



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

RAYSA SAMANTA MORAES LARANJEIRA

**POLIMORFISMOS E PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DO INFLAMASSOMA
EM PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER**

Recife
2023

RAYSA SAMANTA MORAES LARANJEIRA

**POLIMORFISMOS E PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DO INFLAMASSOMA
EM PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER**

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 (a): Neide Santos

Coorientador (a): Jaqueline de Azevêdo Silva

Recife

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Laranjeira, Raysa Samanta Moraes.

Polimorfismos e perfil de expressão de genes do inflamassoma em pacientes com síndrome de Turner.
/ Raysa Samanta Moraes Laranjeira. – 2023.

122 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Neide Santos.

Coorientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2023.

Inclui referências.

1. IL-1 β 2. NLRP3. 3. NLRP1; estradiol. I. Santos, Neide. (orient.). II. Silva, Jaqueline de Azevêdo. (coorient.). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-073

RAYSA SAMANTA MORAES LARANJEIRA

**POLIMORFISMOS E PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DO INFLAMASSOMA
EM PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Genética. Área de concentração: Genética.

Aprovado em: 15/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Camilla Albertina Dantas de Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Matheus Filgueira Bezerra
FIOCRUZ-PE

Dra. Suelen Cristina de Lima
FIOCRUZ-PE

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

**Aos meus pais e irmã.
Pelo amor, incentivo e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Ana Patricia e Luis Carlos, em especial, por todo o amor, compreensão, educação e incentivo durante toda a minha vida. Eu devo a vocês toda as minhas conquistas. Obrigada por tanto! Meu amor por vocês é incondicional!

À minha irmã Luana Prado, a quem eu sempre admirei e me espelhei como pessoa e excelente profissional. Agradeço por sua amizade, conselhos e apoio. Obrigada por me proporcionar ser tia e madrinha de Sérgio, que veio ao mundo para nos trazer ainda mais alegrias e para nos ensinar um amor tão especial e puro. Eu amo vocês!

A todos os meus familiares e amigos, que mesmo de longe, sempre estiveram torcendo e vibrando por mim.

À minha amiga e irmã Arley, por todos os anos que dividimos um apartamento tão cheio de alegrias e emoções. O apartamento 202 se tornou um lar importante na minha trajetória. Eu te admiro muito pela mulher forte e guerreira! Obrigada por todos os momentos que passamos juntas. Você e Valentina sempre terão um espaço reservado em meu coração.

À minha orientadora Profa. Neide Santos, que ao longo desses nove anos, esteve me auxiliando, incentivando e somando no meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço também por, além de ser orientadora, ser minha grande amiga. Obrigada por todos os momentos, conselhos e emoções que passamos juntas. Meu desejo é que essa amizade e parceria perdurem por muitos anos. E que a frase “com o passar dos vinhos, os anos ficam melhores” seja sempre real em sua vida. Gratidão, professora!

À minha grande amiga e parceira Ju (Juliana Arcoverde), por ter me ensinado muito desde o meu início no laboratório. Você faz parte da minha trajetória! Obrigada pela amizade que construímos e pelos bons momentos compartilhados, o que tornou minha rotina de trabalho e de experimentos mais leves. Tenho um amor e carinho enormes por você e Helena. Conte sempre comigo!

À minha querida amiga Aldianne, por todos os ensinamentos trocados e por seu apoio em muitos experimentos no laboratório. Obrigada por fazer parte da minha rotina, sempre me trazendo a calma quando eu mais precisava. Estou torcendo por suas conquistas e pode contar comigo. Tenho gratidão e carinho por você!

A todos os que fazem e fizeram parte do LGCAH. Cada um que, direta ou indiretamente, esteve comigo por todos esses anos, auxiliando no meu crescimento.

À minha coorientadora Profa. Jaqueline de Azevêdo, por todo o apoio, ensinamentos e colaboração em meu mestrado e doutorado. Agradeço também às colaboradoras Maria Eduarda e Thays, por toda a ajuda e empenho, para que nossos projetos dessem andamento. Muito obrigada!

À Malu (Maria Luiza), pela oportunidade de permanecer trabalhando com citogenética humana. Tenho aprendido muito com você e eu só tenho a agradecer pelos novos conhecimentos, pela amizade e apoio na minha “nova fase” em Fortaleza. Obrigada por tudo!

Às médicas e residentes do IMIP e HC/UFPE, pela parceria e colaboração por todos esses anos.

Às pacientes e responsáveis que contribuíram para a realização deste trabalho. À CAPES pela concessão da bolsa e ao PPGG-UFPE. Os meus sinceros agradecimentos!

Resumo

A síndrome de Turner (ST) é uma das cromossomopatias mais frequentes em humanos, acometendo cerca de 1:2500 nascimentos do sexo feminino. Essas pacientes apresentam um risco duas vezes mais elevado de desenvolver doenças autoimunes e desordens inflamatórias comparadas às mulheres em geral. Vários genes que estão envolvidos com o contexto imune e inflamatório vêm sendo avaliados e relatados quanto ao risco às desordens inflamatórias e imunes na ST. Contudo, não há relatos sobre a possível associação de alterações no perfil de ativação do inflamassoma nesta síndrome. O objetivo deste trabalho foi investigar a possível associação entre polimorfismos e expressão nos genes do inflamassoma com o contexto inflamatório na ST. Além disso, avaliamos a influência do 17 β -estradiol (E2) *in vitro* no perfil de expressão do inflamassoma em pacientes ST e controles. O estudo de associação incluindo 92 pacientes ST (caso) e 146 controles saudáveis (HC), para polimorfismos nos genes *IL-1 β* e *NLRP3*, foi realizado usando ensaios de genotipagem TaqMan. A expressão gênica de *IL-1 β* , *NLRP3* e *NLRP1*, avaliada em 17 pacientes ST e 17 controles, foi realizada usando sondas fluorogênicas baseadas em qPCR. Posteriormente foi avaliada a expressão dos genes *IL-1 β* e *NLRP3* em cultivo de PBMCs com e sem tratamento de E2 e estímulo com LPS em oito pacientes ST e oito controles. Diferenças na distribuição alélica e genotípica foram observadas em *IL-1 β* rs16944 e *NLRP3* rs4925659 em ST e HC. A expressão gênica de *IL-1 β* e *NLRP3* foi regulada negativamente (FC=-6.78, p=1.032e-10 e FC=-15.73, p=9.075e-10, respectivamente) e *NLRP1* foi regulado positivamente (FC=21.5, p=5.925e-08) em ST comparado com HC. Em contrapartida, *NLRP3* foi regulado positivamente (FC=9.87, p=0.002) e *IL-1 β* foi regulado negativamente (FC=-1.59, p=0.711) em PBMCs de pacientes ST comparado ao controle. Nossos resultados indicam uma distribuição diferencial dos polimorfismos *IL-1 β* e *NLRP3* em pacientes com ST. Além disso, alterações na expressão dos genes *IL-1 β* , *NLRP3* e *NLRP1* podem conferir desequilíbrio inflamatório nessas pacientes e o E2 parece suprimir a expressão de *NLRP3* e *IL-1 β* na ST.

Palavras-chave: IL-1 β ; NLRP3; NLRP1; estradiol.

Abstract

Turner syndrome (TS) is one of the most frequent chromopathies in humans, occurring in approximately 1:2500 female births. These patients have twice the risk of developing autoimmune diseases and inflammatory disorders compared to women in general. Several genes that are involved with the immune and inflammatory context are being considered and reported regarding the risk of inflammatory and immune disorders in TS. However, there are no reports on the possible association of alterations in the inflammasome activation profile in this syndrome. The objective of this work was to investigate the possible association between polymorphisms and expression in inflammasome genes with the inflammatory context in TS. Furthermore, we evaluated the influence of 17 β -estradiol (E2) in vitro on the inflammasome expression profile in TS patients and controls. The association study including 92 TS patients (case) and 146 healthy controls (HC) for polymorphisms in *IL-1 β* and *NLRP3* genes, was performed using TaqMan genotyping assays. Gene expression of *IL-1 β* , *NLRP3* and *NLRP1*, assessed in 17 TS patients and 17 controls, was performed using qPCR-based fluorogenic probes. Subsequently, the expression of *IL-1 β* and *NLRP3* genes was evaluated in PBMCs culture with and without E2 treatment and stimulus with LPS in eight TS patients and eight controls. Differences in allelic and genotypic distribution were observed in *IL-1 β* rs16944 and *NLRP3* rs4925659 in TS and HC. Gene expression of *IL-1 β* and *NLRP3* was down-regulated (FC=-6.78, p= 1.032e-10 and FC=-15.73, p= 9.075e-10, respectively) and *NLRP1* was up-regulated (FC=21.5, p=5.925e-08) in TS compared to HC. In contrast, *NLRP3* was up-regulated (FC=9.87, p=0.002) and *IL-1 β* was down-regulated (FC=-1.59, p=0.711) in PBMCs from TS patients compared to controls. Our results indicate a differential distribution of *IL-1 β* and *NLRP3* polymorphisms in patients with TS. Furthermore, alterations in the expression of *IL-1 β* , *NLRP3* and *NLRP1* genes can confer inflammatory imbalance in these patients and E2 appears to suppress *NLRP3* and *IL-1 β* expression in TS.

Keywords: estradiol; IL-1 β ; NLRP1; NLRP3.

Lista de Ilustrações

Figura 1 –	Cariótipos encontrados na ST. a) Cariótipo mais comum na ST - 45,X; b) Isocromossomo - i(Xq); c) Cromossomo em anel - r(X); d) Deleção no braço curto do cromossomo X – del(Xq). Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana – LGCAH, UFPE.....	20
Figura 2 –	Localização das regiões pseudoautossômicas (PAR) e do gene <i>SHOX</i> nos cromossomos sexuais. Fonte: Jorge <i>et al.</i> (2008).....	22
Figura 3 –	Principais fenótipos da ST. Fonte: SYBERT & MCCAULEY (2004); FELDHAUS (2016).....	24
Figura 4 –	Pacientes com ST apresentando anormalidades dermatológicas de caráter autoimune e inflamatório. a) alopecia; b) psoríase pustulosa. Fonte: DOGRUK (2014); SCHIAVO <i>et al.</i> (2014).....	30
Figura 5 –	Estrutura do gene <i>CTLA4</i> humano e polimorfismos conhecidos. Em destaque (vermelho) os SNPs mais estudados. Fonte: TU <i>et al.</i> (2015).....	32
Figura 6 –	Estrutura do gene <i>PTPN22</i> , codificando uma tirosina fosfatase com três domínios distintos. O SNP G1858A resulta em uma substituição no primeiro motivo rico em prolina (em azul). Fonte: Adaptado de STANFORD e BOTTINI. (2014).....	33
Figura 7 –	Estrutura do gene <i>FOXP3</i> . Fonte: Adaptado de MARQUES <i>et al.</i> (2015).....	34
Figura 8 –	Estrutura do gene e localização dos polimorfismos mais conhecidos no gene <i>VDR</i> . Fonte: Adaptado de LI <i>et al.</i> (2015).....	36
Figura 9 –	Mecanismos de ativação e montagem dos inflamassomas. a) Ativação do inflamassoma por PAMPs ou DAMPs.b) Piroptose e liberação de citocinas através de GSDMD.	

	Fonte: Adaptado de MALIK (2017).....	38
Figura 10 –	Representação dos Inflamassomas NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2. Fonte: Adaptado de SUTTERWALA (2014).....	40
Figura 11 –	Representação esquemática de alguns SNPs envolvidos nos componentes do inflamassoma. Fonte: Adaptado de PONTILLO <i>et al.</i> (2012).....	41
Figura 12 –	Localização do gene <i>NLRP1</i> . https://www.genecards.org/cgibin/carddisp.pl?gene=LRP1.....	41
Figura 13 –	A estrutura e ativação do inflamassoma de NLRP3. Fonte: Adaptado de SHIET <i>al.</i> (2020).....	44
Figura 14 –	Localização do gene <i>NLRP3</i> no cromossomo 1. Fonte: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NLRP3#location.....	45
Figura 15 –	Representação esquemática dos três domínios (LRR, NAD e NACHT) e as mutações e polimorfismos em <i>NLRP3</i> . LRR, repetição rica em leucina; NAD, domínio associado a NACHT; PYD, domínio de pirina. Fonte: Adaptado de CONFORTI-ANDREONI <i>et al.</i> (2011).....	46
Figura 16 –	As três subfamílias da IL1. A sequência consenso AXD da família IL1 é indicada em cada subfamília e o número de aminoácidos é indicado ao final de cada precursor de citocina. Como IL-1Ra tem um peptídeo sinal e é prontamente secretado, não há sítio AXD. Sequência consenso AXD significa que “A” pode ser qualquer aminoácido alifático, seguido por qualquer aminoácido “X” e então “D” para ácido aspártico. Fonte: Adaptado de GARLANDA (2013).....	49
Figura 17 –	Localização do gene da <i>IL-1β</i> . Fonte: https://www.genecards.org/cgibin/carddisp.pl?gene=IL1B.....	49
Figura 18 –	Processamento e regulação de IL-1β. Adaptado de van de VEERDONK (2013).....	51
Figura 19 –	O papel do inflamassoma na indução da morte de células β e	

	progressão do DMT2. Fonte: Adaptado de ABDERRAZAK <i>et al.</i> (2015).....	53
Figura 20 –	Ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras do estradiol e da progesterona. Fonte: Adaptado de MAUVAIS-JARVIS <i>et al.</i> (2020).....	54
Capítulo 1		
Figure 1 –	Expression profile of <i>NLRP1</i> , <i>NLRP3</i> and <i>IL-1β</i> in TS patients vs. healthy control group (HC).....	81
Capítulo 2		
Figura 1 –	Perfil de expressão dos genes <i>NLRP3</i> e <i>IL-1β</i> em pacientes ST e controle saudável (CT).....	95
Figura 2 –	Perfil de expressão dos genes <i>NLRP3</i> e <i>IL-1β</i> em ST sem desordens inflamatórias (DIC) versus com DIC.....	96
Figura 3 –	Perfil de expressão dos genes <i>NLRP3</i> e <i>IL-1β</i> em ST de acordo com as etapas do experimento. (a) STCN vs. STE; (b) STLPS vs. STELPS.....	97

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Tipo e frequência das alterações cromossômicas na síndrome de Turner. Fonte: Adaptado de GRAVHOLT <i>et al.</i> (2017).....	21
Tabela 2 – Doenças autoimunes e inflamatórias mais frequentes na síndrome de Turner . Fonte: Adaptado de GRAVHOLT <i>et al.</i> (2017).....	27
Capítulo 1	
Tabela 1 – Genotype and allele distribution of <i>IL-1β</i> gene polymorphism in TS and control group.....	78
Tabela 2 – Genotype and allele distribution of <i>NLRP3</i> gene polymorphisms in TS and control group.....	79
Tabela 3 – Genotype and allele distribution of <i>IL-1β</i> and <i>NLRP3</i> gene polymorphisms in TS group.....	80

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
β	Beta
Cm	Centímetros
Ca^{2+}	Cálcio
K^+	Potássio
Cl^-	Cloreto
del(X)	Deleção no cromossomo X
i(X)	Isocromossomo X
r(X)	Cromossomo X em anel
pb	Pares de bases
A	Adenina
AIM2	Absent in melanoma 2
APCs	Células apresentadoras de antígenos
AR	Artrite reumatóide
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
BE	Baixa estatura
β -hCG	Gonadotrofina coriônica humana
C	Citosina
CAPS	Síndromes periódicas associadas à criopirina
CASP1	Caspase-1
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DAIS	Doenças autoimunes
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DC	Doença celíaca
DG	Doença de Graves
DII	Doença inflamatória intestinal
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
ER α	Receptore de estrogênio alfa
ER β	Receptore de estrogênio beta

ERRO	Espécies reativas de oxigênio
E2	17-beta-estradiol
FCAS	Síndrome autoinflamatória familiar pelo frio
FISH	Hibridação in situ Fluorescência
FOXP3	Forkhead box P3
G	Guanina
GH	Hormônio do crescimento
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G associados à membrana
GSDMD	Gasdermin D
HIV-1	Human immunodeficiency vírus
HTLV-1	Human T-cell lymphotropic vírus 1
IL-1	Interleucina-1
IL-1R	Receptor de interleucina IL-1
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeos
LRR	Repetição rica em leucina
Lyp	Lymphoid-specific phosphatase
mER	Receptores de estrogênio de membrana
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MWS	Síndrome de Muckle-Wells
NBD	Domínio de oligomerização/oligador de nucleotídeo
NF- κ B	Fator nuclear kappa β
NLRs	Receptores do tipo NOD
NLRC4	NLR, CARD domaincontaining 4
NLRP1	Pyriindomaincontaining 1
NLRP3	Pyriindomaincontaining 3
NOMID	Doença inflamatória multissistêmica de início neonatal
PAMPs	Padrões moleculares associadas a patógenos
PAR1	Região pseudoautosômica 1
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POI	Insuficiência ovariana prematura

PTPN22	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 gene
PYD	Pyriindomain
RE	Retículo endoplasmático
<i>SHOX</i>	<i>Short statureHOmeobox gene</i>
SNPs	Polimorfismos de único nucleotídeo
ST	Síndrome de Turner
T	Timina
TB	Tuberculose
TCR	T-cellantigen receptor
Tg	Tireoglobulina
Tg-Ab	Anticorpos antitireoglobulina
TGF- β	Transforminggrowthfactor beta
TH	Tireoidite de Hashimoto
TLR	Receptor toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TPO-Ab	Anticorpos antitireoperoxidase
TPO	Peroxidase tireoidiana
TSH	Hormônio tireoestimulante
TXNIP	Thioredoxin-interactingprotein
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
VDR	Vitamin D Receptor

Sumário

1	Introdução	17
2	Revisão da Literatura	19
2.1	Síndrome de Turner (ST).....	19
2.2	Desordens imunológicas e inflamatórias na ST.....	26
2.2.1	<i>Genes candidatos atuando no contexto inflamatório e imune da ST</i>	31
2.3	Inflamassomas.....	37
2.3.1	<i>Polimorfismos genéticos em componentes do Inflamassoma</i>	40
2.4	Hormônios sexuais e sistema imune.....	53
3	Objetivos	58
3.1	Objetivo geral.....	58
3.2	Objetivos específicos.....	58
4	Capítulos	59
4.1	Capítulo I - Inflammasome complex genes influence upon Turner syndrome patients.....	59
4.2	Capítulo II - 17 β -estradiol modula a expressão do inflamassoma em pacientes com síndrome de Turner.....	82
5	Discussão geral	98
6	Conclusões	104
	Referências	106

1 Introdução

A síndrome de Turner (ST) consiste em uma das cromossomopatias mais frequentes em humanos, acometendo cerca de 1:2500 nascimentos do sexo feminino. A ST é caracterizada pela ausência, parcial ou total, de um segundo cromossomo sexual, podendo ser definida citogeneticamente por várias alterações envolvendo o cromossomo X e clinicamente por diversos fenótipos característicos.

Clinicamente, pacientes com ST apresentam comumente a baixa estatura, pescoço curto e alado e distúrbios gonadais, que cursam com amenorreia primária, atraso da puberdade e infertilidade. Além do fenótipo marcante, também foram relatados nestas pacientes um aumento dos níveis de autoanticorpos, bem como um risco aumentado de desenvolver algumas desordens inflamatórias e imunes, como tireoidite de Hashimoto, hipotireoidismo, diabetes mellitus, doença celíaca, doença de Crohn, artrite reumatoide juvenil, doença de Addison, psoríase, vitiligo e alopecia.

Vários mecanismos são usados para regular e manter a homeostase imune, prevenir a autoimunidade e a inflamação moderada induzida por agentes patogênicos e fatores ambientais. Genes como o *CTLA4*, *PTPN22*, *FOXP3* e *VDR*, que estão envolvidos com o contexto imune e inflamatório, vêm sendo avaliados e relatados quanto ao risco às desordens inflamatórias e imunes na ST. Contudo, não há relatos sobre a possível associação de alterações no perfil de ativação do inflamassoma nesta síndrome.

O inflamassoma consiste em um dos mais importantes complexos proteicos multiméricos de sinalização, que desencadeiam a ativação de caspases inflamatórias para a maturação e processamento de importantes citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e 1L-18. Entre os vários complexos de inflamassoma,

o NLRP3 é mais bem caracterizado e fundamental para a defesa imunológica e resposta inflamatória.

Polimorfismos e a expressão alterada em genes dos componentes do inflamassoma, mais especificamente o *NLRP3* e *NLRP1*, foram relatados em algumas desordens inflamatórias incluindo diabetes mellitus, doença celíaca, doença de Crohn, obesidade, entre outras. A maioria dessas alterações cursa com níveis aumentados de IL-1 β , contribuindo para uma inflamação sistêmica. Polimorfismos no gene *IL-1 β* podem contribuir para diferenças na sua expressão, levando à suscetibilidade a doenças inflamatórias.

Dada a relevância do inflamassoma em diversas desordens inflamatórias e imunes, polimorfismos nos genes *IL-1 β* e *NLRP3*, bem como alterações no perfil de expressão dos genes *IL-1 β* , *NLRP3* e *NLRP1* podem ser importantes contribuintes para um desequilíbrio imune e inflamatório em pacientes portadoras da ST. Além disso, o 17 β -estradiol pode atuar modulando a ativação do inflamassoma nestas pacientes.

2 Revisão da Literatura

2.1 Síndrome de Turner

A síndrome de Turner (ST) é uma das cromossomopatias humanas mais comuns, causada por alterações numéricas ou estruturais do cromossomo X, acometendo cerca de 1 em 2500 nascimentos femininos vivos (AVERSA *et al.*, 2015; GRAVHOLT *et al.*, 2017).

Para o diagnóstico da ST é necessário o exame de cariotipagem, mais comumente realizado através da cultura de linfócitos de sangue periférico. Para isso, é requerido um padrão mínimo de 20 células analisadas, sem mosaicismo, ou uma análise de até 100 se os cariótipos com mosaicismo estiverem presentes nas primeiras 20 células. Em indivíduos com cariótipo 46,XX em células do sangue periférico, mas com alto nível de suspeita de ST com base no fenótipo, é recomendado o estudo citogenético de um segundo tecido, por exemplo, a biópsia da pele para cultura de células ou esfregaço bucal para aplicar a técnica de Hibridação in situ Fluorescente (FISH) (JUNG *et al.*, 2010; WOLFF *et al.*, 2010).

Durante o período pré-natal é possível detectar alterações nos cromossomos sexuais através da amostragem da vilosidade coriônica ou amniocentese. Contudo, fetos com cariótipo 45,X normalmente apresentam anormalidades ultrassonográficas, incluindo higroma cístico (acúmulo de líquido linfático anormal), hidropsia (acúmulo de fluido intersticial anormal), aumento da translucência nucal, anormalidades renais, coarctação da aorta e síndrome de hipoplasia do coração esquerdo, que podem gerar a suspeita clínica de ST, entretanto, a confirmação pós-natal do cariótipo é obrigatória (PAPP *et al.*, 2006; BONDY, 2006; GERSEN *et al.*, 2013; GRAVHOLT *et al.*, 2017). Níveis alterados

das dosagens de gonadotrofina coriônica humana β (hCG), estriol não conjugado e α -fetoproteína também podem sugerir o diagnóstico de ST durante a triagem do soro materno (ALVAREZ-NAVA *et al.*, 2015).

Pacientes portadoras de ST podem apresentar diferentes cariótipos (Figura 1), todos relacionados à perda total ou parcial de material do cromossomo X, levando ao desenvolvimento clínico da síndrome. Os cariótipos incluem a perda completa do cromossomo X (45,X), que ocorre em cerca de 40 - 50% dos casos, mosaicismos com linhagens 45,X/46,XX em 15 a 25%, além da presença de um isocromossomo do braço curto ou longo [i(Xp) ou (Xq)] em 10%, cromossomos em anel [r(X)] em 10 - 12%, entre outros cariótipos complexos que podem ocorrer em mosaicismos (Tabela 1) (GRAVHOLT *et al.*, 2017).

Figura 1. Cariótipos encontrados na ST. a) Cariótipo mais comum na ST - 45,X; b) Isocromossomo - i(Xq); c) Cromossomo em anel - r(X); d) Deleção no braço curto do cromossomo X – del(Xq).

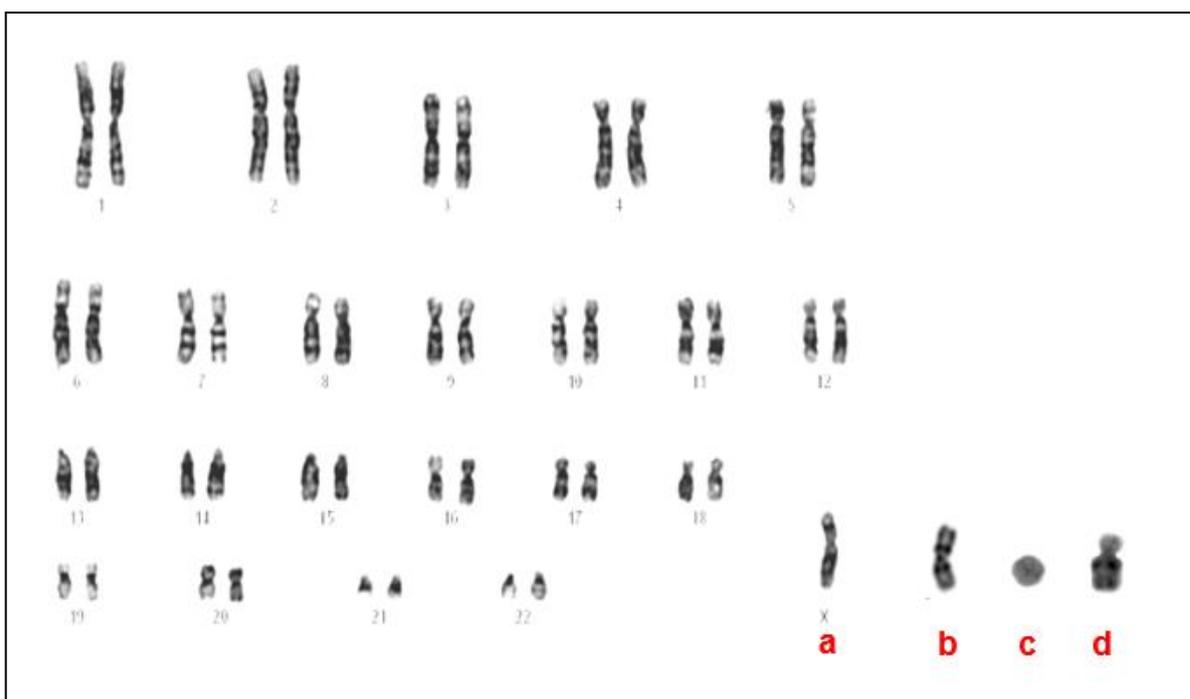


Tabela 1. Tipo e frequência das alterações cromossômicas na síndrome de Turner.

Cariótipo	%	Descrição
45,X	40 - 50	Monossomia X
45,X/46,XX	15 - 25	Mosaicismo 45,X com linhagem normal 46,XX
45,X/47,XXX; 45,X/46,XX/47,XXX	3	Mosaicismo com triplo X
45,X/46,XY	10 - 12	Mosaicismo com presença do Y
46,X,del(X)(p22.3); 46,X,r(X)/46,XX		Deleção no X(p22.3); Cromossomo X em anel
46,X,i(Xq); 46,X,idic(Xp)	10	Isocromossomo Xq; isodicêntrico Xp
Translocação do X com autossomo, desbalanceada	Raro	Vários

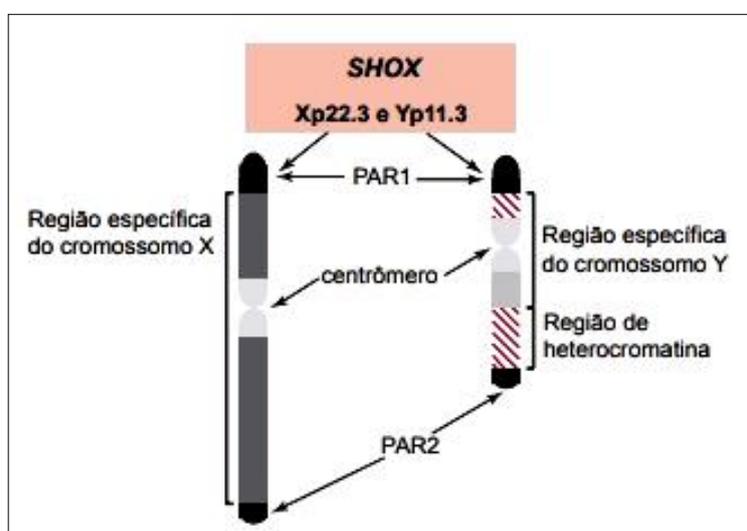
Fonte: Adaptado de GRAVHOLT *et al.* (2017).

