

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A DOENÇAS
AUTOIMUNES/INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN**

Recife
2023

JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A DOENÇAS
AUTOIMUNES/INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Profa. Dra. Neide Santos

Coorientador Profa. Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva

Recife

2023

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Arcoverde, Juliana Vieira de Barros.

Perfil de expressão de genes relacionados a doenças autoimunes/inflamatórias em indivíduos com síndrome de down. / Juliana Vieira de Barros Arcoverdes . – 2023.

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

Orientadora: Neide Santos.

Coorientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva.

.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências e anexos.

1. Autoimunidade. 2. Expressão gênica. 3. Aneuploidia. 4. Inflamação. I. Santos, Neide (Orient.). II. Silva, Jaqueline de Azevêdo (Coorient.). III. Título.

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-051

JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS A DOENÇAS
AUTOIMUNES/INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Aprovado em 20/12/2023

Banca Examinadora:

Dr. Neide Santos

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Maria Tereza Cartaxo Muniz

Universidade de Pernambuco

Dra. Camilla Albertina de Lima

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ronaldo Celerino da Silva

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco

À minha filha, Helena, com todo o amor do mundo, dedico!

Agradecimentos

A Deus, por sempre guiar meus passos e não me deixar desistir!

À minha família: meus pais, Everaldo e Luciana, que são a minha base e a quem eu devo todo o meu caráter e educação, muito obrigada por sempre acreditarem no meu sonho (até mais do que eu mesma acreditei); meus irmãos, Júnior e Fabiana, e meus cunhados, Rebeka e Raul obrigada por todo apoio, amor e cuidado; meus padrinhos, Marlene e Junior, que mesmo de longe me incentivam e torcem por mim. Eu amo muito todos vocês!

Ao meu esposo, Hugo, pelo companheirismo, paciência e amor. Obrigada por me dar o maior incentivo pra continuar e buscar sempre o melhor: nossa filha, Helena (tão pequena e nem imagina a força gigantesca que desperta em mim). Eu amo vocês!

À minha orientadora, Profa. Neide Santos, que acreditou em mim desde a iniciação científica e nunca me deixou desistir deste sonho sempre acreditando que eu poderia chegar mais longe, e aqui estou. Muito obrigada por sua amizade, confiança, ensinamentos e companheirismo! Com a senhora essa vida acadêmica fica mais leve!

À minha coorientadora, Profa. Jaqueline de Azevêdo, por aceitar nos ajudar nesse desafio da biologia molecular. Obrigada por sempre vir com mil ideias e soluções!

À minha amiga, irmã, parceira, Raysa, mesmo em outro estado sempre esteve presente tirando dúvidas de experimento, e, muitas vezes, sendo minha psicóloga. Amiga, eu te amo para além da vida profissional!

A todos os integrantes do LGCAH, especialmente Carla e Aldianne, que estiveram presentes em todas as etapas deste trabalho! À Thays e Débora, que conseguiram deixar o final turbulento dos experimentos bem mais leve!

Às pessoas com síndrome de Down, os doadores voluntários e seus responsáveis, que acreditam na ciência e não mediram esforços para que esse trabalho fosse realizado. Devo esse resultado a vocês!

A todo o corpo docente da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular por todo ensinamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

“É justo que muito custe o que muito vale”

Santa Tereza D’Ávila

RESUMO

A síndrome de Down (SD) é a doença cromossômica mais prevalente em recém-nascidos, afetando 1 em cada 700 nascidos vivos. Indivíduos com SD apresentam características clínicas clássicas como hipotonia, prega palmar única e olhos amendoados. Eles também são propensos a múltiplos desequilíbrios imunológicos denominados doença autoimune da tireoide (AITD), diabetes tipo 1 (DM1), alopecia areata, doença celíaca, artrite idiopática juvenil e vitiligo. O inflamassoma, sensor imunológico responsável por induzir respostas inflamatórias, tem participação em diversas doenças autoinflamatórias e autoimunes, porém ainda não há estudos sobre seu papel em indivíduos com SD, bem como dos genes com importante papel na manutenção da homeostase do sistema imunológico, como o *CTLA-4* e *PTPN22*. O presente estudo avaliou o perfil de expressão dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *IL-1 β* , *CTLA-4* e *PTPN22* em indivíduos com SD suscetíveis ao desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias. Além disso, avaliamos se os pacientes com SD apresentam resposta inflamatória diferencial dos genes do inflamassoma após infecção *in vitro*. Os indivíduos com SD foram oriundos do Grupo Universitário de Reabilitação Infantil (GURI) e um grupo formado por pais e responsáveis de indivíduos com SD, e o cariótipo obtido através da cultura de linfócitos. O mRNA foi extraído pela metodologia TRIZOL tanto para células do sangue periférico quanto para células monocucleares do sangue periférico (PBMCs) e o ensaio de expressão gênica foi realizado utilizando sondas fluorogênicas TaqMan, por qPCR. As culturas de PBMC foram divididas em dois grupos com e sem estímulo com lipopolissacarídeo (LPS). Foram cariotipados 68 indivíduos com SD, 60 apresentavam trissomia livre (88,2%), seis mosaicismos cromossômicos (8,8%) e dois translocações Robertsoniana (2,9%). Para o ensaio de expressão gênica, 20 indivíduos com SD e 15 indivíduos saudáveis (grupo controle) foram incluídos para análise de sangue total *ex vivo*. Os níveis de mRNA do grupo SD quando comparados ao grupo controle apresentaram regulação negativa de alteração (FC) de 1,9 vezes para *NLRP1* ($p=0,0001$) e de 1,49 vezes para *CTLA-4* ($p=0,0047$). Para os ensaios *in vitro* utilizamos PBMC para detecção de níveis de mRNA e encontramos 1,7 FC de regulação negativa de *NLRP1* ($p = 0,1879$) comparando células tratadas com estímulos de LPS versus células sem LPS. Uma comparação da expressão gênica também foi realizada entre indivíduos com SD estratificados com base na presença de hipotireoidismo e nos níveis de Proteína C reativa ultrasensível

(PCR-us), mas esta análise não mostrou diferença na expressão gênica. A expressão diferencial de *NLRP1* e *CTLA-4* em indivíduos com SD indica que pode haver alguma relação com a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias, porém mais análises são necessárias para confirmar esta relação.

Palavras-chave: autoimunidade; expressão gênica; aneuploidia; inflamação.

ABSTRACT

Down syndrome (DS) is the most prevalent chromosomal disorder in newborns, affecting 1 in every 700 live births. Individuals with DS present classic clinical features such as hypotonia, a single palmar crease and almond-shaped eyes. They are also prone to multiple immunological imbalances, including autoimmune thyroid disease (AITD), type 1 diabetes (T1D), alopecia areata, celiac disease, juvenile idiopathic arthritis and vitiligo. The inflammasome, an immunological sensor responsible for inducing inflammatory responses, is (mis)activated in several autoinflammatory and autoimmune diseases, but there are still no studies on its role in individuals with DS, as well as genes with an important role in maintaining homeostasis of the immune system, such as *CTLA-4* and *PTPN22*. The present study evaluated the expression profile of genes *NLRP1*, *NLRP3*, *IL-1 β* , *CTLA-4* and *PTPN22* in individuals with DS susceptible to the development of autoimmune/inflammatory diseases. Furthermore, we evaluated whether DS patients show a differential inflammatory response of inflammasome genes after *in vitro* infection. Individuals with DS were recruited from the Child Rehabilitation University Group (GURI) and a group formed by parents and guardians of individuals with DS, and the karyotype was obtained through lymphocyte culture. The mRNA was extracted using the TRIZOL methodology for both peripheral blood cells and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). and gene expression assays were performed using TaqMan fluorogenic probes, by qPCR. The PBMC cultures were divided into two groups with and without lipopolysaccharide (LPS) stimulation. Sixty-eight individuals with DS were karyotyped, 60 showed free trisomy (88.2%), six chromosomal mosaicism (8.8%) and two Robertsonian translocation (2.9%). For the gene expression assays, 20 individuals with DS and 15 healthy individuals (control group) were included for *ex vivo* whole blood analysis. The mRNA levels in the DS group, when compared to the control group, showed downregulation changes (FC) of 1.9 times for *NLRP1* ($p=0.0001$) and 1.49 times for *CTLA-4* ($p=0.0047$). In the *in vitro* assays using PBMC for mRNA level detection, we found 1.7 FC downregulation of *NLRP1* ($p = 0.1879$) when comparing cells treated with LPS stimuli versus cells without LPS. A comparison of gene expression was also performed between individuals with DS stratified based on the presence of hypothyroidism and ultrasensitive C-reactive Protein (hs-CRP) levels, but this analysis showed no difference in gene expression. The differential expression of *NLRP1* and *CTLA-4* in

individuals with DS indicates a potential relationship with susceptibility to the development of autoimmune/inflammatory diseases, but further analyses are needed to confirm this association.

Key words: autoimmunity; gene expression; aneuploidy; inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Figura 1 –	Alteração cromossômica na Síndrome de Down. A) Cariótipo 47,XX,+21; b) translocação Robertsoniana – rob(14;21); c) rob(21;22). Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH)/UFPE	23
Figura 2 –	Características faciais em crianças com síndrome de Down em diferentes idades. O painel superior mostra a característica fâcies plana com olhos inclinados para cima, aparência de boca aberta e língua protuberante. O painel inferior mostra a mão e os dedos curtos, clinodactilia (seta sólida), prega simiesca (ponta da seta) e abertura da sandália (seta pontilhada). Fonte: GUPTA e KABRA (2014)	24
Figura 3 –	Divisões do sistema imune. Fonte: Adaptado de TOMAR E DE (2014)	25
Figura 4 –	Representação esquemática de doenças autoimunes sistêmicas e específicas em seus órgãos atingidos. Fonte: Adaptado de WANG, WANG E GERSHWIN (2015)	27
Figura 5 –	Mecanismos de ativação dos inflamassomas por PAMPs ou DAMPs. Seguindo de piroptose e liberação de citocinas através do poro de GSDMD. Fonte: Adaptado de CORNUT, BOURDONNAY e HENRI (2020)	30
Figura 6 –	Esquema geral dos componentes do complexo inflamassoma. Fonte: Adaptado de TOMASIK e BASAK (2022)	31
Figura 7 –	Representação dos Inflamassomas NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2. Fonte: Adaptado de ZHANG <i>et al.</i> (2016)	32
Figura 8 –	Localização do gene <i>NLRP1</i> (17p13.2). Fonte: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NLRP1	32

Figura 9 –	Estrutura do inflamassoma NLRP1. Fonte: YU <i>et al.</i> (2018)	33
Figura 10 –	Localização do gene <i>NLRP3</i> (1q44). Fonte: https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NLRP3#location	33
Figura 11 –	Mecanismo simplificado da formação do inflamassoma NLRP3, dividido em dois estágios: <i>priming</i> e ativação. Fonte: TOMASIK E BASAK (2022)	34
Figura 12 –	Localização do gene da <i>IL-1β</i> (2q14.1). Fonte: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IL1B	35
Figura 13 –	Localização do gene <i>PTPN22</i> (1p13.3-p13.1). Fonte: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTPN22&keywordss=ptpn22	36
Figura 14 –	Variantes do <i>PTPN22</i> humano. Fonte: Adaptado de STANFOR e BOTTINI (2014)	37
Figura 15 –	Associações entre <i>PTPN22</i> e doenças autoimunes. Fonte: Adaptado de TIZAOUI <i>et al.</i> (2021)	38
Figura 16 –	Ativação do inflamassoma NLRP3 pelo <i>PTPN22</i> . Fonte: Adaptado de ARMITAGE, WALLET e MATHEWS (2021)	39
Figura 17 –	Localização do gene <i>CTLA-4</i> (2q33.3). Fonte: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CTLA4&keywordss=ctl4	39
Figura 18 –	Associações entre <i>CTLA-4</i> e doenças autoimunes. Fonte: Adaptado de HOSSEN <i>et al.</i> (2023)	40

ARTIGO 1 – EXPRESSION PROFILE OF INFLAMMASOME GENES IN INDIVIDUALS WITH DOWN SYNDROME

Figura 1 –	Expression profile of the <i>NLRP1</i> ($p<0,0001$), <i>NLRP3</i> ($p=0,5887$) and <i>IL1β</i> ($p=0,2248$) genes in individuals with DS versus the healthy control group (CT)	63
------------	---	----

Figura 2 –	Expression profile of <i>NLRP1</i> ($p=0,1879$), <i>NLRP3</i> ($p=0,5889$) and <i>IL1β</i> ($p=0,0775$) genes in PBMCs from individuals with DS with (LPS+) and without (LPS-) LPS stimulation	64
Figura 3 –	Expression profile of the <i>NLRP1</i> , <i>NLRP3</i> and <i>IL1β</i> genes. a) Individuals with DS with hypothyroidism versus without hypothyroidism: <i>NLRP1</i> ($p=0,7912$), <i>NLRP3</i> ($p=0,4785$) and <i>IL1β</i> ($p=0,3005$); b) Individuals with altered us-CRP versus individuals without changes in us-CRP: <i>NLRP1</i> ($p=0,8587$), <i>NLRP3</i> ($p=0,7384$) and <i>IL1β</i> ($p=0,9795$)	65

ARTIGO 2 – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES *CTLA-4* E *PTPN22* EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN

Gráfico 1 –	Correlação entre os níveis de PCR-us e TSH de 20 indivíduos com SD	75
Gráfico 2 –	Correlação entre os níveis de PCR-us e GME de 20 indivíduos com SD	75
Figura 1 –	Expressão dos genes <i>CTLA-4</i> e <i>PTPN22</i> em indivíduos com SD e controles saudáveis (CT). O asterisco (*) indica que o valor-p foi estatisticamente significativo ($p<0.05$)	76
Figura 2 –	Expressão dos genes <i>CTLA-4</i> e <i>PTPN22</i> em indivíduos com SD e hipotireoidismo vs indivíduos com SD sem hipotireoidismo	77
Figura 3 –	Expressão dos genes <i>CTLA-4</i> e <i>PTPN22</i> em indivíduos com SD e dosagem da PCR-us para alto risco vs indivíduos com SD e dosagem da PCR-us para baixo a médio risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias de fase aguda	78

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 – EXPRESSION PROFILE OF INFLAMMASOME GENES IN INDIVIDUALS WITH DOWN SYNDROME

Tabela 1 – Cytogenetic data of DS individuals	61
Tabela 2 – Serum levels of individuals with DS	62

ARTIGO 2 – PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES *CTLA-4* E *PTPN22* EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN

Tabela 1 – Caracterização citogenética dos indivíduos com SD	72
Tabela 2 – Doenças endócrinas dos indivíduos com SD	73
Tabela 3 – Níveis séricos individuais dos pacientes com SD	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
AA	Alopécia areata
AIM2	Absent in melanoma 2
AITD	Doença autoimune da tireoide
AR	Artrite Reumatoide
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
CARD	Domínio de recrutamento de caspases
CT	Controle saudável
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DC	Doença celíaca
DG	Doença de Graves
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
EM	Esclerose Múltipla
FIIND	Function-to-find domain
GME	Glicose Média Estimada
GSDM	Gasdermina D
GURI	Grupo Universitário de Reabilitação Infantil
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HC	Hipotireoidismo congênito
HE	Hipotireoidismo Evidente
HS	Hipotireoidismo Subclínico
iLIKA	Instituto Keizo Asami
<i>IL1-6</i>	Interleucina 6
<i>IL1-18</i>	Interleucina 18
<i>IL1-B</i>	Interleucina 1 beta
ISCN	Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
LGCAH	Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana
LPS	Lipopolissacarídeos

LYP	<i>lymphoid-specific phosphatase</i>
NLRC4	NLR, CARD domaincontaining 4
NLRs	Receptores do tipo NOD
NLRP1	NLR, pyrin domain containing 1
NLRP2	NLR, pyrin domain containing 2
NLRP3	NLR, pyrin domain containing 3
NLRP6	NLR, pyrin domain containing 6
NLRP7	NLR, pyrin domain containing 7
NLRP9	NLR, pyrin domain containing 9
NLRP12	NLR, pyrin domain containing 12
PAMPs	Padrões moleculares associados à patógenos
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PCR-us	Proteína C Reativa Ultrassensível
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PTPN22	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 gene
PYD	Domínio pirina
RNA	Ácido ribonucleico
SD	Síndrome de Down
SNPs	Polimorfismos de único nucleotídeo
TH	Tireoidite de Hashimoto
TSH	Hormônio Tireoestimulante
TSS	Sítio de início de transcrição
T4 Livre	Tiroxina Livre
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 OBJETIVOS.....	21
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	21
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 SÍNDROME DE DOWN.....	22
2.2 SISTEMA IMUNE E AUTOIMUNIDADE.....	24
2.2.1 IMUNIDADE NA SÍNDROME DE DOWN.....	27
2.3 INFLAMASSOMA.....	29
2.3.1 GENE <i>NLRP1</i>	32
2.3.2 GENE <i>NLRP3</i>	33
2.3.3 GENE <i>IL1-β</i>	35
2.4 GENE <i>PTPN22</i>	36
2.5 GENE <i>CTLA-4</i>	39
3 ARTIGO 1 - EXPRESSION PROFILE OF INFLAMMASOME GENES IN INDIVIDUALS WITH DOWN SYNDROME.....	42
4 ARTIGO 2 - PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES <i>CTLA-4</i> E <i>PTPN22</i> EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN.....	66
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	85
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXO A - Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos CCS-UFPE.....	93
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (para responsável legal pelo menor de 18 anos.....	98
ANEXO C – Comprovante de Submissão do manuscrito ao Periódico Genetics and Molecular Biology.....	101

1 Introdução

A síndrome de Down (SD) é a cromossomopatia mais prevalente em recém-nascidos, com uma incidência de 1 a cada 700 nascidos vivos, sendo a causa genética mais comum de deficiência intelectual e de desenvolvimento. Em 95% dos casos, resulta da falha da segregação cromossômica normal durante a meiose. O cariótipo mais prevalente é a trissomia livre (47,XX,+21 ou 47,XY,+21); 2-4% dos casos de SD é causada por mosaicismo e entre 1-3% pode ocorrer de rearranjos cromossômicos envolvendo o braço longo do cromossomo 21.

Além das características encontradas em todos os portadores de SD, há muitos fenótipos associados a essa síndrome que têm penetrância e expressividade variáveis, e esse é provavelmente o resultado complexo devido a variações genéticas e epigenéticas, fatores ambientais e eventos estocásticos. As características fenotípicas são múltiplas e heterogêneas, e compreendem principalmente deficiência intelectual, defeitos de crescimento e distúrbios endócrinos. Além disso, os indivíduos com SD são caracterizados por uma aceleração do processo de envelhecimento, afetando particularmente o sistema nervoso central e imunológico.

Indivíduos com SD apresentam maiores taxas de disfunção tireoidiana. As anormalidades incluem hipotireoidismo subclínico (HS) (também conhecido como hipertireotropinemia), hipotireoidismo congênito (HC) e doença autoimune da tireoide (AITD), como a tireoidite de Hashimoto (TH) e a doença de Graves (DG). Além da AITD, os indivíduos com SD apresentam um risco geral aumentado de outras doenças autoimunes como a doença celíaca, que apresenta uma prevalência de 20 a 200 vezes maior do que na população em geral, e o vitiligo que aumenta cerca de 0,38% a 2,9%. Além disso, há um risco aumentado de desenvolver diabetes mellitus tipo 1 (DM1), em idades jovens, quando comparados com indivíduos não portadores da SD.

A disfunção do sistema imunológico na SD tem sido atribuída à diminuição do número de linfócitos B, modificações nos subconjuntos de células T, bem como alterações nos níveis de citocinas anti- e pró-inflamatórias. O antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (*CTLA-4*) é uma proteína coestimuladora negativa expressa na superfície de células T ativadas e reguladoras. Mutações no *CTLA-4* em humanos pode levar ao desenvolvimento de doenças autoimunes, destacando a importância do *CTLA-4* como um regulador das respostas imunológicas aos nossos próprios tecidos.

O gene da proteína tirosina fosfatase não receptor 22 (*PTPN22*) é um importante regulador negativo da transdução de sinal através dos receptores de células T. Vários polimorfismos do gene *PTPN22*, que causam aumento da inibição da sinalização do receptor de células T, têm sido associados à susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças autoimunes. Pesquisas buscando determinar se polimorfismos dentro dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* da resposta imune conferem suscetibilidade diferencial a condições clínicas na SD ainda são ausentes.

Os receptores de oligomerização de nucleotídeos com domínios ricos em leucina (NLR) são responsáveis pelo reconhecimento de sequências específicas presentes em micro-organismos e estruturas endógenas e exógenas associados à patogênese. Os NLRs fazem parte de um complexo proteico, o inflamassoma, controlando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como: interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-18 (IL-18) que modulam os efeitos biológicos associados à infecção, inflamação e processos autoimunes regulando, sobretudo, a resposta inflamatória. Os receptores NLRP1 e NLRP3 pertencentes à família NLR vem sendo apontados como principais integrantes do inflamassoma. Ambos interagem com proteínas pró-Caspases 1, como a ASC, que ativam o recrutamento das proteínas caspases estimulando o processamento das citosinas pró-inflamatórias.

Apesar do risco aumentado de desenvolvimento de doenças inflamatórias, infecciosas e autoimunes em indivíduos SD, o mecanismo subjacente relacionado ao desenvolvimento dessas condições clínicas ainda não está bem compreendido. A partir da análise de expressão dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *IL-1 β* , *CTLA-4* e *PTPN22* será possível um melhor entendimento do papel desempenhado na susceptibilidade ao desenvolvimento dessas condições clínicas. Diante desse quadro, a definição de futuras estratégias terapêuticas em busca de tratamentos mais eficazes poderá ser traçada.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Analisar e comparar o perfil de expressão dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *IL-1 β* , *PTPN22* e *CTLA-4* em indivíduos com SD.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os níveis de expressão dos genes do inflamassoma - *NLRP1*, *NLRP3* e *IL-1 β* em indivíduos SD e controles;
2. Avaliar os níveis de expressão dos genes do inflamassoma - *NLRP1*, *NLRP3* e *IL-1 β* - em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos SD com e sem estímulo de lipopolissacarídeo (LPS);
3. Avaliar os níveis de expressão dos genes *PTPN22* e *CTLA-4* em indivíduos SD e controles.

