUWING-DUISTERMAAT, Jeanine J.; TOES, René E. M.; HUIZINGA, Tom W. J.; THOMSON, Wendy; WORTHINGTON, Jane; VAN DER HELM-VAN MIL, Annette H. M.; DE VRIES, René R. P. Quantitative heritability of anti-citrullinated protein antibody-positive and anti-citrullinated protein antibody-negative rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 60, n. 4, p. 916–923, abr. 2009. <https://doi.org/10.1002/art.24385>.

VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1931–1934, 21 dez. 2007. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>.

VASUDEVAN, Shobha. Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs: Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 3, n. 3, p. 311–330, maio 2012. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>.

VICENTE, Rita; NOËL, Danièle; PERS, Yves-Marie; APPARAILLY, Florence; JORGENSEN, Christian. Dereglulation and therapeutic potential of microRNAs in arthritic diseases. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 12, n. 4, p. 211–220, abr. 2016. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.162>.

VIDAL, Christopher; GALEA, Raymond; BRINCAT, Mark; ANASTASI, Angela Xuereb. Linkage to chromosome 11p12 in two Maltese families with a highly penetrant form of osteoporosis. **European Journal of Human Genetics**, v. 15, n. 7, p. 800–809, jul. 2007. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201814>.

WALSH, Matthew C.; LEE, JangEun; CHOI, Yongwon. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. **Immunological Reviews**, v. 266, n. 1, p. 72–92, jul. 2015. <https://doi.org/10.1111/imr.12302>.

WALTER, Matthew J.; PAYTON, Jacqueline E.; RIES, Rhonda E.; SHANNON, William D.; DESHMUKH, Hrishikesh; ZHAO, Yu; BATY, Jack; HEATH, Sharon; WESTERVELT, Peter; WATSON, Mark A.; TOMASSON, Michael H.; NAGARAJAN, Rakesh; O’GARA, Brian P.; BLOOMFIELD, Clara D.; MRÓZEK, Krzysztof; SELZER, Rebecca R.; RICHMOND, Todd A.; KITZMAN, Jacob; GEOGHEGAN, Joel; ... LEY, Timothy J. Acquired copy number alterations in adult acute myeloid leukemia genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 12950–12955, 4 ago. 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903091106>.

WANG, Huiqin; CHEN, Weixia; WANG, Ling; LI, Faxin; ZHANG, Chunling; XU, Li. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 promotes migration of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 4, p. 2761–2766, abr. 2015. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.3104>.

WANG, Wenhong; ZHANG, Yingying; ZHU, Bo; DUAN, Tanghai; XU, Qiugui; WANG, Rui; LU, Liwei; JIAO, Zhijun. Plasma microRNA expression profiles in Chinese patients with rheumatoid arthritis. **Oncotarget**, v. 6, n. 40, 15 dez. 2015. DOI 10.18632/oncotarget.6449. Disponível em: <http://www.oncotarget.com/fulltext/6449>. Acesso em: 31 jan. 2020.

WANG, Yao; DANG, Jinjun; WANG, Heng; ALLGAYER, Heike; MURRELL, George A. C.; BOYD, Douglas. Identification of a novel nuclear factor-kappaB sequence involved in expression of urokinase-type plasminogen activator receptor: A novel NF- κ B sequence in uPAR promoter. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 11, p. 3248–3254, jun. 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01350.x>.

WATERFIELD, Michael R.; ZHANG, Minying; NORMAN, Lourdes P.; SUN, Shao-Cong. NF- κ B1/p105 Regulates Lipopolysaccharide-Stimulated MAP Kinase Signaling by Governing the Stability and Function of the Tpl2 Kinase. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, p. 685–694, mar. 2003. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00070-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00070-4).

WEI, Jian-Wei; HUANG, Kai; YANG, Chao; KANG, Chun-Sheng. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. **Oncology Reports**, v. 37, n. 1, p. 3–9, jan. 2017. <https://doi.org/10.3892/or.2016.5236>.

WEI, Shi-Tong; SUN, Yong-Hua; ZONG, Shi-Hua; XIANG, Yong-Bing. Serum Levels of IL-6 and TNF- α May Correlate with Activity and Severity of Rheumatoid Arthritis. **Medical Science Monitor**, v. 21, p. 4030–4038, 24 dez. 2015. <https://doi.org/10.12659/MSM.895116>.

WESCHE, Holger; GAO, Xiong; LI, Xiaoxia; KIRSCHNING, Carsten J.; STARK, George R.; CAO, Zhaodan. IRAK-M Is a Novel Member of the Pelle/Interleukin-1 Receptor-associated Kinase (IRAK) Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 19403–19410, jul. 1999. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.19403>.

WONG, Brian R; BESSER, Daniel; KIM, Nacksung; ARRON, Joseph R; VOLOGODSKAIA, Masha; HANAFUSA, Hidesaburo; CHOI, Yongwon. TRANCE, a TNF Family Member, Activates Akt/PKB through a Signaling Complex Involving TRAF6 and c-Src. **Molecular Cell**, v. 4, n. 6, p. 1041–1049, dez. 1999. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80232-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80232-4).

WONG, Kok Loon; YEAP, Wei Hseun; TAI, June Jing Yi; ONG, Siew Min; DANG, Truong Minh; WONG, Siew Cheng. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. **Immunologic Research**, v. 53, n. 1–3, p. 41–57, set. 2012. <https://doi.org/10.1007/s12026-012-8297-3>.

WU, Cuiyan; TAN, Sijian; LIU, Li; CHENG, Shiqiang; LI, Peilin; LI, Wenyu; LIU, Huan; ZHANG, Feng'e; WANG, Sen; NING, Yujie; WEN, Yan; ZHANG, Feng. Transcriptome-wide association study identifies susceptibility genes for rheumatoid arthritis. **Arthritis**

Research & Therapy, v. 23, n. 1, p. 38, dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13075-021-02419-9>.

WU, Dennis J.; GU, Ran; SARIN, Ritu; ZAVODOVSKAYA, Regina; CHEN, Chia-Pei; CHRISTIANSEN, Blaine A.; ADAMOPOULOS, Iannis E. Autophagy-linked FYVE containing protein WDFY3 interacts with TRAF6 and modulates RANKL-induced osteoclastogenesis. **Journal of Autoimmunity**, v. 73, p. 73–84, set. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.06.004>.

XU, Wenlong; SAN LUCAS, Anthony; WANG, Zixing; LIU, Yin. Identifying microRNA targets in different gene regions. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. Suppl 7, p. S4, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-S7-S4>.

XUE, Jimeng; XU, Liling; ZHU, Huaqun; BAI, Mingxin; LI, Xin; ZHAO, Zhen; ZHONG, Hua; CHENG, Gong; LI, Xue; HU, Fanlei; SU, Yin. CD14+CD16– monocytes are the main precursors of osteoclasts in rheumatoid arthritis via expressing Tyro3TK. **Arthritis Research & Therapy**, v. 22, n. 1, p. 221, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-02308-7>.

YAMAMOTO, Kazuhiko; OKADA, Yukinori; SUZUKI, Akari; KOCHI, Yuta. Genetics of rheumatoid arthritis in Asia—present and future. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 11, n. 6, p. 375–379, jun. 2015. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.7>.

YAMAMOTO, Yumi; GAYNOR, Richard B. I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 29, n. 2, p. 72–79, fev. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.12.003>.

YAMASAKI, S. Importance of NF-kappaB in rheumatoid synovial tissues: in situ NF-kappaB expression and in vitro study using cultured synovial cells. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 60, n. 7, p. 678–684, 1 jul. 2001. <https://doi.org/10.1136/ard.60.7.678>.

YAO, Zhenqiang; XING, Lianping; BOYCE, Brendan F. NF- κ B p100 limits TNF-induced bone resorption in mice by a TRAF3-dependent mechanism. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 10, p. 3024–3034, 1 out. 2009. <https://doi.org/10.1172/JCI38716>.

YATES, Bethan; BRASCHI, Bryony; GRAY, Kristian A.; SEAL, Ruth L.; TWEEDIE, Susan; BRUFORD, Elspeth A. Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2017. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D619–D625, 04 2017. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1033>.

YE, Hong; ARRON, Joseph R.; LAMOTHE, Betty; CIRILLI, Maurizio; KOBAYASHI, Takashi; SHEVDE, Nirupama K.; SEGAL, Deena; DZIVENU, Oki K.; VOLOGODSKAIA, Masha; YIM, Mijung; DU, Khoi; SINGH, Sujay; PIKE, J. Wesley; DARNAY, Bryant G.; CHOI, Yongwon; WU, Hao. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. **Nature**, v. 418, n. 6896, p. 443–447, jul. 2002. <https://doi.org/10.1038/nature00888>.

YOUNG, Adam; KODURI, Gouri. Extra-articular manifestations and complications of rheumatoid arthritis. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 21, n. 5, p. 907–927, out. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.berh.2007.05.007>.

ZARATIEGUI, Mikel; IRVINE, Danielle V.; MARTIENSSEN, Robert A. Noncoding RNAs and Gene Silencing. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 763–776, fev. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.016>.

ZERVOU, Maria I.; MYRTHIANOU, Efsevia; FLOURI, Irene; PLANT, Darren; CHLOUVERAKIS, Gregory; CASTRO-GINER, Francesc; RAPSOMANIKI, Panayiota; BARTON, Anne; BOUMPAS, Dimitrios T.; SIDIROPOULOS, Prodromos; GOULIELMOS, George N. Lack of Association of Variants Previously Associated with Anti-TNF Medication Response in Rheumatoid Arthritis Patients: Results from a Homogeneous Greek Population. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74375, 10 set. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074375>.

ZHANG, Lian; WU, Haijing; ZHAO, Ming; LU, Qianjin. Identifying the differentially expressed microRNAs in autoimmunity: A systemic review and meta-analysis. **Autoimmunity**, , p. 1–15, 6 jan. 2020. <https://doi.org/10.1080/08916934.2019.1710135>.

ZHANG, Zimu; ZHANG, Rongxin. Epigenetics in autoimmune diseases: Pathogenesis and prospects for therapy. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 10, p. 854–863, out. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2015.05.008>.

ZHENG, Chao; CHEN, Jingtao; CHU, Fengna; ZHU, Jie; JIN, Tao. Inflammatory Role of TLR-MyD88 Signaling in Multiple Sclerosis. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 12, p. 314, 10 jan. 2020. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00314>.

ZHU, Lang-Jing; DAI, Lie; ZHENG, Dong-Hui; MO, Ying-Qian; OU-YANG, Xia; WEI, Xiu-Ning; SHEN, Jun; ZHANG, Bai-Yu. Upregulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 correlated with synovitis severity in rheumatoid arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 14, n. 3, p. R133, 2012. <https://doi.org/10.1186/ar3866>.

ZHU, Lang-Jing; YANG, Tie-Cheng; WU, Qiang; YUAN, Li-Ping; CHEN, Zhen-Wei; LUO, Min-Hong; ZENG, Hai-Ou; HE, Dong-Ling; MO, Cai-Ju. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 6 inhibition mitigates the pro-inflammatory roles and proliferation of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. **Cytokine**, v. 93, p. 26–33, maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.001>.

ZHU, Xiaowei; WU, Longfei; MO, Xingbo; XIA, Wei; GUO, Yufan; WANG, Mingjun; ZENG, Keqin; WU, Jian; QIU, Yinghua; LIN, Xiang; LU, Xin; DENG, Feiyan; LEI, Shufeng. Identification of PBMC-expressed miRNAs for rheumatoid arthritis. **Epigenetics**, , p. 1–12, 10 out. 2019. <https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1676613>.

ZIEGLER-HEITBROCK, Loems; ANCUTA, Petronela; CROWE, Suzanne; DALOD, Marc; GRAU, Veronika; HART, Derek N.; LEENEN, Pieter J. M.; LIU, Yong-Jun; MACPHERSON, Gordon; RANDOLPH, Gwendalyn J.; SCHERBERICH, Juergen; SCHMITZ, Juergen; SHORTMAN, Ken; SOZZANI, Silvano; STROBL, Herbert; ZEMBALA, Marek; AUSTYN, Jonathan M.; LUTZ, Manfred B. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v. 116, n. 16, p. e74–e80, 21 out. 2010. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>.