Embora 1,5% de todas as concepções femininas na espécie humana tenham a constituição cromossômica 45,X, aproximadamente 99% destas são espontaneamente abortadas, levantando-se a hipótese de que para ser viável, o conceito 45,X deve possuir outra linhagem celular, ao menos em alguns órgãos ou períodos embriogênicos críticos. Sendo assim, a monossomia do cromossomo X em embriões viáveis é causada primariamente pela não disjunção mitótica (HOOK e WARBURTON, 2014). Dessa forma, a expressão clínica da ST pode ser atenuada pela baixa contagem de células 45,X, na presença de mosaicismo e/ou alterações estruturais dos cromossomos sexuais, caracterizando poucos estigmas para as pacientes, especialmente se perderem material do cromossomo X paterno (ROVET, 2004; BISPO *et al.*, 2013).

A maioria dos genes que escapam da inativação do cromossomo X são genes pseudoautosômicos localizados em Xp, os quais possuem genes homólogos no cromossomo Y. Com isso, a maioria das anormalidades observadas em ST é ocasionada pela falta de eficiência de genes que normalmente são expressos por ambos os cromossomos X (CARREL e WILLARD, 2005).

Os estigmas mais comuns na ST incluem atraso de crescimento com baixa estatura (BE), insuficiência ovariana e infertilidade (SAENGER *et al.*, 2001; COLLETT-SOLBERG *et al.*, 2011). Na infância e adolescência, a BE é um sinal clínico que leva à suspeita diagnóstica da ST. A BE foi primeiramente relacionada ao gene *SHOX* (*Short stature Homeobox gene*) por Rao *et al.* (1997). O gene *SHOX* está localizado na região pseudoautossômica 1 (PAR1) dos cromossomos sexuais (Xp22 e Yp11.3) (Figura 2) e a perda de uma das cópias deste gene é responsável por dois terços da baixa estatura observada nas pacientes com ST (BINDER *et al.*, 2004).

Figura 2. Localização das regiões pseudoautossômicas (PAR) e do gene *SHOX* nos cromossomos sexuais.



Fonte: JORGE *et al.* (2008).

Contudo, pacientes ST que apresentam uma cópia a mais do gene *SHOX* são portadoras de alta estatura, uma condição clínica pouco frequente nos indivíduos com esta síndrome (DEL REY *et al.*, 2010; SEO *et al.*, 2015).

A insuficiência ovariana prematura (POI), que envolve a amenorreia primária e o infantilismo sexual, pode ser secundária a deleções do cromossomo X envolvendo as regiões Xq13-26 (WIEACKER, 2009). A deleção na região Xp11 também resulta em insuficiência ovariana com a função menstrual, porém mesmo naquelas mulheres com menstruação normal, a fertilidade é muito rara (VUNDINTI *et al.*, 2004). O diagnóstico de ST, em até 10% das mulheres, pode ser atrasado até a idade adulta, principalmente naquelas que entram espontaneamente na puberdade e, subsequentemente, exibem amenorreia secundária, infertilidade e abortos recorrentes (ELSHEIKH *et al.*, 2002; SYBERTE MCCAULEY, 2004; JUNG *et al.*, 2010; GRAVHOLT *et al.*, 2017).

No geral, o fenótipo na ST pode incluir sinais dismórficos como pescoço curto e/ou alado, tórax largo e em escudo, *cubitus valgus*, baixa implantação dos cabelos, orelhas proeminentes e edemas de mãos e pés (Figura 3) (ARAUJO *et al.*, 2010; COLLETT-SOLBERG *et al.*, 2011; BISPO *et al.*, 2013). Em alguns casos podem envolver malformações congênitas, especialmente no coração (mais comumente dissecção da aorta e doença arterial coronariana) e rins. Além de aterosclerose, osteoporose, doenças da tireoide, obesidade, distúrbios endócrinos e metabólicos, os quais são contribuintes reconhecidos para morbidade, mortalidade e diminuição da expectativa de vida (SCHOEMAKER *et al.*, 2008; MORTENSEN *et al.*, 2009; DAVENPORT, 2010).

Um aumento na incidência de perda auditiva, autoimunidade e cardiopatia congênita em pacientes ST portadoras do i(X)(q10) foi relatado (BARRENAS *et al.*, 2000; PRAKASH *et al.*, 2016). Em relação a presença do r(X) pode ser especificamente associado a dificuldades de aprendizagem e distúrbios comportamentais, em alguns casos. Além disso, foi observada uma incidência

aumentada de síndrome metabólica (KUNTSI *et al.*, 2000; LEPPIG *et al.*, 2004; CAMERON-PIMBLETT *et al.*, 2017).

Figura 3. Principais fenótipos da ST. a) Pescoço curto e alado, orelhas proeminentes, ausência de mamas e hipertelorismo mamário; b) Baixa implantação dos cabelos na nuca, pectus excavatum; c) Orelhas antevertidas e pele redundante na região da nuca; d) Edemas de mãos.



Fonte: SYBERT & MCCAULEY (2004); FELDHAUS (2016).

Além disso, 10 a 12% das pacientes ST podem apresentar quantidades diferentes do material do cromossomo Y, detectados por métodos moleculares mais sensíveis como a FISH ou Reação em cadeia da polimerase (PCR), destas cerca de 3% apresentam cariótipo 45,X/46,XY. Mulheres com ST e um cariótipo

com mosaicismos 45,X/46,XY parecem menos propensas a desenvolver distúrbios autoimunes, como hipotireoidismo (CAMERON-PIMBLETT *et al.*, 2017). Entretanto, a presença de material cromossômico Y, por vezes, está associada à virilização durante a puberdade e ao desenvolvimento pouco frequente de gonadoblastoma, um tumor benigno que pode se tornar maligno ao longo do tempo. Portanto, se o cromossomo Y for identificado é recomendada a gonadectomia como medida de prevenção (OLIVEIRA *et al.*, 2009; GRAVHOLT *et al.*, 2017).

A relevância do diagnóstico prévio da ST, além de permitir o diagnóstico precoce de malformações congênitas e adquiridas, pode auxiliar na aplicação das medidas terapêuticas adequadas. Além disso, permitirá que os tratamentos de estímulo do crescimento e reposição de hormônios sexuais sejam feitos na idade adequada, evitando danos adicionais à saúde das pacientes (BONDY, 2006).

O tratamento nas pacientes ST é dependente da idade e envolve terapia de reposição hormonal, bem como o manejo apropriado das comorbidades. Durante a infância e a adolescência, o objetivo do manejo está no crescimento e no tratamento com GH (hormônio do crescimento) e, em alguns casos, com oxandrolona, um andrógeno não aromatizável (GRAVHOLT *et al.*, 2017). Embora os estudos clínicos tenham mostrado um efeito eficaz do tratamento, com aumentos na altura final em cerca de 15 cm, é recomendado que o tratamento seja considerado assim que a falha de crescimento for evidente, possivelmente por volta dos 4-6 anos de idade (VAN PAREREN *et al.*, 2003).

Com relação à indução do desenvolvimento puberal e para manutenção das características sexuais secundárias, a terapia com estrogênio deve ser iniciada entre 11 e 12 anos de idade. Este período de indução puberal deve durar

cerca de 2 a 2,5 anos e, quando ocorrer a menarca, é adicionado um gestágeno, o qual consiste em um grupo de hormônios que atuam nos receptores de progesterona para estimular a fertilidade e manter a gravidez, tornando o tratamento cíclico (KLEIN *et al.*, 2018). Das mulheres com ST que apresentam menarca espontânea e períodos menstruais normais subsequentes, a maioria entrará na menopausa precocemente e subsequente falência ovariana secundária após alguns anos (GRAVHOLT *et al.*, 2017).

Uma teoria sugere que a disfunção ovariana e a ausência de estrógeno e / ou andrógeno é um mecanismo importante que contribui para o desenvolvimento de doenças autoimunes (BAKALOV *et al.*, 2012). Assim como, a ausência de um segundo cromossomo X pode contribuir para o aumento de autoimunidade na ST (INVERNIZZI *et al.*, 2005).

2.2 Desordens imunológicas e inflamatórias na ST

Mulheres com ST possuem um risco duas vezes mais elevado de desenvolver doenças autoimunes (DAIs) comparadas às mulheres em geral (GROSSI *et al.*, 2013). Embora a literatura demonstre estes dados, os mecanismos fisiopatológicos e etiológicos relacionados à imunidade permanecem não definidos (MORTENSEN *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O aumento da suscetibilidade de pacientes ST a DAIs foi atribuído à haploinsuficiência dos genes na região pseudoautosômica do cromossomo X, possivelmente envolvidos no processo de imunorregulação, origem materna do cromossomo X, produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias (IL-6), diminuição de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β) ou hipogonadismo (JORGENSEN *et al.*, 2010; BAKALOV *et al.*, 2012). Também foi demonstrado que

os genes localizados no cromossomo X, incluindo um lócus do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) no braço longo, estão envolvidos na regulação da resposta imune e na tolerância imune alterada (BIANCHI *et al.*, 2012).

Células T auto reativas, como também células B e outras células relacionadas à imunidade, podem não se tornar tolerantes por autoantígenos gerados por um dos dois cromossomos X, e conseqüentemente desencadeando uma resposta autoimune em tecidos alvos (BIANCHI *et al.*, 2012). Além disso, algumas alterações imunológicas têm sido descritas na ST, incluindo baixos níveis de imunoglobulinas G e M, fraca quimiotaxia e resposta diminuída a mitógenos das células T (STENBERG *et al.*, 2004; LARIZZA *et al.*, 2009).

As desordens inflamatórias e imunes mais comuns na ST são as doenças autoimunes da tireoide, diabetes mellitus tipo 1 e 2 (DMT1 e 2), doença inflamatória intestinal (DII), doença celíaca (DC), psoríase, vitiligo e alopecia (LARIZZA *et al.*, 2009; JORGENSEN *et al.*, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2. Doenças autoimunes e inflamatórias mais frequentes na síndrome de Turner

Característica	Frequência (%)
Tireoidite e hipotireoidismo	15-30
Intolerância à glicose	15-50
Diabetes mellitus tipo 2	10
Doença celíaca	8
Vitiligo	5
Alopecia	5
Doença inflamatória intestinal	2-3

Fonte: Adaptado de GRAVHOLT *et al.* (2017).

As doenças autoimunes da tireoide são caracterizadas por ativação linfocítica anormal direcionada contra autoantígenos, tireoglobulina (Tg) e peroxidase tireoidiana (TPO) (COGNI e CHIOVATO, 2013). A TPO elevada, que está positivamente associada à concentração do hormônio tireoestimulante (TSH), está mais frequentemente associada ao hipotireoidismo autoimune. Também foi demonstrado que o nível da titulação de anticorpos antitireoperoxidase (TPO-Ab) aumenta com a idade das pacientes com ST. Além disso, a distribuição elevada de TPO-Ab entre as variantes do cariótipo é mais prevalente em cariótipos com i(X)(q10), seguido de monossomia do X e demais cariótipos (WIKIERA *et al.*, 2006). Portanto, para o acompanhamento de pacientes ST é necessário um monitoramento rigoroso dos níveis circulantes de triiodotironina (T3) e tetraiodotironina (T4), TSH, TPO-Ab e anticorpos antitireoglobulina (Tg-Ab) (ALLYBOCUS *et al.*, 2018).

A DMT2 é uma desordem endocrinológica, com uma frequência de 10% nas pacientes com ST e mais prevalente do que em mulheres normais, podendo ocorrer em qualquer fase da vida, com idade de início tipicamente na faixa de 30–40 anos (LICHARDOPOL *et al.*, 2007; GRAVHOLT *et al.*, 2017). Elsheikh *et al.* (2002) e Bakalov *et al.* (2012) demonstraram que a presença do cromossomo i(X)(q10) está associado com a maior prevalência de DMT2, o que foi explicado pelo aumento dos transcritos de genes pró-inflamatórios.

A intolerância à glicose está presente em cerca de 15 a 50% da população adulta com ST, sendo mais prevalente em comparação com indivíduos controles saudáveis e mulheres com POI (HJERRILD *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2019). Uma vez que a função das células β pancreáticas, na primeira fase da resposta à insulina, parece diminuir substancialmente com a idade avançada na

ST, ao longo do tempo a intolerância à glicose pode progredir para DMT2. A frequência do metabolismo da glicose prejudicado na ST varia com o cariótipo, o qual a maioria das mulheres com cariótipo mosaico tem tolerância normal à glicose em comparação com mulheres com 45,X (BAKALOV *et al.*, 2009).

A frequência de DC na ST é de 8% (GRAVHOLT *et al.*, 2017). A maioria das pacientes ST que também tem atraso de crescimento, não responde à terapia com GH se houver DC coexistente (DURUSU *et al.*, 2005; MARILD *et al.*, 2016). Uma vez que algumas características típicas dos pacientes ST, como baixa estatura, osteoporose, hipogonadismo, podem ser agravadas por uma DC coexistente, a triagem periódica para esta doença é necessária (LARIZZA *et al.*, 2009). Portanto, a triagem sorológica parece ser um método eficaz de identificação de DC subclínica em ST, com posterior biópsia intestinal em pacientes com resultados positivos (DEMIREZER *et al.*, 2012).

Condições dermatológicas relacionadas ao sistema imunológico, como alopecia (Figura 4a), psoríase (Figura 4b) e vitiligo, também ocorrem com frequência ligeiramente aumentada na ST (LARIZZA *et al.*, 2009). A prevalência de psoríase em mulheres com ST é o dobro da população em geral (WATABE *et al.*, 2006). A alopecia e o vitiligo afetam 5% das pacientes com ST, sendo este último comparado a 1-2% da população mundial. Outras anormalidades dermatológicas, como *halo nevos* e *contratura de Dupuytren*, cuja patogênese é considerada autoimune, foram relatadas como significativamente mais comuns na ST do que na população normal (BRAZZELLI *et al.*, 2004; JORGENSEN *et al.*, 2010).

A ST está associada a uma frequência de 2-3% de desenvolver DII, que compreende colite ulcerosa e doença de Crohn, em comparação com mulheres

46,XX (JORGENSEN *et al.*, 2010; GRAVHOLT *et al.*, 2017). A DII deve ser suspeitada na ST em caso de perda de peso inexplicada, diarreia, dor abdominal ou sangramento intestinal. A DII se desenvolve em idades mais jovens na ST do que na população em geral, e frequentemente mais grave, com complicações como fístulas e sepse, podendo necessitar de colectomia. Pacientes ST com i(X)(q10) são particularmente mais suscetíveis, correspondendo a cerca de 52% dos casos em ST (ELSHEIKH *et al.*, 2002; LARIZZA *et al.*, 2009).

Figura 4. Pacientes com ST apresentando anormalidades dermatológicas de caráter autoimune e inflamatório. a) alopecia; b) psoríase pustulosa.



Fonte: DOGRUK *et al.* (2014); SCHIAVO *et al.* (2014).

No Brasil, dois estudos relataram a frequência de desordens inflamatórias e autoimunes nas pacientes ST. Em um estudo realizado com pacientes de São Paulo, Bianco *et al.* (2010) relataram que um total de 44,36% das 142 pacientes ST desenvolveram DAIs, compreendendo doenças autoimunes da tireoide (28.9%), DTM1 (4.9%), psoríase (2.1%), vitiligo (2.1%), lúpus eritematoso

sistêmico (LES) (2.1%), artrite reumatoide (AR) (2.1%) e doença de Crohn (2.1%). Enquanto no estudo realizado por Santos *et al.* (2018), em pacientes de Pernambuco, apenas 36,1% das 86 pacientes ST apresentaram DAIs, compreendendo doenças autoimunes da tireoide (12.8%), alopecia (2.3%) e desordens inflamatórias (21%).

2.2.1 Genes candidatos atuando no contexto inflamatório e imune na ST

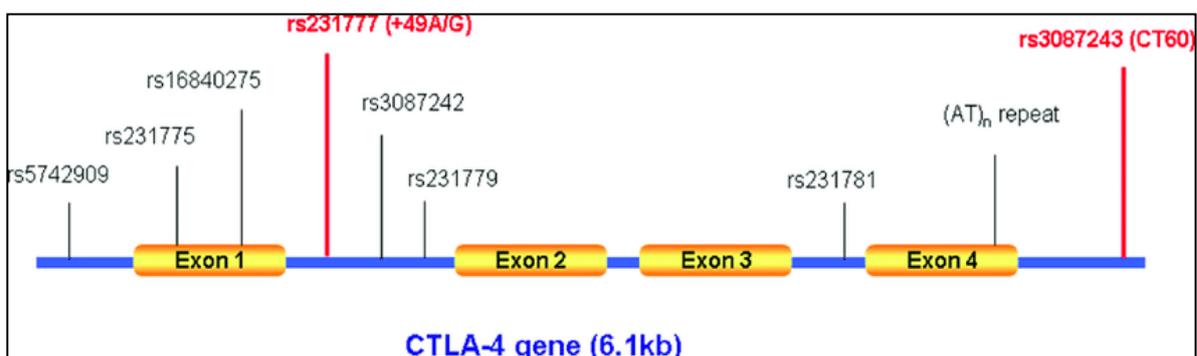
Dentre os diversos genes que estão envolvidos na regulação da resposta imune e em desordens inflamatórias, quatro deles têm sido recentemente estudados na ST, são eles: *CTLA4* (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), *PTPN22* (tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 gene), *FOXP3* (forkhead box P3) e *VDR* (Vitamin D Receptor). O gene *CTLA-4* localizado no cromossomo 2 (2q33), consiste em 7.195 kb e codifica uma proteína formada por 149 aminoácidos (DARIAVACH *et al.*, 1988). A proteína CTLA-4 é uma molécula da superfamília das imunoglobulinas, expressa principalmente nos linfócitos TCD4+ e TCD8+ ativados, exercendo efeito regulador na ativação de células T (WANG *et al.*, 2001; VALK *et al.*, 2008). Portanto, o papel supressor do *CTLA-4* implica que alterações genéticas que afetam a expressão e / ou sua função gênica, podem levar ao desenvolvimento de autoimunidade, por aumentar a ativação de células T (PASTUSZAK-LEWANDOSKA *et al.*, 2013).

Vários SNPs foram identificados no gene *CTLA-4* e associados com autoimunidade em várias populações (VIELAND *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2012; PASTUSZAK-LEWANDOSKA *et al.*, 2013; FATHIMA *et al.*, 2019). Os SNPs mais relatados são o rs231775 (+49 A/G), que corresponde a uma substituição de bases, de uma adenina por uma guanina (ACC – GCC), na posição 49 no éxon 1,

e rs3087243 (CT60 G/A), localizado na posição +6230, na região 3' UTR (Figura 5) (TING *et al.*, 2016).

No estudo realizado por Santos *et al.* (2018) foi observado uma associação entre o SNP rs231775 de *CTLA-4* e a obesidade em pacientes portadoras de ST no nordeste do Brasil, contudo não foi associado com outras desordens inflamatórias ou imunes.

Figura 5. Estrutura do gene *CTLA4* humano e polimorfismos conhecidos. Em destaque (vermelho) os SNPs mais estudados.



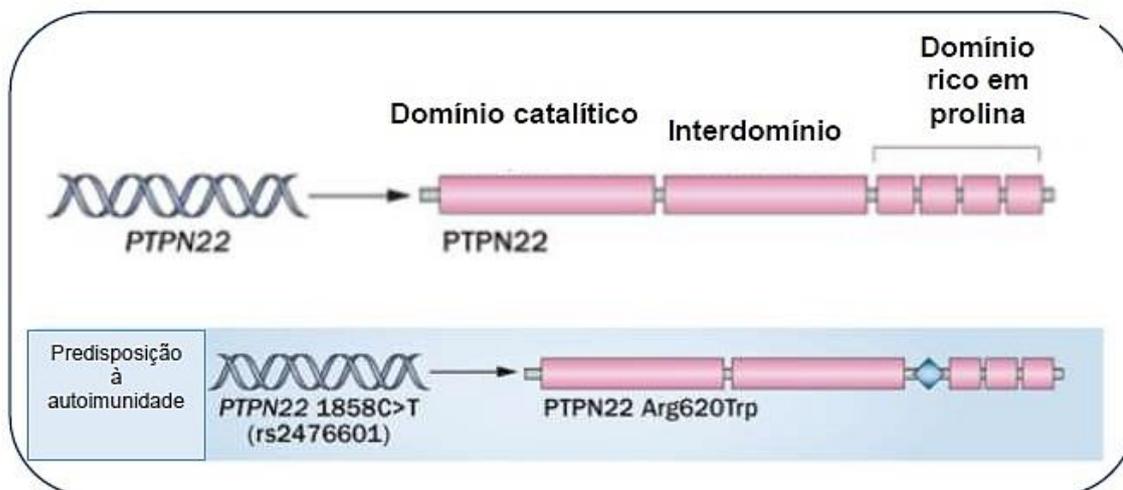
Fonte: Adaptado de TU *et al.* (2015).

Adipócitos de indivíduos ST obesos expressam menos elementos anti-inflamatórios e grandes quantidades de fatores pró-inflamatórios, levando a uma resposta desregulada nas células imunológicas dessas pacientes (BAKALOV *et al.*, 2012).

O gene *PTPN22* (Figura 6) está localizado no cromossomo 1p13.3–13.1. Este gene codifica a proteína Lyp (*lymphoid-specific phosphatase*), uma tirosina fosfatase, que é um importante regulador negativo da ativação de células T por desfosforilação inibitória de mediadores da transdução de sinal *downstream* TCR (T-cell antigen receptor) (BIANCO *et al.*, 2012; STANFORD *et al.*, 2012).

O SNP 1858 C>T foi associado pela primeira vez à ST por Bianco *et al.* (2010) em uma população do sudeste do Brasil. Os autores encontraram associação desde polimorfismo com a predisposição às doenças autoimunes na ST, sugerindo ser um fator importante para a imunidade dessas pacientes. Contudo, em um estudo realizado por Villanueva-Ortega *et al.* (2017) analisando pacientes ST de uma população da cidade do México, não houve associação entre o mesmo SNP e o risco para doenças autoimunes nestas pacientes. Adicionalmente, Santos *et al.* (2018) também não encontraram essa associação em pacientes ST no nordeste do Brasil, ressaltando os diferentes efeitos destes SNPs em várias populações, devido aos diferentes grupos étnicos e heterogeneidade populacional.

Figura 6. Estrutura do gene *PTPN22*, codificando uma tirosina fosfatase com três domínios distintos. O SNP G1858A resulta em uma substituição no primeiro motivo rico em prolina (em azul).



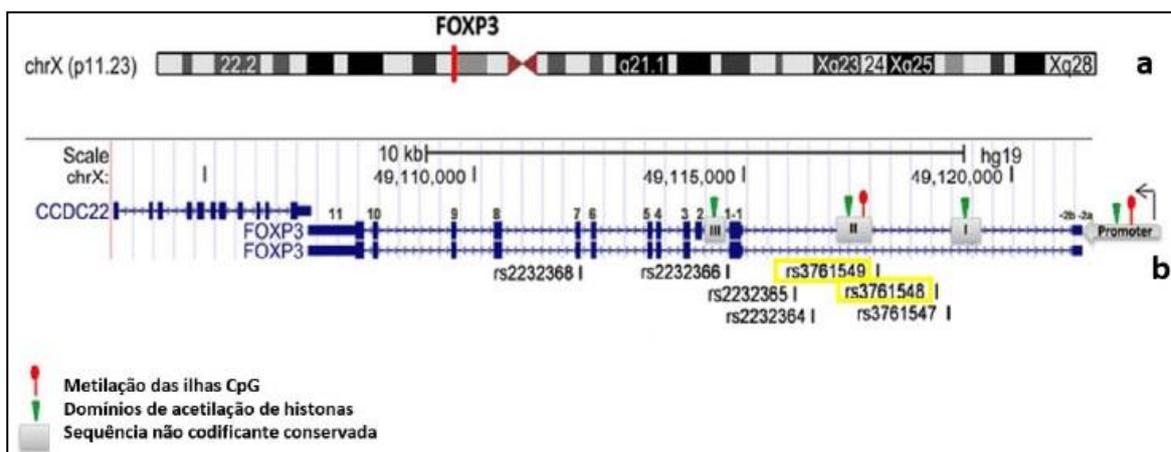
Fonte: Adaptado de STANFORD e BOTTINI. (2014).

Outro gene candidato, o *FOXP3*, está localizado no cromossomo Xp11.23 (Figura 7), consiste em 11 éxons e codifica uma proteína de 431 aminoácidos

(FONTENOT *et al.*, 2005; BAN *et al.* 2007). A proteína FOXP3 é expressa predominantemente nas células do timo, baço e linfonodos, particularmente nas células T CD4+CD25+ (YAGI *et al.*, 2004; TORGERSON, 2007). Este gene tem como função regular a diferenciação e ativação das células Tregs, funcionando como fator de transcrição indispensável para a função supressora da autoimunidade dessas células (D'AMICO *et al.*, 2013).

Laranjeira *et al.* (2022) avaliaram a possível associação entre os SNPs rs3761548 e rs3761549 de *FOXP3* com a susceptibilidade do desenvolvimento de doenças autoimunes/ inflamatórias crônicas em pacientes com ST brasileiras. Os autores não encontraram associação de risco, entretanto, foi observada uma associação entre as frequências alélicas de ambos os SNPs, atuando como fator de proteção nestas pacientes. Além disso, foi observada uma expressão “upregulation” de *FOXP3* em ST quando comparadas a um grupo controle saudável, sugerindo que este gene pode estar atuando diferencialmente no contexto imunológico destas pacientes.

Figura 7. Estrutura do gene *FOXP3*. (a) localização do gene no cromossomo; (b) gene. A figura mostra alguns SNPs, dentre eles, em destaque (amarelo) os SNPs mais estudados.



Fonte: Adaptado de MARQUES *et al.* (2015).

A frequência Treg FOXP3+ entre células T CD4+ foi significativamente maior em pacientes com ST do que um grupo controle, independentemente da presença de autoimunidade tireoidiana (YOUNG *et al.*, 2015). Os autores deste estudo sugeriram que o aumento desta frequência em pacientes com ST seja uma resposta compensatória para reprimir as respostas de células T CD4+ efetoras produtoras de citocinas ativadas e inflamatórias.

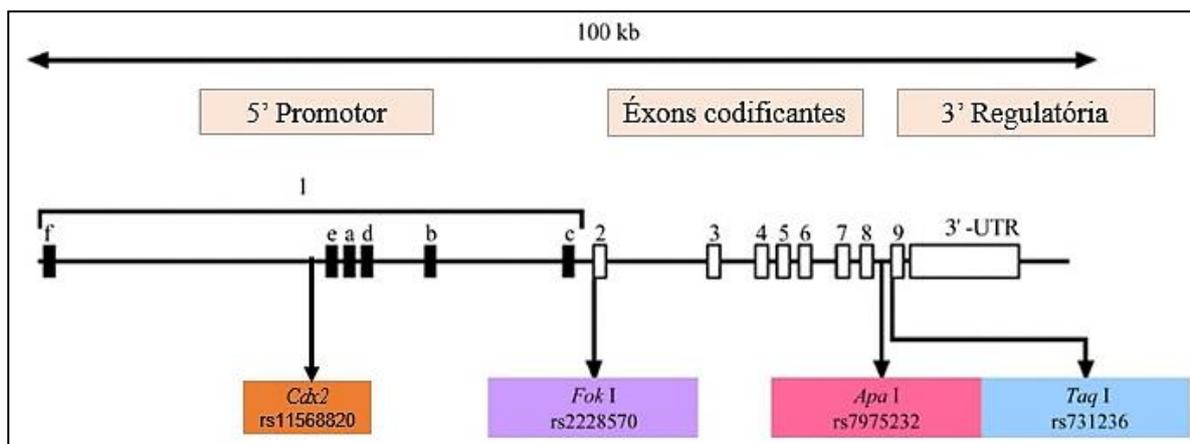
Com relação ao *VDR*, este gene está localizado no cromossomo 12q13.11, é um membro da família dos receptores de esteroides que participa do processo de regulação da transcrição de múltiplos genes e medeia a maioria das atividades biológicas da vitamina D. O *VDR* é expresso na maioria das células do sistema imunológico, incluindo CD4+ e CD8+, bem como em células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células dendríticas. Essas células possuem a 1 α -hidroxilase, que catalisa a síntese da vitamina D ativa (LEHMAN, 2005; BOUILLON *et al.*, 2008).