2 REVISÃO DA LITERATURA

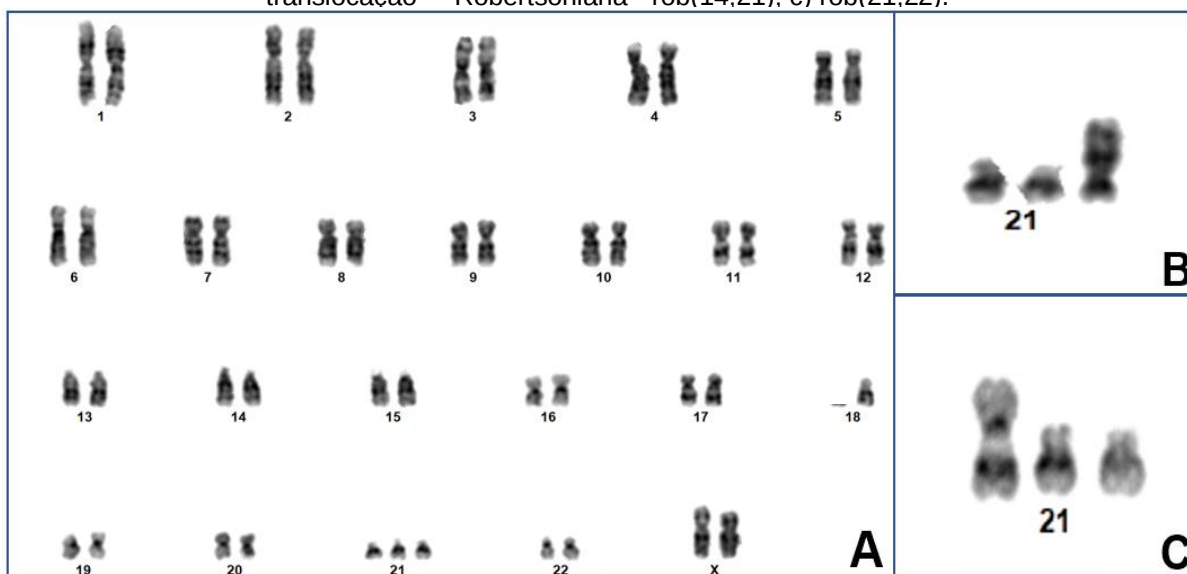
2.1 SÍNDROME DE DOWN

A síndrome de Down (SD) ou trissomia 21 (OMIM #190685, Online Mendelian Inheritance in Man, um Catálogo Online de Genes Humanos e Distúrbios Genéticos) é uma síndrome genética resultante da presença e da expressão de três cópias de genes localizados no cromossomo 21, sendo a aneuploidia cromossômica viável mais frequente em humanos. A SD foi caracterizada pela primeira vez em 1866 por John Langdon Down, que descreveu “indivíduos com manifestações clínicas peculiares” e, em 1958, Jérôme Lejeune e Pat Jacobs afirmaram que a SD é uma síndrome genética relacionada a trissomia do cromossomo 21 (DIEUDONNE *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2021).

No Brasil, a síndrome de Down (SD) ocorre em 1 a cada 700 nascimentos, ocorrendo igualmente em todas as raças e grupos étnicos. Há uma diferença substancial de prevalência de SD ao nascimento entre países desenvolvidos e em desenvolvimento e, mesmo entre os países desenvolvidos, a prevalência de natalidade varia dependendo da idade materna média e da prática de diagnóstico pré-natal de SD, e interrupção de gestações afetadas (YAQOOB *et al.*, 2019; BERMUDEZ *et al.*, 2021).

A trissomia 21 ocorre por uma não disjunção meiótica, resultando em 95% dos casos em um cariótipo com a presença de 47 cromossomos (+21 - trissomia livre) (Figura 1a); por uma não disjunção mitótica, resultando em mosaicismos cromossômicos, observado em 2 a 4% dos casos, o qual representa uma condição na qual um indivíduo tem duas ou mais linhagens de células geneticamente distintas que se originaram de um único zigoto; por translocação Robertsoniana envolvendo o cromossomo 21 com um outro cromossomo acrocêntrico, sendo observado em 1 a 3% dos casos (Figura 1b-c); ou ainda por rearranjos cromossômicos envolvendo o braço longo do cromossomo 21 (dita como a região crítica da SD e chamada de trissomia parcial). A análise citogenética tem um papel importante não só na confirmação do diagnóstico, mas também na previsão do risco de recorrência e no futuro aconselhamento genético (NARAYANAN *et al.*, 2013; PAPAVALASSIOU *et al.*, 2014; BULL, 2020).

Figura 1. Alteração cromossômica na Síndrome de Down. a) Cariótipo 47,XX,+21; b) translocação Robertsoniana - rob(14;21); c) rob(21;22).



Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH) /UFPE.

As características fenotípicas mais comuns na SD são hipotonia, cabeça braquicefálica pequena, ponte nasal plana, fissuras palpebrais inclinadas para cima, boca pequena, orelhas pequenas, excesso de pele na nuca, prega palmar transversa única e quinto dedo curto com clinodactilia e espaçamento amplo, muitas vezes com sulco plantar profundo entre os primeiro e segundo dedos (Figura 2), além de apresentar deficiência intelectual e distúrbios endócrinos (FRANCESCHI *et al.*, 2019; BULL, 2020).

Além das características encontradas na maioria dos indivíduos com SD (Figura 2), há muitos fenótipos associados a essa síndrome que têm penetrância e gravidade variáveis, e esse é provavelmente o resultado complexo devido a variações genéticas e epigenéticas, fatores ambientais e eventos estocásticos (CIPRIANE *et al.*, 2018). Além disso, os indivíduos com SD são caracterizados por uma aceleração do processo de envelhecimento, afetando particularmente o sistema nervoso central e imunológico (CICCARONE *et al.*, 2017; FRANCESCHI *et al.*, 2019).

Dada a forte correlação entre a idade materna avançada na concepção e o aumento do risco de ter um filho com SD, acreditava-se que a não disjunção do cromossomo 21 poderia ser o resultado do acúmulo de erros relacionados à idade, o que tornava a maquinaria meiótica feminina menos eficiente e mais propensa a erros. No entanto, apesar das evidências de que a idade materna avançada na concepção é o principal fator de risco para a trissomia 21, pouco se sabe sobre os mecanismos

moleculares responsáveis pela não disjunção do cromossomo 21 (MIGLIORI *et al.*, 2009).

Figura 2. Características faciais em crianças com síndrome de Down em diferentes idades. O painel superior mostra a característica fácies plana com olhos inclinados para cima, aparência de boca aberta e língua protuberante. O painel inferior mostra a mão e os dedos curtos, clinodactilia (seta sólida), prega simiesca (ponta da seta) e abertura da sandália (seta pontilhada).



Fonte: GUPTA e KABRA (2014).

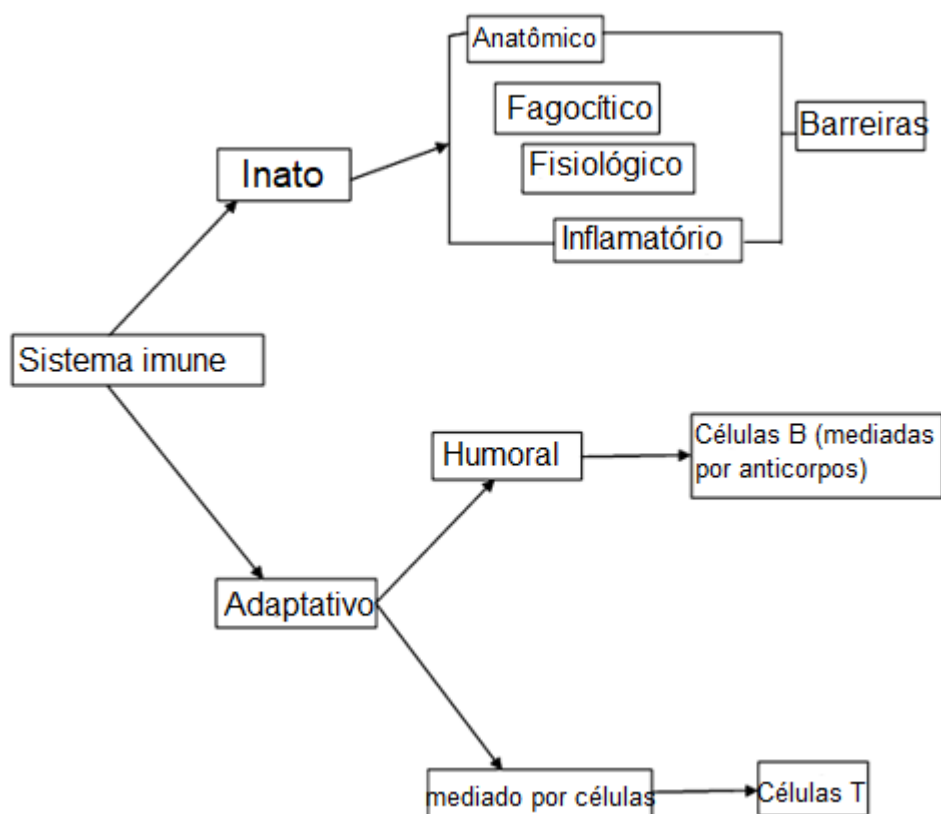
Devido aos avanços médicos e à melhoria dos tratamentos cirúrgicos para cardiopatias congênitas, a expectativa de vida dos pacientes com SD aumentou consideravelmente nas últimas décadas, de modo que agora ultrapassa os 60 anos (DIEUDONNE *et al.*, 2020). Embora o tratamento para doenças cardíacas congênitas tenha diminuído a mortalidade e a morbidade, as complicações relacionadas a doenças imunomediadas continuam a limitar a expectativa de vida em pacientes com SD, aumentando as taxas de infecções, malignidades hematológicas e autoimunidade (FERRARI e STAGI, 2021).

2.2 SISTEMA IMUNE E AUTOIMUNIDADE

O termo “imunidade” originou-se do termo latino “*immunis*”, que significa “isento”, ou seja, o estado de proteção contra doenças infecciosas, sendo importante para a reprodução, desenvolvimento e homeostase. O reconhecimento, comunicação e a resposta são as principais atividades do sistema imunológico: após o reconhecimento de um organismo estranho, ele monta uma resposta efetora através do recrutamento de uma variedade de células e moléculas para eliminar o organismo invasor (TOMAR E DE, 2014; SATTLE, 2017). Este sistema está dividido em dois

tipos gerais de respostas imunológicas: imunidade inata e imunidade adaptativa (Figura 3).

Figura 3. Divisões do sistema imune.



Fonte: Adaptado de TOMAR E DE (2014).

O sistema inato representa a primeira linha de defesa contra um patógeno invasor, sua resposta é rápida e incapaz de memorizar. É composto por quatro tipos de barreiras defensivas – anatômicas (pele, membranas e mucosas), fisiológicas (por exemplo, temperatura, pH baixo), fagocíticas (monócitos sanguíneos, neutrófilos, macrófagos teciduais) e inflamatórias (proteínas séricas). Dessa forma, as células do sistema imunológico inato compreendem: fagócitos, neutrófilos, macrófagos, células natural killer, mastócitos, basófilos, células dendríticas, eosinófilos (TOMAR E DE, 2014).

O sistema imunológico adaptativo é ativado pela imunidade inata. Os componentes do sistema imunológico adaptativo possuem dinâmica temporal mais lenta, com alto grau de especificidade e uma resposta secundária mais potente. O

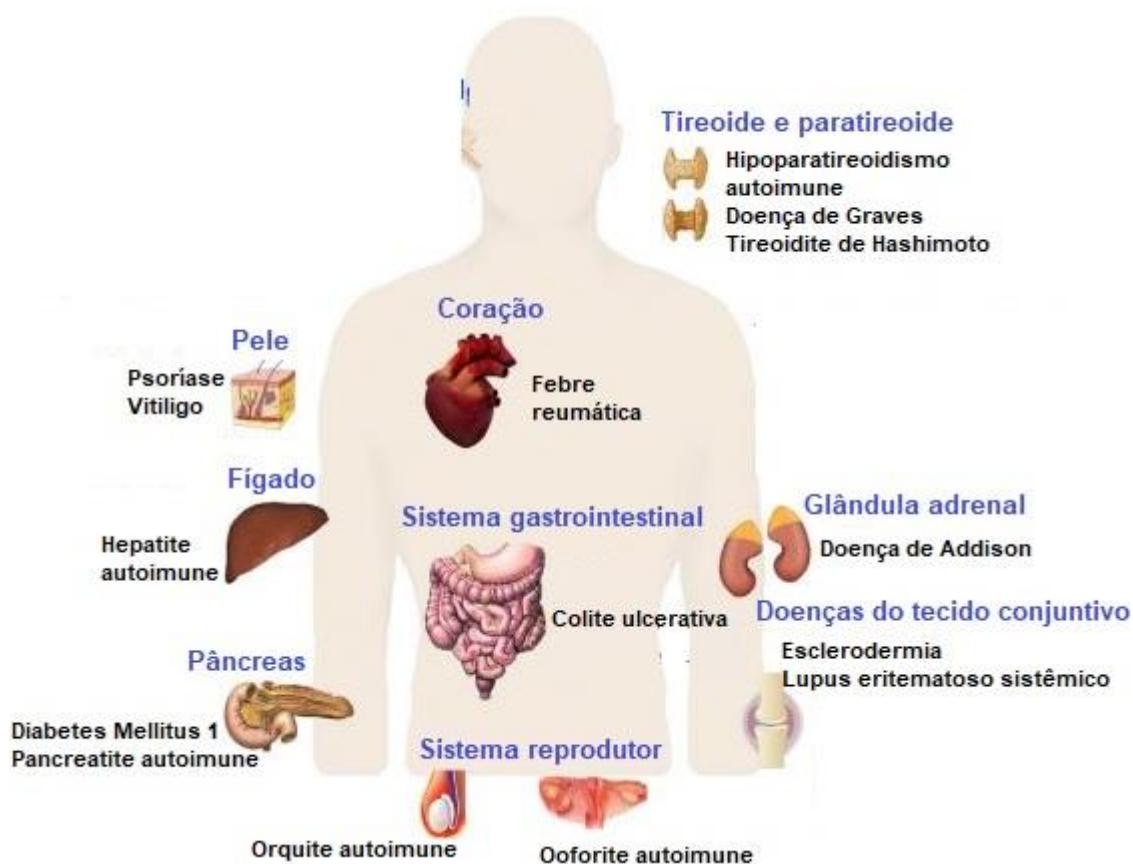
sistema imune adaptativo incorpora frequentemente células e moléculas do sistema inato na sua luta contra corpos estranhos nocivos. Embora o sistema imunológico seja notavelmente específico e adaptativo, pode levar ao desenvolvimento de autoimunidade (TOMAR E DE, 2014).

A doença autoimune resulta de uma resposta imune mal direcionada devido a uma falha do sistema imunológico de um organismo em reconhecer suas células e tecidos como seus. Uma doença autoimune refere-se à condição de ativação de uma resposta imunológica anormal em nosso corpo, causando danos aos tecidos ou órgãos por meio de inflamação contínua, indo desde doenças específicas de órgãos, nas quais anticorpos e células T reagem a antígenos próprios localizados em um tecido específico, até doenças sistêmicas ou não específicas de órgãos caracterizadas por reatividade contra antígenos espalhados por vários tecidos (Figura 4). A causa das doenças autoimunes não é bem compreendida e os médicos sugerem que tanto os fatores ambientais como os genéticos, bem como outros fatores, como a infecção, são responsáveis pelas doenças (VANG ET AL., 2007; WANG, WANG E GERSHWIN, 2015; TIZAOUI ET AL., 2022).

As doenças autoimunes afetam entre 5% a 8% da população mundial. (YE, GILLESPIE E RODRIGUEZ, 2018). Um sistema imunológico regulado é importante para detectar e eliminar rapidamente patógenos causadores de doenças e gerar memória imunológica. Ao mesmo tempo, as células imunitárias precisam ser capazes de reconhecer as células do próprio corpo e distingui-las de invasores externos. Mesmo pequenas desregulações podem fazer com que o sistema imunológico ataque órgãos e tecidos do corpo por engano (SHUMANSKA E BOGESKI, 2022).

Inicialmente, os sintomas dos distúrbios autoimunes são vagos e incluem fadiga, febre baixa, dores musculares e articulares e mal-estar. Geralmente progridem e tornam-se debilitantes com morbidade significativa. Os pacientes muitas vezes são atendidos pelos médicos somente depois que o processo da doença se torna sintomático, obscurecendo a compreensão dos eventos iniciais que levam à doença (CAMPBELL, 2014).

Figura 4. Representação esquemática de doenças autoimunes sistêmicas e específicas em seus órgãos atingidos.



Fonte: Adaptado de WANG, WANG E GERSHWIN (2015).

Muitas doenças autoimunes são caracterizadas pela destruição tecidual mediada diretamente pelas células T. Por exemplo, na artrite reumatóide, as células T autorreativas atacam o tecido das articulações, causando uma resposta inflamatória que resulta em inchaço e destruição do tecido. Na tireoidite de Hashimoto, os autoanticorpos reativos com antígenos específicos do tecido, como a peroxidase tireoidiana e a tireoglobulina, causam destruição grave do tecido. Outros exemplos incluem diabetes mellitus dependente de insulina e esclerose múltipla (TOMAR E DE, 2014).

2.2.1 IMUNIDADE NA SÍNDROME DE DOWN

A síndrome de Down está bem estabelecida por estar associada a múltiplas alterações imunológicas. Condições autoimunes, incluindo Tireoidite de Hashimoto (TH), diabetes tipo 1 (DM1), alopecia aerata (AA), doença celíaca (DC), artrite

idiopática juvenil (AIJ) e vitiligo ocorrem em números desproporcionais entre pessoas com SD em comparação com coortes pareadas por idade (BULL, 2020).

A doença autoimune da tireoide (AITD) é o distúrbio autoimune mais frequente que coexiste com a SD e resulta da complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e endógenos que levam à perda de autotolerância aos antígenos da tireoide (KYRITSI e KANAKA-GANTENBEIN, 2020). A maioria dos pacientes apresenta bócio eutireoidiano ou bócio com hipotireoidismo leve e, às vezes, a criança apresenta hipotireoidismo com retardo de crescimento. Algumas crianças apresentam sintomas clínicos sugestivos de hipertireoidismo, como nervosismo, irritabilidade, aumento da sudorese ou hiperatividade. A glândula tireoide geralmente está difusamente aumentada e firme com acentuação da arquitetura lobular normal. Geralmente, a glândula sofre atrofia progressiva e o indivíduo adquire hipotireoidismo (CHISTIAKOV, 2007; BULL, 2020).

O hipotireoidismo compensado, também conhecido como hipotireoidismo subclínico, é um tipo específico de disfunção tireoidiana observada com maior frequência na população com SD, variando entre 12,5% a 32,9%. Na maioria dos casos, o hipotireoidismo compensado é assintomático e é detectado em exames laboratoriais para rastrear as funções da tireoide, e sua detecção precoce evita uma carga adicional de deficiência intelectual nos indivíduos SD (YAQOOB *et al.*, 2019; NARAYANAN *et al.*, 2013).

Devido à desregulação imunológica, o início precoce de DM1 em indivíduos com SD pode sugerir uma patologia autoimune muito evidente em comparação com indivíduos com DM1 não-SD. A população de células β em indivíduos SD é mais suscetível à destruição mediada por células imunes. Isso sugere que o subgrupo de SD +21 livre com DM1 tem um risco maior de doença autoimune agressiva. O diagnóstico de doenças autoimunes que acompanham a SD pode ser complicado por mascarar os efeitos das características subjacentes da síndrome, como déficit de crescimento e puberdade atrasada (CHISTIAKOV, 2007; VERSTEGEN e KUSTERS, 2020).

A obesidade, ocorrendo em 25% das crianças e pelo menos 50% de adultos com SD, complica muitos problemas na SD, incluindo apnéia obstrutiva do sono, diabetes e condições cardiopulmonares (BULL, 2020).

A doença celíaca, um distúrbio gastrointestinal imunomediado caracterizado por inflamação do intestino delgado após exposição a glúten, cevada e centeio, tem

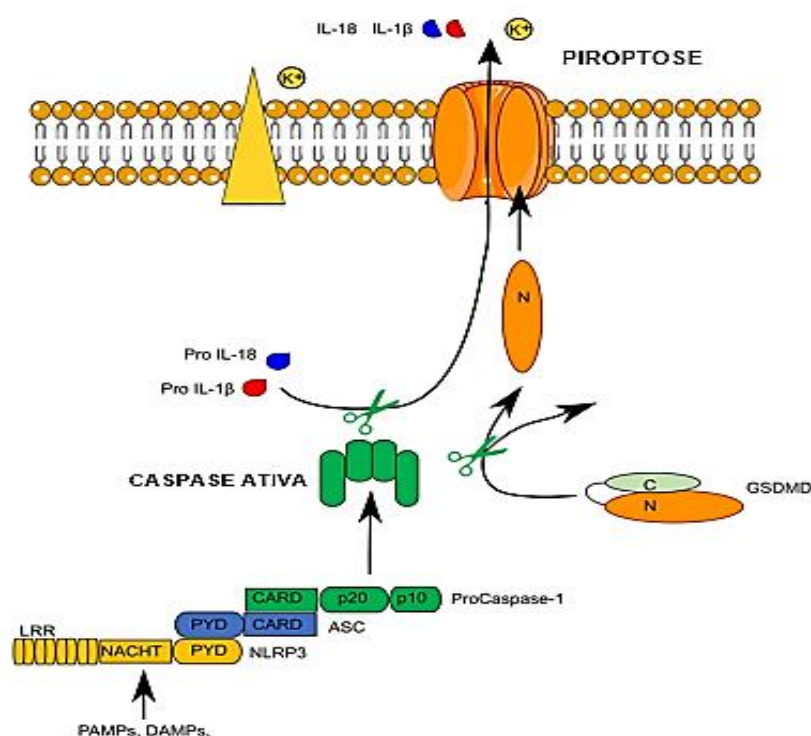
um risco estimado de ocorrência de 6 vezes mais em indivíduos SD em comparação com a população em geral. Contudo, apesar de ser comum é de difícil reconhecimento pois muitos dos sintomas clássicos conhecidos de início da doença, como prisão de ventre, baixa estatura e problemas de comportamento, podem ocorrer com mais frequência entre crianças com SD, independentemente da doença celíaca (SHARR *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2020; FERRARI e STAGE, 2021).

A alopecia aerata (AA) é um tipo de queda de cabelo comum, inflamatória e sem cicatrizes, cerca de 1 a 11% mais prevalente em indivíduos SD quando comparada com a população em geral (ESTEFAN *et al.*, 2014; STRAZZULLA *et al.*, 2018).

2.3 INFLAMASSOMA

A inflamação é uma resposta imune protetora montada pelo sistema imune inato evolutivamente conservado a estímulos nocivos, como patógenos, células mortas ou irritantes, e é rigidamente regulada pelo hospedeiro. A inflamação insuficiente pode levar à infecção persistente de patógenos, enquanto a inflamação excessiva pode causar doenças inflamatórias crônicas ou sistêmicas. A função imune inata depende do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), derivados de patógenos invasores, e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), induzidos como resultado de estresse endógeno, por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) codificados por linha germinativa (Figura 5). Entre os PRRs, o domínio de ligação ao nucleotídeo e a família de receptores contendo repetições ricas em leucina (NLRs) é capaz de reconhecer DAMPs / PAMPs citosólicos. Os NLRs são expressos no citosol de células imunes derivadas de mieloides, bem como em outros tipos de células, como células epiteliais e endoteliais (GUO *et al.*, 2016; ZITO *et al.*, 2020).