**APÊNDICE A - MYD88, IRAK3 AND RHEUMATOID ARTHRITIS
PATHOGENESIS: ANALYSIS OF DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION IN
CD14+ MONOCYTES AND THE INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS**



MYD88, IRAK3 and Rheumatoid Arthritis pathogenesis: Analysis of differential gene expression in CD14 + monocytes and the inflammatory cytokine levels

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva^{a,b,*}, Alexandre Domingues Barbosa^{c,d},
Fabricio Oliveira Souto^{b,e}, Maria de Mascena Diniz Maia^f, Sergio Crovella^g,
Paulo Roberto Eleuterio de Souza^f, Paula Sandrin-Garcia^{a,b}

^a Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Laboratory of Immunopathology Kelzo Asami, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Policlínica Jamacy de Medeiros Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil

^d Hospital das Clínicas of Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^e Agreste Academic Center, Federal University of Pernambuco, Caruaru, Pernambuco, Brazil

^f Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^g Department of Biological and Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, P.O. Box 2713, Doha, Qatar

ARTICLE INFO

Keywords:

Myeloid differentiation protein 88
Interleukin-1 receptor associated kinase 3
RA CD4I
Gene expression
Monocytes

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is a well-known chronic inflammatory disorder. Two molecular players act in the inflammation balance of the disease: MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) is related to TLR (Toll-like receptors) response and promotes the formation of myddosome complex resulting in increased inflammation; IRAK3 (Interleukin-1 receptor associated kinase 3) acts suppressing the myddosome complex thus decreasing inflammation. In this scenario, MYD88 and IRAK3 gene expression profile in RA patients and its correlation with clinical features is still partially known. So, we evaluated the MYD88 and IRAK3 gene expressions in CD14 + monocytes from RA patients and healthy controls and its relation with patients' clinical features and cytokine plasma levels. CD14 + monocytes were isolated using positive selection by magnetic cell separation. The MYD88 and IRAK3 gene expressions were measured through real time relative quantitative PCR with specific primers; relative quantification was normalized to ACTB, GAPDH, 18S and RPLP0 reference genes. Cytokine levels were analyzed by CBA (cytokine beads assays). CD14 + monocytes from RA patients showed lower IRAK3 expression level compared to controls although with a borderline statistical significance (Fold change (FC) = -1.63; $p = 0.054$). Furthermore, RA patients with high disease activity had lower levels of IRAK3 when compared to patients with low/moderate activity measured by the CD4I index (FC = -1.78; $p = 0.030$). No significant differences were observed for MYD88 gene expression (FC = 1.20; $p = 0.294$) between patients and controls analyzed. Additionally, we did not observe correlation between IRAK3 and MYD88 gene expression and TNF- α , IL-6, IL-2 and IL-10 levels. We suggested that IRAK3 gene expression in CD14 + monocytes appears to be relevant to the RA etiology and clinical activity, whereas, in this study, MYD88 does not play a role in RA onset and development.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune and complex disease that affects about 1% of the population worldwide and it is characterized by an inflammatory process that can lead to bone erosion and an irreversible joint damage (Smolen et al., 2018). Innate and adaptive

immune systems are both considered as a trigger for RA, although remains undetermined how and which different immune cells are involved in the disease. According to the literature, the monocytes can play a role in RA pathogenesis since, interplaying with other cells, a range of molecules is produced resulting in RA inflammatory process (Rana et al., 2018). In addition, monocytes are the main precursors of osteoclasts in

* Corresponding author at: Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, 1235, Cidade Universitária – CEP 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.
E-mail address: iisauragomes@gmail.com (I.I.F. Gomes da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.imbio.2021.152152>

Received 6 August 2021; Received in revised form 11 October 2021; Accepted 23 October 2021

Available online 29 October 2021

0171-2985/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

RA (Xue et al., 2020). However, the mechanism through which monocytes deregulation occurs in the disease are still elusive.

MyD88 (Myeloid differentiation primary response 88) is an adaptor molecule related to TLR (Toll-like receptors) response and promotes a higher production of some cytokines such as IL-1 β , TNF- α , IL-6, consequently boosting inflammation (Huang and Pope, 2010). The TLRs activation induces the formation of a myddosome complex composed by MyD88 and IRAKs (Interleukin-1 receptor associated kinase) proteins, mainly IRAK4, IRAK1 and IRAK2 (Freihat et al., 2019; Lin et al., 2010). The myddosome complex induces a downstream cascade with activation of signaling molecules such as TRAF6 (Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6) and activation of NF κ B (nuclear factor kappa B) pathway thus modulating inflammation (Freihat et al., 2019; Kobayashi et al., 2002; Lin et al., 2010). MyD88 deregulation has been related to RA and differential expression had been observed in synovial membrane cells of RA patients (Sacre et al., 2007; Tamaki et al., 2011). In addition, our research group reported the association of a genetic variant of *MYD88* (rs6853) in RA Brazilians patients (odds ratio (OR) = 2.83; p = 0.0152) and its impact on *MYD88* gene expression and IL-1 β levels, in genotype-guided monocyte cell culture from healthy individuals (Gomes da Silva et al., 2021).

Nevertheless, there is another member of the IRAK family called IRAK3 or IRAK-M, mainly produced by monocytes and macrophages, which is not participating in the myddosome complex (Kobayashi et al., 2002). In fact, the IRAK3 has an inhibitory effect on the myddosome downstream cascade since it promotes a loss of interaction between IRAKs of myddosome complex and TRAF6 resulting in a decrease of inflammation (Freihat et al., 2019; Kobayashi et al., 2002). Some few studies related IRAK3 to RA, Cho et al. (Cho et al., 2007) reported a differential expression of IRAK3 in RA fibroblast like synoviocytes (FLS) when stimulated with a bacterial peptidoglycan and Smiljanovic et al., (2018) in RA patients monocytes when compared to osteoarthritis. In addition, a genetic variant (rs11541076) in the *IRAK3* gene has been associated to positive anti-TNF treatment response in Danish RA patients (Sode et al., 2018).

Both molecules, MyD88 and IRAK3, are key modulators of inflammatory responses and their dysregulation can be related to RA chronic inflammation. However, it remains undetermined the levels expression of these genes in CD14 + monocytes from RA patients as well as the relations with pathogenesis and clinical severity of disease. In our study, we assessed *MYD88* and *IRAK3* gene expression in CD14 + monocytes from RA patients to disclose the possible correlation with the etiology, pathogenesis and treatment of the disease. Besides that, we evaluated if *MYD88* and *IRAK3* gene expression was associated with cytokine plasma levels in RA patients.

2. Material and methods

2.1. Patients and controls

RA patients were enrolled at the "Policlinica Doutor Jamacy de Medeiros", Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil and at the "Hospital das Clinicas", Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil. RA patients fulfilled the commonly used criteria for RA classification (Aletaha et al., 2010) and enrollment criteria included twenty RA women older than 18 years and naïve for treatment or treated with disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs), synthetic (methotrexate, leflunomide, sulfasalazine or hydroxychloroquine) and glucocorticoid. Bone erosion was identified in radiographs of the hands and feet based on the presence of at least 1 joint with a Larsen score ≥ 2 (Larsen et al., 1977); RA disease activity was classified according to DAS28 (Prevoo et al., 1995), CDAI (Aletaha and Smolen, 2005) and HAQ (Uhlir et al., 2006) indices.

The control group consisted of 18 healthy women without autoimmune, inflammatory or infectious diseases, matched for age, BMI (Body Mass Index) and geographic region with the RA patients'. The absence of

inflammation was evaluated by Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) < 30 mm/h.

We received ethical approval from the Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (CAAE 10035418.4.0000.5208) and all subjects provided a sign informing consent and medical records.

2.2. CD14 + Monocytes isolation and cytokine levels

Peripheral blood samples (8 mL) of RA patients and healthy controls were collected using sodium heparin tubes and transported at 2–8 °C to laboratory. In a time-lapse up to two hours, the PBMC (Human peripheral blood mononuclear cell) isolation from whole blood has been performed following the standard density gradient centrifugation with Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, USA) according to the manufacturer's instructions.

Then, CD14 + monocytes were isolated by magnetic cell separation by a positive selection kit using Dynabeads CD14 kit (Invitrogen, USA). A minimal of 95% of purity of CD14 + monocytes was confirmed by flow cytometry using Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA) and stained for 30 min at 4 °C with anti-CD14-FTIC (BD Biosciences, USA) and anti-CD3-PE-Cy5.5 (BD Biosciences, USA). Moreover, twenty-five samples of plasma provided by sixteen RA patients and nine healthy controls were collected after PBMC isolation and stored at –80 °C. The detection of TNF- α , IL-6, IL-2, IL-4, IFN- γ , and IL-10 has been performed using BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2 Cytokine Kit II following the manufacturer's instructions and assessed by Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, USA).

2.3. Gene expression analysis

RNA was extracted with the TRIzol® reagent (Invitrogen, USA) and cDNA transcribed by using a GoScript Reverse Transcription System (Promega, USA), according to manufacturers' instructions. *IRAK3* gene sequences were obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) and specific primers were designed by NCBI/Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/); primers sequences are as follows: Forward: 5'-TTGGTCTGGGCACAGAA AA–3' and Reverse: 5'-TAGCTCGACGATGTCCCATCT–3'. The PCR amplification efficiency was 99.177% when evaluated experimentally by standard curve analysis with cDNA serial dilution and their specificity was confirmed by melting curve analysis. Specific primers for *MYD88* gene analysis were described by Gomes-Silva (Gomes da Silva et al., 2021). The quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed using 1X SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA) and 10 μ M of specific primers for *MYD88* and *IRAK3*. Relative quantification of gene expression was normalized to *ACTB*, *GAPDH*, *18S* and *RPLP0* reference genes. Reactions were performed on ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific, USA). All relative quantification of gene expression followed MIQE guidelines (Bustin et al., 2009) and were calculated using normalized data (Vandesompele et al., 2002).

2.4. Statistical analyses

We assessed the normality of quantitative data using Shapiro-Wilk and verified the non-normal distribution in the analyzed data. The difference between the groups was assessed using the Man-Whitney or Kruskal-Wallis test, while the strength of the relationship between two quantitative data was evaluated by Spearman correlation test. Data are presented by mean $\pm$ standard deviation and a value of p < 0.05 was considered as statistically significant. All data were analyzed on the statistical software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

3. Results

3.1. Patients

Average age of the 20 RA patients was 53.20 ± 7.96 (33 to 66) years and the disease duration of 79.08 ± 81.99 (1 to 240) months. About 65% of patients showed a high activity of the disease measured by DAS28 and CDAI indices, while 45% showed moderate or severe disability measured by HAQ. Moreover, eight patients provided their radiographs of the hands and feet, and the presence of bone erosion was observed in three of them (Larsen score ≥ 2). According to the treatment, 85% used synthetic DMARDs (methotrexate, leflunomide, sulfasalazine or hydroxychloroquine) and 55% used glucocorticoid (prednisone) (Table 1). Average age of the 18 healthy controls was 53.83 ± 4.54 (44 to 59) years.

3.2. MYD88 and IRAK3 gene expression in RA patients and controls

We assessed MYD88 and IRAK3 gene expression in RA patients and controls (Fig. 1). The MYD88 gene expression was slightly higher in patients compared to controls although we did not find statistical differences (FC (Fold change) = 1.20; $p = 0.294$). On the other hand, the IRAK3 gene expression was lower in patients as compared to controls although the statistical significance was borderline (FC = -1.63 $p = 0.054$).

3.3. MYD88 and IRAK3 gene expression in RA patient's clinical features and treatment

RA patients were stratified in low/moderate and high activity disease, according to the disease activity indices measured by CDAI and DAS28-ESR (Table 2). We observed a downregulation of IRAK3 gene expression in RA patients with high activity when compared to low/moderate activity measured by CDAI index (FC = -1.78; $p = 0.030$) although no significant difference was observed in DAS28-ESR index ($p = 0.311$). In addition, no significant differences in MYD88 gene expression were observed in RA patients stratified according to the disease activity indices (CDAI: $p = 0.483$; DAS28-ESR: $p = 0.639$) or RA functional disability measure by the HAQ for MYD88 ($p = 0.067$) or

IRAK3 ($p = 0.150$) genes. Both genes were not associated to the presence of erosion (MYD88 $p = 0.393$; IRAK3 $p = 0.393$) (Table 2).

No significant correlation was found between genes' expression and biochemical markers (ESR and CRP), RA disease duration and tender or swollen joint count (TJC and SJC) (Table 3).

In addition, we assessed the impact of treatment upon MYD88 and IRAK3 gene expression. We compared three RA patients' groups: 1 - Naïve: patients without any treatment; 2 - Monotherapy: patients in treatment with only one synthetic DMARDs (methotrexate, leflunomide or hydroxychloroquine); 3 - Therapy combined: patients in treatment with a minimum of two synthetic DMARDs (methotrexate plus hydroxychloroquine or methotrexate plus sulfasalazine). Data expression did not differ among three treatment groups; however, we observed a lower expression of IRAK3 gene in untreated RA patients (Naïve) when compared to treated RA patients ($p = 0.129$) (Fig. 2a). On the other hand, MYD88 gene expression was similar among three groups ($p = 0.951$).

Moreover, due to the influence of glucocorticoids on inflammatory molecules we decided to assess the effect of therapy with prednisone on MYD88 and IRAK3 gene expression. We stratified patients according to prednisone use (users and non-users of prednisone). There were no significant differences among stratified groups, although a lower expression of IRAK3 in prednisone users as compared to non-users was observed (Fig. 2b).