A vitamina D é um hormônio que desempenha papéis essenciais nas funções endócrinas e tem demonstrado efeitos antiproliferativos e imunossupressores em vários tipos celulares. Também suprime a proliferação de linfócitos e a síntese de imunoglobulinas, além de inibir a ação de fatores de transcrição pró-inflamatórios e a produção de diferentes citocinas, como IL-2, IL-12, entre outras (FROICU *et al.*, 2003; MONTICIELO *et al.*, 2012). Portanto, polimorfismos no gene *VDR* podem levar a importantes defeitos na expressão gênica e na sua função, com conseqüente ineficácia da atuação da vitamina D.

Vários SNPs no gene *VDR* foram identificados, dentre eles o *Cdx2* (G/A) localizado na região promotora, *FokI* (C/T), no éxon 2, *Apal* (G/T) e *TaqI* (T/C) presentes na região 3' UTR (Figura 8) (UITTERLINDEN *et al.*, 2004).

Embora o gene *VDR* possua sua importância no sistema imune, os estudos envolvendo SNPs neste gene permanecem controversos. Bianco *et al.* (2012) avaliaram a possível associação dos SNPs *TaqI* (rs731236), *BsmI* (rs15444410), *FokI* (rs2228570) e *ApaI* (rs11168271) do gene *VDR* com o desenvolvimento de doenças autoimunes da tireoide em pacientes ST brasileiras, contudo, não encontraram associação. Santos *et al.* (2019) obtiveram resultados semelhantes em uma outra amostra brasileira, nos quais não houve associação entre a frequência dos SNPs *FokI* (rs2228570) e *Cdx2* (rs11568820) com doenças autoimunes em pacientes ST, embora os dados tenham mostrado que pacientes com ST apresentaram frequências significativamente mais altas do alelo e genótipo variantes de *FokI* comparados ao grupo controle. Neste mesmo estudo, os autores compararam a expressão do gene *VDR* em ST *versus* controles saudáveis e observaram que o gene se encontra “downregulation” em ST. Com estes dados, foi sugerido que o *VDR* possa conferir um desequilíbrio imunológico na ST.

Figura 8. Estrutura do gene e localização dos polimorfismos mais conhecidos no gene *VDR*.



Fonte: Adaptado de LI *et al.* (2015)

Dada a importância da atuação destes genes na ST, são necessários estudos envolvendo diferentes vias de ativação de genes que atuam no contexto imunológico e que possam estar envolvidos na maior susceptibilidade às desordens inflamatórias e imunes observadas nestas pacientes. Portanto, uma via de ativação conhecida, orquestrada pelo complexo inflamassoma, ainda não estudado na ST, pode ser um candidato importante para esclarecer os mecanismos imunológicos envolvidos nesta síndrome (CHEN *et al.*, 2015).

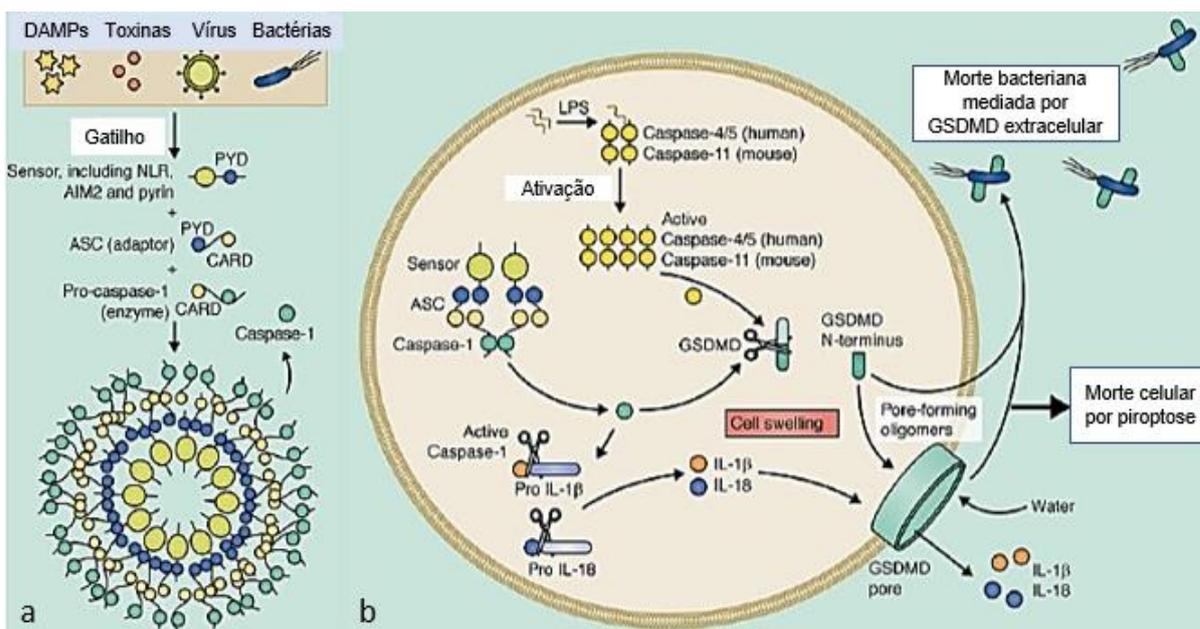
2.3 Inflamassomas

Inflamassomas são um dos mais importantes complexos proteicos multiméricos, que participam das funções do sistema imunológico, sendo amplamente conhecido como um mecanismo inflamatório intracelular (BOINI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015). As respostas imunes inatas dependentes de inflamassomas são iniciadas por receptores do tipo NOD (NLRs), receptores citoplasmáticos de reconhecimento de padrões que detectam patógenos invasores (Figura 9). Os NLRs são ativados por moléculas bacterianas, fúngicas ou virais que contêm padrões moleculares associadas a patógenos (PAMPs) ou por sinais de perigo não microbianos, que são os padrões moleculares associados a danos (DAMPs) liberados por células danificadas (Figura 9a) (LAMKANFI, 2011).

Quando ocorre um dano, o corpo percebe o descontrole da homeostase e inicia-se os processos de reparo e regeneração para restaurar a função do tecido. Portanto, em condições normais a resposta inflamatória favorece a restauração da homeostase, enquanto a inflamação prolongada e não controlada a impede,

favorecendo o desenvolvimento de imunopatologias graves (KARIN e CLEVERS, 2016).

Figura 9. Mecanismos de ativação e montagem dos inflamassomas. a) Ativação do inflamassoma por PAMPs ou DAMPs. b) Piroptose e liberação de citocinas através de GSDMD.



Fonte: Adaptado de MALIK (2017).

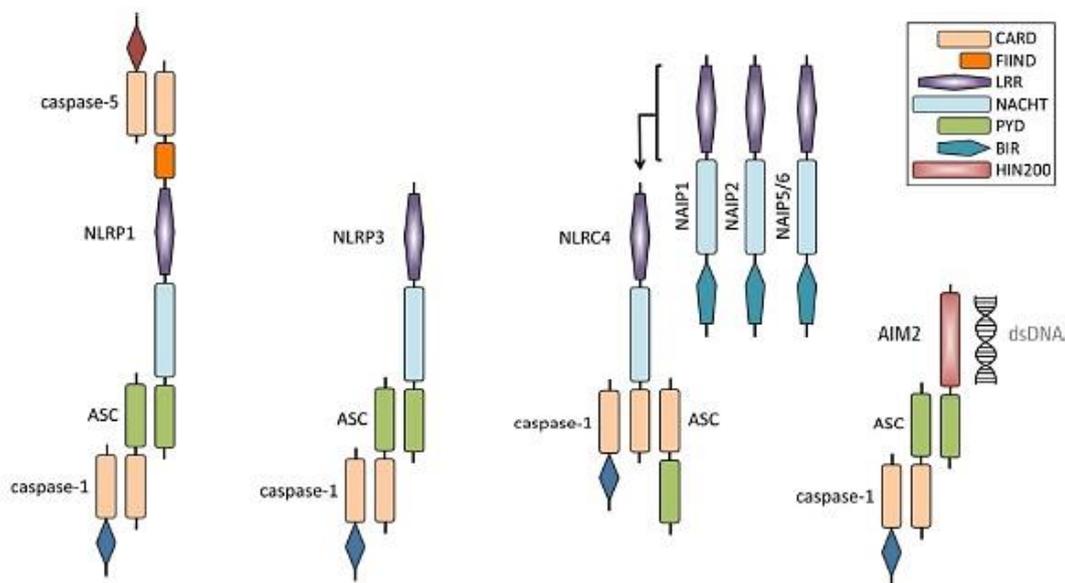
De forma geral, um inflamassoma é composto por um sensor, um adaptador e um efetor. Normalmente, os complexos inflamassoma recebem o nome de seu sensor. Vários destes sensores utilizam uma ou mais proteína adaptadora, como por exemplo, a ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD). A ASC é uma molécula bipartida com um domínio PYD (pyrin domain) e um domínio CARD e serve como uma ponte, conectando o sensor ao efetor *downstream*, caspase-1 (CASP1). As caspases são zimogênios inativos que pertencem à família cisteína-aspartato proteases, desempenhando funções importantes na apoptose, no processamento e maturação de citocinas

pró-inflamatórias. Dentre as caspases inflamatórias humanas estão as caspases - 1, 4, 5 e 12, sendo a caspase-1 a mais bem caracterizada (STROWIG *et al.*, 2012).

Após a montagem do inflamassoma, CASP1 torna-se ativado por meio de autoproteólise induzida por aproximação (Figura 9b). A CASP1 ativa fica então livre para processar e maturar pro-IL1 β e pro-IL18 em IL-1 β e IL-18, respectivamente (SCHRODER *et al.*, 2010; AKIRA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017). CASP1 cliva a proteína gasdermin D (GSDMD) e após a clivagem, o fragmento N-terminal de GSDMD (N-term GSDMD) oligomeriza para formar poros na membrana celular, permitindo que IL-1 β e IL-18 deixem a célula e efetivamente executem a morte celular por piroptose ou processo inflamatório (SBORGI *et al.*, 2016).

Os inflamassomas mais bem estabelecidos estão ilustrados na Figura 10, e incluem o NLRP1 (NLR, pyrin domain containing 1), o NLRP3 (NLR, pyrin domain containing 3), o NLRC4 (NLR, CARD domain containing 4) e o AIM2 (absent in melanoma 2). Além disso, uma série de outras proteínas da família NLR, incluindo NLRP2, NLRP6, NLRP7, NLRP9 e NLRP12, são capazes de formar complexos de inflamassoma multiméricos (VLADIMER *et al.*, 2012; MINKIEWICZ, 2014; LEVY *et al.*, 2015; JANOWSKI e SUTTERWALA, 2016; KHAREET *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2017).

Figura 10. Representação dos Inflamassomas NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2.

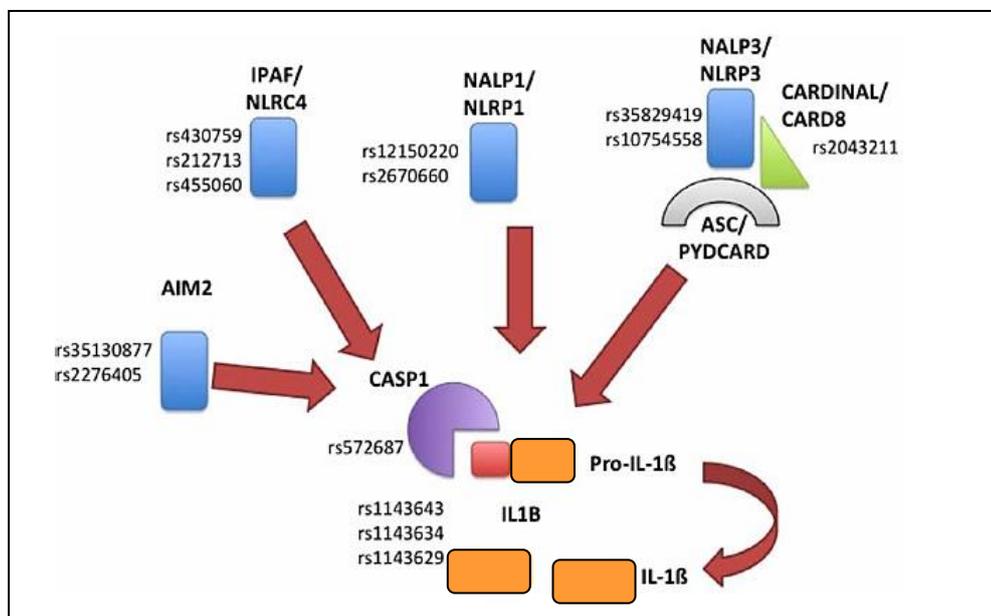


Fonte: Adaptado de SUTTERWALA (2014).

2.3.1 Polimorfismos genéticos em componentes do Inflamassoma

Vários polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes de componentes do inflamassoma foram relatados como associados à suscetibilidade, atividade e resposta ao tratamento de algumas doenças autoimunes (JIN *et al.*, 2007; KASTBOM *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2014; 2015). Alguns dos polimorfismos genéticos em componentes do inflamassoma, incluindo NLRP1, CARD8, NLRC4, AIM2, NLRP3 e IL-1 β estão ilustrados na Figura 11.

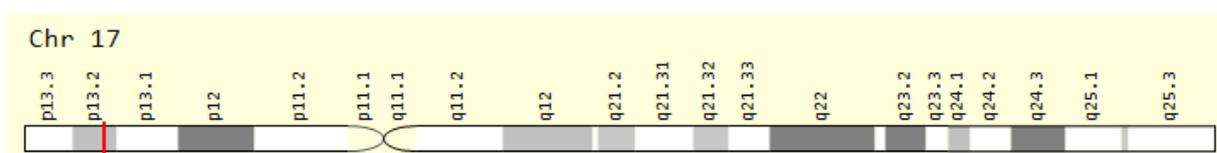
Figura 11. Representação esquemática de alguns SNPs envolvidos nos componentes do inflamassoma.



Fonte: Adaptado de PONTILLO *et al.* (2012).

A primeira associação claramente implicada foi da presença de SNPs em *NLRP1* e doenças autoimunes relacionadas ao vitiligo (JIN *et al.*, 2007). O gene *NLRP1* está localizado no braço curto do cromossomo 17 na região 13.2 (17p13.2) (Figura 12). Este gene codifica um membro das proteínas apoptóticas da família Ced-4 que contêm um domínio de recrutamento para caspase (CARD) e são conhecidos por serem os principais mediadores da morte celular programada.

Figura 12. Localização do gene *NLRP1* (17p13.2).



Fonte: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NLRP1>.

A proteína NLRP1 contém um motivo N-terminal PYD envolvido na interação proteína-proteína, e interage com caspases inflamatórias e com apoptóticas (MARTINON *et al.*, 2002).

Uma vez que foi demonstrado que o *NLRP1* é expresso em células de Langerhans e células T, foi proposto que os SNPs funcionais de *NLRP1* possam conferir riscos à autoimunidade não apenas da pele, como também de outros sistemas do organismo (KUMMER *et al.*, 2007). Posteriormente, Pontillo *et al.* (2012) relataram que o SNP *NLRP1* rs2670660 e o haplótipo *NLRP1* rs12150220-rs2670660 A-G estão associados à suscetibilidade ao LES. SNPs em *NLRP1* também foram associados com outras doenças autoimunes, incluindo esclerose sistêmica, doença de Addison, DC e DMT1 (MAGITTA *et al.*, 2009; ZURAWEK *et al.*, 2010; DIEUDE *et al.*, 2011; PONTILLO *et al.*, 2011).

O polimorfismo *CARD8* C10X foi associado com a atividade inflamatória no início da AR e ao risco aumentado de LES (KASTBOM *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2015). Além disso, a variante *CARD8* rs2043211 foi associada à suscetibilidade em desenvolver psoríase e AR (CARLSTROM *et al.*, 2012; ADDOBBATI *et al.*, 2018).

Estudos mostraram associação entre SNPs do gene *NLRC4* com o desenvolvimento e à gravidade de algumas doenças autoimunes, como AR e esclerose múltipla (ADDOBBATI *et al.*, 2018; SOARES *et al.* 2019). Em um estudo mais recente, Liu *et al.* (2020) encontraram associação entre o polimorfismo *NLRC4*rs385076 com doenças autoimunes da tireoide. Também foram relatadas mutações de ganho de função do gene *NLRC4* em pacientes com síndrome autoinflamatória familiar pelo frio (FCAS) ou autoinflamação com

enterocolite infantil. A maioria das mutações relatadas neste gene resulta na ativação constitutiva do inflamassoma NLRC4 levando ao aumento da produção de IL-1 β , mas especialmente a liberação de IL-18 e piroptose anormal em monócitos (CANNA *et al.*, 2014; KITAMURA *et al.*, 2014; ROMBERG *et al.*, 2014).

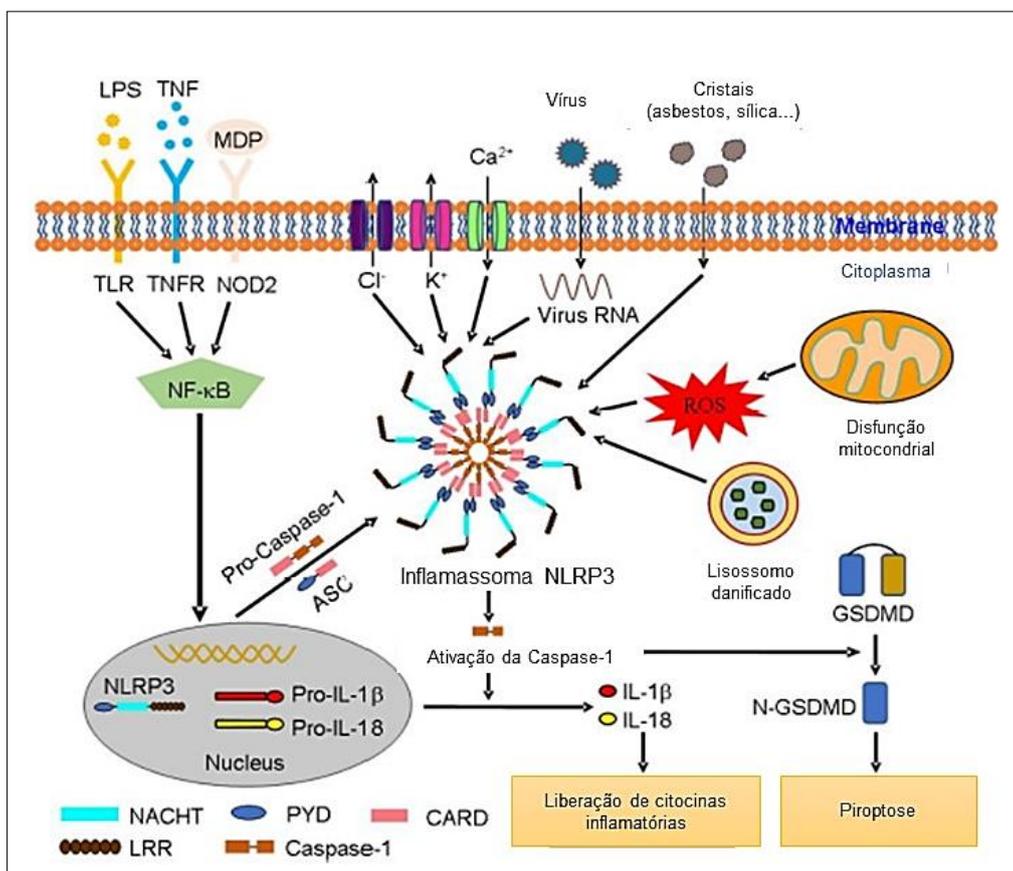
Com relação aos SNPs em *AIM2*, são raros os estudos acerca deste gene relacionando com desordens inflamatórias, imunes e infecciosas. Nenhuma associação foi encontrada entre o SNP rs35130877 e a proteção ou risco de desenvolver tuberculose (TB) (SOUZA DE LIMA *et al.* 2016), contudo, o SNP rs1103577 foi associado com a proteção à TB (FIGUEIRA, 2019). Os dois estudos foram realizados em uma coorte da Amazônia. No estudo realizado por Pontillo *et al.* (2011), envolvendo os SNPs rs2276405 e rs35130877, também não mostrou associação destes com o risco ao LES em uma coorte de São Paulo. Em relação a outras doenças infecciosas, não há relatos até o momento.

O inflamassoma NLRP3 é importante para as defesas imunológicas do hospedeiro contra infecções bacterianas, fúngicas e virais (KANNEGANTI *et al.*, 2006; ALLEN *et al.*, 2009; GROSS *et al.*, 2009; THOMAS *et al.*, 2009). Entretanto, quando desregulado tem sido associado à patogênese de várias desordens inflamatórias e imunes (MENU *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2015).

Por se tratar de um processo inflamatório envolvido, o inflamassoma NLRP3 deve ser estritamente regulado. Para a ativação funcional do NLRP3 dois sinais são necessários (Figura 13). O primeiro sinal, que corresponde à etapa de iniciação, citocinas endógenas ou componentes microbianos na membrana celular estimulam o receptor toll-like (TLR), o domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NOD) 2 ou o receptor do fator de necrose tumoral (TNF) levando à ativação do fator nuclear-kB (NF-kB). NF-kB, então, promove a síntese de NLRP3

e a expressão de pró-IL-1 β e pró-IL-18 (GUO *et al.*, 2016; MATHUR *et al.*, 2018; SWANSON *et al.*, 2019).

Figura 13. A estrutura e ativação do inflamassoma NLRP3.

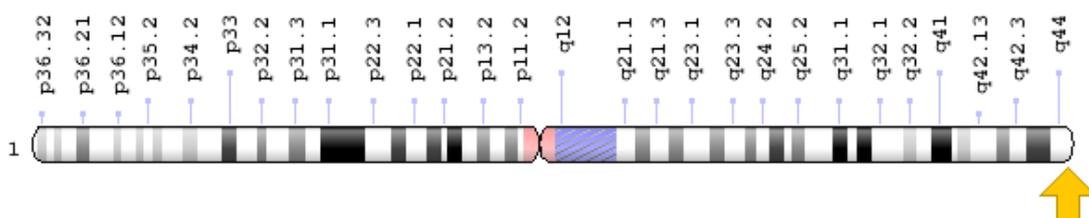


Fonte: Adaptado de SHI *et al.* (2020).

O segundo sinal, que corresponde à etapa de ativação, envolve a oligomerização do NLRP3. Estímulos como efluxo de K⁺, mobilização de Ca²⁺, efluxo de Cl⁻, espécies reativas de oxigênio (ERO), disfunção mitocondrial e dano lisossomal geram sinais de ativação, levando à montagem de NLRP3 inflamassoma com caspase-1 mediando IL-1 β e excreção de IL-18 (ZHANG *et al.*, 2015; KELLEY *et al.*, 2019).

Dentre os inflamassomas descritos, o NLRP3 é considerado, até o momento, o mais bem caracterizado e estudado comparado aos demais (JO *et al.*, 2016). O NLRP3 é codificado pelo gene *NLRP3*, que está localizado no cromossomo 1q44 (Figura 14), consiste de 4470 pb, nove éxons e codifica a criopirina, uma proteína pertencente à família NLR, que está envolvida na plataforma de sinalização do inflamassoma ao regular a atividade da caspase-1 e o processamento da IL-1 β (HOFFMAN *et al.*, 2001; MARIATHASAN *et al.*, 2006; HITOMI *et al.*, 2009).

Figura 14. Localização do gene *NLRP3* (1q44).



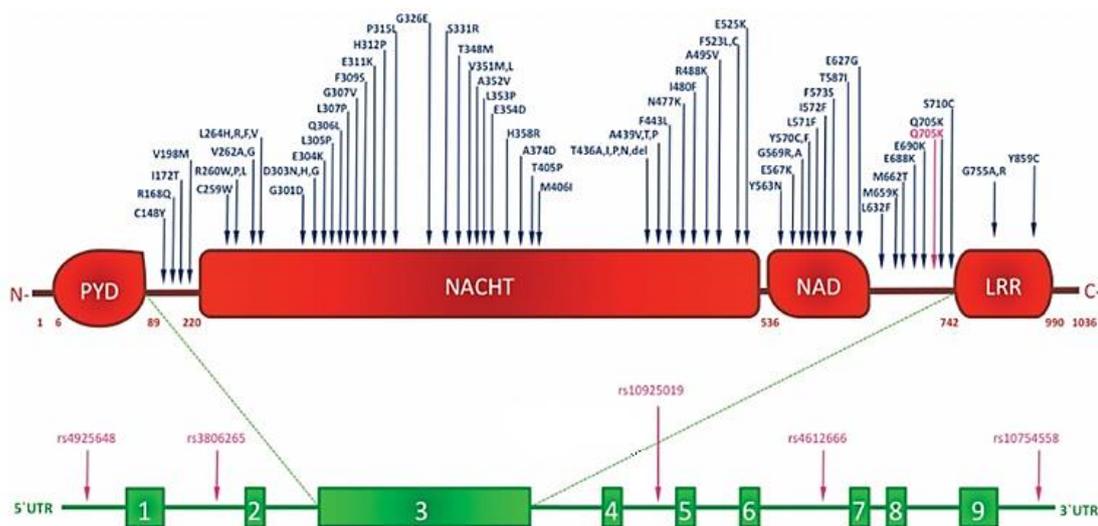
Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NLRP3#location>.

O *NLRP3* é expresso principalmente em células imunes, principalmente células apresentadoras de antígenos (APCs) e células inflamatórias após o gatilho inflamatório, que compreendem macrófagos, células dendríticas, neutrófilos no baço e monócitos (ZHONG *et al.*, 2013). Estruturalmente, o *NLRP3* é constituído por três domínios comuns da família NLR (LRR, NACHT contendo o domínio efetor PYD) (Figura 15) e é ativado por diferentes estímulos (AWAD *et al.*, 2018).

Vários relatos foram descritos para este gene, associados geralmente com doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo DMT1, aterosclerose, psoríase, doença de Crohn, DC, LES, AR e doença cardiovascular (PONTILLO *et al.*,

2010a; 2011; ROBERTS *et al.*, 2010; CARLSTROM *et al.*, 2012; OZAKI *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; WU *et al.*, 2019;).

Figura 15. Representação esquemática dos três domínios (LRR, NAD e NACHT) e as mutações e polimorfismos em *NLRP3*. LRR, repetição rica em leucina; NAD, domínio associado a NACHT; PYD, domínio de pirina.



Fonte: Adaptado de CONFORTI-ANDREONI *et al.* (2011).

A variante *missense* Gln705Lys ou Gln703Lys (rs35829419) possui ação protetora contra o desenvolvimento de DC e infarto do miocárdio em mulheres (PONTILLO *et al.*, 2010a; VARGHESE *et al.*, 2013). Todavia, este mesmo SNP foi associado à suscetibilidade ao melanoma e doença de Crohn (SCHOULTZ *et al.*, 2009; VERMA *et al.*, 2012). O SNP rs10754558, localizado na região não traduzida (3'UTR), foi associado à proteção contra algumas infecções, como HIV-1 (human immunodeficiency vírus), HTLV-1 (human T-celllymphotropic vírus 1) e TB, risco para o desenvolvimento de DMT1 e suscetibilidade aumentada para desenvolver alergia alimentar (HITOMI *et al.*, 2009; PONTILLO *et al.*, 2010a; 2010b, 2012b; KAMADA *et al.*, 2014; SOUZA DE LIMA *et al.*, 2016).

A hiperativação do inflamassoma NLRP3 foi encontrada em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes portadores de LES e diabetes (LEE *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2015), embora o mecanismo preciso pelo qual o inflamassoma NLRP3 torna-se hiperativado ainda não esteja claro.

Cerca de 180 mutações de ganho de função no gene *NLRP3* estão associadas com desenvolvimento de síndromes autoinflamatórias coletivamente chamadas de síndromes periódicas associadas à criopirina (CAPS) (LACHMANN *et al.*, 2009), que incluem síndrome auto-inflamatória (FCAS), síndrome de Muckle-Wells (MWS) e doença inflamatória multissistêmica de início neonatal (NOMID) (BRODERICK *et al.*, 2015). Os sintomas mais comuns observados na CAPS envolvem a pele, olhos, articulações e sistema nervoso central, sendo caracterizada por inflamação sistêmica mediada por excesso da produção da IL-1 β (FELDMANN *et al.*, 2002; AKSENTIJEVICH *et al.*, 2007).