Figura 5. Mecanismos de ativação dos inflamassomas por PAMPs ou DAMPs. Seguido de piroptose e liberação de citocinas através do poro de GSDMD.

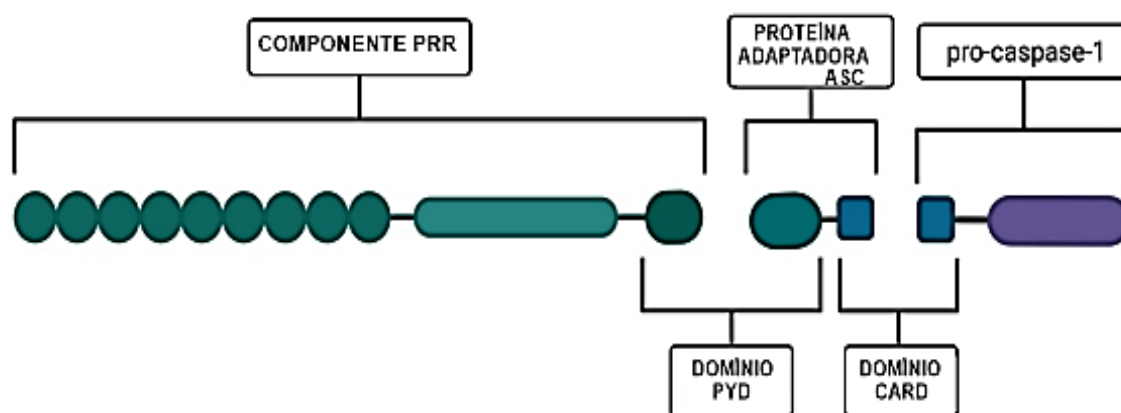


Fonte: Adaptado de CORNUT, BOURDONNAY e HENRI (2020).

Os inflamassomas são complexos intracelulares multiproteicos que fazem parte do sistema imune inato. Eles são responsáveis por regular a resposta imunológica a fatores exógenos e endógenos. Tanto os padrões moleculares PAMPs quanto DAMPs podem desencadear a ativação do inflamassoma e, quando essa ativação é desregulada, pode estar ligada ao desenvolvimento de câncer e doenças autoimunes, metabólicas e neurodegenerativas (BROZ e DIXIT, 2016; SONMEZ e OZEN, 2017; BORTOLOTTI *et al.*, 2018). Os inflamassomas desempenham um papel importante e vital na ativação e liberação de citocinas pró-inflamatórias e são altamente expressos em células imunes, especialmente monócitos e macrófagos, onde foram descobertos pela primeira vez (GUO *et al.*, 2016; BORTOLOTTI *et al.*, 2018; BLEVINS *et al.*, 2022).

Os componentes gerais de um inflamassoma são: um sensor (que, geralmente, dá o nome ao complexo), um adaptador (uma proteína como a ASC - apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) e um efetor (a pro-caspase-1) (Figura 6). A ASC possui dois domínios: um domínio PYD (pyrin domain) e um domínio CARD que liga o sensor ao efetor (TOMASIK E BASAK, 2022).

Figura 6. Esquema geral dos componentes do complexo inflamassoma.

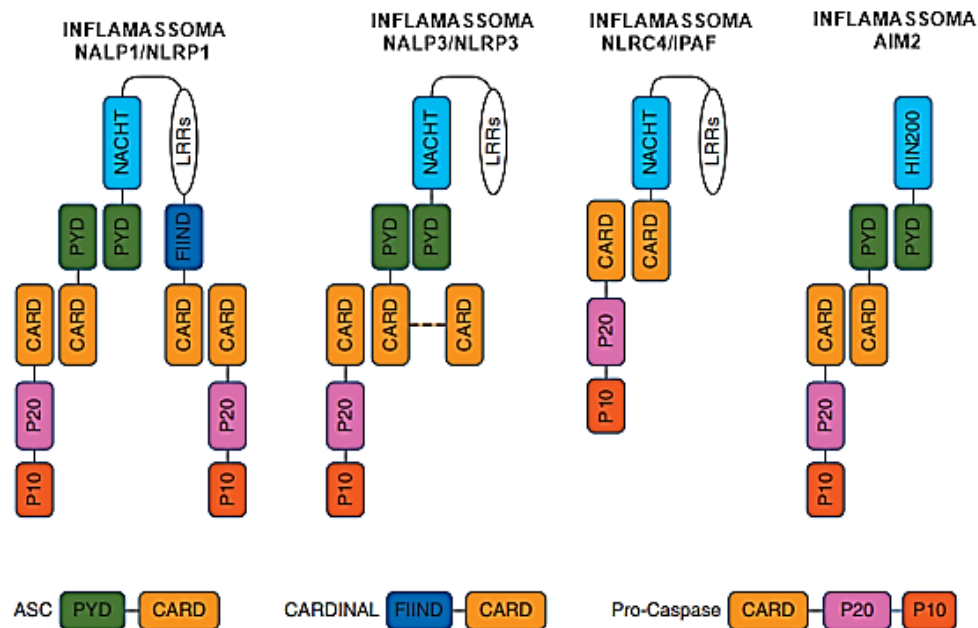


Fonte: Adaptado de TOMASIK e BASAK (2022).

Após a ativação dentro dos inflamassomas, a caspase-1 desencadeia dois eventos principais: uma rápida morte celular inflamatória denominada piroptose, devida à clivagem de uma única proteína, denominada gasdermina D (GSDMD) e a clivagem da pró-forma de duas citocinas (IL-1 β e IL-18), resultando na secreção de suas formas ativas (CORNUT, BOURDONNAY E HENRI, 2020).

A figura 7 ilustra os inflamassomas mais bem estabelecidos: 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, outras proteínas da família NLR são capazes de formar complexos de inflamassoma multiméricos, incluindo NLRP2, NLRP6, NLRP7, NLRP9 e NLRP12 (ZHANG *et al.*, 2016; KHARE *et al.*, 2012; ZHU *et al.*, 2017).

Figura 7. Representação dos Inflamassomas NLRP1, NLRP3, NLRC4 e AIM2.

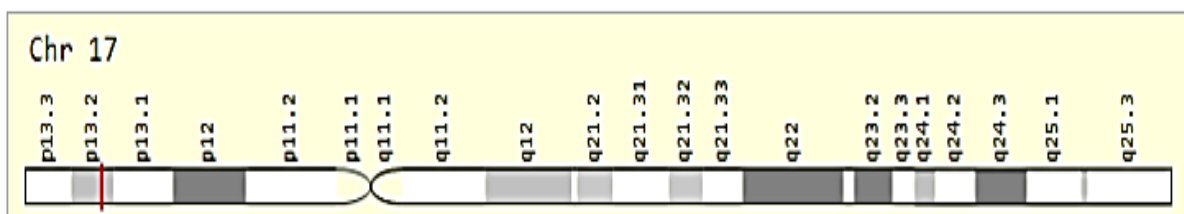


Fonte: Adaptado de ZHANG *et al.* (2016).

2.3.1 GENE *NLRP1*

O gene *NLRP1* está localizado no cromossomo 17 (17p13.2) (Figura 8) e codifica um membro da família Ced-4 (proteínas apoptóticas) com um domínio de recrutamento para caspase (CARD), sendo conhecido com um dos principais mediadores da morte celular programada. É o maior NLR, com um comprimento de 1.473 aminoácidos e sete isoformas produzidas por *splicing* alternativo e o seu motivo N-terminal PYD está envolvido na interação proteína-proteína, interagindo com caspases inflamatórias e apoptóticas (MARTINON *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2018).

Figura 8. Localização do gene *NLRP1* (17p13.2).

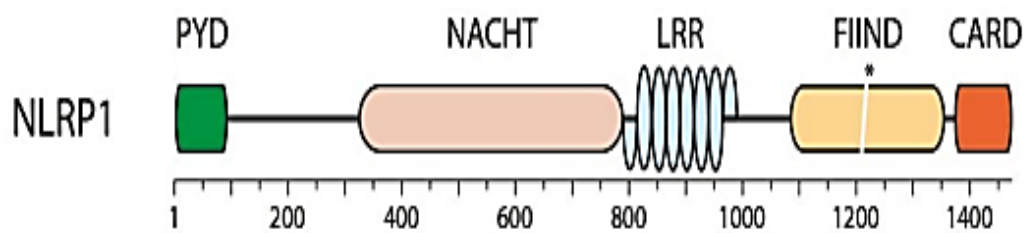


Fonte: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NLRP1>.

A ativação do NLRP1 é regulada de maneira muito complexa, compartilhando certos aspectos com outros sensores do inflamassoma. Em contraste com o

inflamassoma NLRP3, o NLRP1 tem um domínio FIIND, um PYD e um CARD e pode ativar a caspase-1 independente do adaptador ASC (Figura 9). Além disso, essa ativação possui características muito específicas, como autoativação proteolítica e degradação funcional (YU *et al.*, 2018; ALEHASHEMI E GOLDBACH-MANSKY, 2020; FENINE *et al.*, 2020).

Figura 9. Estrutura do inflamassoma NLRP1.

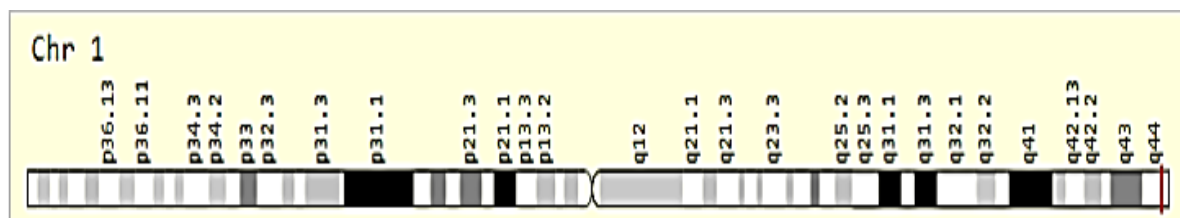


Fonte: YU *et al.* (2018).

2.3.2 GENE *NLRP3*

O gene *NLRP3* está localizado no cromossomo 1 (1q44) (Figura 10), possui 4.470 pb, nove éxons e codifica a uma proteína da família NLR (criopirina), que está envolvida na sinalização do inflamassoma e regula a atividade da caspase-1 e o processamento da IL-1 β (HOFFMAN *et al.*, 2001; MARIATHASAN *et al.*, 2006; HITOMI *et al.*, 2009). O inflamassoma NLRP3 é o mais estudado e caracterizado atualmente devido à sua capacidade de ser ativado por uma gama diversificada de estímulos e sua implicação em várias doenças inflamatórias (BLEVINS *et al.*, 2022).

Figura 10. Localização do gene *NLRP3* (1q44).

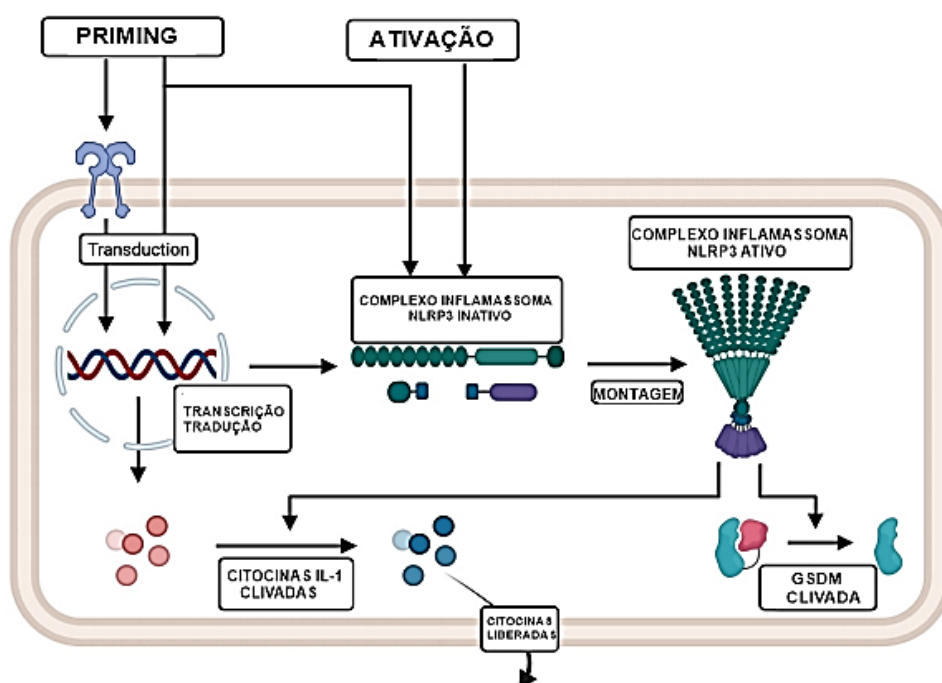


Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/NLRP3#location>

A formação do inflamassoma NLRP3 ocorre em dois estágios: *priming* e ativação (Figura 11) e inclui três elementos: um receptor de reconhecimento de

padrões moleculares (PRR); um domínio de recrutamento de caspase (ASC), que é uma proteína adaptadora; e uma enzima, a caspase 1, que promove a maturação das citocinas inflamatórias IL-1 β e IL-18. Esse inflamassoma é ativado pelo reconhecimento do gatilho pelos PRRs e interação da molécula adaptadora ASC, causando a ativação da caspase 1 (SONMEZ E OZEN, 2017; BLEVINS *et al.*, 2022).

Figura 11. Mecanismo simplificado da formação do inflamassoma NLRP3, dividido em dois estágios: *priming* e ativação.



Fonte: TOMASIK E BASAK (2022).

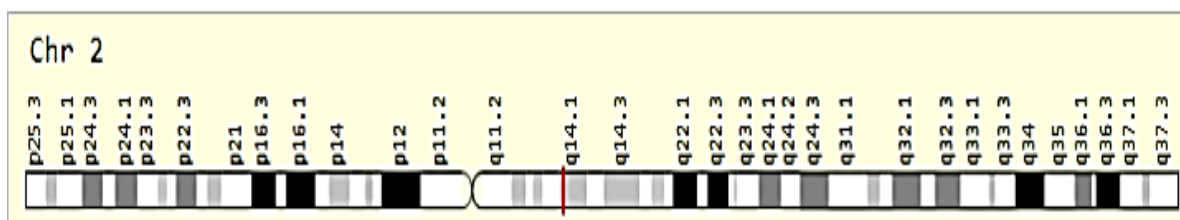
O inflamassoma NLRP3 desempenha um papel intrincado e importante no sistema imune inato em resposta a uma variedade de estímulos. Após a formação do inflamassoma NLRP3, a caspase-1 é liberada e ativa as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18. Essas citocinas continuam a cascata de sinalização inflamatória e recrutam células imunes para combater infecções ou curar lesões. A ativação alterada de NLRP3 leva à inflamação crônica, um denominador comum de várias doenças que causa e / ou estimula a patologia da doença. O NLRP3 é ativado e os níveis de IL-1 β e IL-18 são regulados positivamente em doenças em que a patologia é acompanhada por inflamação (BLEVINS *et al.*, 2022). Além da regulação da maturação de citocinas pró-inflamatórias, o inflamassoma NLRP3 também está envolvido no controle da

piroptose, definida como uma forma rápida e inflamatória de morte celular programada (DUEZ e POURCET, 2021).

2.3.3 GENE *IL1-β*

A família de citocinas da interleucina-1 (IL-1) é composta por 11 isoformas, todas as quais compartilham a característica de induzir inflamação (ZHANG *et al.*, 2016). O gene *IL1-β* está localizado no cromossomo 2 (2q14.1) (Figura 12), possuindo sete éxons, sendo expressado em linfócitos B, monócitos e fibroblastos, codifica uma citocina pró-inflamatória responsável por recrutar células imunes inatas para o local da infecção (AFONINA *et al.*, 2015).

Figura 12. Localização do gene da *IL-1β* (2q14.1).



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

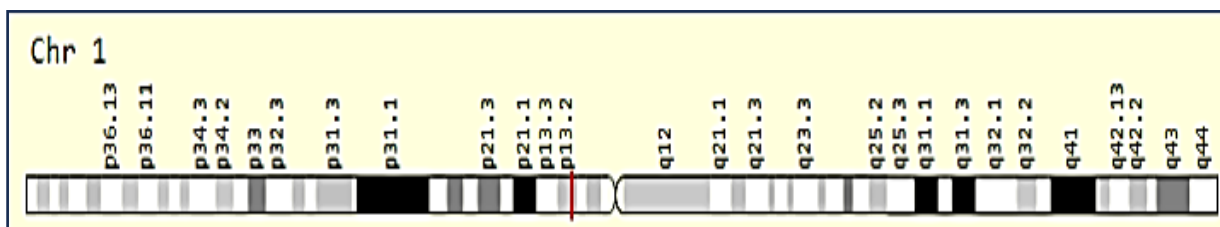
A transcrição de *IL-1β* é regulada por três regiões principais: um promotor proximal, um distal e um intensificador localizado 3 kb a montante do TSS (sítio de início de transcrição). *IL-1β* é um gene precoce imediato, o que significa que sua expressão é regulada imediatamente após sinais pró-inflamatórios independentes da neossíntese de proteínas (CORNUT, BOURDONNAY E HENRI, 2020).

Em geral, a família de citocinas IL-1 está intimamente associada à imunidade inata. Nesse sentido, como membro da família IL-1, a IL-1β suporta a defesa do hospedeiro contra infecções. Assim, a IL-1β produz uma resposta inflamatória por aumentar a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e mesenquimais e por induzir a expressão gênica de quimiocinas. Em particular, a IL-1β recebeu mais atenção do que outros membros da superfamília IL-1 porque desempenha um papel importante na patogênese de vários distúrbios autoinflamatórios. Normalmente, a patogênese dessas doenças envolve um aumento na secreção de IL-1β, que muitas vezes está relacionada a uma ativação anormal da enzima caspase-1 (CAMPBELL *et al.*, 2016).

2.4 GENE *PTPN22*

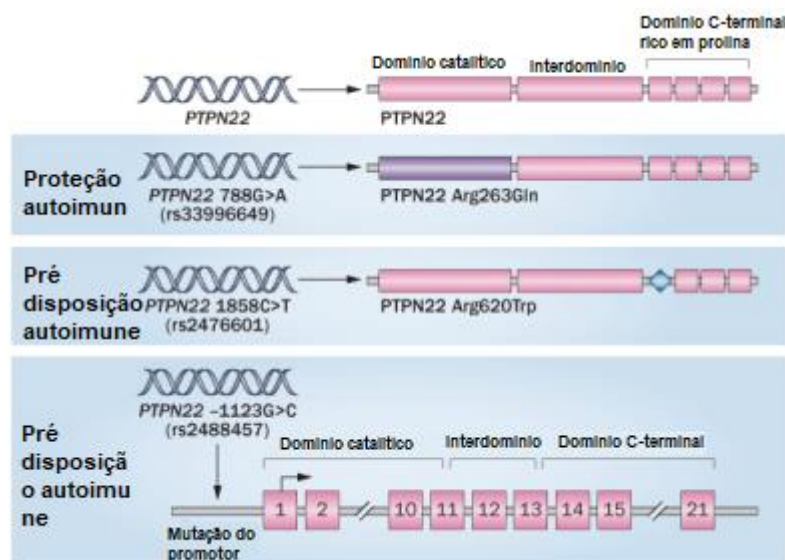
O gene *PTPN22* (proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22) está localizado no cromossomo 1 (1p13.3-p13.1) (Figura 13) e codifica a lisina tirosina fosfatase (LYP), desempenhando um papel central na manutenção da tolerância imunológica e na prevenção da autoimunidade. (NIELSEN et al., 2007). O LYP é considerado um poderoso inibidor da ativação de células T e contribui para sinalizar cascatas iniciadas em diversos tipos de células do sistema imunológico, incluindo células B e células do sistema imunológico inato (FOUSTERI, LIOSSIS e BATTAGLIA, 2013).

Figura 13. Localização do gene *PTPN22* (1p13.3-p13.1).



Fonte: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTPN22&keywords=ptpn22>

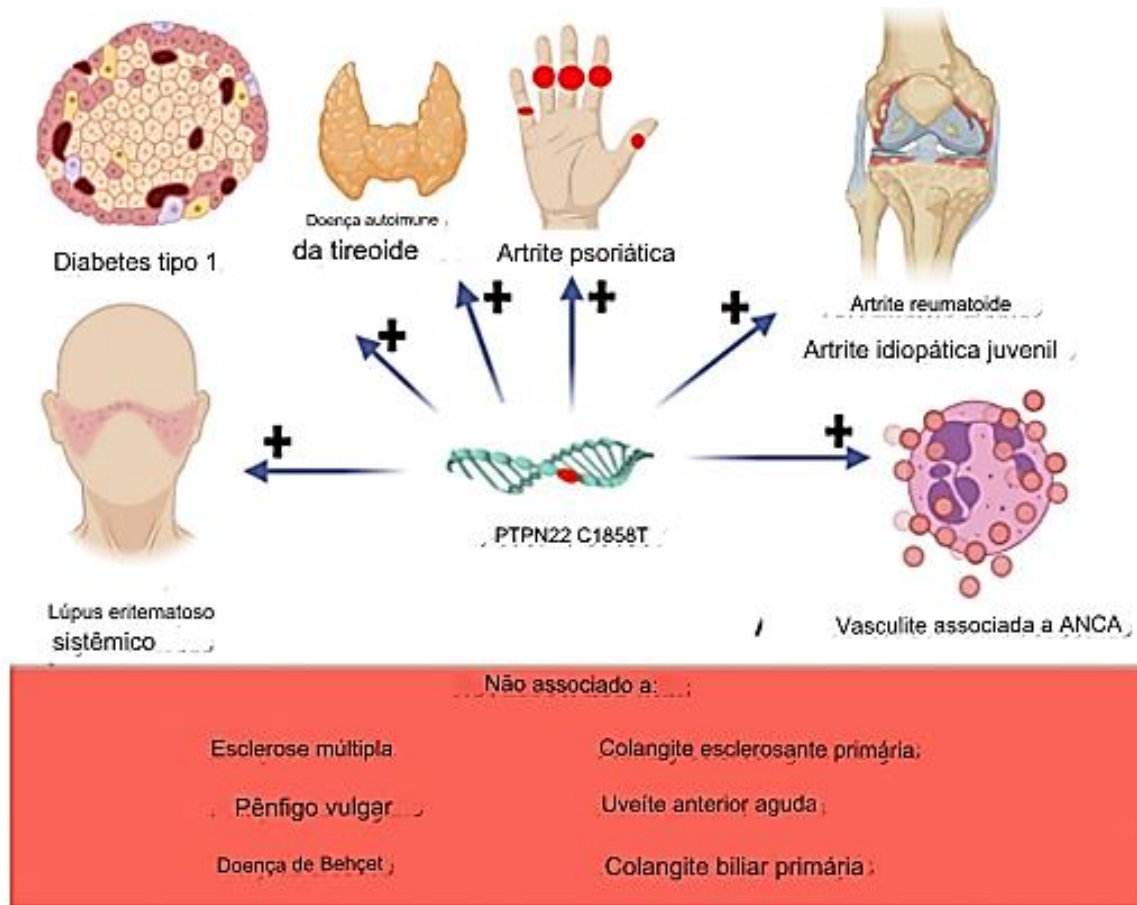
O gene *PTPN22* tem papéis importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas, modulando a produção de citocinas. A perda de *PTPN22* parece levar a um desequilíbrio na homeostase das citocinas, resultando em aumento da suscetibilidade a doenças autoimunes. *PTPN22* contém um domínio PTP N-terminal e quatro motivos ricos em prolina (P1–4) na região C-terminal. Vários SNPs no gene *PTPN22* estão associados a doenças autoimunes (Figura 14) (TIZAOUI et al., 2021).