3.4. MYD88 and IRAK3 gene expression and cytokine plasma levels

We assessed the correlation of MYD88 and IRAK3 gene expression in CD14 + monocytes with cytokine plasma levels in RA patients. IL-6, IL-2 and IL-10 were detected in 100% of the samples, while TNF- α was detected in 88.00% of samples. We did not observe significant correlation between MYD88 and IRAK3 gene expression and TNF- α , IL-10, IL-6 or IL-2 plasma levels. The IL-4 and IFN- γ were under the detection limit in all samples. Correlation data was available in Table 3.

4. Discussion

In this study we evaluated the involvement of MYD88 and IRAK3 genes in the RA pathogenesis analyzing the differential gene expression in CD14 + monocytes between RA patients and healthy individuals, also looking for association with clinical features and the plasma cytokine levels.

In a previous study, Sacre et al. (2007) observed that MyD88 protein was related to IL-6, IL-8 and TNF- α and matrix metalloproteinases production in synovial membrane cultures from RA patients tissue and can be relevant to joint destructive process occurring in RA. In addition, Joosten et al. (2003) observed a decrease in proinflammatory cytokines and chemokines of mice deficient for MyD88 and they did not develop streptococcal cell wall (SCW)-induced arthritis.

Previous studies that evaluated the relation between MYD88 expression and RA were performed in cellular models (Gomes da Silva et al., 2021; Gutiérrez-Cañas et al., 2006; Sacre et al., 2007). This is the first study that implemented the comparative analyzes between CD14 + monocytes RA patients and controls. Our results did not show significant differences in MYD88 gene expression when comparing RA patients and healthy controls. Similarly, a transcriptome study conducted in samples from peripheral blood and bone marrow monocytes did not observe differences of MYD88 gene expression between RA and osteoarthritis (OA) patients (Smiljanovic et al., 2018). Moreover, we did not find difference in MYD88 gene expression in synovial membrane cells of RA patients as compared to OA patients (Tamaki et al., 2011), although a upregulation was reported in fibroblast-like synoviocytes (FLS) of RA patients (Gutiérrez-Cañas et al., 2006). Although MYD88 is an important gene for inflammatory processes, its expression in monocytes lead us to hypothesize that it is not playing a role in RA development.

On the other hand, we detected a 1.63-fold decrease levels of the

Table 1
Clinical, laboratorial and demographics characteristics of the rheumatoid arthritis patients.

Variable	RA patients (N = 20)
Age; mean $\pm$ SD (range) years	53.20 $\pm$ 7.96 (33 to 66)
Disease duration; mean $\pm$ SD (range) months	79.08 $\pm$ 81.99 (1 to 240)
CRP; means $\pm$ SD (range) mg/L	1.60 $\pm$ 2.09 (0 to 7.9)
ESR; mean $\pm$ SD (range) mm/h	29.40 $\pm$ 11.19 (11 to 50)
TJC; mean $\pm$ SD (range)	11.05 $\pm$ 9.26 (0 to 28)
SJC; mean $\pm$ SD (range)	4.65 $\pm$ 4.73 (0 to 11)
Rheumatoid factor positive ^a , n (%)	7 (35.00)
DAS28 n (%)	
Low/moderate activity (DAS28 $\leq$ 5.1)	7 (35.00)
High activity (DAS28 > 5.1)	13 (65.00)
CDAI n (%)	
Low/moderate activity (CDAI $\leq$ 22)	7 (35.00)
High activity (DAS28 > 22)	13 (65.00)
HAQ n (%)	
Mild disability (HAQ < 1)	11 (55.00)
Moderate/Severe disability (HAQ $\geq$ 1)	9 (45.00)
Erosions present ^b , n (%)	3 (37.5)
Treatment with synthetic DMARDs, n (%)	17 (85.00)
Treatment with glucocorticoids, n (%)	11 (55.00)

CRP: C-reactive protein; ESR: Erythrocyte sedimentation rate; TJC: Tender joint count; SJC: Swollen joint count; DAS28: RA disease activity score; CDAI: Clinical Disease Activity Index; HAQ: Health Assessment Questionnaire and DMARDs: Disease-modifying antirheumatic drugs.

^a - Data available for 13 patients; ^b - Data available for 8 patients.

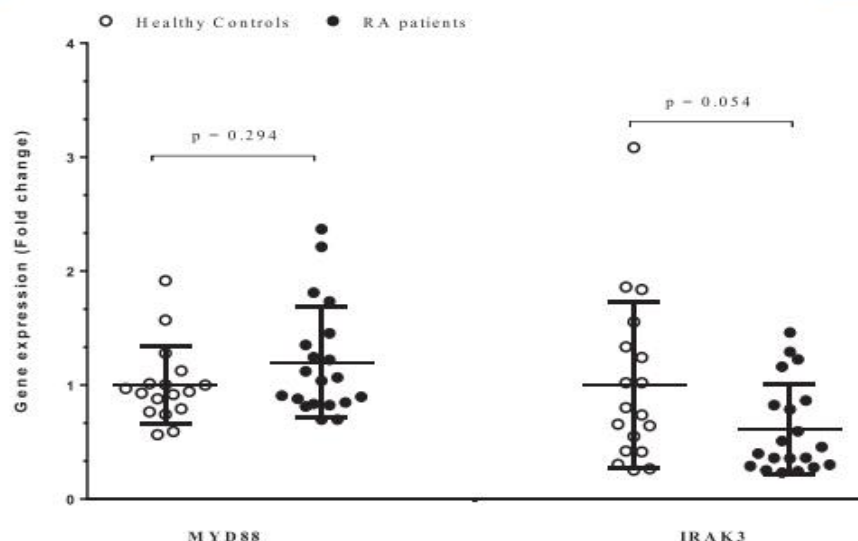


Fig. 1. Relative expression levels (fold change) of MYD88 and IRAK3 in CD14 + monocytes from RA patients and healthy controls. Statistical difference was tested with the non-parametric Mann-Whitney test. Data are presented as mean (central line) and standard deviation (top and bottom of the line).

Table 2

Comparison of diseases activities indexes (CDAI, DAS28-CRP and HAQ) and erosion of rheumatoid arthritis patients and MYD88 and IRAK3 gene expression in CD14 + monocytes.

Disease activities indexes mean (SD)	Disease activities indexes and biochemical markers; mean (SD)			
	MYD88 mean (SD)	P	IRAK3 mean (SD)	P
CDAI				
Low/moderate activity (N = 7)	1.31 ± 0.56	0.483	1.93 ± 0.85	0.030
High activity (N = 13)	1.13 ± 0.45		1.09 ± 0.80	
DAS28-ESR				
Low/moderate activity (N = 7)	1.30 ± 0.57	0.639	1.73 ± 0.99	0.311
High activity (N = 13)	1.13 ± 0.44		1.02 ± 0.82	
HAQ				
Mild disability (N = 11)	1.36 ± 0.53	0.067	1.67 ± 0.95	0.150
Moderate/Severe disability (N = 9)	0.99 ± 0.34		1.03 ± 0.74	
Erosion Presence (N = 3)	1.56 ± 0.33	0.393	1.50 ± 0.82	0.393
Absence (N = 5)	1.38 ± 0.69		0.93 ± 0.45	

CDAI: Clinical Disease Activity Index (Low/moderate: CDAI ≤ 2.2 and High: CDAI > 2.2); DAS28: RA disease activity score 28 (Low/moderate: DAS28 < 5.1; High: DAS28 ≥ 5.1); HAQ: Health Assessment Questionnaire (Mild: HAQ < 1; Moderate/Severe: HAQ ≥ 1); ESR: Erythrocyte sedimentation rate; P* - P value from Mann-Whitney test; SD: Standard deviation.

IRAK3 gene in RA patients compared with controls, although with borderline statistical significance ($p = 0.054$). Our data provide insights about the hypothesis that the decreased levels of IRAK3 gene in monocytes from RA patients can be related to disease development, since

Table 3

Correlation between MYD88 and IRAK3 gene expression in CD14 + monocytes from RA patients and RA clinical features and cytokine plasma levels.

Variables	MYD88 gene		IRAK3 gene	
	r (95% CI)	p-value	r (95% CI)	p-value
Disease duration	0.210 (-0.270 to 0.606)	0.374	0.255 (-0.225 to 0.636)	0.277
ESR	0.064 (-0.402 to 0.503)	0.789	0.002 (-0.453 to 0.455)	0.995
CRP	-0.077 (-0.595 to 0.487)	0.788	-0.306 (-0.777 to 0.285)	0.282
TJC	-0.040 (-0.484 to 0.422)	0.870	-0.107 (-0.535 to 0.365)	0.654
SJC	0.214 (-0.278 to 0.618)	0.379	-0.036 (-0.493 to 0.437)	0.885
TNF-α levels	-0.047 (-0.542 to 0.472)	0.856	-0.298 (-0.700 to 0.247)	0.257
IL-10 levels	0.168 (-0.372 to 0.623)	0.534	-0.106 (-0.582 to 0.425)	0.697
IL-6 levels	0.132 (-0.403 to 0.600)	0.625	0.179 (-0.361 to 0.630)	0.505
IL-2 levels	0.074 (-0.451 to 0.561)	0.786	0.107 (-0.424 to 0.583)	0.691

r: Correlations was tested using Spearman's correlation test; CI: Confidence interval; DAS28: Disease Activity Score 28-joint; CDAI: Clinical Disease Activity Index; HAQ: Health Assessment Questionnaire; ESR: erythrocyte sedimentation rate; CRP: C-reactive protein; TJC: Tender joint count; SJC: Swollen joint count.

IRAK3 acts to negatively modulate inflammation repressing some inflammation-related signaling cascades (Freihat et al., 2019). To our knowledge, only a study by Smiljanovic et al. (2018) assessed the transcriptome of monocytes from RA patients and reported a differential expression of IRAK3 gene between RA patients and OA, although the comparison between patients and healthy controls was not performed ($FC = 1.40p < 0.001$).

Additionally, we evaluated the association between MYD88 and IRAK3 gene expression and RA features as well as type of treatment. The IRAK3 gene expression was -1.78 fold downregulated in RA patients

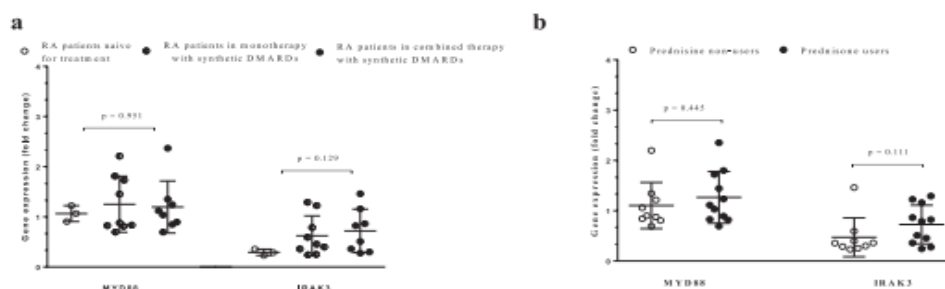


Fig. 2. Relative expression levels (fold change) of MYD88 and IRAK3 in CD14 + monocytes from RA patients. a – RA patients naïve for treatment (untreated), RA patients in monotherapy with synthetic DMARDs (methotrexate, leflunomide or hydroxychloroquine) and RA patients in combined therapy with synthetic DMARDs (methotrexate plus hydroxychloroquine or methotrexate plus sulfasalazine). Statistical difference was tested with the non-parametric Kruskal-Wallis test. b – RA patients in therapy with prednisone and without prednisone. Statistical difference was tested with the non-parametric Mann-Whitney test. Data are presented as mean (central line) and standard deviation (top and bottom of the line).

with high activity as compared to low or moderate activity using CDAI index ($p = 0.030$), confirming that *IRAK3* repression can also contribute to RA severity. We did not observe differences in *IRAK3* expression among different treatment strategies of RA.

Moreover, we measured selected cytokines of the Th1 and Th2 hallmark profiles since these cytokines reflect the general systemic inflammatory status; some studies already showed the correlation between MYD88 and IRAK3 and the studied cytokines (Sacre et al., 2007; Huang and Pope 2010; Freihat et al., 2019). However, we did not find correlation between MYD88 and IRAK3 gene expression and TNF- α , IL-6, IL-2 and IL-10 plasma levels. In contrast, crosstalk between MYD88 and cytokines levels has been demonstrated in vitro in RA synovial membrane cultures (Sacre et al., 2007). In addition, a previous study published by our group observed the association of a genetic variant in MYD88 gene (rs6853) and IL-1 β levels in healthy controls genotype-guided monocyte cell culture (Gomes da Silva et al., 2021). On the other hand, *IRAK3* has an opposite role in inflammation and has been related to lower cytokines levels in macrophages upon PAMP stimuli (Kobayashi et al., 2002). Thus, the MYD88 and IRAK3 gene expression can contribute to cytokines production in other cell types and in *in vitro* studies, as previously reported, but in CD14 + monocytes from RA patients and healthy controls this relation was not observed.