A maioria das mutações observadas na CAPS está localizada dentro do domínio central NBD (domínio de oligomerização ligador de nucleotídeo) no éxon 3 e algumas também foram descritas na região LRR (repetição rica em leucina) (TOUITOU *et al.*, 2004). Aksentijevich *et al.* (2007) propuseram um mecanismo patogênico para CAPS, o qual em condições de repouso, o NLRP3 se encontra no citosol em uma conformação inativa, garantida pela interação LRRs-NBD. Com isso, a ocorrência de mutações em NBD ou LRRs, pode desestabilizar este estado inativo, levando a uma proteína NLRP3 constitutivamente ativada (conformação “aberta”), e à consequente ativação constitutiva do inflamassoma, com aumento da produção de IL-1 β . Portanto, as variantes genéticas em NLRP3 influenciam o limiar de ativação do inflamassoma NLRP3 e dificultam uma resposta imune inata equilibrada.

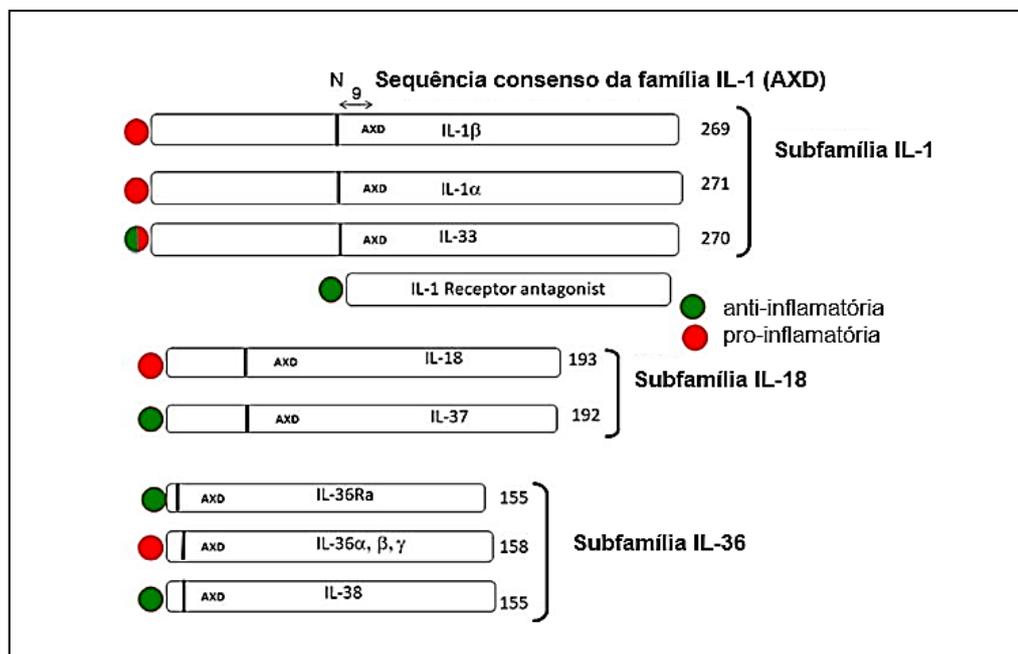
As doenças observadas em modelos de camundongos relacionadas às mutações associadas a CAPS são semelhantes às observadas em humanos, sugerindo que a hiperativação de IL-1 β é suficiente para iniciar e sustentar vários eventos inflamatórios importantes. Portanto, as terapias que bloqueiam a ação de IL-1 β usando um antagonista de IL-1R ou anticorpo monoclonal anti IL-1 β são usadas com sucesso para tratar CAPS e outros distúrbios mediados por IL-1 (CONFORTI-ANDREONI *et al.*, 2011).

A família da interleucina-1 (IL-1), na qual a IL-1 β faz parte, é um mediador central da imunidade inata e da inflamação aguda e crônica. A família IL-1 possui 11 membros e pode ser categorizada em subfamílias de acordo com o comprimento de seu precursor: IL-1, IL-18 e IL-36 (Figura 16) (GARLANDA *et al.*, 2013; van de VEERDONK *et al.*, 2013).

Como ilustrado na Figura 16, a subfamília de citocinas IL-1 inclui agonistas (IL-1 α , IL-1 β e IL-33), bem como antagonista do receptor, IL-1Ra; a subfamília IL-18 compreende os agonistas IL-18 e IL-37, e a subfamília IL-36 é composta pelos agonistas IL-36 α , β , γ e antagonistas do receptor IL-36 Ra e IL-38. Além disso, existem 10 membros da família do receptor de IL-1 (IL-1R) que são capazes de se ligar a ligantes específicos de IL-1 em combinação com um correceptor e desempenhar funções pró e antiinflamatórias (DINARELLO *et al.*, 2018).

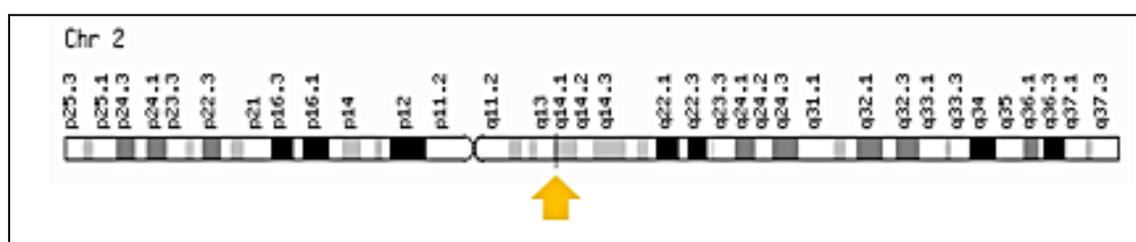
Entre os membros da família IL-1, a IL-1 β é a mais comumente estudada e caracterizada. O gene que codifica a IL-1 β está localizado no cromossomo 2q14 (Figura 17), possui sete éxons e é expresso principalmente em linfócitos B, monócitos e fibroblastos. Consiste em uma citocina pró-inflamatória eficaz que recruta células imunes inatas para o local da infecção e regula as células imunes adquiridas (AFONINA *et al.*, 2015).

Figura 16. As três subfamílias da IL1. A sequência consenso AXD da família IL1 é indicada em cada subfamília e o número de aminoácidos é indicado ao final de cada precursor de citocina. Como IL-1Ra tem um peptídeo sinal e é prontamente secretado, não há sítio AXD. Sequência consenso AXD significa que “A” pode ser qualquer aminoácido alifático, seguido por qualquer aminoácido “X” e então “D” para ácido aspártico.



Fonte: Adaptado de GARLANDA *et al.* (2013).

Figura 17. Localização do gene da IL-1 β (2q14).



Fonte: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL1B>.

Indivíduos com mutações ativadoras em um dos genes-chave que controlam a ativação da caspase-1, ou seja, *NLRP3* (criopirina), podem desenvolver inflamação sistêmica, que pode ser revertida pelo bloqueio de IL-1 β . Em pacientes com essas mutações em *NLRP3*, foi observado que ocorre uma

diminuição nos níveis de estado estacionário de RNAm de pró-caspase-1 com tratamento de IL-1Ra, sugerindo que IL-1 β estimula sua própria produção e processamento (GOLDBACH-MANSKY *et al.*, 2006; van de VEERDONK *et al.*, 2013).

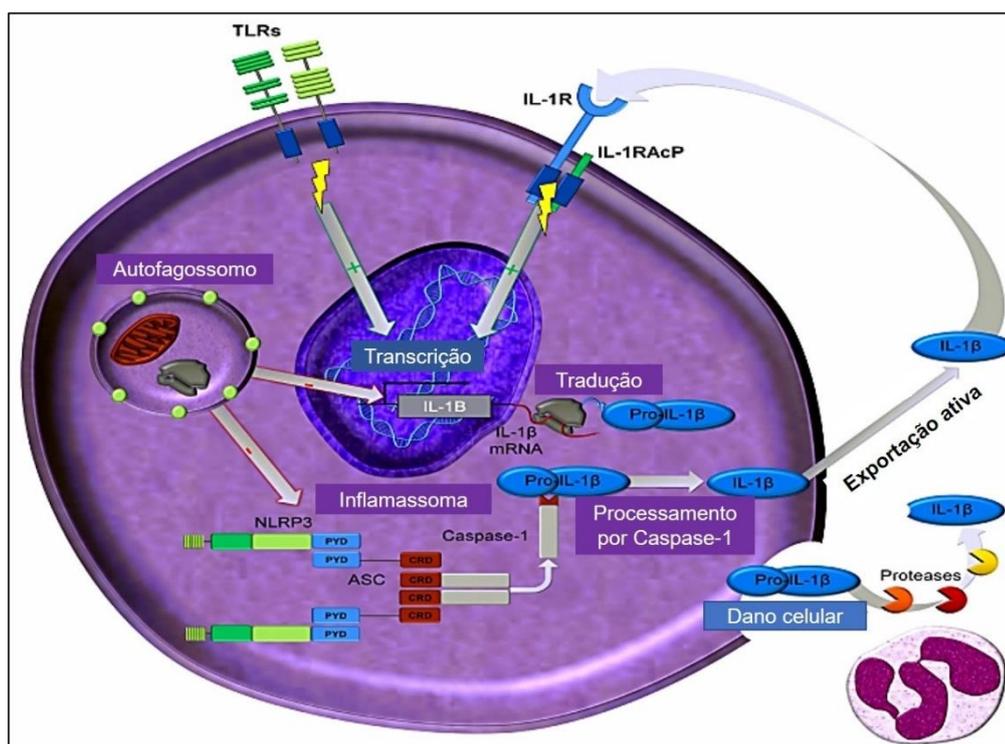
A Figura 18 mostra o processamento e regulação de IL-1 β , onde a transcrição do mRNA da *IL-1 β* pode ser induzida por ligantes que ativam os receptores Toll like (TLR) ou por ligantes IL-1 (IL-1 α e IL-1 β). Esta transcrição pode ser regulada por autofagia. O precursor de IL-1 β , nomeadamente pró-IL-1 β , pode ser processado pela caspase-1 ativa, além disso, as proteases, predominantemente derivadas de neutrófilos, podem clivar a pró-IL-1 β extracelular, que estará presente no contexto de células inflamatórias danificadas. Esta IL-1 β madura e bioativa processada pode então induzir sua própria transcrição (van de VEERDONK *et al.*, 2013).

Os distúrbios que alteram a função da IL-1 β podem desempenhar não apenas um papel na inflamação e nas respostas imunes, mas também na patogênese de DAIs, incluindo doença de Graves (DG) e HT, que são doenças autoimunes da tireoide (AJJAN & WEETMAN, 2003). Polimorfismos no gene *IL-1 β* podem contribuir para diferenças na expressão, tradução, transporte celular e secreção de IL-1 β . Polimorfismos na região promotora do gene *IL-1 β* alteram os efeitos dos lipopolissacarídeos (LPS) na transcrição deste gene, levando à suscetibilidade às doenças inflamatórias (HALL *et al.*, 2004).

O SNP na região promotora de *IL-1B* +3953C/T (rs1143634) foi associada à susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças autoimunes da tireoide em uma população da China e da Tunísia (LIU *et al.*, 2010; ZAABER *et al.*, 2016). Uma metanálise realizada por Chen *et al.* (2014), demonstrou que este SNP não

foi associado ao risco de DG em caucasianos, sugerindo que a discrepância dos resultados entre essas populações pode ser explicada pelo contexto genético distinto, e pelo fato de que doenças autoimunes da tireoide estejam relacionadas à fatores ambientais.

Figura 18. Processamento e regulação de IL-1 β .



Fonte: Adaptado de van de VEERDONK *et al.* (2013).

Além da influência em doenças autoimunes da tireoide, estudos demonstraram a associação de SNPs neste gene com o risco de desenvolver várias desordens inflamatórias e autoimunes, colite ulcerativa, nefropatia diabética, AR e DMT2 (YAMAMOTO *et al.*, 2011; STEFANIDIS *et al.*, 2014; LAGHA *et al.*, 2015; TRIPATHI *et al.*, 2015; TAYEL *et al.*, 2018).

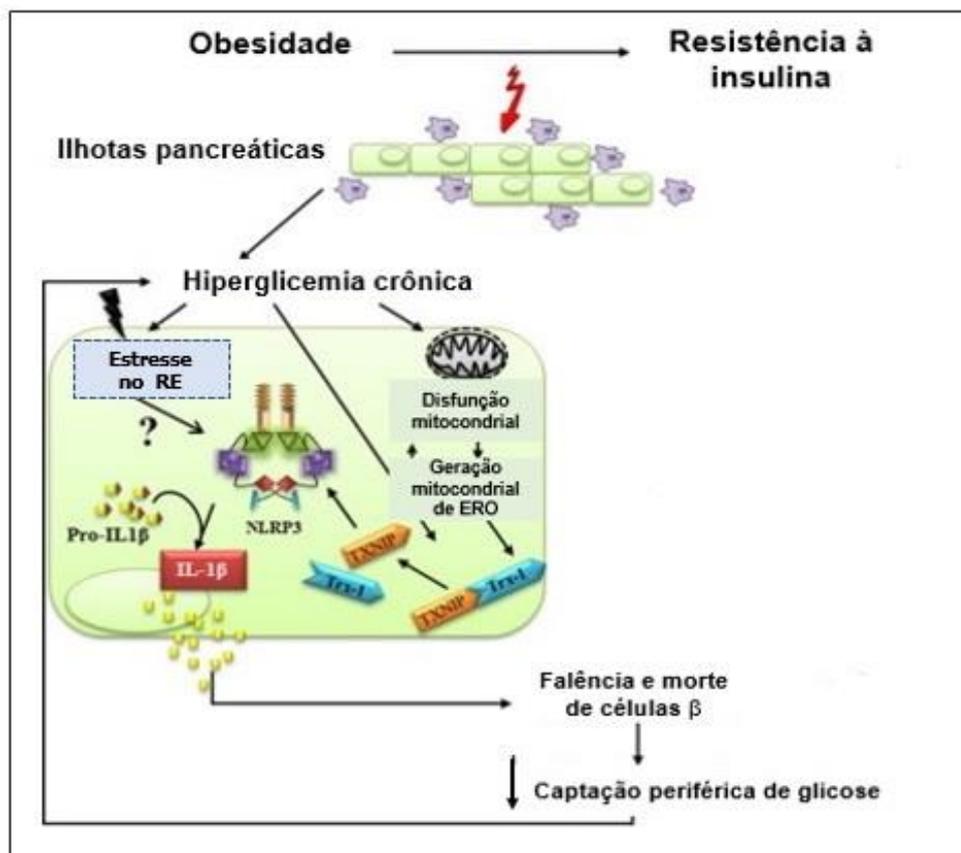
Níveis elevados de IL-1 β na circulação e nas ilhotas pancreáticas estão associados a um risco aumentado de desenvolver DMT2 (Figura 19)

(ABDERRAZAK *et al.*, 2015). A ativação das proteínas do inflamassoma e da caspase-1 está consideravelmente aumentada nos compartimentos celulares do tecido adiposo e do fígado de humanos e camundongos obesos. Portanto, as taxas de expressão dos componentes do inflamassoma estão significativamente correlacionadas com a gravidade da doença em indivíduos obesos com DM2 (STIENSTRA *et al.*, 2010; VANDANMAGSAR *et al.*, 2011).

A exposição crônica de células β pancreáticas às concentrações elevadas de glicose promove a expressão de TXNIP (Thioredoxin-interacting protein), que atua como regulador importante no metabolismo da glicose, além do estresse no retículo endoplasmático (RE) e acúmulo de mitocôndrias disfuncionais levando ao acúmulo de ERO intracelular. A geração de estresse no RE conduz a ativação de NLRP3 de uma maneira dependente de TXNIP. A sinalização de IL-1 β induz um ambiente pró-inflamatório local por meio da ativação de outros fatores quimiotáticos e infiltração de células imunes que agrava a falência das células β , levando a uma deficiência na captação periférica da glicose e conseqüentemente à hiperglicemia crônica (ABDERRAZAK *et al.*, 2015).

Estudos mostram que uma importante família de hormônios sexuais, os estrogênios, pode atenuar o impacto da inflamação que ocorre em doenças como obesidade DMII, além de desempenhar um papel crucial na supressão do desenvolvimento de outras doenças inflamatórias crônicas (VIÑA *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2014). As respostas imunes inatas e adaptativas, humorais e mediadas por células são afetadas por hormônios, e a desregulação desses mecanismos contribui para doenças imunomediadas, incluindo doenças autoimunes (KLEIN *et al.*, 2016; EDWARDS, 2018).

Figura 19. O papel do inflamassoma na indução da morte de células β e progressão do DMT2.



Fonte: Adaptado de ABDERRAZAK *et al.* (2015).

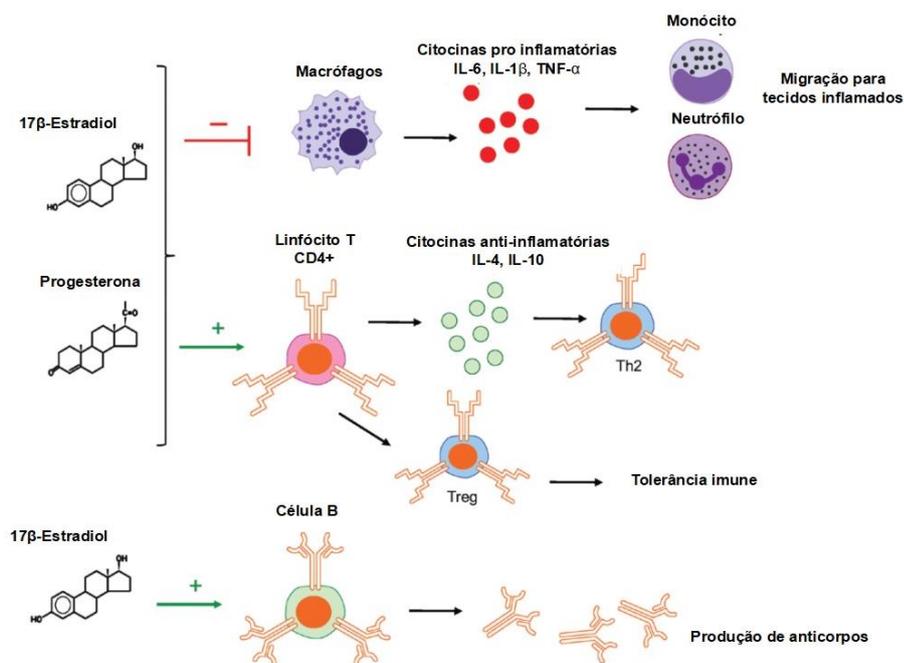
2.4 Hormônios sexuais e sistema imune

O sistema imune não funciona isoladamente, mas como um sistema endócrino e nervoso central que estão integrados através de uma rede de moléculas-sinal (citocinas, hormônios e neurotransmissores), atuando em um conjunto comum de receptores (ARUNA *et al.*, 2014).

Dentre os hormônios existentes, os hormônios sexuais femininos, como estrogênio e progesterona (Figura 20), e hormônios sexuais masculinos, como testosterona e outros andrógenos, são hormônios esteróides que modulam grande parte dos processos biológicos. Além de controlar o sistema reprodutivo,

os hormônios sexuais regulam o desenvolvimento e a função da resposta imune (BOUMAN *et al.*, 2005).

Figura 20. Ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras do estradiol e da progesterona.



Fonte: Adpatado de MAUVAIS-JARVIS *et al.* (2020).

Um dimorfismo sexual quanto à prevalência de doenças como obesidade, DMII e doenças cardiovasculares tem sido relatado, sendo mais prevalentes e com maior risco de doença em homens adultos quando comparados às mulheres. Entretanto, após a menopausa, as mulheres tornam-se tão suscetíveis quanto os homens às doenças associadas à obesidade (ZHU *et al.*, 2014). Pfeilschifter *et al.* (2002) demonstraram que a perda de estrogênios durante a transição da menopausa leva ao aumento da expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6). O estrogênio influencia não apenas o desenvolvimento, mas também várias funções das células T, em particular as células T CD4, incluindo a ativação, diferenciação

na produção de citocinas e funções regulatórias com impacto na fisiologia e doenças autoimunes (PERNIS, 2007; KASSI e MOUTSATSOU, 2010).

A função do estrogênio na homeostase celular é complexa, depende do tipo celular, tecido, concentrações de estrogênio e condições fisiológicas ou patológicas (LEWIS-WAMBI, 2009). Além disso, há uma complexidade maior associada com a variação do meio hormonal feminino ao longo do ciclo, com pico de estrogênio (estradiol) durante a fase ovulatória e pico de progesterona durante a fase lútea (VELDHUIJZEN *et al.*, 2013).

O modo de ação do estrogênio pode ser dividido em vias genômicas (nucleares) e não genômicas (extranucleares). Esses processos são mediados por receptores clássicos, não clássicos e por ligantes, a fim de controlar mecanismos de expressão gênica, modificações de proteínas e sinalização para influenciar as funções celulares (MARINO *et al.*, 2006; CUNNINGHAM e GILKESON, 2011).

Na via genômica clássica, o estrogênio, ou sua forma mais ativa o 17β -estradiol (E2) interage com seus receptores intracelulares, receptores de estrogênio alfa (ER α) e beta (ER β) (EDWARDS, 2005; MARINO *et al.*, 2006). O ER (estrogeno receptor) é um fator de transcrição ativado por ligante, que possui domínios de ligação ao ligante e ao DNA. Por sua vez, o estrogênio se difunde através da membrana celular, liga-se ao ER citoplasmático, que sofre mudança conformacional, e se homo ou heterodimeriza em ER α e ER β . Os dímeros de RE então se deslocam para o núcleo e se ligam a promotores de genes-alvo para regular a expressão gênica (SAFE *et al.*, 2008). Nas vias genômicas não clássicas, o ER ligado ao DNA pode interagir com outros fatores de transcrição, ou pode atuar como cofator para fatores de transcrição, incluindo a proteína de

especificidade 1 (Sp1), ativando a proteína 1 (AP-1), fator nuclear kappa β (NF- κ B) e proteína p300 (SAFE *et al.*, 2008; MANOLAGAS *et al.*, 2013).

Na via não-genômica, o estrogênio pode mediar efeitos por meio de mecanismos de *cross-talk* com cascatas de sinalização. Além dos ERs intracelulares clássicos, o estrogênio pode se ligar a receptores de estrogênio de membrana (mER) e receptores acoplados à proteína G associados à membrana (GPCRs), desencadeando a sinalização a jusante em certos tipos de células. Estes também são chamados de efeitos rápidos do estrogênio mediado por receptores de membrana, receptores de tirosina quinases e vias de sinalização a jusante (REVANKAR *et al.*, 2005; BARTON *et al.*, 2018).

Além de serem amplamente expressos nos tecidos reprodutivos, os ERs também têm sua expressão na maioria das células do sistema imunológico, influenciando nas respostas imunes inatas e adaptativas, servindo como reguladores transcricionais da função celular. Em células mononucleares do sangue periférico humano, os linfócitos T CD4⁺ expressam níveis mais altos de ER α do que ER β , enquanto as células B expressam níveis mais altos de ER β do que ER α (PHIEL *et al.*, 2005; PIERDOMINICI *et al.*, 2010).

Entre os estrogênios, o E2 é o composto mais estudado por seus efeitos regulatórios no sistema imunológico. Seus efeitos imunorreguladores demonstraram influenciar no estado da doença e nos sinais clínicos em doenças autoimunes e alérgicas (DRAGIN *et al.*, 2016). Estudos mostraram que a terapia com E2, levando a concentrações séricas equivalentes à ovulação ou gravidez, apresenta ações imunomoduladoras e anti-inflamatórias benéficas em camundongos e humanos (STRAUB, 2007; KLEIN e FLANAGAN, 2016).

As ações antiinflamatórias de E2 na imunidade inata envolvem a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α por monócitos e macrófago, e quimiocinas, como CCL2, diminuindo assim a migração de neutrófilos e monócitos para áreas inflamadas. Os níveis mais elevados de E2 também se correlacionam com níveis mais baixos de IL-2 e IL-8 e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12 de macrófagos ativados e IL-6 alterando diretamente monócitos CD16 (RAZA *et al.*, 2021).

Estudos também têm demonstrado o papel do E2 no perfil de ativação do inflamassoma em algumas doenças, como isquemia cerebral, doença inflamatória pulmonar e processos inflamatórios em mulheres pós-menopausa (THAKKAR *et al.*, 2016; CHENG *et al.* 2019; GUAN *et al.*, 2020). Contudo o mecanismo de regulação e modulação dos inflamassomas mediado por E2 ainda não está claro. Além disso, não há relatos sobre a influência dos hormônios sexuais, mais especificamente o E2, em genes do inflamassoma de pacientes com ST.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel dos polimorfismos e o perfil de expressão dos genes do inflamassoma na susceptibilidade em desenvolver desordens inflamatórias em pacientes com síndrome de Turner.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar as frequências alélicas e genótípicas dos genes do inflamassoma *IL-1 β* rs16944 (A>G), *NLRP3* rs10754558 (G>C) e rs4925659 (G>A) entre pacientes ST e o grupo controle;
2. Investigar a possível associação entre os polimorfismos dos genes *IL-1 β* e *NLRP3* e desordens inflamatórias em pacientes ST;
3. Avaliar e comparar os níveis de expressão dos genes *IL-1 β* , *NLRP3* e *NLRP1* em pacientes ST e grupo controle, através do mRNA de leucócitos totais;
4. Avaliar e comparar os níveis de expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* em PBMCs com e sem tratamento de 17 β -estradiol e estímulo com LPS em pacientes ST e controles.
5. Avaliar e comparar os níveis de expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* em PBMCs sem tratamento de 17 β -estradiol e estímulo de LPS em pacientes ST com desordens inflamatórias e sem.

4 Capítulos

4.1 Capítulo I

Inflammasome complex genes influence upon Turner syndrome patients

Raysa Samanta Moraes Laranjeira^{1*}, Maria Eduarda de Albuquerque Borborema^{1,2},
Aldianne Milene dos Santos Barbosa¹, Juliana Vieira de Barros Arcoverde¹, Andréa de
Rezende Duarte³, Barbara Guiomar Sales Gomes da Silva⁴, Jaqueline de Azevêdo Silva^{1,2}
and Neide Santos¹

¹*Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.*

²*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.*

³*Serviço de Genética Médica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife, PE, Brazil.*

⁴*Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.*

***Corresponding Author:**

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail address: raysa.laranjeira@hotmail.com (Raysa Samanta Moraes Laranjeira)

ORCID: 0000000167070888

Fax: + 55 81 21268522

Manuscrito submetido ao periódico Scandinavian Journal of Immunology – Fator de Impacto (2021): 3.889; Qualis CAPES A4.

Abstract

Turner syndrome (ST) is associated with an increased risk of inflammatory and autoimmune diseases. The present study evaluated the possible association between genetic polymorphisms in the *IL-1 β* and *NLRP3* genes and the risk of inflammatory disorders in TS patients and the control group. We conducted a genetic association study that included 92 TS patients (case) and 146 healthy control (HC). Genotyping for *IL-1 β* rs16944 as well as *NLRP3* rs10754558 and rs4925659 was performed using TaqMan Genotyping Assays. Subsequently, we compared the mRNA expression levels of *IL-1 β* , *NLRP3*, and *NLRP1* in 17 TS patients and 17 healthy females (control group) using qPCR-based fluorogenic probes. Significant associations were observed with the G allele of rs16944 ($p=0.001$) and GG genotype ($p=0.002$) in the case group compared to HC; however, they were not associated with inflammatory disorders in the TS sample. We found a significantly higher frequency of the A allele ($p=0.02$) and AA genotype ($p=7.645e^{-5}$) for rs4925659 in HC, whereas the frequency of the A allele and GA genotype was higher in the TS group ($p=0.0001$). With regard to mRNA expression, the inflammasome genes *IL-1 β* and *NLRP3* were downregulated (FC=-6.78 and -15.73, respectively), and *NLRP1* was upregulated (FC=21.5) in TS compared to HC. Our results indicate a differential distribution of *IL-1 β* and *NLRP3* polymorphisms in TS patients. Furthermore, alterations in the expression of the *IL-1 β* , *NLRP3*, and *NLRP1* genes may lead to inflammatory imbalance in these patients.