Figura 14. Variantes do *PTPN22* humano.

Fonte: Adaptado de STANFOR e BOTTINI (2014).

O SNP 788G>A, classificado como protetor (rs33996649) causa uma substituição Arg263Gln no domínio catalítico *PTPN22*; o SNP 1858C>T, classificado como de predisposição autoimune (rs2476601) causa uma substituição Arg620Trp no primeiro motivo rico em prolina e contribui para a suscetibilidade genética de muitas doenças autoimunes (Figura 15), sugerindo que semelhanças fundamentais estão subjacentes à sua patogênese; e o SNP -1123G>C também de predisposição autoimune (rs2488457) está na região promotora do gene *PTPN22* (FOUSTERI, LIOSSIS e BATTAGLIA, 2013; STANFOR e BOTTINI, 2014).

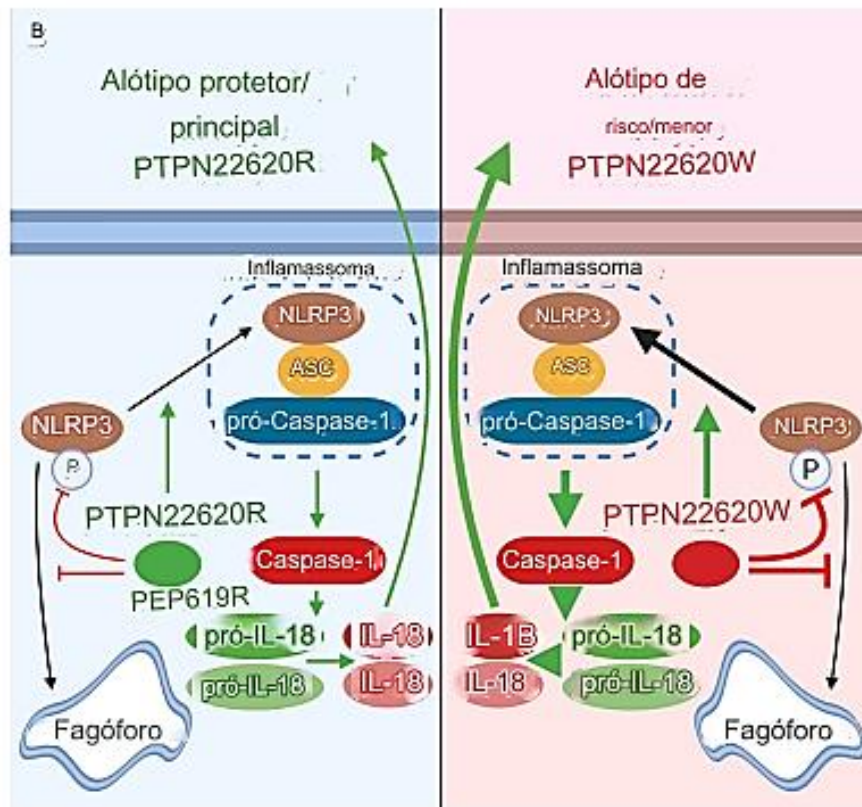
Figura 15. Associações entre *PTPN22* e doenças autoimunes.



Fonte: Adaptado de TIZAOUI *et al.* (2021).

PTPN22 também pode promover a ativação do inflamassoma NLRP3 desfosforilando NLRP3 e impedindo seu sequestro no autofagossomo através de dois alótipos distintos (Figura 16): *PTPN22620W*, que é uma variante de ganho de função e possui capacidade aprimorada de desfosforilar *NLRP3* (isso leva ao aumento da ativação do inflamassoma NLRP3); e *PTPN22620R*, que regula positivamente a ativação de NLRP3 e subsequente liberação de IL-1b (ARMITAGE, WALLET e MATHEWS, 2021).

Figura 16. Ativação do inflamassoma NLRP3 pelo *PTPN22*.



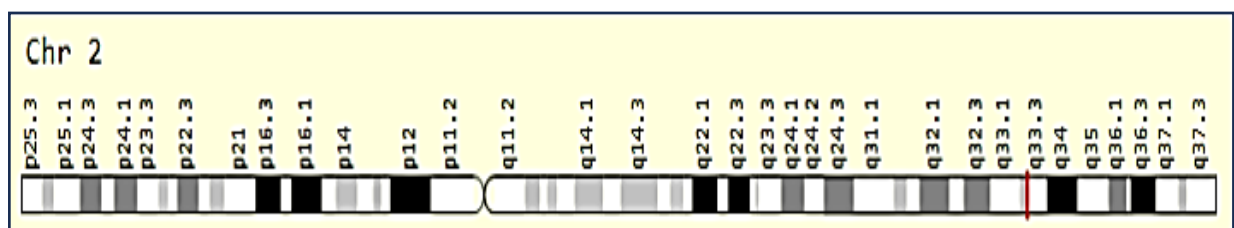
Fonte:

Adaptado de ARMITAGE, WALLET e MATHEWS (2021).

2.5 GENE *CTLA-4*

O gene *CTLA-4* (antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos humano) está localizado no cromossomo 2 (2q33.3) (Figura 17) com um tamanho de nucleotídeo de cerca de 6,2 kb consistindo em quatro éxons (GHADERI, 2011). É um receptor inibitório pertencente à família CD28 que é expresso principalmente em células T e consiste em uma cauda citoplasmática, uma parte transmembrana e um domínio extracelular (VAN COILLIE, WIERNICKI e XU, 2020).

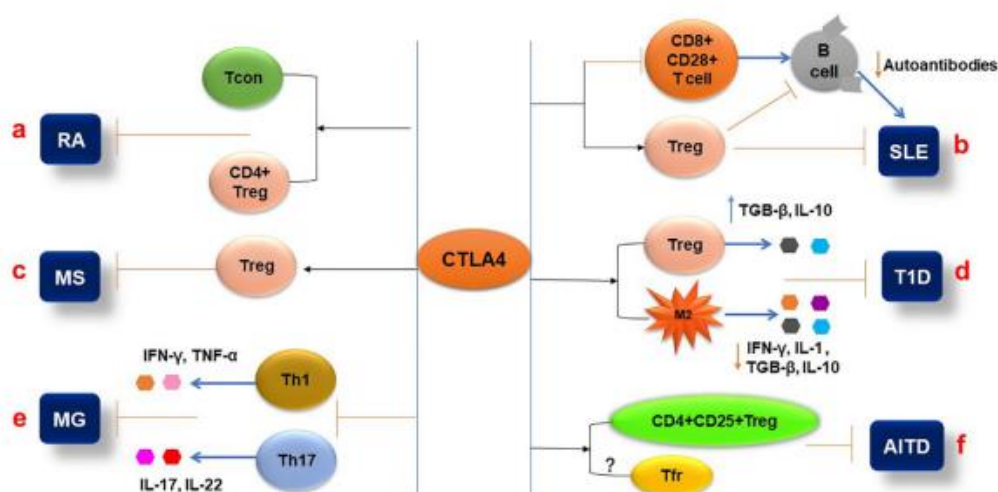
Figura 17. Localização do gene *CTLA-4* (2q33.3).



Fonte: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CTLA4&keywords=ctla4>

CTLA-4 ou *CD152* é uma glicoproteína de superfície de células T que desempenha um papel crítico na prevenção de patologia autoimune e representa a via inibitória mais bem caracterizada para a ativação de células T (ROMO-TENA, GÓMEZ-MARTÍN e ALCOCER-VARELA, 2013), regulando a iniciação, diferenciação e migração de células T, que expressam *CTLA-4* após sua ativação, servindo como mecanismo de controle de feedback para equilibrar a magnitude das respostas imunes adaptativas, regulando a produção de citocinas (LINGEL e BRUNNER-WEINZIERL, 2019). Polimorfismos no gene *CTLA-4* podem contribuir para a patogênese de doenças autoimunes através da sua expressão ou função reduzida. Vários SNPs no *CTLA-4* demonstraram estar intimamente associados à AR (artrite reumatoide), lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose múltipla (EM), diabetes tipo 1 (DM1) e miastenia gravis (MG) (Figura 18) (HOSSEINE *et al.*, 2020).

Figura 18. Associações entre *CTLA-4* e doenças autoimunes.



Fonte: Adaptado de HOSSEN *et al.* (2023).

Os aspectos fisiopatológicos das doenças autoimunes são influenciados pela expressão de *CTLA-4*, onde nas células T convencionais e T reguladoras (CD4+FoxP3+) pode inibir a patogênese da AR; atenua a função imunossupressora das células Treg e inibe as funções das células T CD8 + CD28 + que afetam a produção de autoanticorpos pelas células B durante a patogênese do LES; pode ativar células Treg e reduzir a atividade da MS; diferencia as células Treg CD4+CD25+ e inibe a patogênese do T1D aumentando a secreção de IL-10 e TGF-β; diminui a frequência de células Th1 e Th17 e sua produção de citocinas em MG; desempenha

um papel inibitório ao ativar as células Treg CD4+CD25+ e suas funções imunossupressoras na AITD; além disso, a interação do CTLA-4 com macrófagos reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IFN- γ) e inibe o DM1 (HOSSEN *et al.*, 2023)

3 ARTIGO 1 - EXPRESSION PROFILE OF INFLAMMASOME GENES IN INDIVIDUALS WITH DOWN SYNDROME

Inflammasome and Down syndrome

Juliana Vieira de Barros Arcoverde¹, Carla Fernandes dos Santos¹, Maria Cecília Magalhães Luckwu¹, Raysa Samanta Moraes Laranjeira¹, Aldianne Milene dos Santos Barbosa¹, Thays Maria Costa de Lucena¹, Jaqueline de Azevêdo Silva^{1,2} and Neide Santos^{1*}

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

²Instituto Keizo Asami – iLIKA, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

key words: Down syndrome; Inflammasome; Expression.

***Corresponding Author:**

Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco.

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

E-mail address: neide.santos2@ufpe.br

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

Manuscrito submetido ao periódico Genetics and Molecular Biology – Fator de Impacto (2023): 2.087; Qualis CAPES A3. – **Anexo C**

Abstract

Down syndrome (DS), affecting 1 in 700 live births, is the most prevalent chromosomal disorder among newborns. Recognizable by classical clinical features, they are susceptible to various immunological misbalances named, autoimmune thyroid disease, type 1 diabetes, alopecia, celiac disease, juvenile idiopathic arthritis and vitiligo. Inflammasome, immune sensors responsible for inducing inflammatory responses, is (mis)activated in several autoinflammatory and autoimmune diseases, however there are still no studies on their role in individuals with DS. The present study evaluated the expression profile of *NLRP1*, *NLRP3* and *IL-1 β* genes in DS, aiming to understand their susceptibility to autoimmune/inflammatory diseases. In addition, we assessed whether the DS individuals present a differential inflammatory response after infection *in vitro*. For the gene expression assay, 20 individuals with DS and 15 healthy individuals (control group) were included. mRNA levels from DS group showed 1.9-fold change (FC) downregulation for *NLRP1* ($p=0.0001$). For the *in vitro* assays, we found 1.7 FC downregulation of *NLRP1* ($p=0.1879$) when comparing cells treated with lipopolysaccharide (LPS) stimuli to those without LPS. The differential expression of *NLRP1* in individuals with DS suggests a potential association with susceptibility to the development of autoimmune/inflammatory diseases, but further analyzes are needed to confirm this relationship.

Introduction

Down syndrome (DS) or trisomy 21 (OMIM #190685, Online Mendelian Inheritance in Man, an Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders) is a genetic condition resulting from the presence and expression of three copies of genes located on chromosome 21. It is the most common viable chromosomal aneuploidy in humans (Migliori *et al.*, 2009; Dieudonne *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2021). In Brazil, DS occurs in approximately 1/700 newborns, and affects individuals of all races and ethnic groups (Yaqoob *et al.*, 2019; Bermudez *et al.*, 2021).

Trisomy 21 is primarily attributed to meiotic non-disjunction, resulting in a karyotype with the presence of 47 chromosomes (a condition known as free trisomy) in approximately 95% of cases. Other contribution factors include chromosomal mosaicism (2 to 4% of cases), Robertsonian translocation involving chromosome 21 with another acrocentric chromosome (occurring in between 1 and 3% of cases), and chromosomal rearrangements involving the long arm of chromosome 21 (denoted as the critical region of DS and called partial trisomy) (Oster-Granite *et al.*, 2011; Coppede, 2016; Bull, 2020). Cytogenetic analysis has an important role not only in confirming the diagnosis of DS, but also in predicting the risk of recurrence and providing essential information for future genetic counseling (Narayanan *et al.*, 2013).

Immune-mediated diseases in individuals with DS often lead to complications that can reduce life expectancy, including increasing susceptibility to infections, hematological malignancies, and autoimmunity conditions (Ferrari and Stagi, 2021). DS is well recognized for its association with multiple immunological alterations. However, diagnosing autoimmune diseases in individuals with DS can be complicated due to the masking effects of the syndrome's underlying characteristics, such as failure to thrive, short stature and delayed puberty (Christiakov, 2007; Bull, 2020).

The rapid advancement of inflammasome research has demonstrated important roles for inflammasome activation in various diseases, both autoinflammatory and autoimmune conditions (Kahlenberg and Kang, 2021). However, there is a gap in the literature regarding the inflammasome's role in individuals with DS, a population known for their heightened susceptibility to autoimmune diseases, which makes our study a pioneer on the subject.

Inflammasomes play an important and vital role in the activation and subsequent release of pro-inflammatory cytokines, exhibiting high expression in immune cells (Guo *et al.*, 2016; Bortolotti *et al.*, 2018; Blevins *et al.*, 2022). These molecular complexes are responsible for regulating the immune response to both exogenous (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) and endogenous (Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) factors. Dysregulation of inflammasome activation has been associated with the development of various conditions, including cancer, autoimmune diseases, metabolic disorders, and neurodegenerative diseases (Broz and Dixit, 2016; Sonmez and Ozen, 2017; Bortolotti *et al.*, 2018).

Individuals with DS have an increased risk of developing inflammatory, infectious, and autoimmune diseases, which can significantly influence their quality of life and life expectancy. However, the precise mechanism contributing to the development of these clinical conditions remain not yet well understood. Therefore, the objective of our study was to analyze and compare the expression profile of the inflammasome genes NLRP1 (NLR, pyrin domain containing 1), NLRP3 (NLR, pyrin domain containing 3) and IL-1 β (Interleukin 1 β) in individuals with DS and in healthy controls, as well as analyzing the expression profile of these genes in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated and not stimulated with lipopolysaccharide (LPS) in these individuals, aiming to understand their susceptibility to

autoimmune/inflammatory diseases and whether they present a response differential inflammatory response after in vitro infection

Materials and methods

Patients and controls

The individuals with DS were recruited from University Group for Child Rehabilitation (Grupo Universitário de Reabilitação Infantil, GURI) and a group formed by parents and guardians of individuals with DS. Our study involved a sample comprised 68 individuals with DS. Among these, 20 individuals were included in the gene expression assay, with a mean age of 10.9 years (ages ranged from 8 to 14 years). Additionally, 10 participants with DS were included in gene expression assays in PBMCs following stimulation with lipopolysaccharide (LPS).

The healthy control group (CT) consisted of 15 children and adolescents, with a mean age of 11.7 years (ranging from 8 to 14 years). These participants did not have DS and had no prior history of autoimmune or chronic inflammatory diseases. All individuals in the study come from the state of Pernambuco (PE).

Our study was approved by the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (nº 32478820.0.0000.5208). All legal guardians of the individuals who participated in this research provided their informed consent by signing the Informed Consent Form. All participants voluntarily contributed to the research.

Lymphocyte culture and G-banding

Cytological preparations for chromosomal analyzes were obtained from lymphocyte cultures, and around 20 metaphases were analyzed with G-banding for each individual, and in the case of chromosomal mosaicism, around 30 metaphases

were analyzed per individual. The chromosomes were identified and classified according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN) of 2020. The collection of biological material from DS individuals and the CT occurred between August 2021 to July 2023.

PBMCs Culture, RNA extraction and cDNA synthesis

For the culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), 15 mL of venous blood was collected from 10 individuals with DS, using tubes containing heparin as an anticoagulant. PBMCs were isolated from whole blood using Histopaque - 1077 (Sigma). A total of 5×10^6 PBMCs per well were cultured in RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Life Technology, USA). The PBMCs were cultivated in 12-well plates within an incubator with 5% CO₂ at 37 °C. The culture for each individual was divided into two experimental stages: (1) Negative culture - without stimulation (lasting 18 hours); (2) LPS stimulation (4 hours). Inflammation was induced by exposing the cells to LPS at a concentration of 50 ng/ml (Sigma).

Total RNA was isolated from PBMCs and peripheral blood using the Trizol® reagent according to the manufacturer's instructions. Subsequently, RNA quantification was carried out using the NanoDrop™ equipment, using spectrophotometry, to evaluate both the total concentration and purity of the RNA. The isolated RNA samples were stored in a –80 °C freezer for preservation.

The synthesis of complementary DNA (cDNA), utilizing a standard RNA concentration of 500 ng, was carried out with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher).

Gene expression assay

The expression assay was performed using Taqman® type fluorogenic probes for the target genes *NLRP1* (Hs00248187_m1), *NLRP3* (Hs00918082_m1) and *IL-1 β* (Hs01555410_m1). The relative expression of the target genes was normalized by employing the endogenous genes *EF1A* (F- GAGGCTGCTGAGATGGGAAA and R- CGTTCACGCTCAGCTTTCAG) and *HPRT1* (F- ACAGGACTGAACGTCTTGCT and R- GAGCACACAGAGGGCTACAA). These endogenous genes were used using the Sybr Green methodology, selected based on their expression stability demonstrated in peripheral blood and determined based on Genorm. Relative expression analysis was performed using the normalization factor.

Clinical Laboratory Evaluations

All individuals who participated in the gene expression assay underwent biochemical examinations in a specialized laboratory. These examinations encompassed the assessment of various parameters, including: Ultrasensitive Thyroid Stimulating Hormone (TSH) and free T4 (Free Thyroxine) levels, to detect thyroid disorders; Glycated Hemoglobin (HbA1c) and Estimated Average Glucose (EMG) measurements, which provide insights into diabetes; and dosage of Ultrasensitive C-Reactive Protein (us-CRP), a marker inflammation.

Regarding us-CRP levels, the reference values for risk categorization were as follows: Low risk: <0.1mg/dL; Medium risk: 0.1 to 0.2mg/dL; High risk: >0.2mg/dL; Very high risk: >1mg/dL and Acute phase inflammatory diseases: $\geq$ 1mg/dL. These reference ranges enabled the classification of individuals based on their vitamin D status and inflammation risk.

Thyroid disease was defined and classified based on the following criteria: subclinical hypothyroidism (SH), for cases where individuals exhibited “high” TSH levels while maintaining normal free T4 levels at the time of diagnosis or without medication, and Overt Hypothyroidism (OH), for cases displaying “high” TSH levels coupled with “low” free T4 levels at any point in time. The categorization of “high” and “low” was determined based on individual reference ranges, with the following reference values: TSH range of 0.30 to 4.20 μ IU/mL, and free T4 levels between 0.82 to 1.62 ng/dL for.

The diagnosis of diabetes mellitus was defined when both the laboratory reference values for glycated hemoglobin and estimated mean glucose equaled or exceeded 6.5% and 126 mg/dL, respectively.

Statistical analysis

Gene expression assays were performed in technical duplicate, and the results were presented as group means and standard deviations. Statistical analysis and graphics were carried out using GraphPad software, version 8.0.0. To verify the distribution of the samples, the Shapiro-Wilk normality test was performed.

In the normalized analyses, parametric tests such as Student's T-test or One-Way ANOVA were applied, whereas non-parametric tests, the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis test, were applied in the non-normalized data. A significance level of $p < 0.05$ was adopted, with a 95% confidence interval.

Results

The cytogenetic analysis of the 68 individuals, comprising 38 men and 30 women, revealed a total of 60 patients exhibited free trisomy, constituting 88.2% of the

cases. Additionally, six patients showed chromosomal mosaicism, accounting for 8.8% of the cases, while two patients were identified with Robertsonian translocation, representing 2.9% of the cases (Table 1).

Of the 68 individuals with DS, 20 of them were also evaluated for serum levels of ultra-sensitive thyroid-stimulating hormone (TSH), free thyroxine (free T4), glycated hemoglobin (HbA1c) and ultra-sensitive protein C (us-CPR) (Table 2). All individuals had karyotype with free trisomy. Through the results it was possible to observe that nine individuals had changes in TSH, eight of them compatible with subclinical hypothyroidism and one with overt hypothyroidism; and eight individuals showed changes in us-CPR. Furthermore, one individual had diabetes mellitus, HbA1c and EMG values are available in table 3 (individual 8).

Regarding mRNA levels in peripheral blood, among the 68 individuals with DS, expression assays for the *NLRP1*, *NLRP3* and *IL-1 β* genes were conducted on a subset of 20 individuals (Figure 1). When compared to individuals in the healthy control group (CT, n=15), we observed a downregulation of the *NLRP1* gene of 1.8 times ($p<0.0001$). In contrast, the *NLRP3* (FC: 1.0; $p=0.5887$) and *IL1 β* (FC: 1.0 ($p=0.2248$)) genes showed no difference in expression.

For PBMC mRNA levels for the *NLRP1*, *NLRP3* and *IL-1 β* genes (Figure 2) among individuals with DS (n=10), we found downregulation of the *NLRP1* of 1.7 times ($p=0.1879$), and an upregulation of the *NLRP3* and *IL-1 β* genes by 1.4 times ($p=0.5889$) and 1.0 times ($p=0.2248$), respectively, when comparing cells treated with LPS stimulation in relation to cells that did not receive the stimulus.

Individuals were stratified into two groups based on changes in TSH and us-CRP. Individuals with hypothyroidism (n=9) (Figure 3a), the mRNA levels showed an upregulation of the *NLRP1* gene of 1.0 times ($p=0.7912$), and a downregulation of the

NLRP3 and *IL-1 β* genes by 1.1 times ($p=0.4785$) and 1.4 times ($p=0.3005$), respectively, when compared with individuals without hypothyroidism ($n=11$).