In conclusion, considering our results and the literature findings, we suggest that the decrease in *IRAK3* gene expression, but not MYD88, in CD14 + monocytes of RA patients seem to be relevant for development and RA disease activity. Notably, we are aware that our study suffers some limitations: we did not evaluate other important cytokines, including IL-1 β , so further analyses in another patients' set, including larger variety of cytokines, need to be performed. In addition, we assessed the gene expression levels of MYD88 and IRAK3 in monocytes, however, studies including functional approaches also are needed to clarify the relation between the expression of these genes and RA. We also assessed the relation between type of therapy and MYD88 and IRAK3 gene expression since the type of therapy may restrict our ability to recognize the eventual association between gene expression and clinical characteristics. We did not find MYD88 and IRAK3 gene expression differences within different therapy strategies. Finally, due to the small number of RA patients analyzed studies with larger groups would be able to double-check and possibly confirm our hypotheses.

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

CRedit authorship contribution statement

Conceptualization: IIFGS and PSG. Data curation and Formal analysis: IIFGS and ADB. Methodology: IIFGS and FOS. Writing – original draft: IIFGS. Writing – review & editing: All the authors.

Declaration of Competing Interest

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

Acknowledgement

We would like to thank the Instituto Aggeu Magalhães (Fiocruz Pernambuco) for use its facilities.

References

- Aletaha, D., Neogi, T., Silman, A.J., Funovits, J., Felson, D.T., Bingham, C.O., Birnbaum, N.S., Burmester, G.R., Bykerk, V.P., Cohen, M.D., Combe, B., Costenbader, K.J.L., Dougados, M., Emery, P., Ferraccioli, G., Haxel, J.M.W., Hobbs, K., Huizinga, T.W.J., Kavanaugh, A., Kay, J., Kvien, T.K., Laing, T., Mease, P., Ménard, H.A., Moreland, L.W., Naden, R.L., Pincus, T., Smolen, J.S., Stankiewicz-Biernat, E., Symmons, D., Tak, P.P., Upchurch, K.S., Vencovsky, J., Wolfe, F., Hawker, G., 2010. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62 (9), 2569–2581. <https://doi.org/10.1002/art.27584>.
- Aletaha, D., Smolen, J.S., 2005. The Simplified Disease Activity Index (SDAI) and the Clinical Disease Activity Index (CDAI): a review of their usefulness and validity in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23, S100–S108.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Cho, M.-L., Ju, J.-H., Kim, H.-R., Oh, H.-J., Kang, C.-M., Jhun, J.-Y., Lee, S.-Y., Park, M.-K., Min, J.-K., Park, S.-H., Lee, S.-H., Kim, H.-Y., 2007. Toll-like receptor 2 ligand mediates the upregulation of angiogenic factor, vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Immunol. Lett.* 108 (2), 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2006.11.005>.
- Freihat, L.A., Wheeler, J.L., Wong, A., Turek, I., Manalack, D.T., Irving, H.R., 2019. IRAK3 modulates downstream innate immune signalling through its guanylate cyclase activity. *Sci. Rep.* 9, 15468. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51913-3>.
- Gomes da Silva, L.J.F., Lima, C.A.D., Silva, J.E.A., Rushansky, E., Mariano, M.H.Q.A., Rolim, P., Oliveira, R.D.R., Louzada-Júnior, P., Souto, F.O., Crovello, S., de Azevedo Silva, J., Sandrin-Garcia, P., 2021. Is there an inflammation role for MYD88 in Rheumatoid Arthritis? *Inflammation* 44 (3), 1014–1022. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01397-5>.
- Gutiérrez-Cañas, I., Juaranz, Y., Santiago, B., Arranz, A., Martínez, C., Galindo, M., Payá, M., Gomara, R.P., Pablos, J.L., 2006. VIP down-regulates TLR4 expression and TLR4-mediated chemokine production in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatology* 45, 527–532. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kei219>.
- Huang, Q.-Q., Pope, R.M., 2010. Role of toll like receptors in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 11, 357–364. <https://doi.org/10.1007/s11926-009-0051-z>.

- Joosten, L.A.B., Koenders, M.I., Smeets, R.L., Heuvelmans-Jacobs, M., Helsen, M.M.A., Takeda, K., Akira, S., Lubberts, E., van de Loo, F.A.J., van den Berg, W.B., 2003. Toll-like receptor 2 pathway drives streptococcal cell wall-induced joint inflammation: critical role of myeloid differentiation factor 88. *J. Immunol.* 171 (11), 6145–6153. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.11.6145>.
- Kobayashi, K., Hernandez, L.D., Galán, J.E., Janeway, C.A., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2002. IRAK-M is a negative regulator of toll-like receptor signaling. *Cell* 110 (2), 191–202. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00827-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00827-9).
- Larsen, A., Dale, K., Eek, M., 1977. Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol. Diagn. (Stockh.)* 18 (4), 481–491. <https://doi.org/10.1177/028418517701800415>.
- Lin, S.-C., Lo, Y.-C., Wu, H., 2010. Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465 (7300), 885–890. <https://doi.org/10.1038/nature09121>.
- Prevoo, M.L.J., Van't Hof, M.A., Kuper, H.H., Van Leeuwen, M.A., Van De Putte, L.B.A., Van Riel, P.L.C.M., 1995. Modified disease activity scores that include twenty-eight joint counts. Development and validation in a prospective longitudinal study of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38 (1), 44–48.
- Rana, A.K., Li, Y., Dang, Q., Yang, F., 2018. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int. Immunopharmacol.* 65, 348–359. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.016>.
- Sacre, S.M., Andreaskos, E., Kiriakidis, S., Amjadi, P., Lundberg, A., Giddins, G., Feldmann, M., Brennan, F., Foxwell, B.M., 2007. The toll-like receptor adaptor proteins MyD88 and Mal/TIRAP contribute to the inflammatory and destructive processes in a human model of rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* 170 (2), 518–525. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060657>.
- Smiljanovic, B., Radzikowska, A., Kuca-Warnawin, E., Kurowska, W., Grün, J.R., Stuhlmeier, B., Bonin, M., Schulte-Wrede, U., Sörensen, T., Kyogoku, C., Bruns, A., Hermann, S., Ohndorf, S., Aupperle, K., Backhaus, M., Burmester, G.R., Radbruch, A., Grützka, A., Maslinski, W., Häupl, T., 2018. Monocyte alterations in rheumatoid arthritis are dominated by preterm release from bone marrow and prominent triggering in the joint. *Ann. Rheum. Dis.* 77 (2), 300–308. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2017-211649>.
- Smolen, J.S., Aleisha, 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. Primers* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.1>.
- Sode, J., Vogel, U., Bank, S., Andersen, P.S., Hetland, M.L., Loch, H., Heegaard, N.J.H., Andersen, V., 2018. Confirmation of an IRAK3 polymorphism as a genetic marker predicting response to anti-TNF treatment in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* 18 (1), 81–86. <https://doi.org/10.1038/tpj.2016.66>.
- Tamaki, Y., Takakubo, Y., Hirayama, T., Kontinen, Y.T., Goodman, S.B., Yamakawa, M., Takagi, M., 2011. Expression of toll-like receptors and their signaling pathways in rheumatoid synovitis. *J. Rheumatol.* 38 (5), 810–820. <https://doi.org/10.3899/jrheum.100732>.
- Uhlir, T., Haavardsholm, E.A., Kvien, T.K., 2006. Comparison of the health assessment questionnaire (HAQ) and the modified HAQ (MHAQ) in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 45, 454–458. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kel181>.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3 (research0034), 1. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>.
- Xue, J., Xu, L., Zhu, H., Bai, M., Li, X., Zhao, Z., Zhong, H., Cheng, G., Li, X., Hu, F., Su, Y., 2020. CD14+CD16+ monocytes are the main precursors of osteoclasts in rheumatoid arthritis via expressing Tyro3TK. *Arthritis Res. Ther.* 22, 221. <https://doi.org/10.1186/s13075-020-02308-7>.

APÊNDICE B - ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

CIITA GENE POLYMORPHISM (S3087456) IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND RHEUMATOID ARTHRITIS: A POPULATION-BASED COHORT STUDY

Artigo publicado na revista “International Journal of Immunogenetics” com Fator de Impacto de 1.551.

Received: 14 October 2020 | Revised: 30 May 2021 | Accepted: 6 June 2021
DOI: 10.1111/ijg.12548

SHORT COMMUNICATION

IMMUNOGENETICS WILEY

CIITA gene polymorphism (rs3087456) in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: A population-based cohort study

Suelen Cristina Lima¹ | Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva^{1,2} |
Denise de Queiroga Nascimento^{1,2} | Ronald Rodrigues de Moura³ |
Matheus da Silva Mesquita¹ | Nadja Maria Jorge Asano⁴ | Gisele Vagjel Fernandes⁵ |
Lucila Maria Valente⁵ | Eliezer Rushansky⁶ | Maria Helena Queiroz de Araújo Mariano⁶ |
Ricardo Machado Xavier⁷ | José Artur Bogo Chies⁸ | Sergio Crovella⁹ |
Paula Sandrin-Garcia^{1,10}

¹Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Recife, Brazil

²Postgraduate Program in Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

³Department of Advanced Diagnostics, IRCCS Materno Infantile Burlo Garofalo, Trieste, Italy

⁴Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

⁵Division of Nephrology, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

⁶Division of Clinical Rheumatology, University of Pernambuco, Recife, Brazil

⁷Rheumatology Sector, Clinical Hospital, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁸Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁹Department of Biological and Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, Doha, State of Qatar

¹⁰Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Correspondence

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária - ZIP CODE: 50670-901, Recife - Pernambuco - Brazil.
Email: issaigomes@gmail.com

Abstract

Systemic lupus erythematosus (SLE) and rheumatoid arthritis (RA) are influenced by genetic variants in immune system HLA genes. The Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator (CIITA) is an important co-activator of the HLA transcriptional complex; the single nucleotide variant (SNV) rs3087456 localized in the gene promoter region (~168 A/G) has been reported as able to modify its transcription level. In our study, we assessed CIITA rs3087456 SNV in 1,044 Brazilians from two Brazilian regions (Northeast and South) to verify the association with susceptibility and clinical manifestations of (SLE) and (RA) using TaqMan SNP Genotyping Assays System. We observed a protection for a recessive model (GG x AA+AG) for RA susceptibility and increased risk for erosion development in AG genotype patients. No significant association was observed for SLE susceptibility; however, we observed significant increased risk for Class IV and V nephritis development in G allele and GG genotype patients. In conclusion, we showed the contribution of CIITA rs3087456 to SLE or RA clinical features and RA susceptibility in the studied populations.

KEYWORDS

human leukocyte antigen (HLA), MHC2TA, rheumatoid arthritis, single nucleotide variation, systemic lupus erythematosus

[Correction added on 9 July 2021, after first online publication: The affiliation of Sergio Crovella is corrected to Department of Biological and Environmental Sciences, College of Arts and Sciences, Qatar University, Doha, State of Qatar.]

IS THERE AN INFLAMMATION ROLE FOR MYD88 IN RHEUMATOID ARTHRITIS?

Artigo publicado na revista “Inflammation” com Fator de Impacto de 4.092.

Inflammation (© 2021)
DOI: 10.1007/s10753-020-01397-5

ORIGINAL ARTICLE



Is there an Inflammation Role for *MYD88* in Rheumatoid Arthritis?

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva^{1,2,7}  Camilla Albertina Dantas Lima,^{2,3}
José Eduardo Adelino Silva,² Eliezer Rushansky,⁴ Maria Helena Queiroz Araujo Mariano,⁴
Patrícia Rolim,⁵ Renê Donizeti Ribeiro Oliveira,⁵ Paulo Louzada-Júnior,⁵
Fabrício Oliveira Souto,^{2,6} Sergio Crovella,^{1,2} Jaqueline de Azevêdo Silva,^{1,2} and
Paula Sandrin-Garcia^{1,2}

Received August 29, 2020; accepted December 7, 2020

Abstract— Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune and inflammatory disease with strong genetic influence, especially upon immune response components. Several cytokines from the toll-like receptors activation pathway display recognized role for RA establishment. However, few studies have verified the role of key mediators such as *MYD88* gene and its genetic variants. In the present study, we aim to evaluate the rs6853 functional single-nucleotide variation (SNV) role in RA etiopathogenesis, clinical severity status, and its impact in *MYD88* mRNA levels and IL-1 β protein levels. For the association study, a total of 423 RA patients and 346 health individuals, enrolled as control, from Northeast and Southeast Brazil were genotyped using specific Taqman probe. For the gene expression assays, we performed a *MYD88* rs6853 genotype-guided monocyte cell culture divided into non-stimulated and lipopolysaccharides

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Rua Prof Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil

²Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Recife, Pernambuco, Brazil

³Department of Oceanography, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Division of Clinical Rheumatology, University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁵Clinical Immunology Division, Department of Medicine, Medicine Faculty of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁶Núcleo de Ciências da Vida, Centro Acadêmico do Agreste, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁷To whom correspondence should be addressed at Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Rua Prof Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil. E-mail: iisauragomes@gmail.com

MIRNA-195 EXPRESSION IN THE TUMOR TISSUES OF FEMALE BRAZILIAN BREAST CANCER PATIENTS WITH OPERABLE DISEASE

Artigo publicado na revista “Clinics” com Fator de Impacto de 2.365.