Keywords: Inflammatory disorders; *IL-1 β* ; *NLRP1*; *NLRP3*; Turner syndrome.

Introduction

Turner syndrome (ST), one of the most common aneuploidies in humans, occurs in 1 in every 2,500 female births and is cytogenetically characterized by total or partial monosomy of the X chromosome [1]. Patients with TS have an increased risk of autoimmunity and other chronic inflammatory diseases compared to healthy individuals [2, 3]. Although the causes remain uncertain, this risk can be attributed to X-chromosome haploinsufficiency, the maternal origin of the X chromosome, decreased anti-inflammatory cytokines (e.g., interleukin-10 [IL-10] and transforming growth factor- β [TGF- β]), overproduction of pro-inflammatory cytokines, and hypogonadism [4, 5].

Pro-inflammatory cytokines are involved in immune regulation, acting as relevant players in innate and adaptive immunity. The mechanisms involved in the maturation and processing of important pro-inflammatory cytokines (e.g., interleukin-1 β [IL-1 β] and interleukin-18 [IL-18]) depend on the activation of a cytosolic multiprotein complex known as the inflammasome [6]. The inflammasome comprises accessory and self-oligomerizing scaffold proteins belonging to nucleotide-binding oligomerization domain receptors (NLR family) [7].

Based on homotypic interactions, NLRs bind to pyrin signaling domains (PYD) or CARD, which interact with caspase recruitment protein (ASC). ASC recruits pro-caspase-1, leading to its dimerization and autoproteolytic processing. This mechanism generates caspase-1 (CASP-1), a protease that triggers pyroptosis (regulated cell death characterized by cell lysis and release of a mature pro-inflammatory cytokine IL-1 β) [8].

NOD-like receptor family pyrin domain containing 1 (NLRP1) has been recognized as the first NLR family protein to recruit an inflammasome; however, NLRP3 is the most abundant inflammasome sensor and contributes to the production of most proinflammatory cytokines [9-12]. Although these cytokines play a beneficial role in promoting

inflammation and eliminating infectious pathogens, mutations that result in constitutive activation of the inflammasome and overproduction of IL-1 β and IL-18 have been associated with inflammatory and autoimmune disorders [13-15]. Recent reports indicate that mutations in the NLRP1 and NLRP3 inflammasome genes are related to some of the most common chronic inflammatory disorders (e.g., type 1 diabetes mellitus (T1DM), Addison's disease, celiac disease, Crohn's disease, rheumatoid arthritis (RA), obesity, Alzheimer's disease, systemic lupus erythematosus [SLE], and cardiovascular disease) [16-23].

Turner syndrome patients present a broad clinical feature comprising various immune and inflammatory dysregulations. Moreover, inflammasomes play roles in several diseases. Thus, we aimed to investigate the frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *IL-1 β* (rs16944) and *NLRP3* (rs10754558 and rs4925659) genes as well as the expression profile of the *NLRP1*, *NLRP3*, and *IL-1 β* genes in TS patients compared to healthy controls.

Materials and Methods

Patients and controls

Ninety-two TS patients were included in the present study, with an average age of 21 years (SD \pm 7.47). Patients were enrolled at the *Serviço de Genética Médica, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP)* and at the *Serviço de Endocrinologia Pediátrica, Hospital de Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)*, Brazil. The healthy control group (HC) comprised 146 healthy females (averaging 34.8 years old [SD \pm 13.51]) from the same geographical region. Exclusion criteria for the control group included a history of individuals with chronic inflammatory and autoimmune disease and close relatives, such as parents.

For the gene expression study, we evaluated 17 TS patients averaging 13.76 years old ($SD\pm 6.1$) and 17 HC patients averaging 30.38 years old ($SD\pm 4.53$) with no history of autoimmune or chronic inflammatory diseases.

The clinical data were obtained from the medical records of each patient, stating the history of inflammatory disorders or lack thereof. The study protocol was approved by the Research Ethics Committees of IMIP (no. 802/06), UFPE (no. 32478820.0.0000.5208), and the *Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares* (EBSERH) (no. 32478820.0.3001.8807). All individuals (or their legal guardians) agreed to and signed an informed consent form and participated in the study voluntarily, without prejudice to their medical treatment. Data collection began after ethical approval.

Association study: DNA isolation - selection of SNPs and genotyping

Genomic DNA was isolated from whole blood samples using the Illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's recommendations and stored at -20°C .

Three SNPs were selected (*IL-1 β* rs16944 [A>G; ID C__1839943_10], *NLRP3* rs10754558 [G>C; C__26052028_10], and *NLRP3* rs4925659 [G>A; C__42550584_10]) based on a 10% minor allele frequency (MAF) and according to their linkage relationship, frequencies, and reported associations with immune and inflammatory diseases. Genotyping was performed using commercially available TaqMan assays (Applied Biosystems, Life Technologies, USA) on an ABI7500 sequence detection system (Applied Biosystems, USA).

Gene expression assays: RNA isolation, cDNA synthesis, and qPCR

Total ribonucleic acid (RNA) was obtained from total leukocytes of peripheral blood samples using TRIzol® reagent following the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). For cDNA synthesis, the concentration of total RNA was standardized at 500 mg for each sample and converted using the commercial GoScript Reverse Transcription kit (Promega) according to the standard protocol.

Gene expression assays were performed using TaqMan Gene Expression probes for the target genes *NLRP1*, *NLRP3*, and *IL-1 β* . The mRNA levels of the reference genes *beta-2-microglobulin (B2M)* and *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1)* were evaluated using the SYBR Green method and their respective primers (F: 5'-AGATGAGTATGCCTGCCGTG-3', R: 5'-ACATGTCTCGATCCCACTTAAC-3'; and F: 5'-AGGACTGAACGTCTTGCCCTCG-3', R: 5'-ATCCAACACTTCGTGGGGTC-3'). Relative quantification assays were performed on an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Analyses were performed based on quantification cycle values, whereas mRNA levels were calculated using the $\Delta\Delta C_q$ method.

Statistical analysis

Statistical analyses of the association study were performed using SNPStats [24] and R version 3.5.1 software. The allelic and genotypic distributions of *IL-1 β* and *NLRP3* SNPs were evaluated by direct counting, while Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was obtained using the chi-square (χ^2) test. The statistical significance of the difference in allelic and genotypic frequencies was calculated using Fisher's exact test, and a p value < 0.05 was considered statistically significant. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were also calculated, and a p value < 0.05 was considered statistically

significant. Bonferroni correction for multiple comparisons was applied. Post hoc statistical analysis of power was performed using G*power 3.1.9.2 software [25].

For the gene expression analyses, the Shapiro–Wilk test and Student's t test were performed to verify the normality of the sample distribution and to analyze the variance, respectively. Finally, statistical analyses were performed using the nonparametric Mann–Whitney test, with a significance level of 5% ($p < 0.05$) to find differences between the groups.

Results

IL-1 β and *NLRP3* polymorphisms in TS patients and the healthy control group

Genotypes and allele frequencies of the *IL-1 β* rs16944 (A>G) polymorphism in TS and HC are shown in Table 1. Significantly different distributions of the G allele ($p = 0.001$, OR=1.83, 95% CI 1.24-2.71) and GG genotype ($p = 0.002$, OR=3.09, 95% CI 1.41-6.92) were observed in TS patients compared to HCs (statistical power = 0.999).

Table 2 summarizes the allele and genotype distributions of *NLRP3* in the TS and control groups. Regarding *NLRP3* rs10754558 (G>C), there were no differences in allele or genotype frequencies ($p = 1.0$ and $p = 0.6$) between TS and HC. The power was 0.11 to detect a mean effect size ($w = 0.06$) for genotypes in TS and HC. In contrast, in *NLRP3* rs4925659 (G>A), a significantly different distribution of allele and genotype frequencies was observed in HC compared to TS (statistical power = 0.999).

Furthermore, our analysis did not detect the homozygous AA genotype of rs4925659 in TS, and the A allele and AA genotype were significantly more frequent in controls than in TS ($p = 0.02$, OR=0.61, 95% CI 0.39-0.94 and $p = 7.645e^{-5}$, OR= 0.00, 95% CI 0.00-0.28, respectively). Genotype distributions were in HWE ($\chi^2 < 3.84$) for the SNPs evaluated, except for *NLRP3* rs4925659 in TS patients ($p = 0.0012$). After applying

Bonferroni correction, the association remained significant for *NLRP3* rs10754558 and rs4925659 ($p_{\text{Bonf}} = 0.01$ and $3.8225e^{-6}$, respectively).

***IL-1 β* and *NLRP3* polymorphisms in the TS group**

To find possible associations of *IL-1 β* and *NLRP3* variants with inflammatory disorders, such as alopecia, autoimmune thyroid diseases (Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis, and hypothyroidism), and other inflammatory diseases (chronic otitis media, dermatitis, dyslipidemia, and obesity), we categorized TS into two groups: (1) TS case and (2) TS control, with and without inflammatory disorders, respectively.

The allele and genotype distributions of *IL-1 β* rs16944 (A>G) as well as *NLRP3* rs10754558 (G>C) and rs4925659 (G>A) between TS cases and TS controls are summarized in Table 3. No significant association was identified between the evaluated SNPs rs16944 and rs10754558 and inflammatory disorders in TS patients.

In contrast, significantly different distributions of rs4925659 *NLRP3* were observed. The frequency of variant allele A ($p=0.0001$, OR=0.20, 95% CI 0.07-0.49) and GA genotype ($p=1.81e^{-09}$, OR=0.00, 95% CI 0.00-0.07) was significantly higher in TS cases than in TS controls. However, this result cannot be fully explained because of the lack of HWE in this specific group.

Inflammasome gene expression assay

We investigated the relative mRNA expression of the *NLRP1*, *NLRP3*, and *IL-1 β* genes in total leukocytes from 17 TS and 17 HC patients (Figure 1). The expression profile of *IL-1 β* differed significantly between TS and HC (-6.78-fold change -FC; $p= 1.032e^{-10}$), characterizing downregulation in TS patients. Furthermore, *NLRP3* gene expression was also shown to be reduced in TS compared to HC (-15.73-FC, $p= 9.075e^{-10}$). We also

observed a statistically significant difference in NLRP1 gene expression between TS and HC, indicating that *NLRP1* was upregulated (21.5-FC, $p=5.925e-08$) in TS patients.

Discussion

Through this case–control study, we investigated the possible association between *IL-1 β* and *NLRP3* polymorphisms and susceptibility to developing inflammatory disorders in TS by studying three candidate SNPs. Our results showed a differential distribution of the *IL-1 β* rs16944 (A>G) polymorphism in TS compared to controls, although it was not associated with the presence of inflammatory disorders investigated in our patients.

In our study, approximately 36.95% of TS patients (mean age 21 years) were diagnosed with some type of inflammatory disorder. Similar results with a frequency ranging from 20-50% in TS patients, depending on age, have been observed [2, 34-36]. The latest guidelines for the care of girls and women with TS indicate that the risk of autoimmune diseases increases with age [1]. Therefore, we cannot rule out the late development of these disorders in our investigated TS patients.

Previous studies have shown the association of the *IL-1 β* rs16944 polymorphism with the risk of developing a number of inflammatory disorders (e.g., Graves' disease, ulcerative colitis, diabetes nephropathy, rheumatoid arthritis, and type 2 diabetes mellitus [DM2]) [26-30]. Polymorphisms in the *IL-1 β* gene may contribute to differences in IL-1 β expression, translation, cellular transport, and secretion. Hall et al. [31] reported that polymorphisms in the *IL-1 β* promoter region alter the effects of lipopolysaccharide (LPS) on *IL-1 β* gene transcription, allowing the development of inflammatory diseases.

Our results show no association between the selected *NLRP3* rs10754558 and inflammatory disorders in TS patients. Pontillo et al. [16] observed that the rs10754558 G allele was less frequent in T1DM patients ($p=0.02$), thus suggesting a protective role for

this variant in the development of the disease in a pediatric population from Northeast Brazil. Functional analyses performed by Hitomi et al. [32] in a Japanese pediatric population showed that the G allele variant of rs10754558 influences *NLRP3* overexpression (1.4-fold), altering mRNA stability, which could explain systemic but not organ-specific susceptibility.

Remarkably, a significant association was found between the SNP rs10754558 and RA susceptibility [18]. The C allele and the C/C genotype were significantly more frequent in patients than in controls. In addition, upregulation of *NLRP3* and *IL-1 β* genes was observed in RA patients, suggesting that downregulated *NLRP3* transcription in these patients contributes to establishing exacerbated inflammation.

With respect to *NLRP3* rs4925659, we found that the A allele and AA genotypes were less frequent in TS ($p=0.02$ and $p=7.645^{-5}$, respectively) than in the control group. Furthermore, when comparing the TS case group versus the TS control group, we also observed a lower frequency of the variant A allele and heterozygous GA genotype ($p=0.0001$ and $p=1.81e^{-09}$) in the group corresponding to patients not developing inflammatory disorders. This suggests a protective role of this variant in the development of inflammatory diseases. However, this polymorphism is not in HWE, possibly because of the lack of the variant genotype (AA) in both analyses.

Therefore, we should consider that genetic association in complex diseases in a given population may not be replicated in another population because of differences in geographic distribution, incidence, phenotypes, and sample size [33]. In our study, the limited sample size may have implied the nonassociation of these SNPs with susceptibility to inflammatory disorders.

In recent years, the inflammatory and immunological context in TS has been further evaluated and reported [36-40]. Although it is well known that TS patients are at increased

risk for inflammatory disorders, the underlying pathophysiological mechanism is still partially unknown. However, to date, there is no evidence of a role for genes of the inflammasome complex acting in TS.

To our knowledge, the present study is the first to analyze the expression of inflammasome genes in TS. Our results showed that *IL-1 β* and *NLRP3* are globally downregulated in TS compared to HCs. Our TS sample is intentionally heterogeneous to clarify how the inflammasome behaves in this type of syndrome.

In contrast, recent reports have indicated that *IL-1 β* and *NLRP3* levels are increased in various autoinflammatory, autoimmune, and chronic inflammatory and metabolic diseases, including gout, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, type 2 diabetes, autoimmune thyroid disease, and allergic airway inflammation [41-43]. In addition, increased *NLRP1* expression has also been reported in autoimmune diseases [43,44]. Similar results were found in the present study, as *NLRP1* was upregulated in TS patients.

Importantly, TS patients have hypogonadotropic hypogonadism and decreased circulating estradiol [1]. The role of estrogens in inflammation has been widely studied [45-47], but their action on inflammasomes remains poorly understood. Therefore, we consider that the regulatory effect of estrogen on the inflammasome may differ according to the disease.

In conclusion, we detected different distributions for the rs16944 and *NLRP3* rs4925659 polymorphisms of *IL-1 β* in TS patients. Furthermore, the downregulation of *IL-1 β* and *NLRP3* with the upregulation of *NLRP1* may cause an inflammatory imbalance in TS patients. Our results may be relevant to aid in understanding the role of the inflammasome complex in TS and future therapeutic strategies.

Acknowledgments

The authors thank the patients, parents, and physicians for their cooperation in obtaining the data used in this research.

Authorship contributions

R.L. conducted experiments; R.L., M.E.A.B., A.M.S.B., J.V.B.A., J.A.S., and N.S. were involved in the study design, interpretation of results, and preparation of the manuscript; A.R.D. and B.G.S.G.S. were involved in patient recruitment and clinical data. All co-authors critically reviewed and approved the final version of the submitted manuscript.

Funding

The present research was supported by *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) (grant number APQ-0638-2.02/12), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares* (EBSERH) (grant number 403940/2021-4), and *Universidade Federal de Pernambuco* (UFPE).

References

- [1] Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, Dekkers OM, Geffner ME, Klein KO (2017) Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. *Europ J Endocrinol.* 177: G1–G70. doi:10.1530/EJE-17-0430

- [2] Jørgensen KT, Rostgaard K, Bache I, Biggar RJ, Nielsen NM, Tommerup N *et al.* (2010) Autoimmune diseases in women with Turner's syndrome. *Arthritis & Rheum.* 62: 658–66. doi:10.1002/art.27270
- [3] Aversa T, Lombardo F, Valenzise M, Messina MF, Sferlazzas C, Salzano G *et al.* (2015) Peculiarities of autoimmune thyroid diseases in children with Turner or Down syndrome: an overview. *Ital J Pediatr.* 41: 39. doi:10.1186/s13052-015-0197-4
- [4] Invernizzi P, Miozzo M, Selmi C, Persani L, Battezzati PM, Zuin M *et al.* (2005) X chromosome monosomy: a common mechanism for autoimmune diseases. *J Immunol.* 175: 575–8. doi:0.4049/jimmunol.175.1.575
- [5] Bakalov VK, Gutin L, Cheng CM, Zhou J, Sheth P, Shab K *et al.* (2012) Autoimmune disorders in women with turner syndrome and women with karyotypically normal primary ovarian insufficiency. *J Autoimmun.* 38: 315–21. doi:10.1016/j.jaut.2012.01.015
- [6] Duncan JA, Canna SW (2018) The NLRC4 inflammasome. *Immunol Rev* 281: 115–123. doi:10.1111/imr.12607
- [7] Zheng Y, Gardner SE, Clarke MCH (2011) Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 2781–2786. doi:10.1161/ATVBAHA.111.224907
- [8] Shen J, Yin Y, Mai J, Xiong X, Pansuria M, Liu J, Maley E, Saqib NU, Wang H, Yang XF (2010) Caspase-1 recognizes extended cleavage sites in its natural substrates. *Atherosclerosis* 210: 422–429. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.12.017
- [9] Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT (2014) Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. *Front Neurosci.* 8: 315. doi:10.3389/fnins.2014.00315

- [10] Walsh JG, Muruve DA, Power C (2014) Inflammasomes in the CNS. *Nature Rev Neurosci.*15: 84–97. doi:10.1038/nrn3638
- [11] De Rivero Vaccari JP, Dietrich WD, Keane RW (2014) Activation and regulation of cellular inflammasomes: gaps in our knowledge for central nervous system injury. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 34:369–375. doi:10.1038/jcbfm.2013.227..
- [12] Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of pro ILBeta. *Mol Cell.* 10: 417–26. doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
- [13] Rubartelli A (2019) Redox control of NLRP3 inflammasome activation in health and disease. *J Leukoc Biol.* 92: 951–8. <https://doi.org/10.1189/jlb.0512265>
- [14] Masters SL (2013) Specific inflammasomes in complex diseases. *Clin Immunol.* 143: 223–8. doi:10.1016/j.clim.2012.12.006
- [15] Pollard KM, Kono DH (2013) Requirements for innate immune pathways in environmentally induced autoimmunity. *BMC Med.* 11:100. doi:10.1186/1741-7015-11-100
- [16] Pontillo A, Brandao L, Guimaraes R, Segat L, Araújo J, Crovella S (2010) Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. *Autoimmunity* 43: 583–9. doi:10.3109/08916930903540432
- [17] Roberts RL, Topless RK, Phipps-Green AJ, Geary RB, Barclay ML, Merriman TR (2010) Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. *Genes Immun.* 11: 351–6. doi:10.1038/gene.2010.11
- [18] Guo H, Callaway JB, Ting JP (2015) Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med.* 21: 677–687. doi:10.1038/nm.3893

- [19] Addobbati C, Cruz HLA, Adelino JE, Ramos ALMT, Fragoso TS, Domingues A, Duarte ALBP, Oliveira RDRO, Louzada-Junior P, Donadi EA *et al.* (2017) Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. *Inflamm Res*.67: 255-264. doi:10.1007/s00011-017-1119-2
- [20] Wu XY, Li KT, Yang HX, Yang B, Lu X, Zhao LD *et al.* (2019) Complement C1q synergizes with PTX3 in promoting NLRP3 inflammasome over-activation and pyroptosis in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun.* 106: 102336. doi:10.1016/j.jaut.2019.102336
- [21] Tan W, Gu Z, Leng, J, Zou X, Chen H, Min F *et al.* (2019) Let-7f-5p ameliorates inflammation by targeting NLRP3 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Biomed Pharmacother.* 118: 109313. doi:10.1016/j.biopha.2019.109313
- [22] Zhang Y, Chen Y, Zhang Y, Li PL, Li X. (2019) Contribution of cathepsin B dependent Nlrp3 inflammasome activation to nicotine-induced endothelial barrier dysfunction. *Eur J Pharmacol.* 865: 172795. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172795
- [23] Magitta NF, Boe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM *et al.* (2009) A coding polymorphism in *NALP1* confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. *Genes Immun.* 10: 120–124. doi:10.1038/gene.2008.85
- [24] Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics* 22: 1928–9. doi:10.1093/bioinformatics/btl268
- [25] Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang AG (2009) Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. *Behav Res Methods* 41: 1149–60. doi:10.3758/BRM.41.4.1149

- [26] Yamamoto-Furusho JK, Santiago-Hernández JJ, Pérez-Hernández N, Ramírez Fuentes S, Fragoso JM, Vargas-Alarcón G (2011) Interleukin 1 β (IL-1B) and IL-1 antagonist receptor (IL-1RN) gene polymorphisms are associated with the genetic susceptibility and steroid dependence in patients with ulcerative colitis. *J Clin Gastroenterol.* 45: 531-5. doi:10.1097/MCG.0b013e3181faec51
- [27] Stefanidis I, Kreuer K, Dardiotis E, Arampatzis S, Eleftheriadis T, Hadjigeorgiou GM, Zintzaras E, Mertens PR (2014) Association between the interleukin-1 β Gene (IL1B) C-511T polymorphism and the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes: a candidate-gene association study. *DNA Cell Biol.* 33: 463-8. doi:10.1089/dna.2013.2204
- [28] Lagha A, Zidi S, Stayoussef M, Gazouani E, Kochkar R, Kochbati S, Almawi WY, Yacoubi-Loueslati B (2015) Interleukin-1 β , Interleukin1-Ra, Interleukin-10, and tumor necrosis factor- α polymorphisms in Tunisian patients with rheumatoid arthritis. *Pathol Biol (Paris)* 63:179-84. doi:10.1016/j.patbio.2015.04.004
- [29] Tripathi AK, Shukla S, Tripathi JK, Saket RD, Kol S, Mishra P, Chauhan UK, and Indurkar M (2015) Association of Genetic Polymorphism of Inflammatory Genes (IL-1 β and IL-4) with Diabetes Type 2. *J Genet Mol Cell Biol.* 1: 004. doi:10.18650/2379-5700.21001
- [30] Tayel SI, Fouda EAM, Elshayeb EI, Eldakamawy ARA, El-kousy SM (2018) Biochemical and Molecular Study on Interleukin-1 β Gene Expression and Relation of Single Nucleotide Polymorphism in Promoter region with Type 2 Diabetes Mellitus. *J Cell Biochem.* 119: 5343-5349. doi:10.1002/jcb.26667
- [31] Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TWF, Breedveld F. C., Seymour AB (2004) Correlation of Polymorphic Variation in the

- Promoter Region of the Interleukin-1_α Gene With Secretion of Interleukin-1_α Protein. *Arthritis & Rheum* 50: 1976–1983. doi:10.1002/art.20310
- [32] Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N *et al.* (2009) Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 124: 779-85.e6. doi:10.1016/j.jaci.2009.07.044
- [33] Zhang H, Wang Z, Lu X, Wang Y, Zhong J, Liu J (2014) NLRP3 gene is associated with ulcerative colitis (UC), but not Crohn's disease (CD), in Chinese Han population. *Inflamm Res*. 63: 979–985. doi:10.1007/s00011-014-0774-9
- [34] Grossi A, Crino A, Luciano R, Lombardo A, Cappa M, Fierabracci A (2013) Endocrine autoimmunity in Turner syndrome. *Ital J Pediatr*. 39: 79. doi:10.1186/1824-7288-39-79
- [35] Aversa T, Lombardo F, Corrias A, Salerno M, De Luca F, Wasniewska M (2014) In young patients with Turner or Down syndrome, Graves' disease presentation is often preceded by Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid*. 24: 744–7. doi:10.1089/thy.2013.0452
- [36] Gawlik AM, Elzbieta B, Blat D, Klekotka R, Gawlik T, Blaszczyk E, Hankus M, Malecka-Tendera E (2018) Immunological profile and predisposition to autoimmunity in girls with Turner Syndrome, *Front Endocrinol* 9: 307. doi:10.3389/fendo.2018.00307
- [37] Bianco B, Verreschi IT, Oliveira KC, Guedes AD, Galera MF, Barbosa CP, Lipay MVN (2010) PTPN22 polymorphism is related to autoimmune disease risk in patients with Turner syndrome. *Scand J Immunol*. 72: 256–259. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02438.x

- [38] Bianco B, Verreschi IT, Oliveira KC et al (2012) Analysis of vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms in Turner syndrome patients. *Gynecol Endocrinol.* 28: 326–329. doi:10.3109/09513590.2011.631630
- [39] Santos LO, Bispo AVS, Barros JV, Laranjeira RSM, Pinto, Pinto RN, Silva, JA, Duarte AR, Araújo J, Sandrin-Garcia P, Crovella, S, Bezerra MAC *et al.* (2018) CTLA-4 gene polymorphisms are associated with obesity in Turner Syndrome. *Genet Mol Biol.* 41: 727-734. doi:10.1590/1678-4685-gmb-2017-0312
- [40] Santos LO, Laranjeira R, Borborema MEBA, Sotero-Caio CG, Duarte AR, Araújo J, de Azevedo Silva J, Santos N (2019) Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and expression profile influence upon the immunological imbalance in Turner syndrome. *J Endocrinol Invest.* 43: 505-513. doi:10.1007/s40618-019-01135-1
- [41] Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK (2013) Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 62: 194-204. doi:10.2337/db12-0420.
- [42] Addobbati, C., da Cruz, H.L.A., Adelino, J. et al. (2018) Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. *Inflamm Res.* 67: 255–264. doi:10.1007/s00011-017-1119-2
- [43] Guo Q, Wu Y, Hou Y, Liu Y, Liu T, Zhang H, Fan C, Guan H, Li Y, Shan Z and Teng W (2018) Cytokine Secretion and Pyroptosis of Thyroid Follicular Cells Mediated by Enhanced NLRP3, NLRP1, NLRC4, and AIM2 Inflammasomes Are Associated With Autoimmune Thyroiditis. *Front Immunol.* 9: 1197. doi:10.3389/fimmu.2018.01197.

- [44] Zhao LR, Xing RL, Wang PM, Zhang NS, Yin SJ, Li XC and Zhang L (2018) NLRP1 and NLRP3 inflammasomes mediate LPS/ATP-induced pyroptosis in knee osteoarthritis. *Mol Med Rep.* 17: 5463-5469. doi:10.3892/mmr.2018.8520
- [45] Xu Y, Sheng H, Bao Q, Wang Y, Lu J, Ni X. (2016) NLRP3 inflammasome activation mediates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behavior and hippocampal inflammation in mice. *Brain Behav Immun.* 56: 175–86. doi:10.1016/j.bbi.2016.02.022
- [46] Cheng C, Wu H, Wang M, Wang L, Zou H, Li S, Liu R. (2019) Estrogen ameliorates allergic airway inflammation by regulating activation of NLRP3 in mice. *Biosci Rep.* 39. doi:10.1042/BSR20181117
- [47] Liu T, Ma Y, Zhang R, Zhong H, Wang L, Zhao J, Yang L, Fan X (2019) Resveratrol ameliorates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behaviors and hippocampal inflammation in mice. *Psychopharmacology* 236: 1385–1399. doi:10.1007/s00213-018-5148-5

Tables

Table 1. Genotype and allele distribution of *IL-1 β* gene polymorphism in TS and control group.

SNPs	TS n (%)	Control n (%)	Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> -value
rs16944				
Alleles	184	290		
A	84 (0.46)	176 (0.61)		
G	100 (0.54)	114 (0.39)	1.83 (1.24-2.71)	0.001*
Genotypes	92	145		
AA	22 (23.9)	55 (37.9)		
AG	40 (43.5)	66 (45.5)	1.51 (0.77-3.01)	0.2
GG	30 (32.6)	24 (16.6)	3.09 (1.41-6.92)	0.002*

TS = Turner syndrome; CI = confidence interval; $P < 0.05$ was considered statistically significant.

*Significant difference using Fisher's exact test.

Table 2. Genotype and allele distribution of *NLRP3* gene polymorphisms in TS and control group.