For the group with changes in us-CRP ($n=8$) (Figure 3b), the mRNA levels demonstrated an upregulation of the *NLRP3* gene by 1.0 times ($p=0.7384$), and a downregulation of the *NLRP1* and *IL-1 β* genes by 1.0 times ($p=0.8587$) and 1.0 times ($p=0.9795$), respectively, when compared to individuals who did not present the change in us-CRP ($n=12$).

Discussion

The percentage of 88.2% of free trisomy cases in our study sample was slightly lower than 95% reported in the literature (Oster-Granite *et al.*, 2011; Coppede, 2016; Bull, 2020). This variance can be explained to differences in birth prevalence, which depend on maternal age, as well as the practice of prenatal diagnosis of DS followed by termination of affected pregnancies (Yaqoob *et al.*, 2019).

Regarding the expression of *NLRP1*, *NLRP3* and *IL-1 β* genes in individuals with DS, we found a downregulation of *NLRP1* when compared with the healthy control group. The *NLRP1* gene exhibited the most pronounced difference in expression in relation to the healthy control group and it was the only one that reached statistical significance. The downregulation of *NLRP1* and upregulation of *NLRP3* and *IL-1 β* genes may indicate an unbalanced immune response in individuals with DS. Furthermore, upregulation of the *NLRP3* and *IL-1 β* genes can affect chronic inflammation, potentially affecting the function of the endocrine system, possibly contributing to metabolic problems such as obesity, insulin resistance and diabetes.

According to Verstegen and Kusters (2020), given that all aspects of the immune system in individuals with DS present changes to some degree, disrupted

cellular communication may play a role in decreased function and dysregulation of gene expression. Consequently, the direct effect of this deregulated expression can influence intracellular pathways, affecting fundamental cellular processes such as cell division and mitochondrial function, in addition to those that are specific to immune system cells.

In order to confirm autoimmune thyroid disease (AITD) in the nine individuals who presented hypothyroidism, a thorough laboratory investigation involving serological markers of thyroid autoantibodies would be essential, such as: anti-thyroid stimulating hormone receptor antibody (anti-TSH-R) and anti-thyroid peroxidase antibodies (anti-TPO). However, it is worth noting that autoimmune conditions such as type 1 diabetes mellitus (DM1), AITD, alopecia, celiac disease (CD), juvenile idiopathic arthritis, and vitiligo are known to occur at a higher rate among individuals with DS when compared to those without DS (Bull, 2020).

An increased expression of several inflammasome components, including *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *AIM2*, *ASC* and caspase-1, along with their downstream cytokines, namely *IL-18* and *IL-1 β* , within thyroid tissues of patients with AITD was observed by Guo *et al.* (2018). This finding highlights the association of altered expression and activity of multiple inflammasomes with the pathogenesis of AITD in humans. A downregulation of the *NLRP1* and *NLRP3* genes in individuals with DM1 was also observed by Liu *et al.* (2017), which is an autoimmune condition often prevalent in individuals with DS. In our sample, one individual exhibited value above the reference range for HbA1c and EMG, suggesting the possible presence of DM1. These elevated values are indicative of potential diabetes, particularly Type 1 diabetes, which is characterized by autoimmune destruction of insulin-producing beta cells in the

pancreas. This finding underscores the complex and varied roles of inflammasomes in autoimmune disorders and their relevance in individuals with DS.

In our analysis of the expression profile of the *NLRP1*, *NLRP3* and *IL-1 β* genes in response to LPS stimulation in PBMCs, we observed an elevated expression of the *IL-1 β* gene. However, this increase was not statistically significant in the stimulated cells. *IL-1 β* is one of the main cytokines in the inflammatory response and can be produced by various cell types, including monocytes and macrophages. Muendlein *et al.* (2020) observed that macrophages, when activated by LPS, underwent pyroptosis, a highly inflammatory form of cell death, and secreted IL-1 β . This process can be initiated by activation of CASP-8, which in turn directly activated gasdermin (GSDMD) and the NLRP3 inflammasome. This cascade of events resulted in both pyroptosis and the maturation and release of IL-1 β . These observations highlight the complex and interconnected mechanisms involved in the production and release of IL-1 β during an inflammatory response, shedding light on the intricate pathways that govern immune responses and inflammation.

It is worth noting that individuals with DS exhibit altered differentiation programs in their CD8⁺ T as mechanism to avoid hyperactivation, overproduction of cytokines and increased functionality (Arayaa *et al.*, 2019). This phenomenon may explain for the difference in the expression of the *IL-1 β* gene within our study group. The dysregulation of *IL-1 β* activity has been associated with a range of seemingly unrelated diseases, such as type II diabetes and gout (Menu and Vince, 2011). This underscores the broad impact of *IL-1 β* in various pathological conditions.

In our study, the analysis of serum levels of C-reactive protein (us-CRP), an important marker of inflammation, revealed eight individuals with elevated levels. However, when we compared these individuals to those without changes in this

protein, we did not find a statistically significant difference between the two groups. It is important to note, that a study conducted by Manti *et al.* (2018) investigated this marker in a group of individuals with DS compared to those without DS, they showed that ultrasensitive CRP (us-CRP) levels were significantly higher in individuals with DS. This underscores the significance of analyzing CRP levels in DS individuals, and highlights its potential relevance as an important marker in this context.

In conclusion, our analyzes may suggest potential evidence between the *NLRP1*, *NLRP3* and *IL1B* genes and susceptibility to autoimmune/inflammatory diseases in individuals with DS. However, it is important to emphasize that more comprehensive analyzes are needed to firmly establish the existence of this relationship. Additional research and investigations will be essential to confirm and elucidate the role of these genes in the context of autoimmune and inflammatory conditions in individuals with Down syndrome.

Acknowledgments: The authors thank the SD individuals and their guardians for participating in the study. To the University Child Rehabilitation Group (GURI), for welcoming and providing access to family members of individuals with DS treated at the ONG.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

Authors Contributions: J.V.B.A recruited the individuals, performed the cytogenetic and molecular analysis, performed the literature review, interpreted the results and wrote the manuscript; C.F.S performed the cytogenetic and molecular analysis and helped with writing the manuscript; M.C.M.L performed the cytogenetic analysis; R.S.M.L helped with writing the manuscript; A.M.S.B performed the cytogenetic and molecular analysis; T.M.C.L performed the statistical analysis and helped with writing the manuscript; J.A.S. structured the study protocol, interpreted the results and wrote the manuscript. and N.S. designed the study protocol, performed the cytogenetic analysis, interpreted the results and wrote the manuscript.

References

Araya P, Waugh KA, Sullivan KD, Núñez NG, Roselli E, Smith KP, Granrath RE, Rachubinski AL, Estrada BE, Butcher ET *et al.* (2019) Trisomy 21 dysregulates T cell lineages toward an autoimmunity-prone state associated with interferon hyperactivity. PNAS 116: 24231-24241. doi: 10.1073/pnas.1908129116.

Bermudez BEBV, Amara MES, Gomes CS, Novadzki IM and Oliveira CM (2021) Respiratory and otolaryngological disorders in Down syndrome from one center in Brazil. AJMG 185: 2356-2360. doi: 10.1002/ajmg.a.62244

Blevins HM, Xu M, Bibby S and Zhang S (2022) The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. Front Aging Neurosci 14:879021. doi: 10.3389/fnagi.2022.879021.

Bortolotti P, Faure E and Kipnis E (2018) Inflammasomes in Tissue Damages and Immune Disorders After Trauma. Front. Immunol. 9:1900. doi: 10.3389/fimmu.2018.01900.

Broz V and Dixit VM (2016) Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. Nat Rev Immunol 16: 407-420. doi: 10.3389/fimmu.2018.01900.

Bull MJ (2020) Down Syndrome. N Eng J Med 382: 2344-2352. doi: 10.1056/NEJMr1706537.

Chistiakov D (2007) Down syndrome and coexistent autoimmune diseases. *J Appl Biomed* 5: 71–76. doi: 10.32725/jab.2007.009.

Coppedè F, Bosco P, Lorenzoni V, Migheli F, Barone C, Antonnuci I, Stuppia L, Romano C and Migliore L. (2013) The MTR 2756A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome: a case-control study and a meta-analysis. *Mol Bio Rep* 40: 6013-6025. doi: 10.1007/s11033-013-2810-1.

Dieudonne Y, Uring-Lambert B, Jeljeli MM, Gies C, Alembik Y, Korganow A and Guffroy A (2020) Immune defect in adults with Down syndrome: insights into a complex issue. *Front Immunol* 11: 840. doi:10.3389/fimmu.2020.00840.

Ferrari M and Stagi S (2021) Autoimmunity and Genetic Syndromes: A Focus on Down Syndrome. *Genes* 12:268. doi: 10.3390/genes12020268.

Guo H, Callaway J and Ting JPY (2016) Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics. *Nat Med* 21: 677–687. doi: 10.1038/nm.3893.

Guo Q, Wu Y, Hou Y, Liu Y, Liu T, Zhang H, Fan C, Guan H, 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.

International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN), 2020. Edited by Jean McGowan-Jordan, Ros J. Hastings, Sarah Moore. S.Karger AG

doi: 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2

Kahlenberg JM and Kang I (2021) The clinicopathologic significance of inflammasome activation in autoimmune diseases: inflammasome and autoimmune diseases. *Arthritis Rheumatol* 72 : 386–395. doi: 10.1002/art.41127.

Liu H, Xu R, Kong Q, Liu J, Yu Z and Zhao C (2017) Downregulated NLRP3 and NLRP1 inflammasomes signaling pathways in the development and progression of type 1 diabetes mellitus. *Biomed & Pharmacother* 94: 619–626. doi:10.1016/j.biopha.2017.07.102.

Menu P and Vince JE (2011) The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol* 166: 1–15. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04440.x.

Migliore L, Migheli F and Coppedè F (2009) Susceptibility to Aneuploidy in Young Mothers of Down Syndrome Children. *Scientific World J* 9: 1052–1060. doi: 10.1100/tsw.2009.122.

Muendlein HI, Jetton D, Connolly WM, Eidell KP, Magri Z, Smirnova I and Poltorak A (2020) cFLIP_L protects macrophages from LPS-induced pyroptosis via inhibition of complex II formation. *Science* 367(6484): 1379–1384. doi: 10.1126/science.aay3878.

Narayanan DL, Yesodharan D, Kappanayi M, Kuthirolly S, Thampi MV, Hamza A, Anilkumar A, Nair KM, Sundaram KR, Kumar RK, *et al.* (2013) Cardiac spectrum, cytogenetic analysis and thyroid profile of 418 children with down syndrome from South

India: a cross-sectional study. *Indian J Pediatr* 81: 547-51. doi: 10.1007/s12098-013-1088-6.

Oster-Granite ML, Parisi MA, Abbeduto L, Berlin DS, Bodine C, Bynum D, Capone G, Collier E, Hall D, Kaeser L, *et al.* (2011) Down syndrome: National conference on patient registries, research databases, and biobanks. *Mol Genet Metabol* 114: 13-22. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.07.005.

Porpora M, Conte M, Lania G, Bellomo C, Rapacciuolo L, Chirido FG, Auricchio R, Troncone R, Auricchio S, Barone MV, *et al.* (2022) Inflammation Is Present, Persistent and More Sensitive to Proinflammatory Triggers in Celiac Disease Enterocytes. *Int J.Mol Sci* 23: 1973. doi: 10.3390/ijms23041973.

Santos RA, Costa LH, Linhares RC, Pradella-Hallinan M, Coelho FMS and Oliveira GP (2021) Sleep disorders in Down syndrome: a systematic review. View and Review. *Arq Neuropsiquiatr* 80: 424-443. doi: 10.1590/0004-282X-ANP-2021-0242.

Sönmez HE and Özen S (2017) A clinical update on inflammasomopathies. *Int Immunol* 29: 393–400. doi: 10.1093/intimm/dxx020.

Verstegen RHJ and Kusters MAA (2020) Inborn Errors of Adaptive Immunity in Down Syndrome. *J Clin Immunol* 40: 791–806. doi: 10.1007/s10875-020-00805-7.

Yaqoob M, Manzoor J, Hyder SN and Sadiq M (2019) Congenital heart disease and thyroid dysfunction in Down syndrome reported at Children's Hospital, Lahore, Pakistan. Turk J Pediat 61: 915-924. doi: 10.24953/turkjpedit.2019.06.013.

Internet Resources

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <https://omim.org/entry/190685> (September 6, 2023).

Table 1. Cytogenetic data of DS individuals.

Karyotypes	N (%)	Karyotypic group(%)
47,XY,+21	32 (47,1)	88,2%
47,XX,+21	28 (41,2)	
47,XY,+21/46,XY	3 (4,4)	
47,XX,+21/46,XX	1 (1,5)	
47,XY,+21/47,XXY	1 (1,5)	8,8%
47,XX,+mar[13]/47,XX,+21[9]/48,XX,+2mar[3]/49,XX,+3mar[2]/46,XX[3]	1 (1,5)	
46,XY,+21,der(21;22)(q10;q10)	1 (1,5)	
46,XY,+21,der(14;21)(q10;q10)	1 (1,5)	2,9%
Total	68	100%

Table 2. Serum levels of individuals with DS.

Individual	us-CRP (mg/dL)	TSH (μ UI/mL)	Free T4 (ng/dL)	HbA1c (%)	EMG (mg/dL)
1	0,05	6,46*	1,04	5,2%	103
2	0,02	2,95	1,11	5,3%	104
3	<0,02	4,14	1,23	5,5%	110
4	0,08	2,1	1,59	5,4%	109
5	0,19	1,45	0,92	5,1%	99
6	0,02	5,31*	0,86	4,5%	82
7	0,63*	5,38*	1,32	5,2%	102
8	0,79*	6,73*	1,44	8,0%	183*
9	0,41*	3,01	0,94	4,9%	95
10	0,17	49,32*	0,77*	5,0%	97
11	0,33*	3,11	1,16	5,3%	104
12	0,02	4	1,12	5,0%	97
13	0,95*	3,61	1,56	5,0%	96
14	0,55*	4,47*	1,13	5,6%	114
15	0,27*	2,97	1,14	5,8%	119
16	0,15	16,96*	1,04	4,6%	86
17	0,15	2,76	1,37	4,6%	86
18	0,19	11,65*	1,44	5,6%	115
19	0,11	4,18	1,21	5,2%	102
20	0,29*	9,35*	0,97	5,6%	115

* in us-CRP indicates that the levels corresponded to high risk for acute phase inflammatory diseases, and in the TSH, free T4 and EMG column that the value was outside the range of reference.

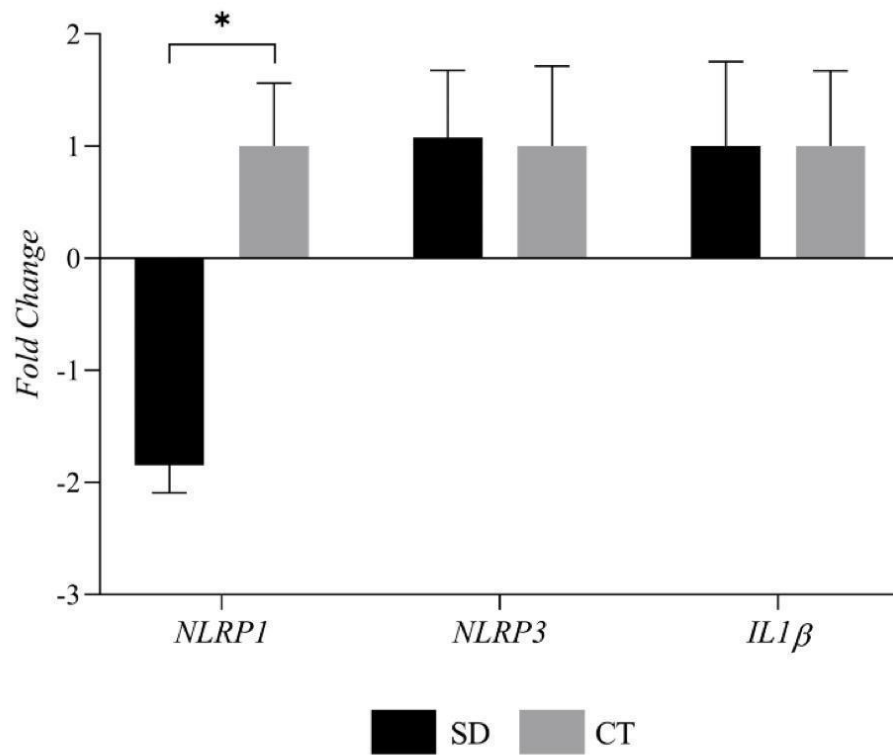


Figure 1. Expression profile of the *NLRP1* ($p < 0,0001$), *NLRP3* ($p = 0,5887$) and *IL1β* ($p = 0,2248$) genes in individuals with DS versus the healthy control group (CT).

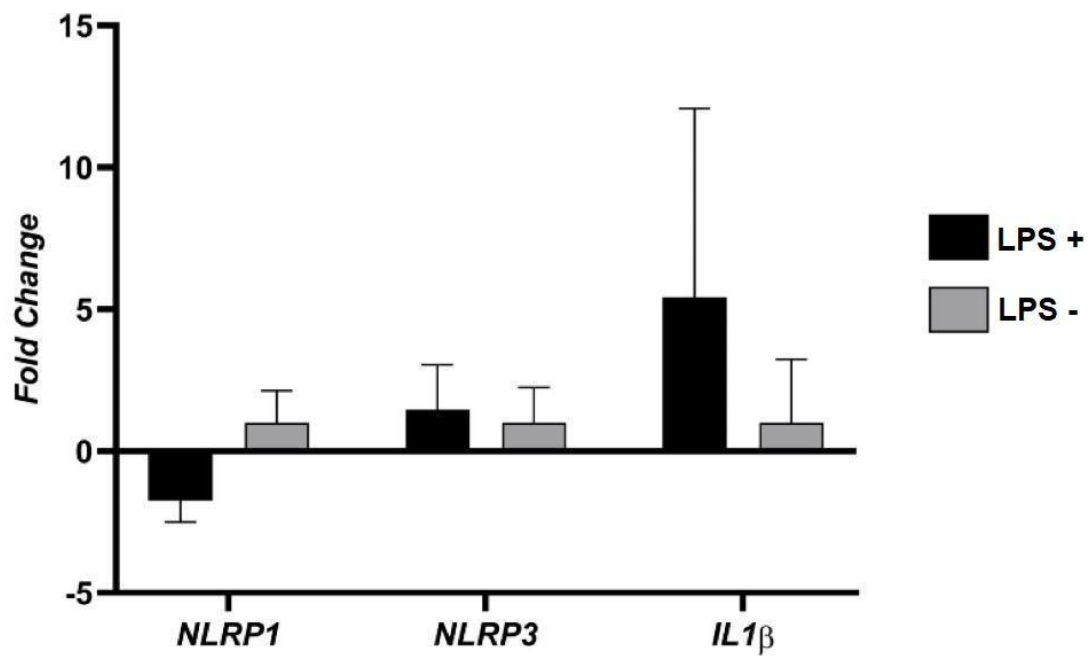


Figure 2. Expression profile of *NLRP1* ($p=0,1879$), *NLRP3* ($p=0,5889$) and *IL1β* ($p=0,0775$) genes in PBMCs from individuals with DS with (LPS+) and without (LPS-) LPS stimulation.

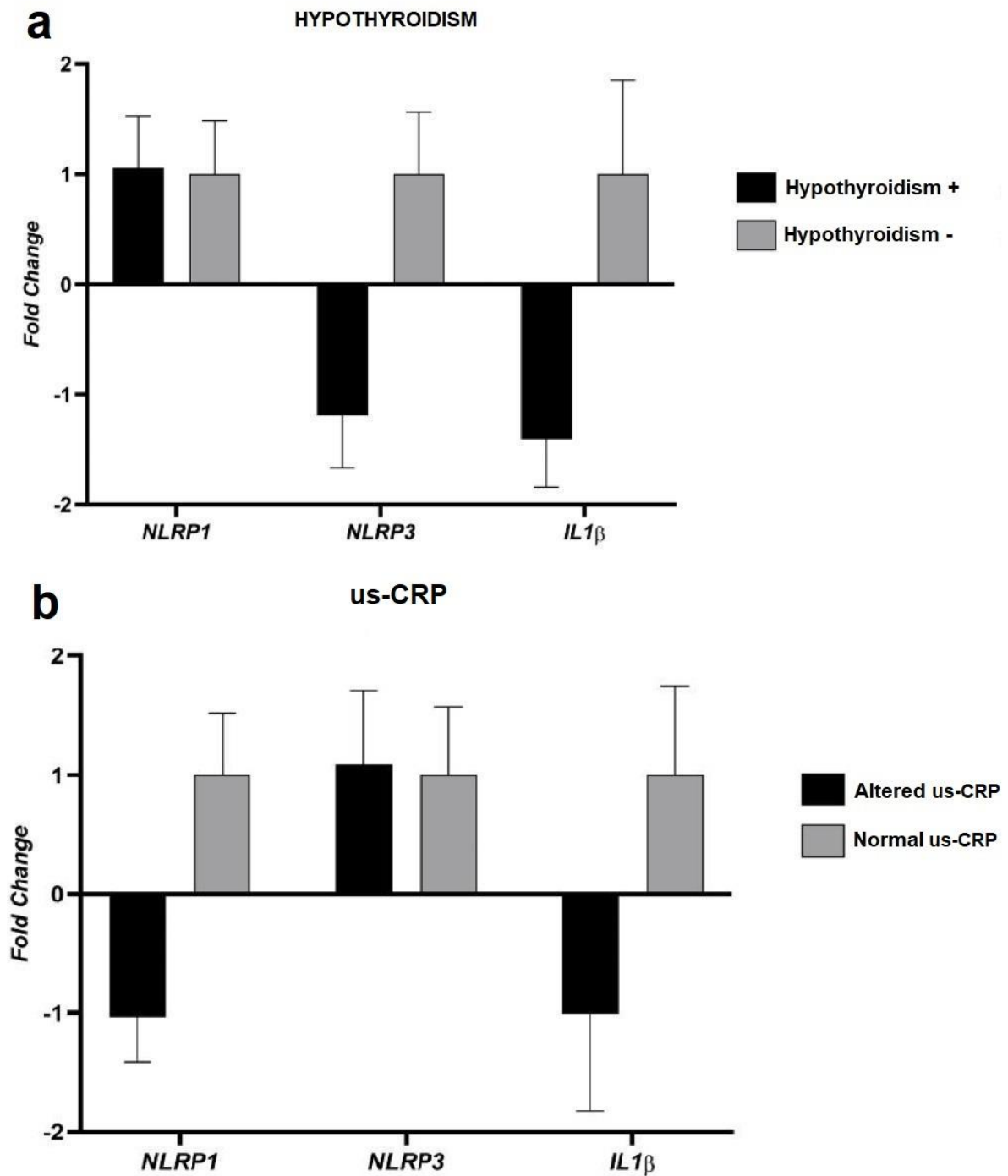


Figure 3. Expression profile of the *NLRP1*, *NLRP3* and *IL1β* genes. a) Individuals with DS with hypothyroidism versus without hypothyroidism: *NLRP1* ($p=0,7912$), *NLRP3* ($p=0,4785$) and *IL1β* ($p=0,3005$); b) Individuals with altered us-CRP versus individuals without changes in us-CRP: *NLRP1* ($p=0,8587$), *NLRP3* ($p=0,7384$) and *IL1β* ($p=0,9795$).