CLINICS

ORIGINAL ARTICLE

miRNA-195 expression in the tumor tissues of female Brazilian breast cancer patients with operable disease

Alexandre Cesar Vieira de Sales¹,¹ Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva¹,¹ Matheus Carvalho Brito Leite¹,¹ Leandro de Lima Coutinho¹,¹ Renata Bezerra de Albuquerque Cavalcante Reis¹,¹ Danyelly Brunessa Gondin Martins¹,¹ José Luiz de Lima Filho¹,¹ Fabrício Oliveira Souto¹,¹

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (UKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, BR. ²Núcleo de Ciências da Vida (NCV), Centro Acadêmico do Agreste (CAA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Caruaru, PE, BR.

de Sales ACV, da Silva IIFG, Leite MCB, de Lima Coutinho L, de Albuquerque Cavalcante Reis RB, Martins DBG, et al. miRNA-195 expression in the tumor tissues of female Brazilian breast cancer patients with operable disease. Clinics (Sao Paulo). 2021;76:e2142

*Corresponding author. E-mail: acsales@uol.com.br

OBJECTIVE: This study aimed to assess miRNA-195 expression in the tumor tissues from a cohort of Brazilian female breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy (NAC) and evaluate its correlation with various clinicopathological markers.

METHODS: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to evaluate the miRNA-195 expression in tumor tissues from a cohort of female breast cancer patients undergoing NAC. This expression was then correlated with the occurrence of several distinct breast cancer molecular subtypes and other clinicopathological variables.

RESULTS: A total of 55 patients were included in this study, 28 (50.9%) of whom were treated using NAC. Tumor miRNA-195 expression was suppressed in breast cancer patients, regardless of their exposure to systemic treatments, histological grade, size, nodal status, and tumor-node-metastasis (TNM) staging. This was more pronounced in luminal and triple-negative patients, and patient's response to NAC was correlated with an increase in miRNA-195 expression.

CONCLUSION: miRNA-195 is downregulated in the tumor tissues of Brazilian breast cancer patients regardless of NAC exposure; this reinforces its role as a tumor suppressor and a potential biomarker for chemotherapy response.

KEYWORDS: miRNA-195; Breast Cancer; Biomarker; Tumor Tissue; Neoadjuvant Chemotherapy.

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common cancer among women, and there are an estimated 2.1 million new cases of breast cancer annually. Breast cancer is also the leading cause of cancer-related deaths in over 100 countries (1), and despite significant evolution in our understanding of breast cancer carcinogenesis and its molecular pathways, the development of noninvasive diagnostic and prognostic biomarkers remains an unmet need. In fact, mammography is still considered the gold standard for the screening and early diagnosis of breast cancer in asymptomatic patients (2).

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNA molecules comprising between 19 and 23 nucleotides; they regulate gene expression at the posttranscriptional level (3).

Accumulating evidence suggests that miRNAs play a crucial role in several physiological and pathological processes including metabolism, proliferation, differentiation, and apoptosis. Their dysregulation has been associated with a broad spectrum of diseases including Alzheimer's dementia, Parkinson's disease, diabetes, obesity, cardiovascular diseases, autoimmune disorders, and cancer (4,5).

miRNAs are differentially expressed in healthy and tumor cells and may even exhibit tissue-specific signatures among distinct types of cancer. These small regulators can either promote or suppress tumor development and progression by influencing various oncogenic processes including tumor initiation, promotion, malignant conversion, progression, and metastasis (6). In addition, miRNAs can be detected in the intracellular environment and in several body fluids, such as blood, urine, saliva, semen, and breast milk. This makes them a promising source of stable, noninvasive biomarkers for cancer diagnosis, prognosis, and treatment (7,8).

miRNAs have been extensively investigated as promising biomarkers for the diagnosis, prognosis, and treatment of breast cancer and other neoplasms (9). Currently, only three established biomarkers (ER, PR, and HER-2) are routinely evaluated for all newly diagnosed breast cancer patients (10). However, there is a high degree of heterogeneity in the identity of the miRNAs associated with different cancers and

Copyright © 2021 CLINICS – This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium or format, provided the original work is properly cited.

No potential conflict of interest was reported.

Received for publication on June 21, 2020. Accepted for publication on October 2, 2020

DOI: 10.6061/clinics/2021/e2142

MIRNA21 EXPRESSION IN THE BREAST CANCER TUMOR TISSUE IS INDEPENDENT OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

Artigo publicado na revista “Breast Cancer: Targets and Therapy” com Fator de Impacto de 1.410.

Breast Cancer: Targets and Therapy

Dovepress

open access to scientific and medical research

Open Access Full Text Article

ORIGINAL RESEARCH

Mirna21 Expression in the Breast Cancer Tumor Tissue is Independent of Neoadjuvant Chemotherapy

This article was published in the following Dove Press journal:
Breast Cancer: Targets and Therapy

Alexandre Cesar Vieira Sales^{1,2}
Isaura Isabelle Fonseca
Gomes da Silva¹
Matheus CB Leite¹
Leandro L Coutinho¹
Renata BAC Reis¹
Angela Castoldi¹
Danyelly BG Martins¹
José Luiz Lima-Filho¹
Fabrício Oliveira Souto^{1,2}

¹Keizo Asami Immunopathology Laboratory, LIKA/Federal University of Pernambuco – UFPE, Recife, PE, Brazil;
²Life Sciences Nucleus– NCV, Agreste Academic Center– CAA, Federal University of Pernambuco – UFPE, Caruaru, PE, Brazil

Introduction: MicroRNA-21 (miRNA-21) has been described as one of the most significantly upregulated miRNAs in human breast cancer. However, limited knowledge exists on miRNA-21 expression in breast cancer tissue after neoadjuvant chemotherapy (NAC).

Purpose: The aim of this study was to assess miRNA-21 expression in the tumor tissues of Brazilian patients with breast cancer who underwent NAC and its correlation with clinicopathological variables.

Patients and Methods: Utilizing qRT-PCR, miRNA-21 expression in tumor tissue was measured in a cohort of female patients with breast cancer who underwent NAC. The correlation of miRNA-21 expression with breast cancer molecular subtypes and other clinicopathological variables was also assessed.

Results: A total of 55 patients were included in the study, and 28 (50.9%) underwent NAC. miRNA-21 was upregulated in patients with breast cancer, regardless of previous exposure to chemotherapy, molecular subtypes, tumor-node-metastasis (TNM) staging and lymph node status of the axilla. miRNA-21 expression did not differ between patients with breast cancer who achieved a pathologic complete response after NAC and healthy controls.

Conclusion: miRNA-21 was upregulated in the tumor tissue of Brazilian patients with breast cancer regardless of NAC treatment, which reinforces its role as an “oncomiR” and a potential biomarker.

Keywords: miRNA-21, breast cancer, biomarker, tumor tissue, neoadjuvant chemotherapy

Introduction

With an annual estimate of 2.1 million new cases worldwide, breast cancer is the most common neoplasia among women and is the leading cause of cancer-related death in over 100 countries.¹ Despite the significant progress in the comprehension of breast cancer molecular biology, mammography is still considered the gold standard method for screening and early diagnosis in asymptomatic patients,² and the development of novel biomarkers for breast cancer diagnosis and disease outcome prediction is urgently needed.

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNA molecules with a length of 19–23 nucleotides that regulate gene expression at the posttranscriptional level.³ Based on accumulated evidence, miRNAs play a crucial role in several physiological and pathological processes, such as metabolism, proliferation, differentiation and apoptosis. Their deregulation has been associated with a broad spectrum of diseases, such as Parkinson's disease, Alzheimer's dementia, obesity, diabetes, autoimmune disorders, cardiovascular diseases and cancer.^{4,5}

Correspondence: Alexandre Cesar Vieira Sales; Fabrício Oliveira Souto
Keizo Asami Immunopathology Laboratory, LIKA/Federal University of Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife, PE 52171-011, Brazil
Tel/Fax: +55 (81) 2126-8484;
+55 (81) 2126-8484
Email: ac.sales@uol.com.br;
fabricao.souto@ufpe.br

submit your manuscript | www.dovepress.com
Dovepress
http://dx.doi.org/10.31463/BCTT.13249519

Breast Cancer: Targets and Therapy 2020; 12:141–151

141

© 2020 Sales et al. This work is published and licensed by Dove Medical Press Limited. The full terms of this license are available at <https://www.dovepress.com/terms.php> and incorporate the Creative Commons Attribution – Non Commercial (unpublished, cc) license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). By accessing the work you hereby accept the Terms. No commercial uses of the work are permitted without any further permission from Dove Medical Press Limited, provided the work is properly attributed. For permission for commercial use of this work, please see paragraphs 4.2 and 5 of our Terms (<https://www.dovepress.com/terms.php>).

PHARMACOGENETIC PROFILE AND THE DEVELOPMENT OF THE DYSKINESIA INDUCED BY LEVODOPA-THERAPY IN PARKINSON'S DISEASE PATIENTS: A POPULATION-BASED COHORT STUDY

Artigo publicado na revista “Molecular Biology Reports” com Fator de Impacto de 2.316.

Molecular Biology Reports
https://doi.org/10.1007/s11033-020-05956-9

ORIGINAL ARTICLE



Pharmacogenetic profile and the development of the dyskinesia induced by levodopa-therapy in Parkinson's disease patients: a population-based cohort study

Erinaldo Ubirajara Damasceno dos Santos¹ · Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva² · Amdore Guescel C. Asano^{4,5} · Nadja Maria Jorge Asano^{4,5} · Maria De Mascena Diniz Maia³ · Paulo Roberto Eleutério de Souza^{1,2,3}

Received: 3 August 2020 / Accepted: 28 October 2020
© Springer Nature B.V. 2020

Abstract

Levodopa-induced dyskinesia (LID) is an adverse effect that negatively impacts the quality of life of patients with Parkinson's disease (PD). Studies report that genetic variations in the genes of the pharmacogenetic pathway of the levodopa (L-DOPA) might be associated with LID development. The goal of the present study was to investigate a possible influence of functional genetic variants in the *DRD1* (rs4532), *DRD2* (rs1800497), *DAT1* (rs28363170), and *COMT* (rs4680) genes with LID development. A total of 220 patients with idiopathic PD were enrolled. The genotyping for *DRD1* (rs4532), *DRD2* (rs1800497), *DAT1* (rs28363170), and *COMT* (rs4680) polymorphisms were performed using Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Univariate and multivariate analyses were performed to assess the association of these polymorphisms and risk factors with LID development. Multivariate Cox regression analysis showed increased risk to LID development for both Levodopa Dose Equivalency (LED) (Hazard ratios (HR)= 1.001; 95% CI 1.00–1.01; $p=0.009$) and individuals carrying the *COMT* L/L genotype (HR= 2.974; 95% CI 1.12–7.83; $p=0.010$). Furthermore, when performed a Cox regression analysis adjusted for a total LED, we observed that the genotype *COMT* L/L had a 3.84-fold increased risk for LID development (HR= 3.841; 95% CI 1.29–11.37; $p=0.012$). Our results suggest that before treating LID in PD patients, it is important to take into consideration genetic variant in the *COMT* gene, since *COMT* LL genotype may increase the risk for LID development.

Keywords Pharmacogenetics · Levodopa · Genetic variants · PCR-RFLP · Parkinson's disease

Introduction

Parkinson's disease (PD) is multisystem and multifactorial [1–3]. This disorder affects about 6.2 million individuals worldwide currently [4] and is characterized by motor and non-motor symptoms [1, 2, 5]. The motor symptoms result from an ongoing prominent degeneration of dopaminergic cells in the substantia nigra pars compacta (SNc), leading to depletion of dopamine and loss of control over motor functions [6, 7].

The Levodopa (L-DOPA), a dopamine precursor, is the principal pharmacological agent used in the treatment of PD symptoms to restore the dopamine level in the brain [8–11]. Although L-DOPA improves parkinsonian symptoms patients treated in long-term with dopaminergic medications may develop side-effects such as Levodopa-induced dyskinesia (LID) [12–15].