SNPs	TS n (%)	Control n (%)	Odds ratio (95% CI)	<i>p</i> -value
rs10754558				
Alleles	168	240		
G	104 (0.62)	148 (0.62)		
C	64 (0.38)	92 (0.38)	0.98 (0.64-1.51)	1.0
Genotypes	84	120		
GG	31 (36.9)	48 (40.0)		
GC – CC	53 (63.1)	72 (60.0)	1.13 (0.61-2.11)	0.6
rs4925659				
Alleles				
G	135 (0.75)	189 (0.65)		
A	45 (0.25)	103 (0.35)	0.61 (0.39-0.94)	0.02*
Genotypes	90	146		
GG	45 (50.0)	64 (43.8)		
GA	45 (50.0)	61 (41.8)	1.04 (0.58-1.86)	0.89
AA	0 (0)	21 (14.4)	0.00 (0.00-0.28)	7.645e-5

TS = Turner syndrome; CI = confidence interval; $P < 0.05$ was considered statistically significant.

*Significant difference using Fisher's exact test.

Table 3. Genotype and allele distribution of *IL-1 β* and *NLRP3* gene polymorphisms in TS group.

SNPs	TS case n (%)	TS control (%)	Odds ratio (95% CI)	p-value
<i>rs16944 - IL-1β</i>				
Alleles	56	128		
A	25 (0.45)	59 (0.46)		
G	31 (0.55)	69 (0.54)	1.05 (0.53-2.09)	0.8
Genotypes	28	64		
AA	06 (21.4)	16 (25.0)		
AG	13 (46.4)	27 (42.2)	0.78 (0.36-2.77)	0.7
GG	09 (32.1)	21 (32.8)	1.13 (0.36-3.59)	1.0
<i>rs10754558- NLRP3</i>				
Alleles	54	114		
G	30 (0.56)	74 (0.65)		
C	24 (0.44)	40 (0.35)	1.47 (0.72-3.01)	0.3
Genotypes	27	57		
GG	07 (25.9)	24 (42.1)		
GC	16 (59.3)	26 (45.6)	0.47 (0.14-1.49)	0.2
CC	04 (14.8)	07 (12.3)	1.07 (0.22-5.83)	1.0
<i>rs4925659 - NLRP3</i>				
Alleles	54	72		
G	45 (0.83)	36 (0.5)		
A	09 (0.17)	36 (0.5)	0.20 (0.07-0.49)	0.0001*
Genotypes	27	36		
GG	18 (66.7)	0 (0)		
GA	09 (33.3)	36 (100)	0 (0.00-0.07)	1.81e-09
AA	0 (0)	0 (0)		

TS = Turner syndrome; CI = confidence interval; P < 0.05 was considered statistically significant.

*Significant difference using Fisher's exact test.

Figure

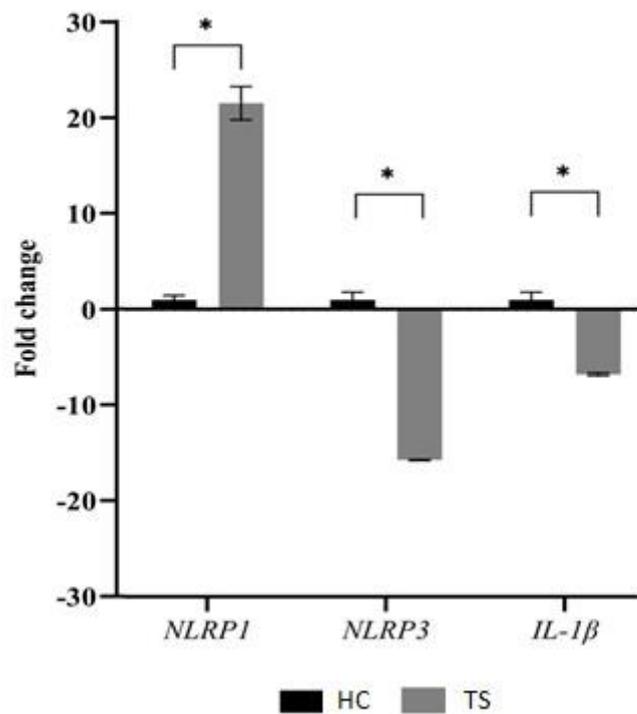


Fig 1. Expression profile of *NLRP1*, *NLRP3* and *IL-1β* in TS patients vs. healthy control group (HC).

4.2 Capítulo II

17 β -estradiol modula a expressão do inflamassoma em pacientes com síndrome de Turner

Raysa Samanta Moraes Laranjeira¹, Maria Eduarda de Albuquerque Borborema^{1,2}, Juliana Vieira Barros Arcoverde¹, Aldianne Milene dos Santos Barbosa¹, Thays Maria Costa de Lucena^{1,2}, Hanna Danielle Correa da Silva³, Jaqueline de Azevêdo Silva^{1,2}, Neide Santos¹

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

²Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

³Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

***Autor correspondente:**

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: raysa.samanta@ufpe.br (R.S.M. Laranjeira)

ID ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6343-7707>

Manuscrito será submetido ao Periódico Genetics and Molecular Biology (GMB) – Fator de Impacto (2021): 2.087; Qualis CAPES A3

Resumo

A terapia hormonal com estrogênio é recomendada em cerca de 90% das pacientes com síndrome de Turner (ST) para induzir a puberdade e desenvolvimento de características sexuais femininas. O estradiol (E2) é o estrogênio mais estudado por seus efeitos imunoregulatórios. Dessa forma, neste trabalho nós avaliamos a influência do 17β -estradiol *in vitro* no perfil de expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* do inflamassoma e sua associação com a imunoregulação em pacientes ST. O isolamento e cultura de PBMCs foi realizada em oito pacientes ST (caso) e oito mulheres saudáveis (controle - CT), em quatro etapas diferentes: (1) Cultura negativa (CN) - sem tratamento e sem estímulo; (2) Tratamento com E2 (12 hrs); (3) E2 (12hrs) + estímulo de LPS (4hrs); (4) LPS (4hrs). O ensaio de expressão gênica foi realizado a partir de sondas fluorogênicas TaqMan, através da qPCR. Ao compararmos os níveis de expressão gênica nas amostras CN, observamos uma regulação positiva de *NLRP3* (FC=9.87) e negativa de *IL-1 β* em ST (FC=-1.59) comparadas ao CT. Nas amostras tratadas com E2, houve uma redução na expressão de *NLRP3* comparado a amostra CN, mesmo permanecendo aumentada em ST (FC=2.02), enquanto uma redução de *IL-1 β* foi observada neste grupo (FC=-5.00). Uma regulação negativa de *NLRP3* (FC = -3.13) e *IL-1 β* (FC = -2.21) foi observada na amostra de pacientes ST/E2 quando comparado as amostras ST/CN. Nossos dados mostram que o 17β -estradiol pode atuar na menor ativação dos genes do inflamassoma, conseqüentemente participando do contexto imune e inflamatória das pacientes ST.

Palavras-chave: estradiol; inflamassoma; *IL-1 β* ; *NLRP3*; síndrome de Turner

Introdução

A Síndrome de Turner (ST) é a aneuploidia do cromossomo sexual mais comum no sexo feminino, caracterizada por distúrbios endócrinos e metabólicos, aumento do risco de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (Davenport, 2010; Pinske, 2012). Uma característica importante na ST é a disgenesia gonadal com insuficiência de hormônios sexuais decorrente de falência ovariana prematura, o que leva ao atraso no desenvolvimento de características sexuais secundárias e infantilismo sexual (Gravholt *et al.*, 2017).

Apesar da puberdade espontânea estar presente em algumas meninas com ST, a terapia hormonal com estrogênio ainda é recomendada em cerca de 90% das pacientes para induzir puberdade, desenvolvimento de características sexuais femininas, tamanho uterino normal e pico de massa óssea (Gawlik *et al.*, 2018; Gravholt *et al.*, 2019). Os hormônios femininos também têm forte influência na produção e funcionamento das células e moléculas do sistema imunológico (Klein *et al.*, 2016). Contudo, o mecanismo de regulação imune por hormônios esteroides ainda não é muito claro.

Entre os estrogênios, o 17β -estradiol (E2) é o hormônio esteroide mais estudado por seus efeitos regulatórios na resposta imune inata e adaptativa (Cunningham *et al.*, 2014; Stojic-Vukanic *et al.*, 2015). O papel anti-inflamatório do E2 na imunidade inata envolve a supressão de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) por monócitos e macrófagos. O estrogênio pode regular também a expressão de citocinas e quimiocinas como IL-10, IL-27, CXCL8 e CCL2 (Kramer *et al.*, 2004; Fish, 2008; Souza *et al.*, 2021).

A resposta imune durante o processo inflamatório causa a ativação transcricional de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios importantes. Os inflamassomas são uma família de receptores envolvidos na resposta imune que contém domínios de

ligação a nucleotídeos, repetições ricas em leucina (NLRs), domínios de pirina e estão relacionados à resposta ao estresse intracelular (Lamkanfi, 2011). O inflamassoma NLRP3 é um complexo multiproteico intracelular que consiste em NLRP3, ASC e procaspase 1. A ativação do inflamassoma NLRP3 pode regular a produção das citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e IL-18 (Sutterwala *et al.*, 2014; Man *et al.*, 2015).

Até o momento, ainda não está claro se as funções regulatórias imunológicas dos estrogênios desempenham papéis fisiologicamente significativos no contexto imunológico e inflamatório da ST. No presente estudo, avaliamos a influência do 17 β -estradiol *in vitro* no perfil de expressão gênica do inflamassoma *NLRP3* e *IL-1 β* em pacientes com síndrome de Turner.

Métodos

Pacientes e controles

As pacientes foram recrutadas no Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Nossa amostra de casos compreendeu oito pacientes com diagnóstico de ST, com idade média de 18.5 anos (idades variaram de 9 a 42 anos; SD \pm 10.63). Dentre o grupo caso, quatro das pacientes ST apresentaram alguma doença inflamatória crônica (DIC) (obesidade, dermatite e doença autoimune da tireoide). Para o grupo controle saudável foram recrutadas oito mulheres saudáveis com idade média de 27.65 anos (variando de 21 a 36 anos; SD \pm 10.5), sem histórico de doenças autoimunes ou inflamatórias crônicas.

Os dados clínicos de cada paciente, incluindo histórico de autoimunidade e doença inflamatória, foram obtidos dos prontuários médicos. O diagnóstico dessas condições clínicas foi testado a partir do perfil clínico e de exames laboratoriais das pacientes incluídas no estudo.

Nosso estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (nº 32478820.0.0000.5208) e da Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (nº 32478820.0.3001.8807). Todos os indivíduos (ou seus responsáveis legais) envolvidos na presente pesquisa concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e participaram do estudo de forma voluntária, sem impacto no tratamento médico.

Isolamento e cultura de células mononucleares do sangue periférico

Para o isolamento de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), 15ml de sangue venoso foram coletados de pacientes ST e controles, em tubos contendo heparina como anticoagulante. As PBMCs de pacientes ST e controles foram isoladas utilizando Histopaque - 1077 (Sigma). Uma quantidade de 5×10^6 PBMCs / poço foi cultivada em RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, Life Technology, EUA). PBMCs foram cultivadas em placas de 12 poços e em incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C.

Tratamento *in vitro* com 17 β -estradiol (E2) e estímulo de lipopolissacarídeo (LPS)

O cultivo de PMBCs para cada indivíduo foi dividido em quatro etapas de experimento: (1) Cultura negativa - sem tratamento e sem estímulo (24h); (2) Tratamento com E2 (12h); (3) Tratamento com E2 (12h) + estímulo de LPS (4h), e (4) Estímulo de LPS (4h). As células foram tratadas pelo tempo indicado com E2 (Sigma) na concentração de 100 μ M. A inflamação foi induzida por LPS (lipopolissacarídeo) em uma concentração de 50 ng/ml (Sigma) isoladamente ou em combinação com o respectivo E2.

Extração de RNA total e síntese de cDNA

PBMCs de todos os indivíduos seguiram para extração de RNA realizada pela metodologia de TriZol (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida as amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria (Nanodrop 2000c-Thermo Scientific). Para a síntese de cDNA, a concentração total de RNA foi padronizada em 500ng para cada amostra, usando o kit comercial para transcrição reversa GoScript (Promega), seguindo o protocolo padrão.

Ensaio de expressão gênica

O ensaio de expressão foi realizado utilizando sondas fluorogênicas do tipo TaqMan para os genes alvo *NLRP3* (Hs00918082_m) e *IL-1 β* (Hs01555410_m1). Quanto ao controle endógeno, o que apresentou maior estabilidade foi o gene de referência *GUSB* (β -glucuronidase) (F-CTGTCACCAAGAGCCAGTTCCT e R-GGTTGAAGTCCTTCACCAGCAG), realizado através da metodologia de SyBR Green. Todos os ensaios foram realizados em equipamento ABI7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As análises foram realizadas com base nos valores do ciclo de quantificação, enquanto os níveis de mRNA foram calculados pelo método $\Delta\Delta Cq$.

Análise estatística

Os ensaios de expressão gênica foram realizados em duplicata técnica e os resultados apresentados por média do grupo e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas no software R, versão 4.1.2. Para verificar a normalidade dos grupos foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Por fim, o teste paramétrico One-Way ANOVA foi aplicado nas análises normalizadas, e o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi aplicado

nas análises não normalizadas, considerando como estatisticamente significante $p < 0,05$ em um intervalo de confiança de 95%.

Resultados

As análises de expressão gênica relativa indicaram que na cultura celular negativa 24h, o gene *NLRP3* apresentou um aumento significativo dos níveis de mRNA em pacientes ST comparado ao grupo controle (FC = 9.87; $p = 0.002$) (Figura 1a). Em contraste, uma regulação negativa foi observada na expressão de *IL-1 β* em pacientes ST (FC = -1.59; $p = 0.711$) (Figura 1b).

Quando comparado ao grupo controle tratado com E2 (12h), os níveis de mRNA de *NLRP3* ainda permaneceram aumentados após o tratamento com E2 (12h) em ST (FC = 2.04; $p = 0.02291$). Em contrapartida, uma regulação negativa foi observada na expressão de *IL-1 β* no grupo ST comparado ao grupo controle (FC = -5.0; $p = 0.71$), após o tratamento com E2 (12h).

Com relação às culturas de PBMCs que foram tratadas com E2 + LPS (12h + 4h, respectivamente), um aumento nos níveis de mRNA de *NLRP3* (FC = 3.49; $p = 0.057$) e *IL-1 β* (FC = 1.58; $p = 0.07$) foi observado em ST comparado ao controle. Nas células que receberam apenas o estímulo com LPS (4h), um aumento na expressão de *NLRP3* (FC = 3.59; $p = 0.018$) e de *IL-1 β* foi observado (FC = 1.03; $p = 0.27$) no grupo ST.

Além disso, nós comparamos os níveis de expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* dentro do grupo de pacientes ST (Figura 2). Nesse grupo, quatro pacientes desenvolveram algum tipo de doença inflamatória crônica (DIC) e quatro não possuíam histórico de DIC. Entretanto, não foi encontrada diferença de expressão nesses grupos de análise.

Quando avaliamos a expressão gênica na amostra total de pacientes ST (n=8) após o tratamento com E2, observamos uma regulação negativa da expressão de *NLRP3* (FC = -3.13; p = 0.29) e *IL-1 β* (FC = -2.21; p = 0.96), comparado a cultura celular negativa (Figura 3A). Além disso, outro dado importante da análise no grupo ST, é que também encontramos uma expressão gênica negativa de *NLRP3* e *IL-1 β* (FC = -1.25; p = 0,76 e FC = -1.03; p = 0.42, respectivamente) quando comparamos as amostras LPS+E vs. LPS (Figura 3B).

Discussão

Neste estudo, nós demonstramos que os níveis de expressão do gene *NLRP3* estão aumentados na amostra de pacientes ST, embora uma diminuição de *IL-1 β* tenha sido observada nessas pacientes. Além disso, nossos dados mostraram que o 17 β -estradiol parece suprimir a expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* na ST.

Em mulheres no geral, as funções ovarianas tornam-se disfuncionais ou falham gradualmente quando estão na perimenopausa e, após a menopausa, o nível de estrogênio cai repentinamente (Laven, 2015). Vários estudos têm utilizado ratas ovariectomizadas, fornecendo um modelo experimental semelhante ao encontrado em mulheres na pós-menopausa, a fim de estudar os efeitos do estrogênio em condições inflamatórias crônicas (Gómez López *et al.*, 2015; Cheng *et al.*, 2018; Guan *et al.*, 2020). Com base nesses achados, também podemos hipotetizar, que este modelo experimental se assemelha ao que ocorre na ST, visto que essas pacientes apresentam o hipogonadismo, em sua maioria, necessitando de reposição hormonal com E2 para o desenvolvimento da puberdade e outras funções fisiológicas (Gawlik *et al.*, 2016).

Os inflamassomas são conhecidos por participar de respostas intracelulares a patógenos e estresse celular. Suas funções na resposta inata envolvidas na inflamação,

doenças autoimunes e distúrbios metabólicos estão sendo cada vez mais avaliadas (Gattorno e Rubartelli, 2011; Wree *et al.*, 2014).

O NLRP3 atua em um conjunto diversificado de PAMPs e DAMPs, o que pode contribuir diferencialmente para a etiopatogenia de doenças inflamatórias através da ativação do inflamassoma (Choulaki *et al.*, 2015). A ativação do inflamassoma NLRP3, que leva à liberação de citocinas pró-inflamatórias e piroptose, demonstrou estar envolvida em doenças relacionadas ao sistema imunológico, como artrite reumatoide (AR), diabetes tipo 2, aterosclerose e asma (Kim *et al.*, 2017; Grebe *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2018). Estudos demonstraram também que citocinas, como IL-1 β , estão aumentadas em ratas ovariectomizadas e mulheres pós-menopausa (Chen *et al.*, 2003; Shivers *et al.*, 2015). Mesmo após a formação do complexo inflamassoma, a expressão e tradução do gene *IL-1 β* ou ativação ineficiente da caspase-1, podem alterar a secreção da citocina IL-1 β (Sakalyte *et al.*, 2012).

No presente estudo, quando avaliamos a expressão de *NLRP3* e *IL-1 β* dentro do grupo ST, comparando o grupo de pacientes com DIC e aquelas que não desenvolveram tais condições, nós não encontramos diferenças significativas nos níveis de mRNA em todas as etapas do cultivo celular.

Estudos demonstraram que a via de sinalização do NLRP3 desempenha um papel importante durante o desenvolvimento da inflamação mediada por E2. Thakkar *et al.* (2016) mostraram que o E2 pode reduzir a ativação de NLRP3 e a produção de citocinas pró-inflamatórias no cérebro após isquemia cerebral. Cheng *et al.* (2019) também relataram que E2 inibiu acentuadamente a expressão de *NLRP3*, atenuando o processo inflamatório em tecido pulmonar. Além disso, foi demonstrado que em mulheres na pós-menopausa, a diminuição dos níveis de E2 leva à regulação positiva do perfil de expressão de NLRP3/Caspase-1/IL-1 β em uma condição de inflamação, fornecendo evidências de

que esta via do inflamassoma está envolvida na perda óssea regulada por estrogênio (Guan *et al.*, 2020).

Há pouca informação sobre o efeito do estrogênio na expressão do *NLRP3*, mas o papel dos inflamassomas na resposta a diferentes estímulos já foi descrito e sugere um efeito inibidor por meio do NF- κ B (Hsu *et al.*, 2000; Pansiot *et al.*, 2017). Além disso, foi relatado o efeito antagônico *cross-talk* entre as vias NF- κ B e ER (receptor de estrogênio), demonstrando que o ER ativado por estrogênio tem a capacidade de suprimir os sinais de NF- κ B (Chadwick *et al.*, 2005).

Nossos dados mostraram que após o tratamento com E2, os níveis de *NLRP3* ainda permaneceram aumentados em ST, entretanto quando comparado ao grupo ST (sem tratamento), uma redução nos níveis de mRNA dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* foi observada. Apesar de nossos resultados para essa análise não apresentar diferenças significantes, podemos levar em consideração a significância biológica desses dados. Uma possível explicação para que ocorra a diminuição dos níveis de *NLRP3* diante do tratamento com E2, é que o receptor de estrógeno ativo impede a ação do NF- κ B – fator de transcrição para a expressão do *NLRP3* e outros genes – sendo assim, é possível hipotetizar que ocorra uma regulação negativa do inflamassoma, corroborando com dados encontrados anteriormente acerca do papel do E2 na ativação deste complexo (Biswas *et al.*, 2005).

Nosso estudo mostrou que a expressão do inflamassoma *NLRP3* está aumentada em PBMCs de pacientes ST e o E2 parece suprimir a expressão de *NLRP3* e *IL-1 β* nessas pacientes.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos pacientes, pais e médicos pela cooperação na obtenção dos dados utilizados nesta pesquisa.

Financiamento

A presente pesquisa contou com o apoio da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) (APQ-0638-2.02/12), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH) (nº 403940/2021-4), e Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Declaração de conflito de interesse

Os autores não têm conflitos de interesse.

Referências

- Biswas DK, Singh S, Shi Q, Pardee AB, Iglehart JD (2005) Crossroads of estrogen receptor and NF-kappaB signaling. *Sci STKE*. 2005 Jun 14;2005(288):pe27.
- Chadwick S, Chippari E, Matelan L, Borges-Marcucci AM, Eckert JC, Keith LM, Albert Y, Leathurby HA, Harris, RA et al. (2005) Identification of pathway-selective estrogen receptor ligands that inhibit NF-kB transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 15;102(7):2543-8.
- Chen HY, Chen WC, Wu MC, Tsai FJ, Lin CC (2003) Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in postmenopausal women: correlation to bone mineral density and susceptibility to osteoporosis. *Maturitas*. 2003;44: 49–54.
- Cheng C, Wu H, Wang M, Wang L, Zou H, Li S, Liu R (2019) Estrogen ameliorates allergic airway inflammation by regulating activation of NLRP3 in mice. *Biosci Rep*. 2019 8;39(1): BSR20181117.
- Choulaki C, Papadaki G, Repa A, Kampouraki E, Kambas K, Ritis K, et al. (2015) Enhanced Activity of NLRP3 Inflammasome in Peripheral Blood Cells of Patients With Active Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res Ther*. 17: 257.
- Cunningham MA, Wirth JR, Naga O, Eudaly J, Gilkeson GS (2014) Estrogen receptor alpha binding to ERE is required for full Tlr7- and Tlr9-induced inflammation. *SOJ Immunol*. 2(1):07.
- Davenport M (2010) Approach to the patient with Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 95: 1487-95.
- Fish EN (2008) The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol*. 8: 737–744.
- Gattorno M and Rubartelli A (2011) Mechanisms of NLRP3 inflammasome activation in CAPS patients. In: Parnham MJ, Schmidtke A, eds. *Progress in inflammation research. The Inflammasomes*. Berlin: Springer Basel AG:183–195.

- Gawlik A, Hankus M, Such K, Drosdzol-Cop A, Madej P, Borkowska M, Zachurzok A, Malecka-Tendera E (2016) Hypogonadism and Sex Steroid Replacement Therapy in Girls with Turner Syndrome. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2016 Dec;29(6): 542-550.
- Gawlik AM, Hankus M, Szeliga K, Antosz A, Gawlik T, Soltysik K, et al. (2018) Indução tardia da puberdade por estrogênio transdérmico em meninas com síndrome de Turner - um estudo longitudinal . *Front Endocrinol (Lausanne).* 9: 23.
- Gómez López M, Domínguez López A, Abarca Rojano E, Rojas Hernández S, Martínez Godínez Mde L, Miliar García A, Campos Rodríguez R (2015) 17 β -Estradiol transcriptionally modulates Nlrp1 and Nlrp3 inflammasomes in gonadectomized rats with inflammation. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 37(4): 343-50.
- Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, Dekkers OM, Geffner ME, Klein KO (2017) Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. *Europ J Endocrinol.* 177: G1–G70.
- Gravholt CH, Viuff MH, Brun S, Stochholm K, Andersen NH (2019) Turner syndrome: mechanisms and management. *Nat Rev Endocrinol.* 15(10):601-614.
- Grebe A, Hoss F, Latz E (2018) NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. *Circul Res.* 122: 1722–40.
- Guan X, Guan Y, Shi C, Zhu X, He Y, Wei Z, Yang J, Hou (2020) Estrogen deficiency aggravates apical periodontitis by regulating NLRP3/caspase-1/IL-1 β axis. *Am J Transl Res.* 15;12(2): 660-671.
- Hsu SM, Chen YC, Jiang MC (2000) 17 Beta-estradiol inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear factor-kappa B activation by increasing nuclear factor-kappa B p105 level in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 279: 47–52.
- Kim RY, Pinkerton JW, Essilfie AT, Robertson AAB, Baines KJ, Brown AC, et al. (2017) Role for NLRP3 Inflammasome-Mediated, IL-1 β -Dependent Responses in Severe, Steroid-Resistant Asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 196: 283–97.
- Klein SL, Flanagan KL (2016) Sex differences in immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 16:, 626–638
- Kramer PR, Kramer SF and Guan G (2004) 17 β -estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum.* 50: 1967–1975.
- Lamkanfi M (2011) Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat Rev Immunol.* 11: 213–220.
- Laven JS. (2015) Genetics of early and normal menopause. *Semin Repord Med.* 33: 377–83.
- Man SM, Kanneganti TD (2015) Regulation of inflammasome activation. *Immunol Rev.* 265(1): 6–21.
- Pansiot J, Mairesse J, Baud O (2017) Protecting the developing brain by 17 β -estradiol. *Oncotarget.* 7;8(6):9011-9012.
- Pinsker, J.E. (2012). Turner Syndrome: Updating the Paradigm of Clinical Care. *J Clin Endocrinol Metab.* *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 97: E994-E1003.
- Sakalyte R, Denkovskij J, Bernotiene E, Stropuviene S, Mikulenaite SO, Kvederas G, Porvaneckas N, Tutkus V, Venalis A, Butrimiene I (2022) The Expression of Inflammasomes NLRP1 and NLRP3, Toll-Like Receptors, and Vitamin D Receptor in Synovial Fibroblasts From Patients With Different Types of Knee Arthritis. *Front Immunol.* 19;12: 767512.

- Shen HH, Yang YX, Meng X, Luo XY, Li XM, Shuai ZW, et al. (2018) NLRP3: A Promising Therapeutic Target for Autoimmune Diseases. *Autoimmun Rev.* 17: 694–702.
- Shivers KY, Amador N, Abrams L, Hunter D, Jenab S, Quinones-Jenab V (2015) Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Cytokine.* 72: 121–9.
- Souza CLSE, Barbosa CD, Coelho HILN, Santos Júnior MN, Barbosa EN, Queiroz EC, Teles MF, Dos Santos DC, Bittencourt RS et al. (2021) Effects of 17 β -Estradiol on Monocyte/Macrophage Response to *Staphylococcus aureus*: An *In Vitro* Study. *Front Cell Infect Microbiol.* 14;11: 701391.
- Stojic-Vukanic Z, Nacka-Aleksic M, Bufan B, Pilipovic I, Arsenovic-Ranin N, Djikic J, et al. (2015) 17beta-Estradiol influences in vitro response of aged rat splenic conventional dendritic cells to TLR4 and TLR7/8 agonists in an agonist specific manner. *Int Immunopharmacol.* 24(1): 24–35.
- Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL (2014) Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann N Y Acad Sci.* 1319: 82–95
- Thakkar R, Wang R, Sareddy G, Wang J, Thiruvaiyaru D, Vadlamudi R, Zhang Q, Brann D (2016) NLRP3 Inflammasome Activation in the Brain after Global Cerebral Ischemia and Regulation by 17 β -Estradiol. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:8309031.
- Wree A, McGeough MD, Pen˜a CA, et al. (2014) NLRP3 inflammasome activation is required for fibrosis development in NAFLD. *J Mol Med.* 92: 1069–1082.