4 ARTIGO 2 - PERFIL DE EXPRESSÃO DOS GENES *CTLA-4* E *PTPN22* EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DE DOWN

Carla Fernandes dos Santos^{1‡}, Juliana Vieira de Barros Arcoverde^{1‡}, Aldianne Milene dos Santos Barbosa¹, Raysa Samanta Moraes Laranjeira¹, Thays Maria Costa de Lucena¹, Jaqueline de Azevêdo Silva^{1,2} and Neide Santos^{1*}

‡These authors contributed equally to this work.

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

²Instituto Keizo Asami – iLIKA, 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: neide.santos2@ufpe.br (NeideSantos)

Resumo

A síndrome de Down (SD) possui uma incidência estimada de 1:700 nascidos vivos. Os indivíduos com SD apresentam uma extensa desregulação do sistema imunológico, e isso favorece a predisposição a doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. No entanto, o mecanismo preciso que contribui para o desenvolvimento destas condições clínicas ainda não é bem compreendido. Estudos envolvendo genes com funções importantes na manutenção da homeostase do sistema imunológico, como o *CTLA-4* e *PTPN22* são numerosos na literatura, no entanto o perfil de expressão desses genes na SD ainda não foi avaliado. Nesse trabalho, avaliamos o perfil de expressão dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* em indivíduos com SD. Um total de 68 indivíduos foram cariotipados, 60 apresentavam trissomia livre (88,2%). A expressão relativa do *CTLA-4* e do *PTPN22* no sangue periférico de 20 indivíduos com SD e 15 controles saudáveis foi determinada por qPCR. Uma comparação da expressão gênica também foi realizada entre indivíduos com SD estratificados com base na presença de hipotireoidismo e nos níveis de Proteína C reativa ultrassensível (PCR-us). Nos indivíduos com SD, nenhuma diferença significativa foi encontrada na expressão do *PTPN22* (FC: +1,17; p=0,8804) em relação aos controles, mas houve uma expressão significativamente menor do *CTLA-4* (FC: -1,49; p=0,0047). A expressão reduzida do *CTLA-4* sugere uma provável contribuição para o desequilíbrio imunológico na SD devido à sua função ineficiente.

Palavras-chave: Síndrome de Down; mRNA; Expressão gênica; Autoimunidade.

Introdução

A síndrome de Down (SD) é um distúrbio genético causado por uma trissomia parcial ou completa do cromossomo 21 (Franceschi *et al.*, 2019). Ela está entre as condições genéticas mais complexas e a aneuploidia autossômica mais frequente compatível com a sobrevivência humana, com uma incidência estimada de 1:700 nascidos vivos (Antonarakis, 2016; Paz-Y-Miño *et al.*, 2020). O cariótipo mais prevalente na síndrome é a trissomia livre, mas podem ser observados outros cariótipos, como mosaïcismo cromossômico ou, alterações estruturais envolvendo o cromossomo 21, como translocações Robertsonianas (Antonarakis *et al.*, 2020).

Os indivíduos com a síndrome apresentam uma variedade de manifestações clínicas que podem afetar múltiplos sistemas, principalmente os sistemas musculoesquelético, cardiovascular e neurológico (Antonarakis *et al.*, 2020). Além disso, nesses indivíduos, os distúrbios endócrinos, como disfunção da tireoide, baixa densidade óssea, diabetes, baixa estatura, infertilidade e propensão a sobrepeso/obesidade são muito mais comuns que na população em geral (Whooten *et al.*, 2018).

Entre as anormalidades endócrinas, as disfunções tireoidianas são as mais comuns que coexistem em crianças com SD e foram relatadas em até 28% a 40% dos indivíduos, com frequência aumentando com a idade em até 54% (Szeliga *et al.*, 2022). Dentre essas disfunções, o hipotireoidismo subclínico é a apresentação mais frequente em crianças com SD (Szeliga *et al.*, 2022). Em relação às doenças autoimunes da tireoide, a tireoidite de Hashimoto (TH) é mais comum que a doença de Graves (Amr, 2018; Whooten *et al.*, 2018; Mulu; Fantahun, 2022).

A SD é a síndrome genética mais frequentemente associada à desregulação imune (Cruz *et al.*, 2009) e os indivíduos apresentam taxas de doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas, como doenças autoimunes da tireoide, diabetes mellitus tipo 1 e obesidade, de aproximadamente quatro a seis vezes maior do que a população em geral (Ferrari. Stagi, 2021).

Os fenótipos resultantes da SD estão relacionados à superexpressão dos genes localizados no cromossomo 21, resultando em interações desequilibradas com outros genes, o que pode levar à desregulação da expressão de genes que não estão no cromossomo 21 (Asim *et al.*, 2015).

Os genes Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (*CTLA-4*) e o Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 gene (*PTPN22*) atuam como importantes reguladores negativos da resposta imune. O primeiro é um regulador crucial da homeostase e da autotolerância das células T e sua expressão e função biológica são importantes para a regulação negativa das respostas dessas células (Mitsuiki *et al.*, 2018). Enquanto o *PTPN22* atua como regulador negativo da sinalização dos receptores de células T e B (Armitage; Wallet; Mathews, 2021).

Há vários estudos mostrando que alterações na expressão dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* podem estar associadas a doenças autoimunes e/ou inflamatórias na população em geral, porém não há estudos avaliando o perfil de expressão desses genes em indivíduos com SD, mesmo eles sendo mais susceptíveis a essa categoria de doenças. Diante disso, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o perfil de expressão desses genes em indivíduos com SD, com o intuito de aprofundar nossa compreensão de sua suscetibilidade a doenças autoimunes e inflamatórias. Além disso, esperamos contribuir para o avanço do conhecimento sobre os mecanismos que ligam a SD a essas condições patológicas, buscando proporcionar novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais eficazes.

Materiais e métodos

Pacientes e controles

Os indivíduos com SD foram recrutados do Grupo Universitário de Reabilitação Infantil (GURI) e de um grupo formado por pais e responsáveis de indivíduos com SD. Nosso estudo envolveu uma amostra composta por 68 indivíduos com SD. Dentre estes, 20 indivíduos foram incluídos no ensaio de expressão gênica, com idade média de 10,9 anos (idades variaram de 8 a 14 anos).

O grupo controle saudável (CT) foi composto por 15 crianças e adolescentes, com idade média de 11,7 anos (variação de 8 a 14 anos). Esses participantes não tinham SD e não tinham história prévia de doenças autoimunes ou inflamatórias crônicas. Todos os indivíduos do estudo são procedentes do estado de Pernambuco (PE).

Nosso estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (nº 32478820.0.0000.5208). Todos os responsáveis legais dos indivíduos que participaram desta pesquisa forneceram seu consentimento informado mediante

assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os participantes contribuíram voluntariamente para a pesquisa.

Cultura de linfócitos e bandeamento G

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir de culturas de linfócitos, sendo analisadas cerca de 20 metáfases com bandeamento G para cada indivíduo e, no caso do mosaicismos cromossômico, foram analisadas cerca de 30 metáfases por indivíduo. Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) de 2020. A coleta de material biológico de indivíduos com SD e o CT ocorreu entre agosto de 2021 a julho de 2023.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi isolado do sangue periférico utilizando o reagente Trizol® de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, foi realizada a quantificação do RNA utilizando o equipamento NanoDrop™, por espectrofotometria, para avaliar tanto a concentração total quanto a pureza do RNA. As amostras de RNA isoladas foram armazenadas em freezer a -80°C para preservação.

A síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando uma concentração padrão de RNA de 500 ng, foi realizada com o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (ThermoFisher).

Ensaio de expressão gênica

O ensaio de expressão foi realizado utilizando sondas fluorogênicas do tipo Taqman® para os genes alvo *CTLA-4* (Hs.00175480) e *PTPN22* (Hs.01587526). A expressão relativa dos genes alvo foi normalizada empregando os genes endógenos EF1A (F-GAGGCTGCTGAGATGGGAAA e R-CGTTACGCTCAGCTTTTCAG) e HPRT1 (F-ACAGACTGAACGTCTTGCT e R-GAGCACACAGAGGGCTACAA). Esses genes endógenos foram utilizados pela metodologia Sybr Green, selecionados com base na estabilidade de expressão demonstrada no sangue periférico e determinada com base no Genorm. A análise da expressão relativa foi realizada utilizando o fator de normalização.

Avaliações laboratoriais clínicas

Todos os indivíduos que participaram do ensaio de expressão gênica foram submetidos a exames bioquímicos em laboratório especializado. Esses exames abrangeram a avaliação de vários parâmetros, incluindo: níveis ultrasensíveis de hormônio estimulador da tireoide (TSH) e T4 livre (tiroxina livre), para detecção de distúrbios da tireoide; Medições de hemoglobina glicada (HbA1c) e glicose média estimada (EMG), que fornecem informações sobre diabetes; e dosagem de Proteína C Reativa Ultrasensível (us-CRP), um marcador de inflamação.

Em relação aos níveis de PCR-us, os valores de referência para categorização de risco foram os seguintes: Baixo risco: $<0,1\text{mg/dL}$; Risco médio: $0,1$ a $0,2\text{mg/dL}$; Alto risco: $>0,2\text{mg/dL}$; Risco muito alto: $>1\text{mg/dL}$ e Doenças inflamatórias de fase aguda: $\geq 1\text{mg/dL}$. Esses intervalos de referência permitiram a classificação dos indivíduos com base no risco de inflamação.

As doenças da tireoide foram definidas e classificadas com base nos seguintes critérios: hipotireoidismo subclínico (HS), para casos em que os indivíduos apresentavam níveis “altos” de TSH, mantendo níveis normais de T4 livre no momento do diagnóstico ou sem medicação, e Hipotireoidismo evidente (HE), para casos que apresentam níveis “altos” de TSH juntamente com níveis “baixos” de T4 livre em qualquer momento. A categorização em “alto” e “baixo” foi determinada com base em faixas de referência individuais normais, com os seguintes valores de referência: faixa de TSH de $0,30$ a $4,20\text{ }\mu\text{IU/mL}$ e níveis de T4 livre entre $0,82$ a $1,62\text{ ng/dL}$.

O diagnóstico de diabetes mellitus foi definido quando os valores de referência laboratoriais para hemoglobina glicada e glicose média estimada igualaram ou excederam $6,5\%$ e 126 mg/dL , respectivamente.

Análise estatística

Os ensaios de expressão gênica foram realizados em duplicata técnica e os resultados foram apresentados como médias de grupo e desvios padrão. A análise estatística e os gráficos foram realizados no software GraphPad, versão 8.0.0. Para verificar a distribuição das amostras foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk.

Nas análises normalizadas foram aplicados testes paramétricos como teste T de Student ou One-Way ANOVA, enquanto testes não paramétricos, teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, foram aplicados nos dados não normalizados. Foi adotado nível de significância $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95% .

Resultados

Análise citogenética

Todos os 68 indivíduos clinicamente diagnosticados com SD tiveram os cariótipos confirmados pelo bandejamento G (Tabela 1). O cariótipo mais frequente foi a trissomia livre do cromossomo 21, presente em 88,2% dos indivíduos, os outros cariótipos apresentaram mosaicismos cromossômicos (8,8%) e translocação Robertsoniana (2,9%).

Tabela 1. Caracterização citogenética dos indivíduos com SD.

Cariótipos	N (%)	Grupo cariotípico
47,XY,+21	32 (47,1)	88,2%
47,XX,+21	28 (41,2)	
47,XY,+21/46,XY	3 (4,4)	8,8%
47,XX,+21/46,XX	1 (1,5)	
47,XY,+21/47,XXY	1 (1,5)	
47,XX,+mar/47,XX,+21/48,XX,+2mar/49,XX,+3mar/46,XX	1 (1,5)	
46,XY,+21,der(21;22)(q10;q10)	1 (1,5)	2,9%
46,XY,+21,der(14;21)(q10;q10)	1 (1,5)	
Total	68 (100)	100%

Exames bioquímicos e achados clínicos

Por meio dos exames bioquímicos realizados nos 20 indivíduos com SD, observamos que as doenças endócrinas foram diagnosticadas em 50% dos indivíduos. O hipotireoidismo (doença da tireoide) foi observado em 45% dos indivíduos. E um indivíduo apresentou diagnóstico de diabetes mellitus (DM) (Tabela 2).

Tabela 2. Doenças endócrinas dos indivíduos com SD.

Clínica da SD	N	%
Sem doenças endócrinas identificadas	10	50
Doenças endócrinas		
DM	1	5
Doenças da tireoide		
HS	8	40
HE	1	5
Total	20	100

hipotireoidismo subclínico; HE, hipotireoidismo evidente; DM, diabetes mellitus.

Na tabela 3 estão disponíveis os níveis séricos individuais de PCR-us, TSH, T4 livre, HbA1c e GME dos 20 indivíduos com SD. Em relação à dosagem da PCR-us, 8 indivíduos (40%) apresentaram alto risco para doenças inflamatórias de fase aguda, com valores variando de 0,27 mg/dL a 0,95 mg/dL e média de 0,5 mg/dL $\pm$ 0,23.

Tabela 3. Níveis séricos individuais dos pacientes com SD.

Indivíduos	PCR-us (mg/dL)	TSH (μ UI/mL)	T4 livre (ng/dL)	HbA1c (%)	GME (mg/dL)
1	0,05	6,46*	1,04	5,2%	103
2	0,02	2,95	1,11	5,3%	104
3	<0,02	4,14	1,23	5,5%	110
4	0,08	2,1	1,59	5,4%	109
5	0,19	1,45	0,92	5,1%	99
6	0,02	5,31*	0,86	4,5%	82
7	0,63*	5,38*	1,32	5,2%	102
8	0,79*	6,73*	1,44	8,0%	183
9	0,41*	3,01	0,94	4,9%	95
10	0,17	49,32*	0,77*	5,0%	97
11	0,33*	3,11	1,16	5,3%	104
12	0,02	4	1,12	5,0%	97
13	0,95*	3,61	1,56	5,0%	96
14	0,55*	4,47*	1,13	5,6%	114
15	0,27*	2,97	1,14	5,8%	119
16	0,15	16,96*	1,04	4,6%	86
17	0,15	2,76	1,37	4,6%	86
18	0,19	11,65*	1,44	5,6%	115
19	0,11	4,18	1,21	5,2%	102
20	0,29*	9,35*	0,97	5,6%	115

* na PCR-us indica que os níveis foram correspondentes a alto risco para doenças inflamatórias de fase aguda, e na coluna do TSH e T4 livre que o valor estava fora do intervalo de referência.

Ao avaliarmos os valores de PCR-us com relação aos valores de TSH (Gráfico 1) e GME (Gráfico 2) dos 20 indivíduos, não observamos correlação estatisticamente significativa.

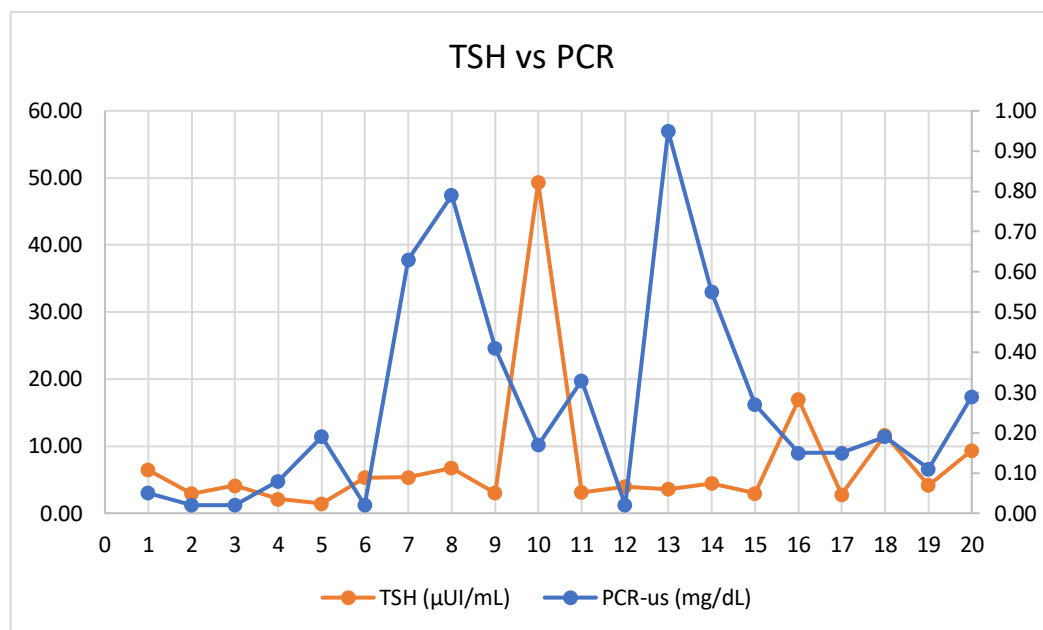


Gráfico 1. Correlação entre os níveis de PCR-us e TSH de 20 indivíduos com SD.

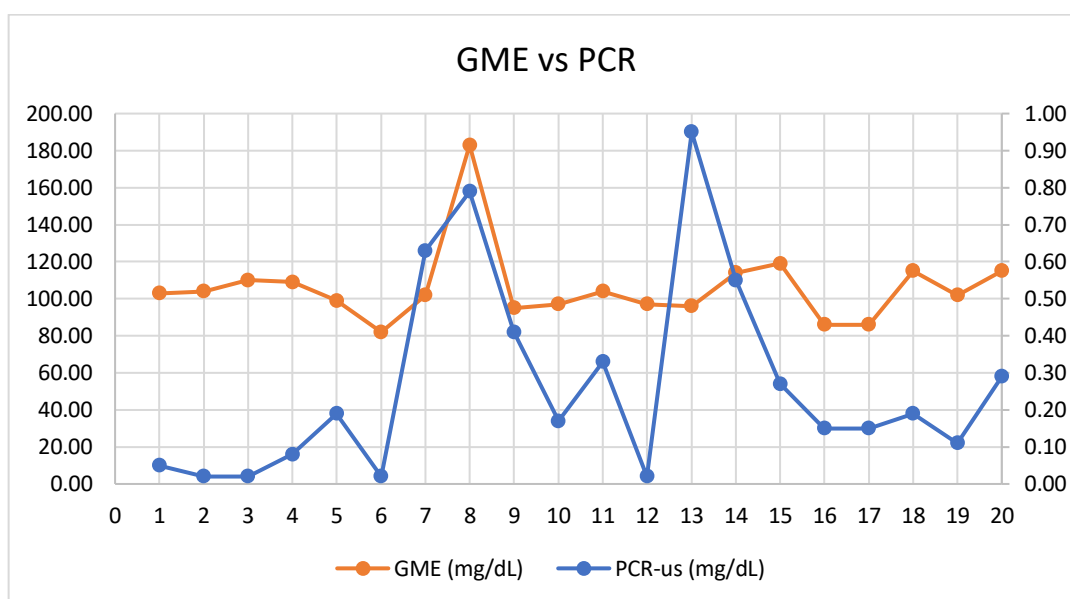


Gráfico 2. Correlação entre os níveis de PCR-us e GME de 20 indivíduos com SD.

Ensaio de expressão dos genes *CTLA-4* e *PTPN22*

Ao compararmos os níveis de mRNA dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* em indivíduos com SD (n=20) e nos controles saudáveis (n=15), observamos uma regulação negativa do gene *CTLA-4* de $-1,49$ vezes (FC) nos indivíduos com SD ($p=0,0047$). O gene *PTPN22* apresentou uma regulação positiva de $1,17$ nos

indivíduos com SD em relação aos controles, porém não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p=0,8804$) (Figura 1).

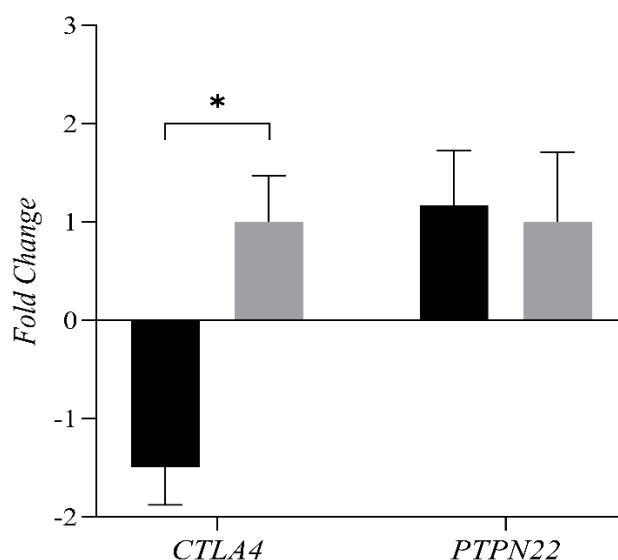


Figura 1. Expressão dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* em indivíduos com SD e controles saudáveis (CT). O asterisco (*) indica que o valor-p foi estatisticamente significativo ($p<0.05$).

Ensaio de expressão dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* em relação à presença de hipotireoidismo e à dosagem da PCR-us

Ao analisar a expressão gênica estratificando a amostra SD ($n=20$) em relação ao hipotireoidismo, ou seja, um grupo caso de indivíduos com hipotireoidismo ($n=9$) e um grupo controle sem hipotireoidismo ($n=11$), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão de ambos os genes (Figura 2).

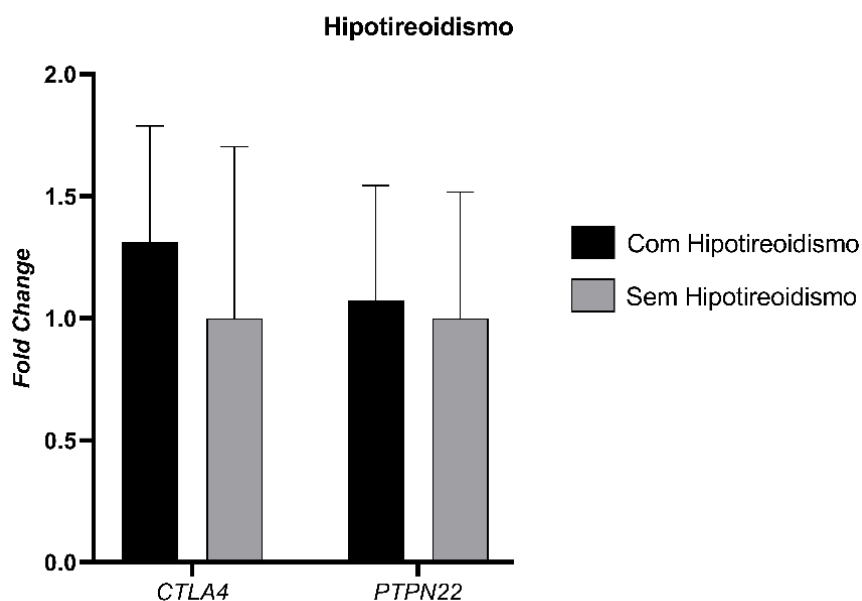


Figura 2. Expressão dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* em indivíduos com SD e hipotireoidismo vs indivíduos com SD sem hipotireoidismo. Sem diferenças estatísticas significativas.