The prevalence of LID development varies from 3 to 94% among PD patients [12, 15]. The main risk factors associated

✉ Paulo Roberto Eleutério de Souza
prsouza30@gmail.com

¹ Graduate Program in Applied Cellular and Molecular Biology, University of Pernambuco (UPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N – Dois Irmãos, CEP: 52171-900 Recife, PE, Brazil

² Graduate Program in Genetics, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

³ Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil

⁴ Department of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil

⁵ Pro-Parkinson Program of the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco Recife (HC/UFPE), Recife, PE, Brazil

IL1B, IL18, NFKB1 AND IFNG GENE INTERACTIONS ARE ASSOCIATED WITH SEVERITY OF RHEUMATOID ARTHRITIS: A PILOT STUDY

Artigo publicado na revista “Autoimmunity” com Fator de Impacto de 2.947.

AUTOIMMUNITY
https://doi.org/10.1080/08916934.2019.1710831



ORIGINAL ARTICLE



IL1 β , IL18, NFKB1 and IFNG gene interactions are associated with severity of rheumatoid arthritis: A pilot study

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva^{a,b} , Camilla Albertina Dantas Lima^{b,c}, Maria Larissa Andrade Monteiro^d, Daniella Alves Silva Pimentel Barboza^d, Eliezer Rushansky^e, Maria Helena Queiroz de Araújo Mariano^e, Paula Sandrin-Garcia^{a,b}, Paulo Roberto Eleutério de Souza^d and Maria de Mascena Diniz Maia^d

^aDepartment of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^bLaboratory of Immunopathology Keizo Asami, Recife, Brazil;

^cDepartment of Oceanography, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^dDepartment of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^eDivision of Clinical Rheumatology, University of Pernambuco, Recife, Brazil

ABSTRACT

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease which can lead to progressive and functional disability. Literature data suggest that some inflammatory proteins are dysregulated in RA patients and its genetic polymorphisms may contribute to the aetiology and pathogenesis of disease in different ethnic groups. Polymorphisms in *IL1 β* , *IL18*, *NFKB1* and *IFNG* genes were studied in different populations with RA, but the analysis indicated contradictory results. Thereby, we hypothesised that polymorphisms in these genes could have a combined effect on susceptibility to and severity of disease. We evaluated the +3953 C/T *IL1 β* (rs1143634), -137 G/C *IL18* (rs187238), -94 ins/del ATTG *NFKB1* (rs28362491) and +874 T/A *IFNG* (rs2430561) polymorphisms in the northeastern Brazilian population. Peripheral blood samples were collected and DNA extraction was conducted. The polymorphisms were evaluated by RFLP and ARMS-PCR. An association was observed in rs1143634 which showed a protective effect against development of RA in carriers of the T allele (OR = 0.58; 95% CI 0.36–0.92; $p = .020$). In addition, we found an association among genotypes of the rs1143634 with the HAQ index ($p = .021$) and rs2430561 with DAS28 ($p = .029$) and CDAI ($p = .029$). In relation to combined effects of these SNPs (C/C to rs1143634, G/G to rs187238, V/I to rs28362491 and AA to rs2430561) we found a significant association with decreased functional disability (HAQ index $p < .001$) and ESR ($p = .034$), indicating a lower disease activity in carriers of these genotypes. GLM analysis confirmed these associations (HAQ ($F = 5.497$; $p < .001$) and ESR ($F = 2.727$; $p = .032$)). Our analysis indicated that in the studied population +3953 C/T *IL1 β* (rs1143634), -137 G/C *IL18* (rs187238), -94 ins/del ATTG *NFKB1* (rs28362491) and +874 T/A *IFNG* (rs2430561) polymorphisms can together contribute to RA severity although they do not individually influence the disease.

ARTICLE HISTORY

Received 28 May 2019
Revised 20 December 2019
Accepted 29 December 2019

KEYWORDS

Combined effect; polymorphism; rheumatoid arthritis; SNP; gene interaction

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease characterised by persistent chronic synovitis that can lead to a progressive functional disability, systemic complications and high socioeconomic costs [1]. The aetiology of RA remains unclear, but it is known that a dysregulated immune system involves multiple factors such as genetic and environmental aspects [2].

Many signalling pathways and inflammatory proteins may have an important role in injury tissue and be related to RA pathogenesis [3,4]. Among these, IL (interleukin) -1 β , IL-18 and IFN- γ (interferon- γ), have been found to play an essential role in pathogenesis of RA [5]. IL-1 β and IL-18 are highly expressed in RA patients and studies have indicated a strong correlation of cytokine levels and RA disease activity [6–9]. Similarly, high levels of IFN- γ have been found in RA patients and have also been correlated with

disease activity [3,6]. The high expression of these proteins can be induced by stimulation of the NF κ B (nuclear factor kappa B) pathway [10,11]. Previous studies have also observed altered levels of NF κ B in RA patients [12], and its relation with disease comorbidity [13] or treatment response [14]. In addition, polymorphisms in *IL1 β* , *IL18*, *NFKB1* and *IFNG* genes have been studied in different populations with RA, but when the SNPs were analysed individually, contradictory results were found [7,8,14,15].

The *IL1B* + 3953 C/T gene polymorphism (rs1143634) is located on exon V and promotes a synonymous substitution which results in an increase in IL-1 β secretion [8,16]. Likewise, the *IL18* -137 G/C gene polymorphism (rs187238) is located in a promoter region and it is related to overexpression of the IL-18 protein [17]. Although a meta-analysis study performed in 2016 did not show associations between RA susceptibility and this polymorphism, its influence on disease activity remains unclear [18]. The *NFKB1*

CONTACT Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva isauragomes@gmail.com Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil; Rua Prof Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária – CEP, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil

Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2020 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

THE PATTERN OF METHYLATION AND POLYMORPHISM IN INTERLEUKIN-6 PROMOTER GENE ARE RELATED TO THE DEVELOPMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS

Artigo publicado na revista “Acta Medica Iranica” com Fator de Impacto de 0.88.

ORIGINAL ARTICLE

The Pattern of Methylation and Polymorphism in Interleukin-6 Promoter Gene Are Related to the Development of Rheumatoid Arthritis

Isaura Isabelle Fonseca Gomes-Silva¹, Eliezer Rushansky², Francisco Geraldo Carvalho-Neto¹, Amanda Virginia Batista Vieira³, Maria Helena Queiroz de Araujo Mariano², Paulo Roberto Eleutério de Souza³, Martín Alejandro Montes³, Maria Mascena Diniz Maia³

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235-Cidade Universitária, Recife-PE, Brazil

² Department of Clinical Rheumatology, University of Pernambuco, Rua Arnóbio Marques, 10-Santo Amaro, Recife-PE, Brazil

³ Department of Biology, Rural Federal University of Pernambuco, Rua Manoel de Medeiros-Dois Irmãos, Recife-PE, Brazil

Received: 08 Apr. 2017; Accepted: 12 Dec. 2017

Abstract- Rheumatoid Arthritis (RA) is a complex disease with higher level of *IL-6*. In order to elucidate the alterations related to *IL-6* gene in RA, we evaluated the -174 G/C *IL-6* gene polymorphism and methylation pattern of its promoter. A total of 120 RA patients and 120 healthy controls were recruited for polymorphism analysis, and 30 individuals of both groups were randomly selected for methylation analysis. The *IL-6* gene polymorphism was analyzed by *PCR-RFLP* and methylation pattern was analyzed by *MSP-PCR*. Regarding *IL-6* gene polymorphism, no significant difference was found between RA patients and controls ($P>0.05$). For DNA, two CpG regions of *IL-6* promoter gene was analyzed. The first region (-1069, -1061, -1057 and -1001 CpG) did not show significant differences, whereas the second region (-628, -610, -574 and -491 CpG) showed a significant hypermethylated status ($P=0.0004$) in RA patients as compared with controls. These results, suggest a possible relationship between methylation pattern and the susceptibility to RA in our studied population.

© 2018 Tehran University of Medical Sciences. All rights reserved.

Acta Med Iran 2018;56(7):429-433.

Keywords: Cytokine; Inflammation; Epigenetics; *MSP-PCR*; Single nucleotide polymorphism

Introduction

Rheumatoid Arthritis (RA) is an autoimmune disease of unknown etiology. Genetics immunological and epigenetic factors may contribute to RA susceptibility (1,2). Many cytokines are expressed in the process of this pathology (3), among them, the interleukin-6 (*IL-6*) that is a pleiotropic cytokine that can promote inflammation through to differentiation of T helper cells and proliferation of osteoclasts and synoviocytes (4,5). Besides this, has been documented higher levels of *IL-6* in serum and synovial fluid of RA patients (6). Studies have shown that high concentrations of cytokines may be related to genetic and epigenetic variations in RA subjects and consequently affected on susceptibility and severity of the disease (1,2). Besides that, studies involving polymorphism in cytokines genes have been associated with RA susceptibility (7,8). The -174 G/C *IL-6* (rs1800795) gene polymorphism, is responsible for

altering levels of cytokine in vivo (9) and was associated with inflammatory diseases, as like RA (7), acute rheumatic fever (10) and osteoarthritis (11). DNA methylation is an epigenetic modification that affects gene silencing and occurs mainly in CpG-rich islands (1). Recent studies have reported that methylation of CpG motifs is a potential mechanism of regulation of *IL-6* production that may be relevant to the pathogenesis of inflammatory diseases (12,13). Based on this information we hypothesized that the -174 G/C (rs1800795) *IL-6* gene polymorphism and *IL-6* gene promoter methylation pattern might constitute to both epigenetic and genetic susceptibility factors for RA in patients from Pernambuco, Brazil.

Materials and Methods

Study population

In our present study, 120 RA patients (cases) and

Corresponding Author: M. Mascena Diniz Maia

Department of Biology, Rural Federal University of Pernambuco, Rua Manoel de Medeiros-Dois Irmãos, Recife-PE, Brazil
Tel: +55 81 999691052 Fax: +55 81 33206300, E-mail address: mascenadiniz@hotmail.com

INTERLEUKIN (IL)-23 RECEPTOR, IL-17A AND IL-17F GENE POLYMORPHISMS IN BRAZILIAN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS

Artigo publicado na revista “Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis” com Fator de Impacto de 4.291

Arch. Immunol. Ther. Exp.
DOI 10.1007/s00005-017-0473-7



ORIGINAL ARTICLE

Interleukin (IL)-23 Receptor, IL-17A and IL-17F Gene Polymorphisms in Brazilian Patients with Rheumatoid Arthritis

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva¹ · Hildson Dornelas Angelo² ·
Elezer Rushansky³ · Maria Helena Mariano³ · Maria de Mascena Diniz Maia⁴ ·
Paulo Roberto Eleuterio de Souza⁵

Received: 5 October 2016 / Accepted: 14 March 2017
© L. Hirschfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Wrocław, Poland 2017

Abstract Rheumatoid arthritis (RA) is a progressive, autoimmune disease for which the previous studies have shown that some functional polymorphisms can influence its etiology. Knowing this, the aim of this study was to investigate the association of +2199 A/C *IL-23R* (rs10889677), −197 G/A *IL-17A* (rs2275913), and +7488 A/G *IL-17F* (rs763780) gene polymorphisms with RA susceptibility and clinical features in a Brazilian population. A total of 127 RA patients and 134 healthy controls were recruited for the analyses of polymorphic variants. Genotyping was performed using RFLP-PCR. Logistic regression was used to analyze the genotype distribution of the polymorphisms. Individuals carrying the homozygous CC genotype for the *IL-23R* polymorphism seem to be at lower risk for RA development (OR 0.22; $p = 0.004$), as well as those carrying the variant C allele (OR 0.56; $p = 0.002$). For the −197 G/A *IL-17A* polymorphism, the wild-type genotype (GG) was significantly associated with a 3.18-fold (OR 3.18; $p = 0.033$) increased risk for RA. In relation to the +7488 A/G *IL-17F* polymorphism, no significant difference was found between RA cases and

control subjects ($p > 0.05$). Moreover, when investigating the relationship between polymorphisms and clinical features, no evidence of an association was found. Our findings suggest that the variants +2199 A/C *IL-23R* and −197 G/A *IL-17A* could contribute to RA development in the studied population. However, larger studies are needed to fully understand this genetic predisposition.

Keywords Rheumatoid arthritis · Cytokines · Th17 profile · Polymorphisms

Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a common autoimmune disease that is associated with progressive incapacity, systemic complications, socioeconomic impact, and early death. The cause of RA is unknown, and the prognosis is guarded. The disease affects approximately 1% of adults worldwide (Alamanos et al. 2006; McInnes and Schett 2011). Genetic and environmental factors are related to the etiology and pathogenesis of the disease (Guo and Li 2016; Hunt and Emery 2014; Okada et al. 2014). RA involves an immunological disorder of the innate and adaptive system, promoting inflammatory cell infiltration and bone and cartilage erosion (Brzustewicz and Bryl 2015).

Many cytokines and other mediators play an important role in inflammation and tissue damage (Brzustewicz and Bryl 2015; Zaky and El-Nahrery 2016). Cytokines corresponding to T-lymphocyte profile helper 17 (Th17) are important in stimulating the proliferation of cells to combat intracellular and extracellular pathogens and promoting chronic inflammation and autoimmunity (Brzustewicz and Bryl 2015; Isailovic et al. 2015; Shabgah et al. 2014).