Figuras

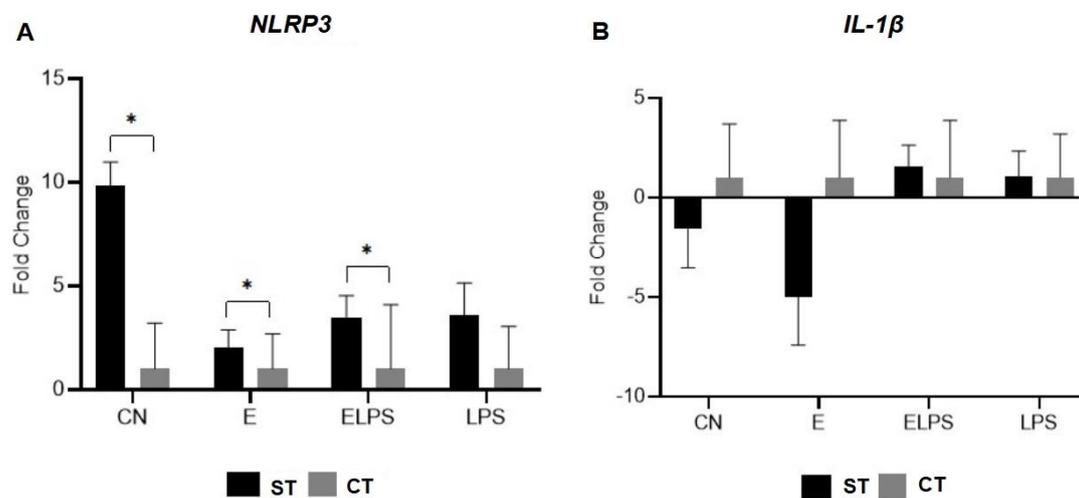


Fig 1. Perfil de expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* em pacientes ST e controle saudável (CT).

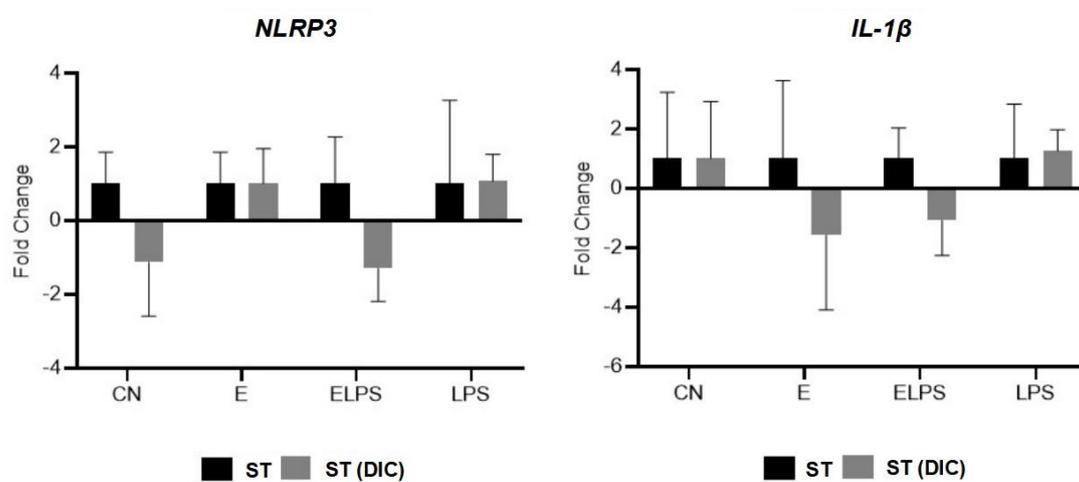


Fig 2. Perfil de expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1β* em ST sem desordens inflamatórias (DIC) versus com DIC.

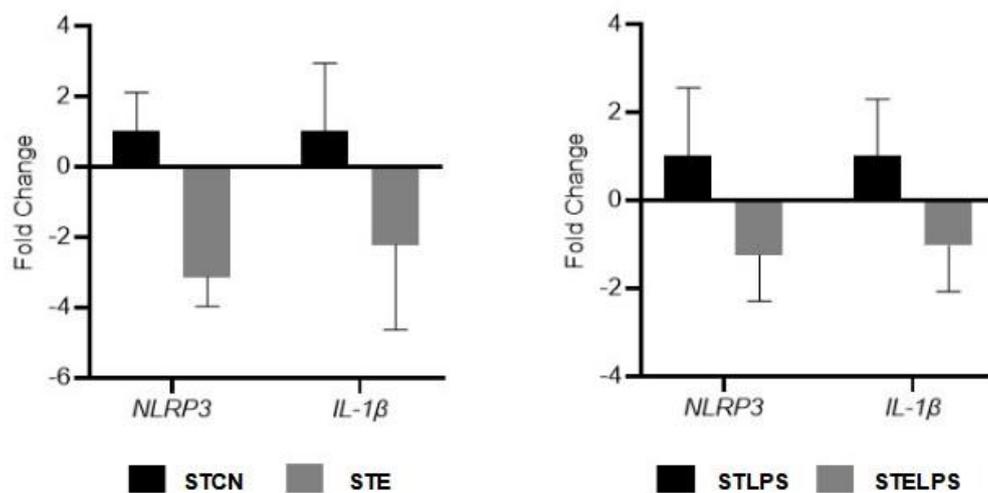


Fig 3. Perfil de expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1β* em ST de acordo com as etapas do experimento. (a) STCN vs. STE; (b) STLPS vs. STELPS.

5 Discussão geral

Uma em cada 2.500 meninas nascidas vivas é diagnosticada com síndrome de Turner (ST), causada pela ausência total ou parcial de um dos cromossomos X (LARIZZA *et al.*, 2009). A baixa estatura e disgenesia gonadal são as características clínicas mais frequentes. Há também um risco aumentado de desenvolver doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. A prevalência de autoimunidade aumenta com a idade, e mais de uma doença autoimune pode coexistir em uma paciente (MORTENSEN *et al.*, 2009; GROSSI *et al.*, 2013).

Em um estudo realizado por Wegiel *et al.* (2019) foi observado que cerca de 64% das pacientes ST eram pré-púberes no momento do diagnóstico de doenças autoimunes, onde tais condições ocorreram antes da exposição ao estradiol. A presença de autoanticorpos, mas sem sintomas clínicos, só foi detectada após a exposição hormonal. Os autores concluíram que a fraca correlação positiva entre a idade de exposição ao estradiol e a idade de diagnóstico de doenças autoimunes pode sugerir que o histórico de autoimunidade nesse grupo de pacientes ST estava relacionado ao início da função ovariana ou à terapia de reposição de hormonal.

Em nossa amostra, cerca de 36,95% das pacientes ST (média de idade de 21 anos) apresentaram algum tipo de desordem imune e inflamatória, incluindo alopecia, doenças autoimunes da tireoide, otite média crônica, dermatite, dislipidemia e obesidade. Resultados similares foram encontrados em estudos anteriores, indicando uma frequência que variava de 20-50% em pacientes com ST, dependendo da idade (JORGENSEN *et al.*, 2010; AVERSA *et al.*, 2014; GAWLIK *et al.*, 2018). Portanto, não podemos descartar o

desenvolvimento tardio dessas desordens em nossas pacientes com ST investigadas.

Além de fatores como a haploinsuficiência dos genes do cromossomo X e padrão de inativação do X, outras causas podem contribuir para a autoimunidade na ST, incluindo a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e hipogonadismo com baixa produção de estrogênios (GAWLIK *et al.*, 2013). O impacto dos estrogênios nas células do sistema imunológico e na regulação de citocinas pró-inflamatórias vem sendo investigado como fator de maior tendência ao desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias em mulheres (GÓMEZ LÓPES *et al.*, 2015; LAVEN, 2015; CHENG *et al.*, 2018; GUAN *et al.*, 2020).

Ainda que desequilíbrio imunológico e inflamatório sejam evidenciados em pacientes ST, os mecanismos genéticos associados não estão bem estabelecidos. Este é o primeiro relato que avalia o perfil do complexo inflamassoma em pacientes com ST.

Considerando a importância do perfil de ativação do inflamassoma em diversas doenças e objetivando identificar possíveis fatores genéticos relacionados ao contexto inflamatório na ST, uma possível associação entre os polimorfismos nos genes *IL-1 β* e *NLRP3* do inflamassoma e o risco de desenvolver desordens inflamatórias em pacientes ST foi realizada no presente trabalho. Adicionalmente, a avaliação do perfil de expressão dos genes *IL-1 β* , *NLRP3* e *NLRP1* em mRNA de leucócitos totais foi realizada em pacientes com ST e controles saudáveis.

Na presente análise, avaliando o polimorfismo *IL-1 β* rs16944 (A>G), diferenças significantes na distribuição do alelo G ($p=0,001$, OR=1,83, 95% CI

1,24-2,71) e genótipo GG ($p=0,002$, $OR=3,09$, 95% CI 1,41-6,92) foram observadas em pacientes com ST em comparação com o controle saudável. Apesar de estudos anteriores relatarem a associação do polimorfismo *IL-1 β* rs16944 com o risco de desenvolver uma série de desordens inflamatórias (YAMAMOTO-FURUSHO *et al.*, 2011; STEFANIDIS *et al.*, 2014; LAGHA *et al.*, 2015; TRIPATHI *et al.*, 2015; TAYEL *et al.*, 2018), em nosso estudo quando avaliamos a presença deste polimorfismo no grupo ST (caso e controle), nós não encontramos associação com a presença de desordens inflamatórias em nossa amostra ($p>0.05$).

Em relação ao *NLRP3* rs10754558 (G>C), não houve diferenças nas frequências alélicas ou genotípicas ($p=1,0$ e $p=0,6$, respectivamente) entre ST e controles, bem como no grupo ST (caso e controle) ($p>0.05$). Entretanto, diferentes estudos têm apontado uma relação desse polimorfismo genético como fator de risco a diferentes doenças (HITOMI *et al.*, 2009; PONTILLO *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2015). Em contrapartida, nós observamos diferenças na distribuição alélica e genotípica em *NLRP3* rs4925659 entre o grupo ST e controle ($p=0,02$ e $p=7,645-5$, respectivamente), bem como no grupo ST caso e controle, sugerindo um papel protetor desse polimorfismo no desenvolvimento de desordens inflamatórias nessas pacientes.

No que se refere às análises de expressão em mRNA de leucócitos totais, nós observamos que os genes *IL-1 β* e *NLRP3* são regulados negativamente no grupo ST comparado com o controle ($FC=-6.78$ e $FC=-15.73-FC$, respectivamente). Em contraste com esses dados, estudos recentes indicam que os níveis de *IL-1 β* , *NLRP3* e *NLRP1* estão aumentados em várias doenças de condição inflamatória (LEE *et al.*, 2013; ADDOBBATI *et al.*, 2018; GUO *et al.*,

2018; ZHAO *et al.*, 2018). Resultados semelhantes aos encontrados na literatura foram observados no presente estudo, uma vez que *NLRP1* foi regulado positivamente em pacientes com ST (FC=21.5).

A análise de expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* também foi realizada utilizando outro tipo celular, as PBMCs, as quais receberam tratamento com E2 e estímulo com LPS, a fim de investigarmos diferenças na expressão dos genes avaliados e o perfil de ativação do inflamassoma em pacientes ST em diferentes condições. Nossos resultados mostraram que ao compararmos o grupo ST com o controle saudável, a cultura negativa apresentou um aumento na expressão de *NLRP3* e redução de *IL-1 β* no grupo ST (FC=9.87 e FC=-1.59, respectivamente).

Adicionalmente, quando comparamos a expressão gênica nos grupos ST e controles tratados com E2 (12h) ainda foi observada uma regulação positiva de *NLRP3* (FC = 2.04), contudo uma expressão negativa de *IL-1 β* (FC = -5.0) em ST. Além disso, em culturas tratadas e com estímulo E2 + LPS (12h + 4h, respectivamente), a expressão de *NLRP3* (FC = 3.49) e *L-1 β* (FC = 1.58) permaneceram aumentadas em ST. Como esperado, as culturas que receberam apenas o estímulo de LPS (4h), *NLRP3* (FC = 3.59; p =0.018) e de *IL-1 β* (FC = 1.03; p = 0.27) apresentaram regulação positiva no grupo ST comparado ao controle.

A ativação do inflamassoma *NLRP3*, com conseqüente liberação de citocinas pró-inflamatórias como a *IL-1 β* , está envolvida em doenças relacionadas ao sistema imunológico (KIM *et al.*, 2017; GREBE *et al.*, 2018; SHEN *et al.*, 2018). Há vários relatos que demonstram a influência do estradiol na modulação do inflamassoma *NLRP3* e seu papel importante em doenças inflamatórias (THAKKAR *et al.*, 2016; CHENG *et al.*, 2019; GUAN *et al.*, 2020)

Em relação à estratificação da amostra ST em casos e controles, nós não encontramos diferenças de expressão significativas nesse grupo de análise, contudo podemos levar em consideração significância biológica. Neste grupo de análise, nós observamos uma regulação negativa da expressão de *NLRP3* (FC = -3.13; p = 0.29) e *IL-1 β* (FC = -2.21; p = 0.96) após o tratamento com E2 (12h), quando comparado a cultura celular negativa em ST casos vs, ST controle. Além disso, encontramos uma expressão gênica negativa de *NLRP3* e *IL-1 β* (FC = -1.25; p = 0,76 e FC = -1.03; p = 0.42, respectivamente) quando comparamos as amostras LPS+E vs. LPS.

Estudos sugerem que o estrogênio desempenha um efeito inibidor por meio do fator de transcrição NF- κ B, com isso modulando a expressão do *NLRP3* (HSU *et al.*, 2000; PANSIOT *et al.*, 2017). Sendo assim, essa hipótese pode explicar a regulação negativa de *NLRP3* diante do tratamento com E2 em nossa amostra com ST.

É importante salientar que no presente estudo, nós abordamos a análise de expressão gênica em tipos celulares e em diferentes condições. Levando em consideração o resultado da resposta do estrogênio no sistema imunológico, naturalmente pode ocorrer variação dependendo do nível de estrogênio, tipo de célula, estado de ativação das células, ambiente local e contexto experimental (KHAN e ANSAR AHMED, 2016).

Nesse trabalho concluímos que há uma distribuição diferencial de polimorfismos nos genes *IL-1 β* e *NLRP3* em pacientes com ST. Além disso, alterações no perfil de expressão dos genes do inflamassoma podem causar um desequilíbrio inflamatório nessas pacientes. Também sugerimos que o E2 parece desempenhar um papel na expressão dos genes *IL-1 β* e *NLRP3* na ST. Nossos

resultados podem ser relevantes para auxiliar na compreensão do papel do complexo inflamassoma e futuras estratégias terapêuticas.

6 Conclusões

1. Nossos resultados indicaram uma distribuição diferencial do polimorfismo rs16944 *IL-1 β* em pacientes ST com relação ao grupo controle. Em contraste, não foram observadas diferenças na distribuição de rs10754558 e rs4925659 *NLRP3* nos casos e controles.
2. Não foi possível associar a presença dos polimorfismos *IL-1 β* rs16944 (A>G), *NLRP3* rs10754558 (G>C) e rs4925659 (G>A) com desordens inflamatórias em pacientes ST.
3. A análise de expressão gênica em mRNA de leucócitos totais, permitiu identificar que *IL-1 β* e *NLRP3* são regulados negativamente em pacientes ST comparado com o controle. Em contrapartida, *NLRP1* está regulado positivamente em pacientes ST. Nossos dados sugerem que diferenças no perfil de expressão dos genes do inflamassoma podem causar um desequilíbrio inflamatório nessas pacientes.
4. Nossos dados sobre a análise de expressão gênica em mRNA de PMBCs mostraram que nas amostras sem tratamento com E2 e sem estímulo de LPS, a expressão do gene *NLRP3* está regulada positivamente e *IL-1 β* negativamente em pacientes ST comparado ao grupo controle. Além disso, as amostras de pacientes ST tratadas com E2 apresentaram redução na expressão destes genes, comparado ao controle. As amostras que receberam tratamento e estímulo com LPS permaneceram com regulação gênica positiva nas pacientes ST.

5. A partir da análise de expressão gênica em mRNA de PMBCs com e sem tratamento/estímulo, não foi possível encontrar diferenças de expressão dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* em pacientes ST que desenvolveram desordens inflamatórias comparadas às que não desenvolveram tais condições. Em contrapartida, o grupo ST no geral, após tratamento com E2, apresentou uma redução na expressão destes genes comparados às amostras CN. Nossos resultados sugerem que o E2 parece desempenhar um papel importante na modulação do inflamassoma na ST, auxiliando na compreensão do papel deste complexo no contexto inflamatório destas pacientes.

Referências

- Abderrazak, A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, Rouis M. NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. **Redox Biol**, 4:296-307, 2015.
- Addobbati C, Da Cruz HLA, Adelino JE, Melo TRAL, Fragoso TS, Domingues A, Branco PDAL, Oliveira RDR, *et al.* Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. **Inflamm Res**, 67(3):255-264, 2018.
- Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. **Immunity**, 42(6):991-1004, 2015.
- Ajjan RA, Weetman AP. Cytokines in thyroid autoimmunity. **Autoimmunity**, 36, 351–9, 2003.
- Aksentijevich I, Putnam CD, Remmers EF, Mueller JL, Le J, Kolodner RD, Moak Z, Chuang M, *et al.* The clinical continuum of cryopyrinopathies: novel CIAS1 mutations in North American patients and a new cryopyrin model. **Arthritis Rheum**, 56(4):1273–1285, 2007.
- Akira S, Misawa T, Saitoh T, Saitoh T. Macrophages control innate inflammation. **Diabetes Obes Metab**, 15:10–8, 2013.
- Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-Tekippe E, Taxman DJ, *et al.* The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. **Immunity**. 30, 556–565, 2009.
- Allybocus ZA, Wang C, Shihr, Wu QH. Endocrinopathies and cardiopathies in patients with Turner syndrome. **Climacteric**, 21:6, 536-541, 2018.
- Alvarez-nava F, Soto M, Lanes R, Pons H, Morales-machin A and Bracho A. Elevated second-trimester maternal serum β -human chorionic gonadotropin and amniotic fluid alpha-fetoprotein as indicators of adverse obstetric outcomes in fetal Turner syndrome. **J Obstet Gynaecol Res**, 41:1891-1898, 2015.
- Araújo C, Galera MF, Galera BB, Medeiros SF. Clinical and cytogenetic aspects of the Turner syndrome in the Brazilian Western region. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 32(8):381-5, 2010.
- Aruna B, Harmandeep KS, Gurpreet K. "Sex Hormones and Immune Dimorphism", **The Scientific World Journal**, Article ID 159150, 8 pages, 2014.
- Aversa t, Lombardo F, Valenzise M, Messina M, Sferlazzas C, Salzano G, *et al.* Peculiarities of autoimmune thyroid diseases in children with Turner or Down syndrome: an overview. **Ital J Pediatr**, 41(1):39, 2015.

Awad F, Assrawi E, Louvrier C, Jumeau C, Georgin-Lavialle S, Grateau G, Amselem S, Giurgea I, Karabina AS. Pharmacology&Therapeutics Inflammasome biology, molecular pathology and therapeutic implications. **Pharmacology and Therapeutics**,187:133– 149, 2018.

Bakalov VK, Cheng C, Zhou J, Bondy CA. X-chromosome gene dosage and the risk of diabetes in Turner syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 94(9):3289–3296, 2009.

Bakalov VK, Gutin L, Cheng CM, Zhou J, Sheth P, Shab K, *et al.* Autoimmune disorders in women with Turner syndrome and women with karyotypically normal primary ovarian insufficiency. **J Autoimmun**, 38:315–21, 2012.

Ban Y, Tozaki T, Tobe T, Ban Y, Jacobson EM, Concepcion ES, *et al.* The regulatory T cell gene FOXP3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: An association analysis in Caucasian and Japanese cohorts. **J Autoimmun**, 28:201-7, 2007.

Barrenas, M, Landin-Wilhelmsen K, & Hanson C. Ear and hearing in relation to genotype and growth in Turner syndrome. **Hearing Research**, 144, 21–28, 2000.

Barton M, Filardo EJ, Lolait SJ, Thomas P, Maggiolini M, Prossnitz ER. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: historical and personal perspectives. **J Steroid Biochem Mol Biol**,176:4–15, 2018.

Bianco B, Verreschi ITN, Oliveira KC, Guedes AD, Galera BB, Galera MF, Barbosa CP and Lipay MVN. PTPN22 polymorphism is Related to autoimmune disease risk in patients with Turner syndrome. **Scandinavian J Immunol**, 72: 256–259, 2010.

Bianco B, Verreschi IT, Oliveira KC, Guedes AD, Barbosa CP, Lipay MV. Analysis of vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms in Turner syndrome patients. **Gynecol Endocrinol**, 28:326–329, 2012.

Bianchi I, Lleo A, Gershwin ME and Invernizzi P. The X chromosome and immune associated genes. **J Autoimmun**. 38: J187-192, 2012.

Binder G, Renz A, Martinez A, Keselman A, Hesse V, Riedl SW, *et al.* SHOX haploinsufficiency and Leri-Weill dyschondrosteosis: prevalence and growth failure in relation to mutation, sex, and degree of wrist deviation. **J Clin Endocrinol Metab**, 89:4403-8, 2004.

Bispo AVS, Dos Santos LO, Burégio-Frota P, *et al.* Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype. **Genet Mol Res**, 12:4243-50, 2013.

Boini KM, Xia M, Abais JM, Li G, Pitzer AL, Gehr TW, *et al.* Activation of inflammasomes in podocyte injury of mice on the high fat diet: effects of ASC gene deletion and silencing. **Biochim. Biophys. Acta**, 1843, 836–845, 2014.

- Bondy CA. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 1, p. 10–25, 2006.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Hilary F *et al.* Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocr Rev**, 29(6):726-76, 2008.
- Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. **Hum Reprod Update**, 11(4):411–23, 2005.
- Brazzelli V, Larizza D, Martinetti M, Martinoli S, Calcaterra V, De Silvestri A, *et al.* Halo nevus, rather than vitiligo, is a typical dermatologic finding of Turner's syndrome: clinical, genetic, and immunogenetic study in 72 patients **J Am Acad Dermatol**, 51:354-358, 2004.
- Broderick L, Nardo DD, Franklin BS, Hoffman HM, Latz E. The inflammasomes and autoinflammatory syndromes. **Annu. Rev. Pathol**, 10, 395–424, 2015.
- Cameron-Pimblett A, La Rosa C, King TFJ, Davies MC, Conway GS. The Turner Syndrome Life Course Project: Karyotype–phenotype analyse across the life span. **Clinical Endocrinology**, 87, 532–538, 2017.
- Canna SW, de Jesus AA, Gouni S, Brooks SR, Marrero B, Liu Y, Di Mattia MA, Zaal KJ, Sanchez GA, Kim H, *et al.* An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. **Nat Genet**, 46(10):1140-6, 2014.
- Carlstrom M, Ekman AK, Petersson S, Soderkvist P, Enerback C. Genetic support for the role of the NLRP3 inflammasome in psoriasis susceptibility. **Exp. Dermatol**, 21: 932– 937, 2012.
- Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X linked gene expression in females. **Nature**, 434:400–4, 2005.
- Chen ML, Liao N, Zhao H, Huang J, Xie ZF. Association between the IL1B (-511), IL1B (+3954), IL1RN (VNTR) polymorphisms and Graves' disease risk: a meta analysis of 11 case-control studies. **PLoS One**, 9,e86077, 2014.
- Chen Y, Pitzer AL, Li X, Li PL, Wang L, Zhang Y. Instigation of endothelial Nlrp3 inflammasome by adipokine visfatin promotes inter-endothelial junction disruption: role of HMGB1. **J Cell Mol Med**, 19(12):2715-27, 2015.
- Cheng C, Wu H, Wang M, Wang L, Zou H, Li S, Liu R. Estrogen ameliorates allergic airway inflammation by regulating activation of NLRP3 in mice. **Biosci Rep**. 39, 2019.

Cogni G, Chiovato L. An overview of the pathogenesis of thyroid autoimmunity. **Hormones (Athens)**, 12:19, 2013.

Collett-Solberg P, Gallicchio C, Coelho S, Siqueira R, Alves S, Guimarães M. Endocrine diseases, perspectives and care in Turner syndrome. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 55:550-8, 2011.

Conforti-Andreoni C, Ricciardi-Castagnoli P, Mortellaro A. The inflammasomes in health and disease: from genetics to molecular mechanisms of autoinflammation and beyond. **Cell Mol Immunol**, 8(2):135-145, 2011.

Cunningham M, Gilkeson G. Estrogen receptors in immunity and autoimmunity. **Clin Rev Allergy Immunol**, 40:66-73, 2011.

D'Amico F, Skarmoutsou E, Marchini M, Malaponte G, Caronni M, Scorza R, Mazzarino MC. Genetic polymorphisms of FOXP3 in Italian patients with systemic sclerosis. **Immunol Lett**, 152:109-13, 2013.

Dariavach P, Mattéi MG, Golstein P, Lefranc MP. Human Ig superfamily CTLA 4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. **Eur J Immunol**, 18: 1901-1905, 1988.

Davenport M. Approach to the patient with Turner syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 95:1487-95, 2010.

Del Rey G, Jasper H, Bengolea SV, Boywitt A, De Bellis R, Heinrich JJ. Trisomy of the short stature homeobox-containing gene (SHOX) due to duplication/deletion of the X chromosome: clinical implications on the stature. **Horm Res Paediatr**, 74: 297-304, 2010.

Demirezer A, Ersoy R, Akin E, Ersoy O. Celiac disease in patient with Turner syndrome. **Turk J Gastroenterol**, 23:812-813, 2012.

Dieude P, Guedj M, Wipff J, Ruiz B, Riemekasten G, Airo P, Melchers I, Hachulla E, Cerinic MM, Diot E, Hunzelmann N, *et al.* NLRP1 influences the systemic sclerosis phenotype: a new clue for the contribution of innate immunity in systemic sclerosis-related fibrosis in galveolitis pathogenesis, **Ann. Rheum. Dis**, 70 (4)668-674, 2011.

Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunol**, 281(1):8-27, 2018.

Dogruk Kacar S, Ozuguz P, Polat S. Coexistence of psoriasis, and alopecia areata with trachyonychia in a pediatric patient with Turner Syndrome. **Arch Argent Pediatr**, 112:e209-e212, 2014.

Dragin N, Bismuth J, Cizeron-Clairac G, Biferi MG, Berthault C, Serraf A, Nottin R, Klatzmann D, Cumano A, Barkats M, Le Panse R, Berrih-Aknin S. Estrogen mediated downregulation of AIRE influences sexual dimorphism in autoimmune

diseases. **J Clin Invest**, 126(4):1525–1537, 2016.

Durusu M, Gurlek A, Simşek H, Balaban Y, Tatar G. Coincidence or causality: Celiac and Crohn diseases in a case of Turner syndrome. **Am J Med Sci**, 329: 214-216, 2005.

Edwards DP. Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. **Annual Review of Physiology**, 67, 335–376, 2005.

Edwards M, Dai R, Ahmed SA. Our environment shapes us: the importance of environment and sex differences in regulation of autoantibody production. **Front Immunol**. 9:478, 2018.

Elsheikh M, Wass JA, Conway GS. Autoimmune thyroid syndrome in women with Turner's syndrome- the association with karyotype. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 55:223–6, 2001.

Elsheikh M, Dunger DB, Conway GS and Wass JA. Turner's syndrome in adulthood. **Endocr Rev**, 23:120–40, 2002.

Fathima N, Narne P, Ishaq M. Association and gene-gene interaction analyses for polymorphic variants in CTLA-4 and FOXP3 genes: role in susceptibility to autoimmune thyroid disease. **Endocrine**, 64(3):591-604, 2019.

Feldhaus T. Organização da documentação iconográfica do serviço de Endocrinologia pediátrica do departamento de pediatria da UFPR. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Endocrinologia Pediátrica) – Hospital das Clínicas – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2016.

Feldmann J, Prieur AM, Quartier P, Berquin P, Certain S, Cortis E, Teillac-Hamel D, Fischer A, de Saint Basile G. Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes. **Am J Hum Genet**, 71(1):198–203, 2002.

Figueira, MBA. Avaliação de polimorfismos de base única (SNP) em genes do inflamassoma e componentes relacionados em pacientes com tuberculose. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, p.116, 2019.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the fork head transcription factor foxp3. **Immunity**, 22:329-341, 2005.

Froicu M, Weaver V, Wynn TA, McDowell MA, Welsh JE, Cantorna MT. A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases. **Mol Endocrinol**, 17:2386–2392, 2003.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. **Immunity**, 39(6):1003-18, 2013.

Gawlik A, Gawlik T, Januszek-Trzciakowska A, Patel H, Malecka-Tendera E. Incidence and dynamics of thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity in girls with Turner's syndrome: a long-term follow-up study. **HormRes Paediatr**, 76:314-20, 2011.

Gersen SL, Keagle MB. The Principles of Clinical Cytogenetics. Third Edition. Connecticut, USA: **Springer Science**, 175-179 p, 2013.

Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, Gelabert A, Jones J, Rubin BI, *et al.* Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. **New England J. Med**, 355:581–592, 2006.

Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, *et al.* Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. **Eur. J. Endocrinol**, 177, G1-G70, 2017.

Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, Hartmann G, *et al.* Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. **Nature**, 459, 433–436, 2009.

Grossi A, Crinò A, Luciano R, Lombardo A, Cappa M, Fierabracci A. Endocrine autoimmunity in Turner syndrome. **Ital J Pediatr**, 20;39:79, 2013.

Guan X, Guan Y, Shi C, Zhu X, He Y, Wei Z, Yang J, Hou T. Estrogen deficiency aggravates apical periodontitis by regulating NLRP3/caspase-1/IL-1 β axis. *Am J Transl Res*. 2020 Feb 15;12(2): 660-671, 2020.

Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat Med**, 21: 677-87, 2015.

Guo Z, Yu S, Chen X, Ye R, Zhu W, and Liu X. NLRP3 Is involved in ischemia/reperfusion injury. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, 15, 699–712, 2016.

Hall SK, Perregaux DG, Gabel CA, Woodworth T, Durham LK, Huizinga TW, Breedveld FC, Seymour AB. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. **Arthritis Rheum**, 50(6):1976-83, 2004.

Hitomi Y, Ebisawa M, Tomikawa M, Imai T, Komata T, Hirota T, Harada M, Sakashita M, Suzuki Y, Shimojo N, Kohno Y *et al.* Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. **J. Allergy Clin. Immunol**, 124 (779–785), e776, 2009.

Hjerrild BE, Holst JJ, Juhl CB, Christiansen JS, Schmitz O, Gravholt CH.

Delayed β - cell response and glucose intolerance in young women with Turner syndrome. **BMC Endocr. Disord**, 11, 6, 2011.

Hoffman HM, Mueller JL, Broide DH, Wanderer AA, Kolodner RD. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial coldauto inflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. **Nature Genet**, 29: 301-305, 2001.

Hook EB and Warburton D. Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. **Hum Genet**, 133:417-24, 2014.

Invernizzi P, Miozzo M, Selmi C, Persani L, Battezzati PM, Zuin M, Lucchi S, Meroni PL, Marasini B, Zeni S, Watnik M, Grati FR, Simoni G, Gershwin ME, Podda M. X chromosome monosomy: a common mechanism for autoimmune diseases. **J. Immunol**, 175, 575–578, 2005.

Janowski AM, Sutterwala FS. A typical inflammasomes. In: Di Virgilio, F, Pelegrín, eds. NLR Proteins: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology. New

Jin Y, Mailloux CM, Gowank, Riccardi SL, LaBerge G, Bennett DC, Fain PR, Spritz RA. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. **N. Engl. J. Med**, 356 (12), pp. 1216-1225, 2007.

Jo EK, Kim JK, Shin DM, Sasakawa C, Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 13, n. 2, p. 148–159, 2016.

Jorge AAL, Nishi MY, Funari MFA, Souza SC, Arnhold IJP & Mendonça BB. Baixa estatura por haploinsuficiência do gene SHOX: do diagnóstico ao tratamento. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 52(5), 765-773, 2008.

Jorgensen KT, Rostgaard K, Bache I, Biggar RJ, Nielsen NM, Tommerup N, Frisch M. Autoimmune diseases in women with Turner's syndrome. **ArthritisRheum**, 62:658–66, 2010.

Jung MP, Amaral JL, Fontes RG, Costa AT, Wuillaume SM & Cardoso MHCA. Diagnóstico da Síndrome de Turner: a experiência do Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia - Rio de Janeiro, de 1970 a 2008. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**, 10: 117-124, 2010.

Kamada AJ, Pontillo A, Guimaraes RL, Loureiro P, Crovella S, Cavalcanti Brandao LA. NLRP3 polymorphism is associated with protection against human T lymphotropic vírus 1 infection. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 109(7):960, 2014.

Kanneganti TD, Body-Malapel M, Amer A, Park J-H, Whitfield J, Franchi L, Taraporewala ZF, Miller D, Patton JT, Inohara N, *et al.* Critical role for

Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double stranded RNA. **J. Biol. Chem.** 281, 36560–36568, 2006.

Karin M, Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature* 529: 307-15, 2016.

Kassi E, Moutsatsou P. Estrogen receptor signaling and its relationship to cytokines in systemic lupus erythematosus. **J Biomed Biotechnol.** 317452, 2010.

Kastbom A, Verma D, Eriksson P, Skogh T, Wingren G, Soderkvist P. Genetic variation in proteins of the cryopyrin inflammasome influences susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. **Rheumatol. (Oxford, England)**, 47 (4) pp. 415–417, 2008.

Kastbom A, Johansson M, Verma D, Soderkvist P, Dahlqvist SR. CARD8 p.C10X polymorphism is associated with inflammatory activity in early rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis**, 69 (4):723-726, 2010.

Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, de Almeida L, Rojanasakul Y, Stehlik C. An NLRP7-containing inflammasome mediates recognition of microbial lipopeptides in human macrophages. **Immunity** 36, 464–476, 2012.

Kitamura A, Sasaki Y, Abe T, Kano H, Yasutomo K. An inherited mutation in NLRP4 causes autoinflammation in human and mice. **J Exp Med**, 17;211(12):2385-96, 2014.

Klein SL, Flanagan KL. Sex differences in immune responses. **Nat Rev Immunol**, 16:626–38, 2016.

Klein KO, Rosenfield RL, Santen RJ, Gawlik AM, Backeljauw PF, Gravholt CH, Sas TCJ, Mauras N. Estrogen replacement in Turner syndrome: literature review and practical considerations. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, 103, 1790–1803, 2018.

Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, van Bruggen R, Tschopp J. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response **J. Histochem Cytochem**, 55 (5):443-452, 2007.

Kuntsi J, Skuse D, Elgar K, Morris E, & Turner C. Ring-X chromosomes: The irrecognitive and behavioural phenotype. **Annals of Human Genetics**, 64, 295–305, 2000.

Lachmann HJ, Kone-paut I, Kuemmerle-deschner JB et al. Use of canakinumab in the cryopyrin-associated periodic syndrome. **N Engl J Med**. 360: 2416-25, 2009.

Lagha A, Zidi S, Stayoussef M, Gazouani E, Kochkar R, Kochbati S, Almawi WY, Yacoubi-Loueslati B. Interleukin-1 β , Interleukin-1-Ra, Interleukin-10, and tumor necrosis factor- α polymorphisms in Tunisian patients with rheumatoid arthritis.

Pathol Biol (Paris), 63(4-5):179-84, 2015.

Lamkanfi M. Emerging inflammasome effect or mechanisms. **Nat Rev Immunol**, 11: 213–220, 2011.

Laranjeira RSM, Santos LO, Borborema MEA, Silva RFA, Bispo AVS, Duarte AR, Araújo J, Silva JA, Santos N. Upregulation of *FOXP3* may act on immunological misbalance in Turner syndrome. **Scandinavian J Immunol**, 2022.

Larizza D, Calcaterra V, Martinetti M. Autoimmun estigmata in Turner syndrome: when lacksan X chromosome. **J Autoimmun**, 33:25–30, 2009.

Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. **Diabetes**, 62: 194-204, 2013.

Lehman B. The vitamin D3 pathway in human skin and its role for regulation of biological processes. **Photochem Photobiol**, 81: 1246–1251, 2005.

Leppig KA, Sybert VP, Ross JL, Cunniff C, Trejo T, Raskind WH & Disteché C M. Phenotype and X inactivation in 45,X/46,X,r(X) cases. **American Journal of Medical Genetics**, 128A, 276–284, 2004.

Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, Dohnalová L, Zilberman-Schapira G, Mahdi JA, *et al.* Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal Microenvironment by regulating NLRP6 inflammasome signaling. **Cell**, 163, 1428–1443, 2015.

Lewis-Wambi JS, Jordan VC. Estrogen regulation of apoptosis: how can one hormone stimulate and inhibit?. **Breast Cancer Res**, 11:206, 2009.

Li Y, Zhu J, Gao C, Peng B. Vitamin D Receptor (VDR) Genetic Polymorphisms Associated with Intervertebral Disc Degeneration. **Journal of Genetics and Genomics**, 42, 2015.

Lichiardopol C, Mot, a M, Braicu D, *et al.* Diabetes mellitus and Turner syndrome. **Rom J Intern Med**, 45:299–304, 2007.

Liu X, Bai X, Zhao J, Gao C, Du P, Zhang JA, Li. Associations between NLRP4 Gene Polymorphisms and Autoimmune Thyroid Disease. **Biomed Res Int**, 1378427, 2020.

Liu YH, Chen RH, Wu HH, Liao WL, Chen WC, Tsai Y, *et al.* Association of interleukin-1 β (IL1B) polymorphisms with graves' ophthalmopathy in Taiwan Chinese Patients. **Investig Ophthalmol Vis Sci**, 51(12):6238–46, 2010.

Magitta MA and Kanneganti T. Inflammasome activation and assembly at a glance, **Journal of Cell Science** 130, 3955-3963, 2017.

Magitta NF, Boe Wolff AS, Johansson S, Skinningsrud B, Lie BA, Myhr KM *et al.* A

coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. **Genes Immun.** 10, 120–124, 2009.

Malik A and Kanneganti TD. Inflammasome activation and assembly at a glance. **J Cell Sci**, 1;130(23):3955-3963, 2017.

Manolagas, S. C., O'Brien, C. A. & Almeida, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, 9(12), 699–712m 2013.

Marques C, Costa, RS, Costa GNO, et al. Genetic and epigenetic studies of *FOXP3* in asthma and allergy. **Asthma Res Pract**, 20;1:10, 2015.

Mariathasan, S, Weiss D, Newton K, et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. **Nature**, 440, 228–232, 2006.

Marild K, Stordal K, Hagman A, Ludvigsson JF. Turner Syndrome and Celiac Disease: A Case-Control Study. **Pediatrics**,137(2):e20152232, 2016.

Marino M, Galluzzo P & Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. **Current Genomics**, 7(8), 497–508, 2006.

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proILb. **Molecular Cell**, v. 10, p. 417– 426, 2002.

Mathur A, Hayward JA, and Man SM. Molecular mechanisms of inflammasome signaling. **J. Leukoc. Biol**,103, 233–257, 2018.

Mauvais-Jarvis F, Klein SL, Levin ER. Estradiol, Progesterone, Immunomodulation, and COVID-19 Outcomes. **Endocrinology**, 161(9):bqaa127, 2020.

Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: The good, the bad and the ugly. **Clin. Exp. Immunol**, 166, 1–15, 2011.

Minkiewicz J, Vaccari JPR, Keane RW (2013) Human astrocytes express a novel NLRP2 inflammasome. *Glia* 61, 1113–1121.

Monticielo OA, Brenol JC, Chies JA, Longo MG, Rucatti GG, Scalco R, Xavier RM. The role of Bsm1 and FokI vitamin D receptor gene polymorphisms and serum 25-hydroxyvitamin D in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, 21(1):43-52, 2012.

Mortensen KH, Cleemann L, Hjerrild BE, Nexø E, Locht H, Jeppesen EM and Gravholt CH. Increased prevalence of autoimmunity in Turner syndrome – influence of age. **Clin Exp Immunol**, 156:205–10, 2009.

Oliveira RMR, Verreschi ITN, Lipay MVN, Eça LP, Guedes AD, Bianco B. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. **Sao Paulo Med. J**, São Paulo, v. 127, n. 6, p. 373-378, 2009.

Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: current perspectives. **J Inflamm Res**. 8: 15–27, 2015.

Papp C, Beke A, Mezei G, Szigeti Z, Bán Z, Papp Z. Prenatal diagnosis of Turner syndrome: report on 69 cases. **J Ultrasound Med**, 25: 711-7, 2006.

Pastuszek-Lewandoska D, Domańska D, Rudzińska M, Bossowski A, Kucharska A, Sewerynek E, Czarnecka K, Migdalska-Sęk M, Czarnocka B. CTLA-4 polymorphisms (+49 A/G and -318 C/T) are important genetic determinants of AITD susceptibility and predisposition to high level soft thyroid autoantibodies in Polish children - preliminary study. **Acta Biochim Pol**, 60(4):641-6, 2013.

Pernis AB. Estrogen and CD4+ T cells. **Curr Opin Rheumatol**, 19:414–20, 2007.

Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. **Endocr Rev**, 23: 90-119, 2002.

Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. **Immunol Lett**. 97:107–13, 2005.

Pierdominici M, Maselli A, Colasanti T, Giammarioli AM, Delunardo F, Vacirca D, et al. Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes. **Immunol Lett**, 132:79–85, 2010.

Pontillo A, Brandao L, Guimaraes R, Segat L, Araujo J, Crovella S. Two SNPs in NLRP3 gene are involved in the predisposition to type-1 diabetes and celiac disease in a pediatric population from northeast Brazil. **Autoimmunity** 43, 583–589., 2010a.

Pontillo A, Brandao LA, Guimaraes RL, Segat L, Athanasakis E, Crovella S. A 3'UTR SNP in NLRP3 gene is associated with susceptibility to HIV-1 infection. **J Acquir Immune Defic Syndr**, 54(3):236–240, 2010b.

Pontillo A, Vendramin A, Catamo E, Fabris A, Crovella S. The missense variation Q705K in CIAS1/NALP3/NLRP3 gene and an NLRP1 haplotype are associated with celiac disease. **Am. J. Gastroenterol**, 106, 539–544, 2011.

Pontillo A, Girardelli M, Kamada AJ, Pancotto JA, Donadi EA, Crovella S, Sandrin-Garcia P. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity**, 45(4):271-8, 2012.

Prakash SK, Bondy CA, Maslen CL, Silberbach M, Lin AE, Perrone L, Milewicz DM. Autosomal and X chromosome structural variants are associated with

congenital heart defects in Turner syndrome: The NHLBI GenTAC registry. **American Journal of Medical Genetics: Part A**, 170, 3157–3164, 2016.

Rao E, Weiss B, Fukami M, Rump A, Niesler B, Mertz A, Muroya K, Binder G, Kirsch S and Winkelmann M. Pseudo autosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. **Nat genet**, 16: 54-63, 1997.

Raza HA, Sen P, Bhatti OA et al. Sex hormones, autoimmunity and gender disparity in COVID-19. **Rheumatol Int**, 41, 1375–1386, 2021.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. **Science**, 307:1625–30, 2005.

Roberts RL, Topless RK, Phipps-Green AJ, Gearry RB, Barclay ML, Merriman TR. Evidence of interaction of CARD8 rs2043211 with NALP3 rs35829419 in Crohn's disease. **Genes Immun**. 11:351–6, 2010.

Romberg N, Al Moussawi K, Nelson-Williams C, Stiegler AL, Loring E, Choi M, Overton J, Meffre E, Khokha MK, Huttner AJ, West B, Podoltsev NA, Boggon TJ, Kazmierczak BI, Lifton RP. Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and auto inflammation. **Nat Genet**, 46(10):1135-1139, 2014.

Rovet J. Turner Syndrome: Genetic and Hormonal Factors Contributing to a Specific Learning Disability Profile. **Learning Disabilities Research & Practice**, 19(3), 133–145, 2004.

Saenger P, Wikland K, Conway G, Davenport M, Gravholt C, Hintz R, et al. Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**. 86:3061–9, 2001.

Safe S, Kim K, Kim K. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. **J Mol Endocrinol**. 41:263–75, 2008.

Santos LO, Bispo AVS, Barros JV, Laranjeira RSM, Pinto RN, Silva JA, Duarte AR, Araújo J, Sandrin-Garcia P, Crovella S, Bezerra MAC, Belmont, TFM, Cavalcanti MS, & Santos N. CTLA-4 gene polymorphisms are associated with obesity in Turner Syndrome. **Genetics and Molecular Biology**, 41(4), 727-734, 2018.

Santos LO, Laranjeira R, Borborema MEBA, Sotero-Caio CG, Duarte AR, Araújo J, de Azevedo Silva J, Santos N. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and expression profile influence upon the immunological imbalance in Turner syndrome. **J Endocrinol Invest**. 43(4):505-513, 2019.

Sborgi L, Rühl S, Mulvihill E, Pipercevic J, Heilig R, Stahlberg H, Farady CJ, Müller DJ, Broz P, Hiller S. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. **EMBO J**. 35, 1766–1778, 2016.

Shi C, Yang H and Zhang Z. Involvement of Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Family Pyrin Domain Containing 3 Inflammasome in the Pathogenesis of Liver Diseases. **Front. Cell Dev. Biol.** 8:139, 2020.

Schiavo AL, Brasiello M, Sangiuliano S, Ruocco E. Pustular psoriasis in a patient with Turner syndrome: profile of serum cytokine levels. **International Journal of Dermatology**, 53, e1–e79, 2014.

Schoultz I, Verma D, Halfvarsson J, Torkvist L, Fredrikson M, Sjoqvist U, Lordal M, Tysk C, Lerm M, Soderkvist P, Soderholm JD. Combined polymorphisms in genes encoding the inflammasome components NALP3 and CARD8 confer susceptibility to Crohn's disease in Swedishmen. **Am J Gastroenterol**, 104(5):1180–1188, 2009.

Schoemaker MJ, Swerdlow AJ, Higgins CD, Wright AF, Jacobs PA. Mortality in women with turner syndrome in Great Britain: a national cohort study. **J Clin Endocrinol Metab**, 93(12):4735–4742, 2008.

Schroder K, Zhou R, Tschopp J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? **Science** 327:296–300, 2010.

Seo GH, Kang E, Cho JH, Lee BH, Choi JH, Kim GH, Seo EJ and Yoo HW . Turner syndrome presented with all stature due to overexpression of the SHOX gene. **Ann Pediatr Endocrinol Metab**, 20: 110-3, 2015.

Soares JL, Oliveira EM, Pontillo A. Variants in NLRP3 and NLRC4 inflammasome associate with susceptibility and severity of multiple sclerosis. **Mult Scler Relat Disord**. 29:26-34, 2019.

Souza de Lima D, Ogusku MM, Sadahiro A, Pontillo A, et al. Inflammasome genetics contributes to the development and control of active pulmonary tuberculosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 41, p. 240– 244, 2016.

Stanford SM, Rapini N, Bottini. Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity. **Immunology**, 137, 1–19, 2012.

Stefanidis I, Kreuer K, Dardiotis E, Arampatzis S, Eleftheriadis T, Hadjigeorgiou GM, Zintzaras E, Mertens PR. Association between the interleukin-1 β Gene (IL1B) C-511T polymorphism and the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes: a candidate-gene association study. **DNA Cell Biol**. 33(7):463-8, 2014.

Stenberg AE, Sylven L, Magnusson CG, Hultcrantz M. Immunological parameters in girls with Turner syndrome. **J Negat Results Biomed** 25(3):6, 2004.

Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocr Rev**, 28(5):521-574, 2007.

- Strowig, T, Henao-Mejia J, Elinav E, Flavell R. Inflammasomes in health and disease. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 278– 105 286, 2012.
- Sun L, Sun L, Wang Y, Zhou T, Zhao X, Wang Y, Wang G, Gang X. Glucose metabolism in Turner syndrome. **Front. Endocrinol.** 10, 49, 2019.
- Sutterwala FS, Haasken S, Cassel SL. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. **Ann N Y Acad Sci**, 1319(1):82-95, 2014.
- Swanson KV, Deng M, and Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nat. Rev. Immunol**, 19, 477–489, 2019.
- Sybert VP and Mccauley E. Turner's Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, 351:1227-1238, 2004.
- Thakkar R, Wang R, Sareddy G, Wang J, Thiruvaiyaru D, Vadlamudi R, Zhang Q, Brann D. NLRP3 Inflammasome Activation in the Brain after Global Cerebral Ischemia and Regulation by 17 β -Estradiol. **Oxid Med Cell Longev**. 2016:8309031, 2016.
- Tan W, Gu Z, Leng J, Zou X, Chen H, Min F, et al. Let-7f-5p ameliorates inflammation by targeting NLRP3 in bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Biomed.Pharmacother**. 118:109313, 2019.
- Tayel SI, Fouda EAM, Elshayeb EI, Eldakamawy ARA, El-kousy SM. Biochemical and Molecular Study on Interleukin-1 β Gene Expression and Relation of Single Nucleotide Polymorphism in Promoter region with Type 2 Diabetes Mellitus. **Journal of Cellular Biochemistry**, 119(7):5343-5349, 2018.
- Thomas PG, Dash P, Aldridge JR, Ellebedy AH, Reynolds C, Funk AJ, Martin WJ, Lamkanfi M, Webby RJ, Boyd KL, et al. The intracellular sensor NLRP3 mediates key innate and healing responses to influenza A virus via the regulation of caspase-1. **Immunity** 30, 566–575, 2009.
- Ting W-H, Chien M-N, Lo F-S, Wang C-H, Huang C-Y, Lin C-L, et al. Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study. **PLoS ONE**, 11(4): e0154394, 2016.
- Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells. **J Allergy Clin Immunol**. 120(4):744-50, 2007.
- Tripathi AK, Shukla S, Tripathi JK, Saket RD, Kol S, Mishra P, Chauhan UK, and Indurkar M. Association of Genetic Polymorphism of Inflammatory Genes (IL-1 β and IL-4) with Diabetes Type 2. **Enliven: J Genet Mol Cell Biol**. 1(1): 004, 2015.

Tu Y, Fan G, Dai Y, Zeng T, Xiao F, Chen L, Kong W. Association between rs3087243 and rs231775 polymorphism with in the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and Graves' disease: A case/control study combined with meta-analyses. **Oncotarget**, 8(66): 110614–110624, 2015.

Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, 338:143-156, 2004.

Valk E, Rudd CE, and Schneider H. CTLA-4 trafficking and surface expression **Trends Immunol**, 29: 272–279, 2008.

van de Veerdonk FL, Netea MG. New Insights in the Immuno biology of IL-1 Family Members. **Front Immunol**, 8;4:167, 2013.

van Pareren YK, de Muinck Keizer-Schrama SM, Stijnen T, et al. Final height in girls with turner syndrom eafterlong-term growth hormone treatment in three dosages and low dose estrogens. **J Clin Endocrinol Metab**, 88(3):1119-1125, 2003.

Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Nature Medicine**, 17(2):179–188, 2011.

Varghese GP, Fransén K, Hurtig-Wennlöf A, Bengtsson T, Jansson JH, Sirsjö A. Q705K variant in *NLRP3* gene confers protection against myocardial infarction in female individuals. **Biomed Rep**, 1(6):879–882, 2013.

Veldhuijzen DS, Keaser ML, Traub DS, Zhuo J, Gullapalli RP, Greenspan JD. The role of circulating sex hormones in menstrual cycle-dependent modulation of pain-related brain activation. **Pain**, 154(4):548–59, 2013.

Verma D, Bivik C, Farahani E, Synnerstad I, Fredrikson M, Enerback C, Rosdahl I, Soderkvist P. Inflammasome polymorphisms confer susceptibility to sporadic malignant melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res**, 25(4):506–513, 2012.

Vieland VJ, Huang Y, Bartlett C, Davies TF, Tomer Y. A multilocus model of the genetic architecture of autoimmune thyroid disorder, with clinical implications. **Am J Hum Genet**, 82: 1349–1356, 2008.

Villanueva-Ortega E, Ahedo B, Fonseca-Sánchez MA, Pérez-Durán J, Garibay Nieto N, Macías-Galavíz MT, Trujillo-Cabrera Y, García-Latorre E and Queipo G. Analysisof PTPN22, ZFAT and MYO9B polymorphisms in Turner Syndrome and risk of autoimmune disease. **Int J Immunogenet**, 44:153-157, 2017.

Viña J, Gambini J, García-García FJ, Rodríguez-Mañas L, Borrás C. Role of oestrogens on oxidative stress and inflammation in ageing. **Horm Mol Biol Clin Investig**, 16:65–72, 2013.

Vladimer GI, Weng D, Paquette SW, Vanaja SK, Rathinam VA, Aune MH, Conlon JE, Burbage JJ, Proulx MK, Liu Q, Reed G, Meccas JC, Iwakura Y, Bertin J,

Goguen JD, Fitzgerald KA, Lien E. The NLRP12 inflammasome recognizes *Yersinia pestis*. **Immunity** 37, 96–107, 2012.

Vundinti BR, Kerketta L, Korgaonkar S, Ghosh K, Mohanty D. Molecular Cytogenetic Evaluation of Xq Deletion Mosaicism in a Case of Primary Amenorrhea. **Int J Hum Genet.** 4(1): 75-76, 2004.

Wang XB, Zheng CY, Giscombe R and Lefvert AK. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on human peripheral T cells. **Scand J Immunol.** 54: 453-8, 2001.

Wang H, Xu P, Liao D, Ruili D, Xin H, Yujin G, Pei J. Association between NLRP1, NLRP3, and P2X7R gene polymorphisms with partial seizures. **BioMed Research International**, vol. 2017, Article ID 9547902, 6 pages, 2017.

Watabe H, Kawakami T, Kimura S, Fujimoto M, Ono T, Mizoguchi M, et al. (2006) Childhood psoriasis associated with Turner syndrome. *J Dermatol.* 33:896–8.

Wieacker P. Genetic aspects of premature ovarian failure. **J Reprod Med Endocrinol.** 6:17, 2009.

Wikiera B, Barg E, Konieczna A, Głab E, Noczyńska A et al. The prevalence of thyro-peroxidase antibodies and thyroid function in Turner's syndrome. **Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw**, 12(3):190-4, 2006.

Wolff DJ, Van Dyke DL, Powell CM. Laboratory guideline for Turner syndrome. **Genet Med**, 12:52–5, 2010.

Wu XY, Li KT, Yang HX, Yang B, Lu X, Zhao LD et al. Complement C1q synergizes with PTX3 in promoting NLRP3 inflammasome over-activation and pyroptosis in rheumatoid arthritis. **J. Autoimmun.** 106:102336, 2019.

Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **Int Immunol**, 16(11):1643-56, 2004.

Yamamoto-Furusho JK, Santiago-Hernández JJ, Pérez-Hernández N, Ramírez Fuentes S, Fragoso JM, Vargas-Alarcón G. Interleukin 1 β (IL-1B) and IL-1 antagonist receptor (IL-1RN) gene polymorphisms are associated with the genetic susceptibility and steroid dependence in patients with ulcerative colitis. **J Clin Gastroenterol.** ;45(6):531-5, 2011.

Yang J, Qin Q, Yan N, Zhu YF, Li C, Yang XJ, Wang X, Pandey M, Hou P, Zhang JA. CD40 C/T(-1) and CTLA-4 A/G(49) SNPs are associated with autoimmune thyroid diseases in the Chinese population. **Endocrine**, 41: 111–115, 2012.

Yang CA, Huang ST, Chiang BL. Association of NLRP3 and CARD8 genetic polymorphisms with juvenile idiopathic arthritis in a Taiwanese population **Scand. J. Rheumatol**, 43(2):146-152, 2014.

- Yang CA, Huang ST, Chiang BL. Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. **Rheumatol. (Oxford, England)**, 54(2):324-331, 2015.
- Young AL, Hang-RK, Jeong SL, Hae WJ, et al. CD4+FOXP3+ Regulatory T Cells Exhibit Impaired Ability to Suppress Effector T Cell Proliferation in Patients with Turner Syndrome. **PLoS ONE**, 10(12): e0144549, 2015.
- Zaaber I, Mestiri S, Hammedi H, Marmouch H, Mahjoub S, Tensaout BB, Said K. Association of Interleukin-1B and Interleukin-4 Gene Variants with Autoimmune Thyroid Diseases in Tunisian Population. **Immunol Invest**, 45(4):284-97, 2016.
- Zhang Y, Li X, Pitzer AL, Chen Y, Wang L, and Li PL. Coronary endothelial dysfunction induced by nucleotide oligomerization domain-like receptor protein with pyrin domain containing 3 inflammasome activation during hypercholesterolemia: beyond inflammation. **Antioxid. Redox. Signal**, 22, 1084–1096, 2015.
- Zhang Y, Chen Y, Zhang Y, Li PL, Li X. Contribution of cathepsin B-dependent Nlrp3 inflammasome activation to nicotine-induced endothelial barrier dysfunction. **Eur. J. Pharmacol.** 865:172795, 2019.
- Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-like receptors in human diseases. **Front Immunol**, 4:333, 2013.
- Zurawek M, Fichna M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Gryczyńska M, Fichna P, Nowak J, et al. A coding variant in NLRP1 is associated with autoimmune Addison's disease. **Hum. Immunol**, 71(5):530–53, 2010.
- Zhu L, Martinez MN, Emfinger CH, Palmisano BT, Stafford JM. Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 15;306(10):E1188-97, 2014.
- Zhu S, Ding S, Wang P, et al. Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells. **Nature**, 546, 667–670, 2017.