Realizamos também uma segunda estratificação da amostra SD para compararmos a expressão gênica em relação aos níveis de PCR-us referente ao alto risco para desenvolvimento de doenças inflamatórias de fase aguda (n=8) e indivíduos com dosagem da PCR-us de médio a baixo risco (de acordo com os valores de referência) (n=12), e novamente não observamos diferenças estatisticamente significativas (Figura 3).

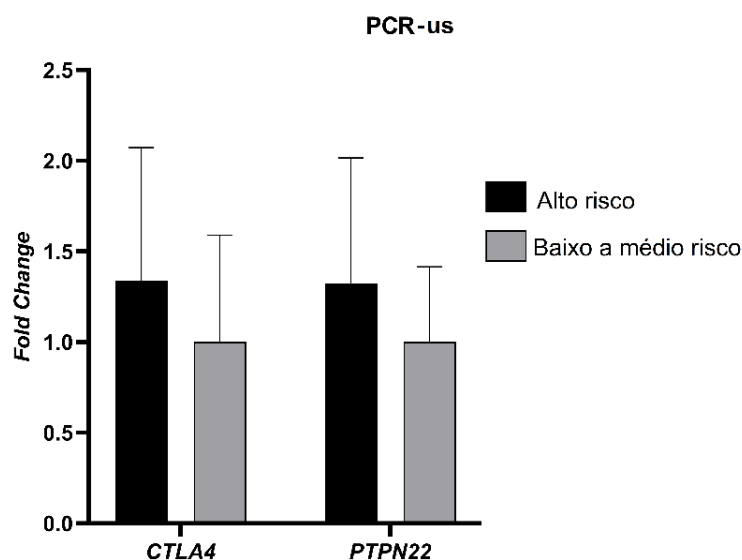


Figura 3. Expressão dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* em indivíduos com SD e dosagem da PCR-us para alto risco vs indivíduos com SD e dosagem da PCR-us para baixo a médio risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias de fase aguda. Sem diferenças estatísticas significativas.

Discussão

Em nossos resultados, a trissomia livre do cromossomo 21 estava presente em 88,2% dos casos. Contudo, encontramos uma frequência de mosaicismos cromossômico de 8,8%, sendo maior do que geralmente é relatada (Vičić *et al.*, 2017; Jaiswal; Kumar; Rai, 2021). Esses achados são congruentes com os relatados por Chandra *et al.* (2010), em um estudo envolvendo 1.020 indivíduos com SD, no qual, 83,8% dos cariótipos apresentaram trissomia livre, 10,8% mosaicismos cromossômico e 5% translocações Robertsonianas. Com base nisso, pode-se inferir que diferenças na frequência dessas duas formas clássicas, menos predominantes da SD, podem não estar necessariamente relacionadas ao tamanho da amostra.

No presente estudo, 45% dos indivíduos avaliados apresentaram hipotireoidismo, sendo cinco do sexo feminino e quatro do sexo masculino. Em uma análise retrospectiva de registros conduzidos por Pierce, Lafranchi e Pinter (2017), foi observado que a ocorrência da doença da tireoide na SD era mais comum e se manifestava em uma idade mais precoce do que na população em geral, além de ser frequentemente transitória e não relacionada ao sexo, obesidade ou outras comorbidades.

A prevalência de HS em crianças com SD é maior do que na população pediátrica saudável em geral, com frequência relatada de até 81,8% (Szeliga *et al.*, 2022). Esse dado está de acordo com nossos resultados, visto que o HS foi o distúrbio da tireoide mais prevalente, presente em 40,9% dos indivíduos com SD. De acordo com a literatura, grande parte do HS na SD não está relacionado à autoimunidade, sendo recomendada a verificação de anticorpos antitireoidianos apenas em casos selecionados (Pierce; Lafranchi; Pinter, 2017; Pepe *et al.*, 2020; Szeliga *et al.*, 2022).

A Proteína C Reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda e sua concentração plasmática aumenta durante condições inflamatórias, como em resposta a lesão ou em doenças inflamatórias crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e autoimunes (Yao; Zhang; Wu, 2019). Ao comparar a expressão dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* e os níveis da PCR-us, não observamos uma diferença significativa em nenhum dos genes. A mesma comparação entre indivíduos SD com e sem hipotireoidismo também não revelou diferença significativa na expressão gênica.

Até o momento, poucos ensaios foram realizados envolvendo genes ligados à imunidade inata e adaptativa em indivíduos com SD, embora a resposta imune seja desregulada neles (Ferrari; Stagi, 2021; Faizi *et al.*, 2023a; Faizi *et al.*, 2023b). Na literatura existem estudos sobre ensaios de expressão dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* na população em geral. Porém, até agora, só há dois estudos envolvendo polimorfismos dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* em indivíduos SD (Faizi *et al.*, 2023a; Faizi *et al.*, 2023b). Portanto, este é o primeiro trabalho que investigou o perfil de expressão desses genes em indivíduos com SD.

Reduções mais sutis na expressão ou função do gene *CTLA-4* podem determinar a suscetibilidade a doenças autoimunes comuns, visto que o *CTLA-4* é um importante regulador negativo da resposta imune mediada por células T e a expressão e a função biológica dele são importantes para a regulação negativa dessas células (Anjos *et al.*, 2002; Hosseini *et al.*, 2020). Em nosso estudo, o *CTLA-4* foi 1,49 vezes menos expresso nos indivíduos com SD do que nos controles ($p=0,0047$). Assim, pode-se presumir que a regulação negativa do *CTLA-4* possivelmente contribui para o desequilíbrio imunológico frequentemente relatado na síndrome.

Níveis de mRNA significativamente baixos de *CTLA-4* foram relatados em pacientes com hipotireoidismo autoimune em comparação com os controles (Patel *et al.*, 2016). Segundo os autores, a regulação negativa foi influenciada por polimorfismos +49A/G e 3' UTR CT60A/G do gene *CTLA4*, sugerindo que variantes

genéticas podem levar à desregulação das expressões de *CTLA-4* em pacientes com hipotireoidismo autoimune e apoiam a patogênese autoimune da doença.

Por outro lado, Zahiri *et al.* (2022) relataram expressão de *CTLA-4* nas células T significativamente maiores em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) do que nos controles saudáveis ($P < 0,0001$). Porém, em outro trabalho similar, foi demonstrado que a capacidade do *CTLA-4* de regular a sinalização e proliferação de células T lúpicas foi prejudicada, sendo esse defeito associado à exclusão de *CTLA-4* dos microdomínios lipídicos, o que poderia explicar a sua perda de função nas células T de pacientes com LES (Jury *et al.*, 2010).

Neste trabalho, os indivíduos com SD mostraram níveis de expressão de mRNA do *PTPN22* 1,17 vezes maior que o CT, porém essa expressão não diferiu significativamente ($p = 0,8804$). Sendo assim, a expressão gênica do *PTPN22* não parece estar relacionada com a susceptibilidade de doenças autoimunes/inflamatórias em indivíduos com SD.

A expressão de *PTPN22* foi associada a doenças autoimunes. Níveis de expressão de mRNA de *PTPN22* foram semelhantes em pacientes inativos com LES e controles saudáveis, porém em pacientes com exacerbação grave a expressão foi quase esgotada, sugerindo que Lyp (proteína codificada pelo gene *PTPN22*) desempenha um importante papel regulador e sua ausência contribui para a resposta inflamatória e atividade da doença no LES (Machado-Contreras *et al.*, 2015). Em uma coorte de pacientes egípcios com AR foi observada uma significativa expressão negativa de *PTPN22* e positiva de *CTLA-4* em comparação aos controles saudáveis ($P = 0,0001$ e $P = 0,005$, respectivamente) (Abdelnaby *et al.*, 2022).

Devido à função exercida pelo *CTLA-4* no sistema imunológico, a sua expressão reduzida nos indivíduos com SD sugere uma provável contribuição para o desequilíbrio imunológico frequentemente relatado na síndrome. Em razão de ser a primeira vez que se observa uma relação entre a expressão do *CTLA-4* e a SD, são necessárias mais pesquisas para garantir a precisão desse resultado. Estudos futuros em outras coortes com SD que investiguem a influência de genes reguladores imunológicos, como o *CTLA-4* e o *PTPN22*, serão importantes para estabelecer uma melhor compreensão das possíveis interações gênicas na síndrome e do que poderia levar a uma expressão diferencial observada do gene *CTLA-4* nesses indivíduos, bem como uma possível associação da expressão com doenças autoimunes.

Referências

ABDELNABY, M. M.; BADRAN, D. I.; ANANI, M, M.; HASHEM, A. A.; MONEIM, N. H. A.; ELDESOUKI, R. E.; ELMEDANY, S. H.; HOSNY, M. M. Three key genes expression profiling in Egyptian rheumatoid arthritis patients. **The Egyptian Journal of Immunology**, v. 29, n. 3, p. 19-28, 2022.

AMR, N. H. Thyroid disorders in subjects with Down syndrome: an update. **Acta Bio Medica: Atenei Parmensis**, v. 89, n. 1, p. 132, 2018. doi: 10.23750/abm.v89i1.7120.

ANJOS, S.; NGUYEN, A.; OUNISSI-BENKALHA, H.; TESSIER, M.; POLYCHRONAKOS, C. A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46478-46486, 2002. doi:10.1074/jbc.M206894200

ANTONARAKIS, S. E. Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 3, p. 147-163, 2016. doi: 10.1038/nrg.2016.154

ANTONARAKIS, S. E. Down syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 9, 2020. Doi: 10.1038/s41572-019-0143-7.

ARMITAGE, L. H.; WALLET, M. A.; MATHEWS, C. E. Influence of *PTPN22* Allotypes on Innate and Adaptive Immune Function in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 636618, 2021. doi:10.3389/fimmu.2021.636618

ASIM, A.; KUMAR, A.; MUTHUSWAMY, S.; JAIN, S.; AGARWAL, S. Down syndrome: an insight of the disease. **Journal of biomedical science**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2015. doi:10.1186/s12929-015-0138-y

CHANDRA, N.; CYRUS C; PREMA L; NALLASIVAM, P.; RAMESH, A.; GOPINATH P. M.; MARIMUTHU, K. M. Cytogenetic Evaluation of Down Syndrome: A Review of 1020 Referral Cases. **International Journal of Human Genetics**, v. 1-3, pág. 87-93, 2010. Doi: 10.1080/09723757.2010.11886090

CRUZ, N. V.; MAHMOUD, S. A.; CHEN, H.; LOWERY-NORDBERG, M.; BERLIN, K.; BAHNA, S. L. Follow-up study of immune defects in patients with dysmorphic disorders. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 102, n. 5, p. 426-431, 2009. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60516-9.

FAIZI, M.; ROCHMAH, N.; HISBIYAH, Y.; PERWITASARI, R. K.; PUTRI, Q. A. N.; BASUKI, S.; ENDARYANTO, A.; SOETJIPTO, S. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 +49A/G polymorphism in Down syndrome children with Hashimoto's thyroiditis. **Biomolecules and Biomedicine**. 2023a. doi:10.17305/bb.2022.7869

FAIZI, M.; ROCHMAH, N.; SOETJIPTO, S.; ENDARYANTO, A.; BASUKI, S.; HISBIYAH, Y.; PERWITASARI, R. K. Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T gene polymorphism in children with down syndrome and autoimmune thyroid diseases. **La Pediatria Medica e Chirurgica**. v. 45, n. 283. 2023b. doi: 10.4081/pmc.2023.283.

FERRARI, M.; STAGI, S. Autoimmunity and genetic syndromes: a focus on Down syndrome. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 268, 2021. doi:10.3390/genes12020268

FRANCESCHI, C.; GARAGNANI, P.; GENSOUS, N.; BACALINI, M. G.; CONTE, M.; SALVIOLI, S. Accelerated bio-cognitive aging in Down syndrome: State of the art and possible deceleration strategies. **Aging cell**, v. 18, n. 3, p. e12903, 2019. doi:10.1111/accel.12903

HOSSEINI, A.; GHARIBI, T.; MAROFI, F.; BABALOO, Z.; BARADARAN, B. CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. **International immunopharmacology**, 80:106221, 2020. doi:10.1016/j.intimp.2020.106221

ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020). Edited by Jean McGowan-Jordan, Ros J. Hastings, Sarah Moore. S.Karger AG. 2020. doi: 10.1159/isbn.978-3-318-06867-2

JAISWAL, S. K.; KUMAR, A.; RAI A. K. Molecular Cytogenetic Classification of Down Syndrome and Screening of Somatic Aneuploidy in Mothers. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 161, n. 8-9, p. 397-405, 2021. doi: 10.1159/000519624.

JURY, E. C.; FLORES-BORJA, F.; KALSI, H. S.; LAZARUS, M.; ISENBERG, D. A.; MAURI, C.; EHRENSTEIN, M. R. Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. **European journal of immunology**, v. 40, n. 2, p. 569-578, 2010. doi:10.1002/eji.200939781

MACHADO-CONTRERAS, J. R.; MUÑOZ-VALLE, J. F.; CRUZ, A.; SALAZAR-CAMARENA, D. C.; MARÍN-ROSALES, M.; PALAFOX-SÁNCHEZ, C. A. Distribution of *PTPN22* polymorphisms in SLE from western Mexico: correlation with mRNA expression and disease activity. **Clinical and experimental medicine**, v. 16, p. 399-406, 2015. doi: 10.1007/s10238-015-0359-0

MITSUIKI, N.; SCHWAB, C.; GRIMBACHER, B. What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system?. **Immunological reviews**, v. 287, n. 1, p. 33-49, 2018. doi:10.1111/imr.12721

MULU, B.; FANTAHUN, B. Thyroid abnormalities in children with Down syndrome at St. Paul's hospital millennium medical college, Ethiopia. **Endocrinology, Diabetes & Metabolism**, v. 5, n. 3, p. e00337, 2022. doi: 10.1002/edm2.337.

PATEL, H.; MANSURI, M. S.; SINGH, M.; BEGUM, R.; SHASTRI, M.; MISRA, A. Association of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (*CTLA4*) and thyroglobulin (TG) genetic variants with autoimmune hypothyroidism. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0149441, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0149441

PAZ-Y-MIÑO, C.; YUMICEBA, V.; MORETA, G.; PAREDES, R.; RUIZ, M.; OCAMPO, L.; PANEQUE, A. L.; PÉREZ, C. O.; RUIZ-CABEZAS J. C.; VIDAL, J. A. *et al.* Multi-institutional experience of genetic diagnosis in Ecuador: National registry of chromosome alterations and polymorphisms. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 8, n. 2, p. 1–14, 2020. doi: 10.1002/mgg3.1087

PEPE, G.; CORICA, D.; SANCTIS, L.; SALERNO, M.; FAIENZA, M. F.; TESSARIS, D.; TULI, G.; SCALA, I.; PENTA, L.; ALIBRANDI, A. *et al.* Prospective evaluation of autoimmune and non-autoimmune subclinical hypothyroidism in Down syndrome children. **European Journal of Endocrinology**, v. 182, n. 4, p. 385-392, 2020. doi: 10.1530/EJE-19-0823.

PIERCE, M. J.; LAFRANCHI, S. H.; PINTER, J. D. Characterization of thyroid abnormalities in a large cohort of children with Down syndrome. **Hormone research in paediatrics**, v. 87, n. 3, p. 170-178, 2017. doi: 10.1159/000457952.

SZELIGA, K.; ANTOSZ, A.; SKRZYNSKA, K.; KALINA-FASKA, B.; JANUSZEK-TRZCIAKOWSKA, A.; GAWLIK, A. Subclinical Hypothyroidism as the Most Common Thyroid Dysfunction *Status* in Children with Down's Syndrome. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 782865, 2022. doi: 10.3389/fendo.2021

VIČIĆ, A.; HAFNER, T.; VLATKOVIĆ, I. B.; KORAĆ, P.; HABEK, D.; STIPOLJEV, F. Prenatal diagnosis of Down syndrome: A 13-year retrospective study. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 6, p. 731-735, 2017. doi:10.1016/j.tjog.2017.10.004

WHOOTEN, R.; SCHMITT, J.; SCHWARTZ, A. Endocrine manifestations of Down syndrome. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 25, n. 1, p. 61, 2018. doi:10.1097/MED.0000000000000382

YAO, Z.; ZHANG, Y.; WU, H. Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation. **Inflammation Research**, v. 68, p. 815-823, 2019. doi: 10.1007/s00011-019-01269-1

ZAHIRI, L.; MALEKMAKAN, L.; MASJEDI, F.; HABIBAGAH, Z.; HABIBAGAH, M. Association Between *IL-17A*, *FOXP3*, and *CTLA4* Genes Expression and Severity of Lupus Nephritis. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 16, n. 1, 2022. doi: 10.52547/ijkd.6537

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A percentagem de 88,2% de casos de trissomia livre na amostra do nosso estudo foi ligeiramente inferior aos 95% comumente relatados na literatura (Oster-Granite *et al.*, 2011; Coppede, 2016; Bull, 2020). Porém, em um estudo realizado por Chandra *et al.* (2010) que envolvia 1.020 indivíduos com SD, 83,8% dos cariótipos apresentaram trissomia livre. Esta variação pode ser explicada pelas diferenças na prevalência de nascimentos, que dependem da idade materna, bem como pela prática de diagnóstico pré-natal da SD seguida de interrupção das gestações afetadas (Yaqoob *et al.*, 2019).

Em relação à expressão dos genes *NLRP1*, *NLRP3*, *IL-1 β* , *CTLA-4* e *PTPN22* em leucócitos totais de indivíduos com SD, encontramos uma regulação negativa de *NLRP1* e *CTLA-4* quando comparado com o grupo controle saudável e foram os únicos que apresentaram significância estatística. O gene *NLRP1* apresentou a diferença de expressão mais pronunciada em relação ao grupo controle saudável. A regulação negativa de *NLRP1* e *CTLA-4* e a regulação positiva dos genes *NLRP3*, *IL-1 β* e *PTPN22* podem indicar uma resposta imune desequilibrada em indivíduos com SD. Além disso, a regulação positiva dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* pode afetar a inflamação crônica, afetando potencialmente a função do sistema endócrino, possivelmente contribuindo para problemas metabólicos como obesidade, resistência à insulina e diabetes.

De acordo com Verstegen e Kusters (2020), dado que todos os aspectos do sistema imunológico em indivíduos com SD apresentam alterações em algum grau, a comunicação celular interrompida pode desempenhar um papel na diminuição da função e na desregulação da expressão gênica. Consequentemente, o efeito direto desta expressão desregulada pode influenciar vias intracelulares, afetando processos celulares fundamentais como a divisão celular e a função mitocondrial, além daqueles que são específicos das células do sistema imunológico.

Em relação ao do perfil de expressão dos genes do inflamassoma *NLRP1*, *NLRP3* e *IL-1 β* em resposta à estimulação com LPS em PBMCs, observamos uma expressão elevada do gene *IL-1 β* . No entanto, este aumento não foi estatisticamente significativo nas células estimuladas. A *IL-1 β* é uma das principais citocinas na resposta inflamatória e pode ser produzida por vários tipos de células, incluindo monócitos e macrófagos. Muendlein *et al.* (2020) observaram que macrófagos,

quando ativados por LPS, sofreram piroptose, forma altamente inflamatória de morte celular, e secretaram *IL-1 β* . Este processo pode ser iniciado pela ativação do CASP-8, que por sua vez ativou diretamente a gasdermina (GSDMD) e o inflamassoma *NLRP3*. Esta cascata de eventos resultou tanto na piroptose quanto na maturação e liberação de *IL-1 β* . Estas observações destacam os mecanismos complexos e interligados envolvidos na produção e libertação de *IL-1 β* durante uma resposta inflamatória, lançando luz sobre as intrincadas vias que governam as respostas imunitárias e a inflamação.

No presente estudo, 45% dos indivíduos avaliados apresentaram hipotireoidismo. Em uma análise retrospectiva de registros conduzidos por Pierce, Lafranchi e Pinter (2017), foi observado que a ocorrência da doença da tireoide na SD era mais comum e se manifestava em uma idade mais precoce do que na população em geral, além de ser frequentemente transitória e não relacionada ao sexo, obesidade ou outras comorbidades.

No entanto, para confirmar a doença autoimune da tireoide (DAIT) nos nove indivíduos que apresentaram hipotireoidismo, seria essencial uma investigação laboratorial minuciosa envolvendo marcadores sorológicos de autoanticorpos tireoidianos, tais como: anticorpo anti-receptor do hormônio estimulador da tireoide (anti-TSH-R) e anticorpos anti-tireóide peroxidase (anti-TPO). No entanto, vale ressaltar que condições autoimunes como diabetes mellitus tipo 1 (DM1), DAIT, alopecia, doença celíaca (DC), artrite idiopática juvenil e vitiligo são conhecidas por ocorrerem em maior taxa entre indivíduos com SD quando comparados a aqueles sem SD (Bull, 2020).

No que diz respeito aos níveis séricos de proteína C reativa (PCR-us), importante marcador de inflamação, nosso estudo revelou oito indivíduos com níveis elevados. Porém, quando comparamos esses indivíduos com aqueles sem alterações nessa proteína, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. É importante notar que um estudo realizado por Manti *et al.* (2018) investigaram esse marcador em um grupo de indivíduos com SD em comparação com aqueles sem SD, mostraram que os níveis de PCR ultrasensível (PCR-us) foram significativamente maiores em indivíduos com SD. Isto ressalta a importância da análise dos níveis de PCR em indivíduos com SD e destaca sua relevância potencial como um marcador importante neste contexto.

CONCLUSÕES

1. A análise dos níveis de expressão do mRNA dos genes do inflamassoma - *Nlrp1*, *Nlrp3* e *IL-1 β* – revelou uma regulação negativa com significância estatística para o gene *NLRP1* em relação ao grupo controle saudável. Essa regulação negativa de *NLRP1* e a regulação positiva dos genes *NLRP3* e *IL-1 β* podem indicar uma resposta imune desequilibrada em indivíduos com SD.
2. A análise dos níveis de expressão do mRNA dos genes do inflamassoma em cultura de PBMCs com e sem estímulo por LPS não revelou diferença estatística na expressão após a estimulação. Porém, a expressão negativa de *NLRP1* e expressão positiva de *IL-1 β* também podem indicar um desequilíbrio na resposta imune de indivíduos SD.
3. A análise dos níveis de mRNA dos genes *CTLA-4* e *PTPN22* revelou uma expressão reduzida do *CTLA-4* em indivíduos SD em comparação aos controles e um equilíbrio na expressão do *PTPN22* nos dois grupos. Mais uma vez, essa desregulação gênica pode estar ligada ao desequilíbrio imunológico em indivíduos SD.