✉ Paulo Roberto Eleuterio de Souza
psouza30@gmail.com

¹ Pós-Graduate Program in Applied Cellular and Molecular Biology, University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

² Federal Institute of Pernambuco, Garanhuns, PE, Brazil

³ Division of Clinical Rheumatology, University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁴ Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil

⁵ Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, PE CEP 52171-900, Brazil

APÊNDICE C - CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

CONSTRUINDO SABERES EM BIOLOGIA - PARTE II.3 – APLICAÇÃO DE CASOS EM BIOLOGIA: PÓS-GRADUAÇÃO – ABP “PROBLEMATIZAÇÃO: A ETIOPATOGENESE DO XERODERMA PIGMENTOSO”

Livro disponível em <http://www.edupe.com.br/produto.php?codigo=60>

ISBN: 978-85-518-0976-1 (2018)

12

PROBLEMATIZAÇÃO: A ETIOPATOGENESE DO XERODERMA PIGMENTOSO

ISAURA ISABELLE FONSECA GOMES DA SILVA¹; JONATHAN WAGNER MEDEIROS²; MARIA TERESA MARQUIM NOGUEIRA CORNÉLIO³; ADRIANA GOMES VIEIRA⁴; MARÍLIA DE FRANÇA ROCHA⁵

¹Bióloga. Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada - UPE. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Genética, UFPE. E-mail: isauragomes@gmail.com

²Biomédico Mestre em Biologia Celular e Molecular Aplicada - UPE. Doutorando em Biologia Celular e Molecular Aplicada ICB/UPE. E-mail: jonathanmedeiros.biomed@gmail.com

³Bióloga. Mestre em Botânica (Área de concentração Citogenética) UFPE. Professora Assistente na área de Genética - ICB/UPE. E-mail: terezamarquim@upe.br

⁴Bióloga. Doutora em Genética Humana - UFPE. Docente Substituta na área de Genética - UFRPE. E-mail: adrianavieiragomes@gmail.com

⁵Bióloga. Doutora em Ciências Biológicas (Área de concentração Genética) UFPE. Professora Adjunta - área de Genética e Educação - ICB/UPE. E-mail: marilia.rocha@upe.br

1. INTRODUÇÃO

O Xeroderma Pigmentoso (XP) é uma doença de caráter autossômico recessivo, caracterizada por defeitos congênitos no sistema de reparo do DNA e expressividade variável (NUSSBAUM et al., 2016). A etiologia do XP vem sendo relacionada a diferentes genes que codificam proteínas atuantes no sistema de reparo por excisão de nucleotídeos (KASHIYAMA et al., 2013; MASUTANI et al., 1999). Sem o pleno funcionamento das proteínas relacionadas ao sistema de reparo, o dano ao DNA causado por agentes químicos e físicos pode tornar-se permanente, sendo este fator de suma importância para o surgimento de diversas complicações na vida do paciente, principalmente ao câncer de pele (CLEAVER, 2000; TOTONCHY et al., 2013). Os pacientes com XP frequentemente são acometidos por diversas desordens extra epidermais, dentre elas, perda da integridade neurológica e perda auditiva (TOTONCHY et al., 2013).

Sabendo que o XP é uma patologia que necessita de uma abordagem interdisciplinar para sua plena compreensão, podendo ser utilizada como modelo para discussão de temas considerados de difícil compreensão da disciplina de genética, como dano e reparo do DNA, expressividade variável e padrões de herança, faz-se necessário que os alunos de graduação compreendam bem o tema. Para isso, o presente estudo buscou facilitar a aprendizagem de alunos de graduação sobre o XP e suas características através de uma problematização, favorecendo a autonomia e estimulando o pensamento crítico do estudante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico e epidemiologia do Xeroderma Pigmentoso

O Xeroderma pigmentoso (XP) foi originalmente descrito no ano de 1863 e, posteriormente, foram identificados seis casos onde a pigmentação foi associada à atrofia e, assim, a patologia foi denominada Xeroderma Pigmentoso (KAPOSÍ, 1882).

No ano de 1968, foi estabelecida a origem molecular do XP, onde foram identificados numerosos defeitos no reparo do DNA em culturas de fibroblastos irradiados com luz ultravioleta (CLEAVER, 1968). Este distúrbio desfigurante e progressivamente letal é condicionado pela divisão celular e reparo de DNA anormal quando danificado pelo curto comprimento de onda ultravioleta (entre 280 e 320 nm) (GUILLÉN; MARTÍNEZ-LIARTE, 2004; ORTELLAO; RAMBALDO, 2007). Essa foi a primeira vez que uma síndrome humana foi relacionada com defeito no reparo de DNA. Atualmente se tem conhecimento que defeitos em treze diferentes genes que codificam para proteínas que participam do reparo por excisão de nucleotídeos (NER) (grupos de complementação XP-A a G), e mais um grupo variante (XP-V), que codifica uma polimerase de síntese translesão, a pol η, além de outros genes associados ao reparo estão associadas ao desenvolvimento de XP (KOCH et al., 2016; SCHUCH et al., 2017; SUN et al., 2016).

Os estudos de prevalência e incidência de XP em diferentes populações são escassos, porém, segundo a Sociedade Brasileira de Dermatologia, a taxa mundial para o XP é de 1: 1.000.000, nos EUA, enquanto na

IMPACTO DAS TECNOLOGIAS NAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

“CRISPR/CAS9 – UMA PROMISSORA FERRAMENTA DE EDIÇÃO GÊNICA”

ISBN: 978-85-7247-038-4 (2019)

CAPÍTULO 4

CRISPR/CAS9 – UMA PROMISSORA FERRAMENTA DE EDIÇÃO GÊNICA

Dalila Bernardes Leandro

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
– Programa de Pós-Graduação em Genética.
Recife/PE

Jessyca Kalyne Farias Rodrigues

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
– Graduação em Biomedicina, Laboratório de
Imunopatologia Kelzo Asami (LIKA), Recife/PE

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
– Programa de Pós-Graduação em Genética.
Recife/PE

RESUMO: A técnica de CRISPR/cas9 (Agrupamentos regularmente inter espaçados de pequenas repetições palindrômicas associados à endonuclease Cas9) é relativamente recente e tem se mostrado muito promissora para edição do DNA de vários organismos. O sistema CRISPR/Cas9 foi descrito originalmente como “sistema imune adaptativo” de alguns procariotos, defendendo estes de vírus e plasmídeos invasores. Esta técnica permite a clivagem específica de uma determinada região da dupla cadeia de DNA com grande eficiência, permitindo assim, a inserção ou deleção de sequências de DNA alvo. Recentemente sua aplicabilidade foi estendida à edição gênica. Este trabalho tem como objetivo revisar alguns aspectos da tecnologia CRISPR/Cas9,

descrevendo sua importância e utilização como ferramenta de edição do DNA. A técnica CRISPR/Cas9 promete grandes avanços na terapia gênica e no tratamento contra infecções de alguns patógenos. Sua capacidade de edição do DNA possibilita remover genes causadores de uma determinada anomalia ou até mesmo, substituí-los por genes saudáveis. Além disso, pesquisas apontam para a possibilidade do uso desta tecnologia na produção de modelos animais de estudo, plantas transgênicas, tratamento de doenças genéticas hereditárias, terapia do câncer, entre outros. Outra aplicação abordada neste trabalho, é sua utilização na remoção do provírus em pessoas infectadas pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), agindo principalmente nos reservatórios virais. Contudo, apesar de uma técnica extremamente inovadora, a CRISPR/Cas9 ainda requer grandes estudos com o intuito de avaliar seus efeitos a longo prazo tanto no indivíduo quanto em sua linhagem germinativa e garantir que não ocorra uma clivagem inespecífica do DNA. **PALAVRAS-CHAVE:** CRISPR/Cas9, Terapia Gênica, ferramenta de edição do DNA.

ABSTRACT: The CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated with the Cas9 endonuclease) technique is relatively recent and has been promising for DNA editing of several organisms.

CONCEITOS BÁSICOS DE EPIGENÉTICA PARA UNIVERSITÁRIOS: “METILAÇÃO DO DNA”

Livro disponível em http://www.editora.ufrpe.br/Conceitos_Basicos_de_Epigenetica
ISBN: 978-65-86547-17-7 (2021)

Capítulo II

METILAÇÃO DO DNA

Maria de Mascena Diniz Maia e
Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

Histórico e Princípios

A metilação do DNA é considerada uma das modificações epigenéticas mais estáveis e mais estudadas e deve ser o principal mecanismo a liderar a herança epigenética ao longo das gerações. Em 1975, dois biólogos ingleses, Robin Holliday e John Pugh, e um biólogo americano, Arthur Riggs, sugeriram pela primeira vez, que a metilação, uma modificação química do DNA, é herdável, pode ser induzida por influências ambientais e deve ser vista como um importante mecanismo para o controle da expressão gênica em organismos superiores. Assim, pode ser apontada como uma marca epigenética herdável e reversível, que se propaga após a replicação do DNA e tem fundamental influência na expressão gênica. Esse mecanismo explica, em parte, as mudanças nos padrões de expressão gênica e a diferenciação celular ao longo do desenvolvimento.

A reação de metilação consiste na adição de um radical metil (-CH₃) na posição 5' de uma molécula de citosina na sequência do DNA, resultando em uma 5-metil citosina (**Fig. 5**) geralmente seguida por uma guanina (dinu-

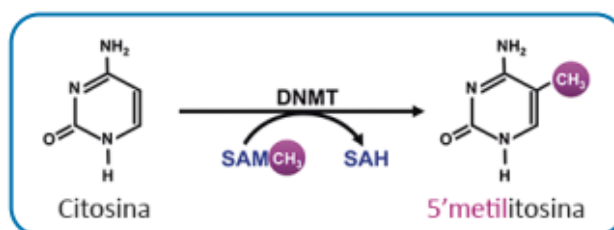


Fig. 5. A enzima DNA metil-transferase (DNMT) catalisa a transferência do grupamento metil (CH₃) da S-adenosil-metionina (SAM) para o carbono 5' da citosina, formando a 5-metilcitosina (5meC) ou seja, a citosina metilada.

Fonte: Adaptado de <https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arcr351/6-16.htm>

CONCEITOS BÁSICOS DE EPIGENÉTICA PARA UNIVERSITÁRIOS: “O MUNDO DOS RNAS”

Livro disponível em http://www.editora.ufrpe.br/Conceitos_Basicos_de_Epigenetica
ISBN: 978-65-86547-17-7 (2021)

Capítulo V

O MUNDO DOS RNAS

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

RNAs e o dogma central da biologia

Os RNAs (ácidos ribonucleicos) desempenham funções vitais na manutenção, homeostase e funcionamento de todas as células. Esta molécula é tão importante e versátil nos processos celulares que há uma hipótese em que o RNA foi considerado a primeira forma de vida na Terra primitiva e foi responsável pela formação da primeira célula procariota. Na hipótese do **Mundo de RNA**, proposta por Walter Gilbert, em 1986, a ideia de que o RNA foi a primeira molécula parece plausível, pois ela tem propriedades informativas como o DNA, ou seja, pode passar informação adiante para outras células e, tem propriedades catalíticas como enzimas, ou seja, podem catalisar reações como a própria síntese e outras funções que permitiram estabelecer a primeira célula formada. Neste capítulo, a grande versatilidade de funções de moléculas de RNA será abordada.

Diferente do DNA, o RNA geralmente é uma molécula de simples fita, o que o torna mais flexível e permite que a molécula apresente diversas conformações. Algumas moléculas de RNA podem ser denominadas de ribozimas pelo fato de que podem catalisar reações, como enzimas proteicas. Além disto, o RNA apresenta uma ribose em seu nucleotídeo, diferente do DNA que apresenta uma desoxirribose e, nos ribonucleotídeos, as bases nitrogenadas são adenina, guanina, citosina e uracila.

Existem diversos tipos de RNA em uma mesma célula, embora apenas algumas classes sejam discutidas amplamente em aulas de genética básica e molecular. Um dos principais pontos onde os RNAs celulares são abordados é no **dogma central da biologia**, que se refere ao fluxo de informações contidas no DNA até a formação de uma proteína, passando pela molécula intermediária do RNA (DNA → RNA → Proteína) (**Fig. 18**). No entanto, este RNA intermediário mencionado no dogma central da biologia refere-se ao RNA mensageiro (mRNA) ou **RNA codi-**

CONCEITOS BÁSICOS DE EPIGENÉTICA PARA UNIVERSITÁRIOS: “RNAs DE INTERFERÊNCIA: MIRNAS E SIRNAS”

Livro disponível em http://www.editora.ufrpe.br/Conceitos_Basicos_de_Epigenetica
ISBN: 978-65-86547-17-7 (2021)

Capítulo VI

RNAS DE INTERFERÊNCIA: MIRNAS E SIRNAS

Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

Como já foi discutido nos capítulos anteriores, grande parte da regulação do processo transcricional e traducional é mediada por proteínas reguladoras, principalmente fatores transcricionais e outras proteínas que se ligam a sequências específicas do DNA. No entanto, moléculas de RNA também são essenciais e participam ativamente deste processo de regulação. Esta regulação transcricional e traducional ocorre em todos os organismos vivos, procariotos e eucariotos. Os procariotos apresentam pequenos RNAs regulatórios que foram abordados no capítulo anterior, no entanto, grande parte dos estudos está direcionada a eucariotos, principalmente no que compete aos RNAs de Interferência. Nas últimas duas décadas houve um salto significativo no conhecimento acerca de RNAs de interferência, onde os principais deles são os microRNAs (miRNAs) e *Small interference* RNAs (siRNAs).

Os miRNAs e siRNAs são pequenos RNAs de interferência que têm atraído atenção porque atuam na regulação da expressão de genes que normalmente se encontram desregulados em muitas patologias. Por isso, estes são alvos prováveis para descoberta e desenvolvimento de novas drogas e podem ser usados como uma ferramenta para manipular a expressão gênica em diferentes organismos.

Histórico

Os **miRNAs** são RNAs de tamanho que varia, em média, entre 19 e 22 nucleotídeos e foram descobertos em 1993 por Victor Ambros. No ano de 1998, Andrew Fire e Craig Mello publicaram um estudo sobre a atuação de miRNAs na regulação da expressão gênica em um organismo modelo de estudo: *Caenorhabditis elegans*, que lhes conferiu o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina do ano de 2006. No entanto, a relevância dos miRNAs na regulação da expressão gênica só foi evidenciada em meados dos anos 2000, a partir da descoberta de dois miRNAs específicos: Let-7 e Lin-4 e o impacto biológico provocado por eles. O miRNA Let-7 foi associado a repressão do mRNA

CONCEITOS BÁSICOS DE EPIGENÉTICA PARA UNIVERSITÁRIOS: “EPIGENÉTICA NAS DOENÇAS HUMANAS”

Livro disponível em http://www.editora.ufrpe.br/Conceitos_Basicos_de_Epigenetica
ISBN: 978-65-86547-17-7 (2021)

Capítulo VII

EPIGENÉTICA NAS DOENÇAS HUMANAS

Maria de Mascena Diniz Maia e
Isaura Isabelle Fonseca Gomes da Silva

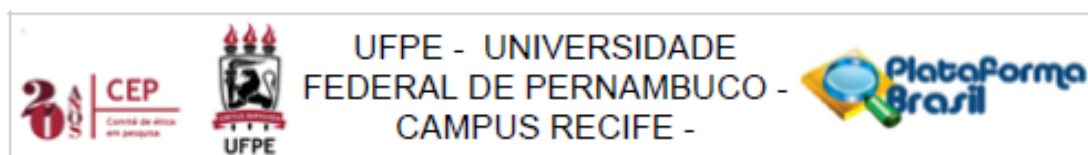
Doenças complexas

Como já foi visto anteriormente, diversos fatores epigenéticos podem modular a regulação de genes de maneira extremamente coordenada em todas as células e tecidos de um organismo. Diversos fatores intrínsecos, como o genoma, e extrínsecos, como o ambiente, podem modular a regulação epigenética. Consequentemente, se estes mesmos fatores se encontram desregulados, podem desencadear uma série de consequências no organismo e levar a patologias.

As doenças humanas podem ser divididas basicamente em doenças monogênicas, isto é, causadas por um único gene, e doenças complexas. Grande parte das doenças humanas é considerada **complexa**, isto é, apresentam múltiplas causas e existem muitos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais envolvidos. Quanto maior a complexidade da doença, mais fatores ambientais influenciam o desfecho, e mais fatores epigenéticos podem ser relacionados. Entre as muitas doenças complexas, os fatores epigenéticos têm sido amplamente relacionados com doenças autoimunes, como artrite reumatoide, lúpus, doença de Chron e outras; distúrbios neurológicos, como Parkinson, esquizofrenia, Alzheimer; doenças cardíacas, como infarto do miocárdio e aterosclerose; e diversos tipos de câncer, como leucemias, mama, pulmão, próstata e outros.

Nas doenças autoimunes há diversos fatores epigenéticos associados. No lúpus eritematoso sistêmico, por exemplo, foram previamente identificados níveis diminuídos de metilação em linfócitos T e genes importantes para resposta imunológica como CD70, CD11a e PRF1. Em relação às modificações de histonas, foram identificadas modificações como redução da trimetilação da H3K9 e níveis desregulados de histonas metilases. Os miRNAs, como miR-146, miR-125a e miR-155 também apresentam níveis de expressão anormais. No diabetes tipo II também já foram identificados padrões de

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS E SUA INFLUÊNCIA SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES ASSOCIADOS À INFLAMAÇÃO NA ARTRITE REUMATOIDE"

Pesquisador: ISAURA GOMES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 10035418.4.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

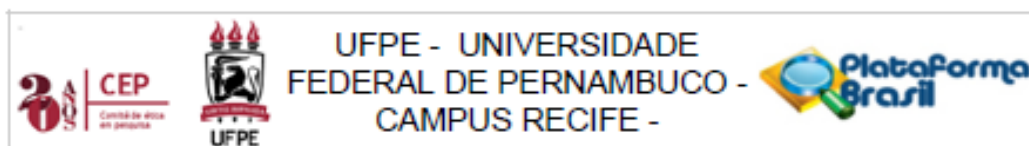
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.377.103

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de tese da discente ISAURA ISABELLE FONSECA GOMES DA SILVA sob a orientação da Professora PAULA SANDRIN-GARCIA, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O projeto será realizado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE. A proposta consiste basicamente na análise da hipótese: desregulações epigenéticas, em particular o padrão de metilação e expressão de miRNAs, modulam a expressão de genes como IL17RA, TRAF6, NFKB1 e JUNB em monócitos e estão relacionados ao desenvolvimento e patogênese da Artrite Reumatoide. Para este fim realizar-se-á um estudo, no qual serão incluídas 30 (trinta) mulheres voluntárias adultas, na faixa etária de 45-60 anos, portadoras de artrite reumatoide (AR), que estejam virgens de tratamento ou em tratamento com Metotrexato e Leflunomida por no mínimo, 6 meses, com tempo mínimo de doença de 5 anos e que apresentem erosão. Adicionalmente, 20 (vinte) mulheres saudáveis, na faixa etária de 45-60 anos serão incluídas no grupo controle do estudo. Todas as voluntárias serão recrutadas no Departamento de Medicina Clínica, Ambulatório de Clínica Médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Policlínica Jamacy de Medeiros na cidade do Cabo de Santo Agostinho e Centro de Infusão de Imunobiológico do Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco. Todas as voluntárias serão avaliadas clinicamente e responderão a ficha de coleta de dados sócio-demográficos. Todas as voluntárias serão submetidas a punção venosa para coleta de 8 ml de sangue periférico. As amostras sanguíneas serão processadas

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.377.103

laboratorialmente para: separação de células mononucleares de sangue periférico; determinação do padrão de metilação; análise do perfil de expressão gênica, seleção e expressão de miRNAs. Os dados coletados serão processados estatisticamente por meio dos programas STATISTICA v.8 e programa R versão 3.2.1. Adicionalmente todos os dados serão armazenados por um período de 5 anos, sob a responsabilidade da Orientadora.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário:

Investigar o padrão de metilação e expressão de micro-RNAs regulatórios dos genes IL17RA, TRAF6, NFKB1 e JUNB e sua relação com o desenvolvimento e patogênese da Artrite Reumatoide (AR).

Objetivos secundários:

- 1- Avaliar a metilação de regiões promotoras/TSS dos genes IL17RA, TRAF6, NFKB1 e JUNB em monócitos de pacientes e controles e correlacioná-los com a expressão dos respectivos genes;
- 2- Analisar a relação entre a metilação dos genes e desenvolvimento e gravidade da AR;
- 3- Avaliar a expressão de miRNAs interferentes nos genes IL17RA, TRAF6, NFKB1 e JUNB e correlacioná-los com a expressão dos respectivos genes;
- 4- Analisar a relação entre a expressão de miRNAs e o desenvolvimento e gravidade da AR.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão devidamente delineados no projeto de pesquisa e no termo de consentimento livre esclarecido. Os riscos eventuais consistem naqueles intrinsecamente relacionados à coleta de sangue periférico; visando minimizá-los todos os procedimentos serão realizados por profissionais habilitados. Adicionalmente todos os dados da pesquisa serão mantidos aos cuidados da orientadora por um período de cinco anos.

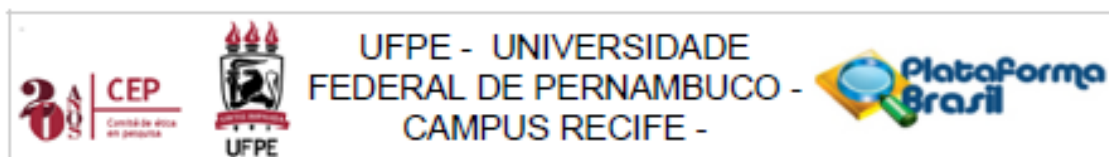
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma temática atual e interessante para comunidade médica e de pacientes portadores de artrite reumatoide, pois, visa o desenvolvimento de abordagens diagnósticas e terapêuticas relacionadas a esta patologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As cartas de anuências, termo de confidencialidade, currículos e termo de consentimento livre e esclarecido estão devidamente anexados. A folha de rosto esta devidamente assinada e carimbada. O orçamento de aproximadamente 24.000,00 reais será de responsabilidade do pesquisador principal. Alega-se que a maior parte dos insumos e equipamentos já estão disponíveis no

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.377.103

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami. O cronograma é compatível para a execução do projeto e consta que a coleta de dados e das amostras sanguíneas só começarão após aprovação pelo comitê de ética.

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

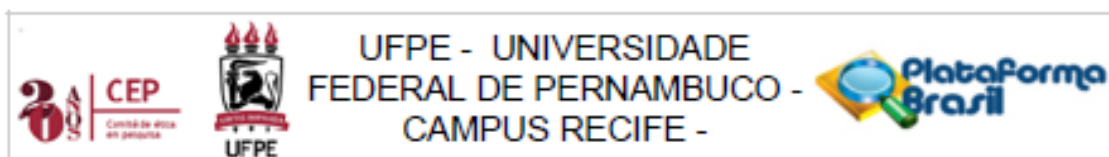
Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.377.103

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1272845.pdf	30/05/2019 16:42:55		Aceito
Outros	Carta_pendencias_30052019.pdf	30/05/2019 16:39:40	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	Carta_anuencia_Jamacy.pdf	30/05/2019 16:37:37	ISAURA GOMES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_AR_Isaura_30052019.pdf	30/05/2019 16:37:23	ISAURA GOMES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido_30052019.pdf	30/05/2019 16:36:48	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	sigla_2019_ISAURA.pdf	20/03/2019 15:37:54	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	curriculo_Eliezer.pdf	20/03/2019 15:27:43	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	curriculo_Maria_Helena.pdf	20/03/2019 15:26:54	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	Carta_anuencia_HUOC_ok.pdf	20/03/2019 15:23:10	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	Carta_Anuencia_HC.pdf	25/01/2019 10:14:57	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	curriculo_Isaura_Gomes.pdf	23/01/2019 10:11:37	ISAURA GOMES	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_completa.pdf	22/01/2019 09:13:48	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	curriculo_Paula_Sandrin.pdf	10/12/2018 17:27:55	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	curriculo_Alexandre_Barbosa.pdf	10/12/2018 17:27:12	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	curriculo_Nadja_Asano.pdf	10/12/2018 17:26:17	ISAURA GOMES	Aceito
Outros	Termo_confidencialidade_Isaura.pdf	10/12/2018 17:22:02	ISAURA GOMES	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_anuencia_Lika.pdf	10/12/2018 16:44:22	ISAURA GOMES	Aceito

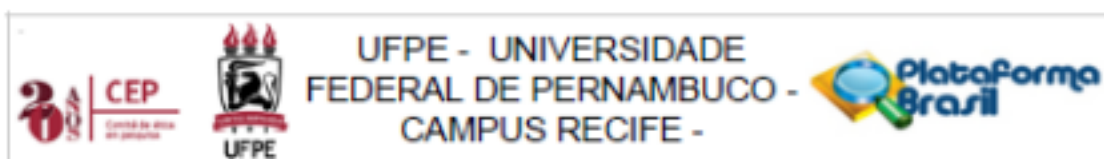
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: S.377.105

RECIFE, 07 de Junho de 2019

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
 (Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br

ANEXO B - CURRÍCULO LATTES ATUALIZADO

<http://lattes.cnpq.br/9915138553762710>