REFERÊNCIAS

- 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.
- ALEHASHEMI S and GOLDBACH-MANSKY R. **Human Autoinflammatory Diseases Mediated by NLRP3-, Pyrin-, NLRP1- and NLRC4-Inflammasome Dysregulation Updates on Diagnosis, Treatment, and the Respective Roles of IL-1 and IL-18**. Frontiers in Immunology, v. 11, p. 01840, 2020.
- ARMITAGE LH, WALLET MA and MATHEWS CE. **Influence of *PTPN22* Allotypes on Innate and Adaptive Immune Function in Health and Disease**. Frontiers in Immunology, v. 12, p. 636618, 2021.
- BERMUDEZ BEBV, AMARA MES, GOMES CS, NOVADZK IM and OLIVEIRA CM. **Respiratory and otolaryngological disorders in Down syndrome from one center in Brazil**. AJMG 185: 2356-2360, 2021.
- BLEVINS HM, XU M, BIBY S and ZHANG S. **The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases**. Front. Aging Neurosci 14:879021, 2022.
- BORTOLOTTI P, FAURE E and KIPNIS E. **Inflammasomes in Tissue Damages and Immune Disorders After Trauma**. Front. Immunol. 9:1900, 2018.
- BROZ V and DIXIT VM. **Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling**. Nature Reviews Immunology 16:407-420, 2016.
- CAMPBELL AW. **Autoimmunity and the Gut**. Autoimmune Diseases, 2014, 1–12, 2014.
- CAMPBELL L, RAHEEM I, MALEMUD C and ASKARI A. **The Relationship between NALP3 and Autoinflammatory Syndromes**. International Journal of Molecular Sciences, 17(5), 725, 2016.
- CHISTIYAKOV D. **Down syndrome and coexistent autoimmune diseases**. J. Appl. Biomed. 5: 71–76, 2007.
- CICCARONE F, VALENTINI E, MALAVOLTA M, ZAMPIERI M, BACALINI MG, CALABRESE R, GUASTAFIERRO T, REALE A, FRANCESCHI C, CAPRI M *et al*. **DNA Hydroxymethylation Levels Are Altered in Blood Cells From Down Syndrome Persons Enrolled in the MARK-AGE Project**. The Journals of Gerontology: Series A, 73(6), 737–744, 2017.
- CIPRIANI G, DANTI S, CARLESÌ C and DI FIORINO M. **Aging with Down Syndrome: The Dual Diagnosis: Alzheimer's Disease and Down Syndrome**. American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias®, 33(4), 2018.

CORNUT M, BOURDONNAY E and HENRY T. **Transcriptional Regulation of Inflammasomes**. International Journal of Molecular Sciences, v. 21, p. 8087, 2020.

DIEUDONNE Y, URING-LAMBERT B, JELJELI MM, GIES C, ALEMBIK Y, KORGANOW A and GUFFROY A. **Immune defect in adults with Down syndrome: insights into a complex issue**. Front. Immunol. 11:840, 2020.

DUEZ H and POURCET B. **Nuclear Receptors in the Control of the NLRP3 Inflammasome Pathway**. Frontiers in Endocrinology, v. 12, p. 630536, 2021.

ESTEFAN JL, OLIVEIRA JC, ABAD ED, SAINTIVE SB, PORTO LC and RIBEIRO M. **HLA antigens in individuals with down syndrome and alopecia areata**. World J Clin Cases. 16;2(10):541-5, 2014.

FENINI G, KARAKAYA T, HENNIG P, DI FILIPPO M and BEER HD. **The NLRP1 Inflammasome in Human Skin and Beyond**. International Journal of Molecular Sciences, 21(13), 4788, 2020.

FERRARI M and STAGI S. **Autoimmunity and Genetic Syndromes: A Focus on Down Syndrome**. Genes 12:268, 2021.

FOUSTERI G, LIOSSIS SNC and BATTAGLIA, M. **Roles of the protein tyrosine phosphatase PTPN22 in immunity and autoimmunity**. Clinical Immunology, 149(3), 556–565, 2013.

FRANCESCHI C, GARAGNANI P, GENSOUS N, BACALINI MG, CONTE M and SALVIOLI, S. **Accelerated bio-cognitive aging in Down syndrome: State of the art and possible deceleration strategies**. Aging Cell, e12903, 2019.

GHADERI A. **CTLA4 gene variants in autoimmunity and cancer: a comparative review**. Iran J Immunol. 8(3):127-49, 2011.

GUO H, CALLAWAY J and TING JPY. **Inflammasomes: Mechanism of Action, Role in Disease, and Therapeutics**. Nat Med. 21(7): 677–687, 2016.

GUPTA NA and KABRA M. **Diagnosis and management of Down syndrome**. The Indian Journal of Pediatrics, v. 81, p. 560-567, 2014.

HITOMI Y, EBISAWA M, TOMIKAWA M, IMAI T, KOMATA T, HIROTA T, HARADA M, SAKUSHITA M, SUZUKI Y, SHIMOJO N *et al.* **Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma**. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 124(4), 779–785.e6, 2009.

HOFFMAN HM, MUELLER JL, BROIDE DH, WANDERER AA and KOLODNER RD. **Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle–Wells syndrome**. Nature Genetics, 29(3), 301–305, 2001.

HOSSEINI A, GHARIBI T, MAROFI F, BABALOO Z and BARADARAN B **CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy**. International Immunopharmacology, 80, 106221, 2020.

HOSSEN MM, MA Y, YIN Z, XIA Y, DU J, HUANG JY, HUANG JJ, ZOU L, YE Z and HUANG Z. **Current understanding of CTLA-4: from mechanism to autoimmune diseases**. Front. Immunol. 14:1198365, 2023.

KHARE S, DORFLEUTNER A, BRYAN NB, YUN C, RADIAN AD, DE ALMEIDA L, ROJANASAKUL Y and STEHLIK C. **An NLRP7-Containing Inflammasome Mediates Recognition of Microbial Lipopeptides in Human Macrophages**. Immunity, 36(3), 464–476, 2012.

KYRITSI EM and KANAKA-GANTENBEIN C. **Autoimmune Thyroid Disease in Specific Genetic Syndromes in Childhood and Adolescence**. Frontiers in Endocrinology, 11, 2020.

LINGEL H and BRUNNER-WEINZIERL MC. **CTLA-4 (CD152): A versatile receptor for immune-based therapy**. In: Seminars in immunology. Academic Press, 2019. p. 101298, 2019.

LIU E, WOLTER-WARMERDAM K, MARMOLEJO J, DANIELS D, PRINCE G and HICKEY F. **Routine Screening for Celiac Disease in Children With Down Syndrome Improves Case Finding**. Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition, 71(2), 252–256, 2020.

MARIATHASAN S, WEISS DS, NEWTON K, MCBRIDE J, O'ROURKE K, ROOSE-GIRMA M, LEE WP, WEINRAUCH Y, MONACK D and DIXIT VM. **Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP**. Nature, 440(7081), 228–232, 2006.

MARTINON F, BURNS K and TSCHOPP J. **The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro-ILb**. Molecular Cell, v. 10, n. 2, p. 417– 426, 2002.

MIGLIORE L, MIGHELI F and COPPEDÈ F. **Susceptibility to Aneuploidy in Young Mothers of Down Syndrome Children**. The Scientific World JOURNAL 9:1052 1060, 2009.

NARAYANAN DL, YESODHARAN D, KAPPANAYI M, KUTHIROLY S, THAMPI MV and HAMZA A. **Cardiac spectrum, cytogenetic analysis and thyroid profile of 418 children with down syndrome from South India: a cross-sectional study**. Indian J Pediatr. 81(6):547-51, 2013.

PAPAVASSILIOU P, CHARALSAWADI C, RAFFERTY K and JACKSON-COOK C. **Mosaicism for trisomy 21: A review**. American Journal of Medical Genetics Part A, 167(1), 26–39, 2014.

PIERCE MJ, LAFRANCHI SH and PINTER JD. **Characterization of thyroid abnormalities in a large cohort of children with Down syndrome.** *Hormone research in pediatrics*, v. 87, n. 3, p. 170-178, 2017.

ROMO-TENA J, GÓMEZ-MARTÍN D and ALCOCER-VARELA J. **CTLA-4 and autoimmunity: New insights into the dual regulator of tolerance.** *Autoimmunity Reviews*, 12(12), 1171–1176, 2013.

SANTOS RA, COSTA LH, LINHARES RC, PRADELLA-HALLINAN M, COELHO FMS and OLIVEIRA GP. **Sleep disorders in Down syndrome: a systematic review. View and Review.** *Arq. Neuro-Psiquiatr.* 80 (4):424-443, 2021.

SATTTLER S. **The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection.** *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology*, 3–14, 2017.

SHARR C, LAVIGNE J, ELSHARKAWI IMA, OZONOFF A, BAUMER N, BRASINGTON C, CANNON S, CRISSMAN B, DAVIDSON E, FLOREZ JC *et al.* **Detecting celiac disease in patients with Down syndrome.** *American Journal of Medical Genetics Part A*, 170(12), 3098–3105, 2016.

SHUMANSKA M and BOGESKI I. **Autoimmunity: Redoxing PTPN22 activity.** *eLife* 11: e79125, 2022.

SÖNMEZ HE and ÖZEN S. **A clinical update on inflammasomopathies.** *International Immunology*, 29(9), 393–400, 2017.

STANFORD SM and BOTTINI N. **PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene.** *Nature Reviews Rheumatology*, v. 10, n. 10, p. 602-611, 2014.

STRAZZULLA LC, WANG EHC, AVILA L, LO SICCO K, BRINSTER N, CHRISTIANO AM and SHAPIRO J. **Alopecia areata.** *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(1), 1–12, 2018.

TIZAOUI K, SHIN JI, JEONG GH, YANG JW, PARK S, KIM JH, HWANG SY, PARK SJ, KOYANAGI A and SMITH L. **Genetic Polymorphism of PTPN22 in Autoimmune Diseases: A Comprehensive Review.** *Medicina*. 58(8):1034, 2022.

TIZAOUI K, TERRAZZINO S, CARGNIN S, LEE KH, GAUCKLER P, LI H, SHIN JI and KRONBICHLER A. **The role of PTPN22 in the pathogenesis of autoimmune diseases: A comprehensive review.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 51(3), 513–522, 2021.

TOMAR N and DE RK. **A Brief Outline of the Immune System.** *Immunoinformatics*, 3–12, 2014.

TOMASIK J and BASAK GW. **Inflammasomes—New Contributors to Blood Diseases.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 238129, 2022.

VAN COILLIE S, WIERNICKI B and XU J. **Molecular and cellular functions of CTLA-4. Regulation of Cancer Immune Checkpoints.** Molecular and Cellular Mechanisms and Therapy, p. 7-32, 2020.

VANG T, MILETIC AV, BOTTINI N and MUSTELIN T. **Protein tyrosine phosphatase PTPN22 in human autoimmunity.** Autoimmunity, 40(6), 453–461, 2007.

VERSTEGEN RH and KUSTERS MA. **Inborn Errors of Adaptive Immunity in Down Syndrome.** *J Clin Immunol* 40, 791–806, 2020.

WANG L, WANG FS and GERSHWIN ME. **Human autoimmune diseases: a comprehensive update.** Journal of Internal Medicine, 278(4), 369–395, 2015.

YAQOOB M, MANZOOR J, HYDER SN and SADIQ M. **Congenital heart disease and thyroid dysfunction in Down syndrome reported at Children's Hospital, Lahore, Pakistan.** The Turkish Journal of Pediatrics 61: 915-924, 2019.

YE J, GILLESPIE K and RODRIGUEZ S. **Unravelling the Roles of Susceptibility Loci for Autoimmune Diseases in the Post-GWAS Era.** Genes, 9(8), 377, 2018.

YU CH, MOECKING J, GEYER M and MASTERS SL. **Mechanisms of NLRP1-Mediated Autoinflammatory Disease in Humans and Mice.** Journal of Molecular Biology, 430(2), 142–152, 2018.

ZHANG H, LI F, LI WW, STARY C, CLARK JD, XU S and XIONG X. **The inflammasome as a target for pain therapy.** British Journal of Anaesthesia, 117(6), 693–707, 2016.

ZHU S, DING S, WANG P, WEI Z, PAN W, PALM NW, YU H, LI H, WANG G, LEI X *et al.* **Nlrp9b inflammasome restricts rotavirus infection in intestinal epithelial cells.** Nature, 546(7660), 667–670, 2017.

ZITO G, BUSCETTA M, CIMINO M, DINO P, BUCCHIERI F and CIPOLLINA C. **Cellular Models and Assays to Study NLRP3 Inflammasome Biology.** International Journal of Molecular Sciences, 21(12), 4294, 2020.

ANEXO A - PARECER SUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS CCS-UFPE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de polimorfismos e expressão de genes relacionados às doenças autoimunes/inflamatórias em pacientes com síndrome de Down **Pesquisador:** JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE **Área Temática:**

Versão: 2

CAAE: 58177422.2.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE **Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.482.843

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado apresentado pela Discente Juliana Vieira de Barros Arcoverde, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Genética, CB, UFPE, sob a orientação da Prof.^a Dr^a Neide Santos Co-orientação da Prof.^a Dr^a Jaqueline de Azevedo Silva.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Investigar associações entre polimorfismos dos genes NLRP1, NLRP3, PTPN22, CTLA-4 e VDR com a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias e o perfil de expressão de marcadores moleculares do inflamassoma em pacientes com síndrome de Down (SD).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estratificar os pacientes em categorias de acordo com o cariótipo;
2. Verificar se existe associação entre os polimorfismos, rs2670660 (NLRP1); rs35829419, rs10754558, rs12239046, rs4925659 (NLRP3); rs2476601 (PTPN22); rs231775, rs3087243 (CTLA-4); rs2228570 e rs11568820 (VDR) com a susceptibilidade no desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias crônicas em pacientes com síndrome de Down;
3. Avaliar os níveis de expressão dos genes Nlrp1 e Nlrp3, VDR, PTPN22 e CTLA-4 em pacientes SD e controles;
4. Avaliar os níveis de expressão de IL-1, IL-18 e IL-6 em pacientes SD e nos controles.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: a pesquisadora refere o risco inerente à coleta de sangue para realização dos exames e descreveu a minimização de forma adequada. Foi anexado termo de compromisso e confidencialidade.

BENEFÍCIOS: A pesquisadora refere que este trabalho não trará benefícios diretos aos pacientes, mas, a partir da análise nas diferenças entre os genes relacionados com doenças autoimunes/inflamatórias será possível um melhor entendimento do papel desses genes no aumento dessas doenças em pessoas com síndrome de Down, visando a definição de futuras estratégias terapêuticas, em busca de tratamentos mais eficazes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é importante. O estudo será do tipo transversal, analítico com comparação de grupos (caso – controle) com amostras independentes constando de dados nominais (genótipo). Nesse estudo serão analisados 200 pacientes clinicamente diagnosticados com a síndrome de Down provenientes de ONGs (foi anexada a carta de anuência do GURI). Outras ONGs ainda estão sendo contactadas.

Serão coletados de cada participante 8 ml de sangue em tubos contendo heparina e EDTA. No momento da coleta será feito um pequeno questionário sobre resultados de exames de rotina, como hemograma e exames hormonais.

O material extraído das amostras de sangue, caracterizado como biorepositório, ficará guardado num freezer no Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH), sob a responsabilidade da pesquisadora/professora Neide Santos, no endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Departamento de Genética – Cidade Universitária, Recife, Pernambuco. CEP: 50670-901, pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa. Os dados coletados através dos questionários nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivos no computador do laboratório citado anteriormente.

Na amostra do grupo controle serão utilizados DNA de indivíduos saudáveis, sem SD e sem doenças autoimunes/inflamatórias crônicas, disponibilizados pelo Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) e um segundo grupo controle de indivíduos com SD, sem doenças autoimunes/inflamatórias crônicas triados a partir da amostra de pacientes (A triagem será feita por meio de um pequeno questionário para a obtenção dos dados de exame de rotina, como hemograma e exames hormonais).

O cronograma apresentado está coerente com a pesquisa. O orçamento apresentado é de R\$ 18.490,00 e será de responsabilidade da pesquisadora principal.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados: 1 - Folha de rosto; 2 - Declaração de vínculo da aluna com a Pós; 3 - Termo de compromisso e confidencialidade; 4 - Lattes das pesquisadoras; 5 - Projetos detalhado e projeto modelo plataforma; 6 - TCLE para maiores de 18 anos, TCLE para responsáveis por menores de 18 anos e TALE; 7 - Carta de anuência do LIKA (local que disponibilizará o DNA dos controles saudáveis); 8 - Carta de anuência do GURI, uma das ONGs que participará da pesquisa.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via “Notificação”, pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link “Para enviar Relatório Final”, disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1671322.pdf	21/06/2022 17:57:55		Aceito
Outros	Carta_anuencia_LIKA.pdf	21/06/2022 17:57:19	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	Carta_anuencia_GURI.jpg	21/06/2022 17:56:44	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	21/06/2022 17:53:41	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEMenor7a18.doc	21/06/2022 17:51:20	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEResponsaveismenores.doc	21/06/2022 17:51:04	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.doc	21/06/2022 17:50:47	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_JulianaVieira.docx	21/06/2022 17:49:58	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	DISPENSA_CARTADEANUENCIA.docx	26/04/2022 13:44:55	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	Termo_confidencialidade.docx	26/04/2022 13:44:27	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	declaracao_20193009811.pdf	25/04/2022 21:23:34	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	CurriculoLattes_NeideSantos.pdf	25/04/2022 21:22:50	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito

Página 04 de

Outros	CurriculoLattes_JulianaVieiradeBarrosArcoverde.pdf	25/04/2022 21:22:35	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	CurriculoLattes_JaquelineAzevedoSilva.pdf	25/04/2022 21:22:22	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	CurriculoLattes_CarlaFernandesdosSantos.pdf	25/04/2022 21:22:06	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	25/04/2022 21:16:25	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 22 de Junho de 2022

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

**ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA
RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS)**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Biociências – Departamento de Genética
Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGAH)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS)

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) _____ {ou menor que está sob sua responsabilidade} para participar, como voluntário (a), da pesquisa **Avaliação de polimorfismos e expressão de genes relacionados à doenças autoimunes/inflamatórias em pacientes com síndrome de Down.**

Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Juliana Vieira de Barros Arcoverde, Rua Frei Gaspar da Madre de Deus, 58, UR 06 Ibura, CEP: 54230-181. Telefone: (81) 9.98793064. E-mail: juhdebarros@hotmail.com. Também participam também desta pesquisa os pesquisadores: Carla Fernandes dos Santos. Telefone (81) 991293439. E-mail: carlafernandes_08@hotmail.com. Sob a orientação de Neide Santos. Telefone: (81) 9991455405. E-mail: neide.santos2@ufpe.br

O/a Senhor/a será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida a respeito da participação dele/a na pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e o/a Senhor/a concordar que o (a) menor faça parte do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias.

Uma via deste termo de consentimento lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. O/a Senhor/a estará livre para decidir que ele/a participe ou não desta pesquisa. Caso não aceite que ele/a participe, não haverá nenhum problema, pois desistir que seu filho/a participe é um direito seu. Caso não concorde, não haverá penalização para ele/a, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

DESCRIÇÃO DA PESQUISA: O objetivo desse estudo é analisar a diferença entre genes relacionados à doenças autoimunes/inflamatórias visando esclarecer se essas diferenças são capazes de tornar portadores de síndrome de Down mais susceptíveis ao desenvolvimento de tais doenças. Para realização dos testes, o voluntário precisará fornecer uma amostra de 8 mL de Sangue Venoso Periférico (SVP) apenas uma vez ao longo da pesquisa. Será utilizado a metodologia de coleta de sangue à vácuo, com 2 tubos BD Vacutainer® Plus (contendo heparina e EDTA como anticoagulantes) com auxílio de agulha para coleta múltipla BD Vacutainer® medindo 25x0,8 mm com bisel trifacetado, siliconizada, esterilizada a Oxido de Etileno(ETO) com adaptador plástico BD Vacutainer®, reutilizável e não estéril. Após a coleta, cada tubo será homogeneizado por inversão de 8 a 10 vezes para evitar hemólise e coagulação do sangue para posterior ensaio. No momento da coleta será feito um pequeno questionário sobre resultados de exames de rotina, como hemograma e exames hormonais.

RISCOS: Dentre os riscos do procedimento, o máximo que poderá ocorrer com o voluntário será o surgimento de hematomas após a coleta de sangue. Dessa forma, para tentar evitar o hematoma, será pressionado o local da punção por, no mínimo, 3 minutos. As seguintes indicações serão enfatizadas ao colaborador após a coleta: evitar flexionar o braço, massagear o local e fazer esforço físico no período posterior à coleta. Se ainda assim o hematoma aparecer, uma compressa de gelo por 15 minutos a cada hora, durante as seis primeiras horas será indicada. Após essa medida, compressas mornas podem ser colocadas no local para acelerar o desaparecimento do hematoma. Se houver qualquer outra reação ou dor no local, o colaborador será encaminhado ao médico.

BENEFÍCIOS: A partir da análise nas diferenças entre os genes relacionados com doenças autoimunes/inflamatórias será possível um melhor entendimento do papel desses genes no aumento dessas doenças em portadores de síndrome de Down, visando a definição de futuras estratégias terapêuticas, em busca de tratamentos mais eficazes.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. O material extraído das amostras de sangue ficará guardado num freezer no Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH), sob a responsabilidade da pesquisadora/professora Neide Santos, no endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Departamento de Genética – Cidade Universitária, Recife, Pernambuco. CEP: 50670-901, pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa. Os dados coletados através dos questionários nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivos no computador do laboratório citado anteriormente.

O (a) senhor (a) não pagará nada e nem receberá nenhum pagamento para ele/ela participar desta pesquisa, pois deve ser de forma voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação dele/a na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento com transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – Prédio do CCS - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

Assinatura do pesquisador (a)

**CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DO/A
VOLUNTÁRIO**

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável por _____, autorizo a sua participação no estudo **Avaliação de polimorfismos e expressão de genes relacionados à doenças autoimunes/inflamatórias em pacientes com síndrome de Down**, como voluntário(a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer

momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de seu acompanhamento/assistência/tratamento) para mim ou para o (a) menor em questão.

Local e data _____

Assinatura do (da) responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do voluntário em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO C – E-MAIL DE SUBMISSÃO DO MANUSCRITO AO PERIÓDICO GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

22/11/23, 21:48

E-mail de Universidade Federal de Pernambuco - Genetics and Molecular Biology - Manuscript ID GMB-2023-0339



NEIDE SANTOS <neide.santos2@ufpe.br>

Genetics and Molecular Biology - Manuscript ID GMB-2023-0339

1 mensagem

Genetics and Molecular Biology <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

20 de novembro de 2023 às 16:40

Responder a: editor@gmb.org.br

Para: neide.santos2@ufpe.br

Cc: juhdebarros@hotmail.com, neide.santos2@ufpe.br, carla.fernandes@ufpe.br, cecilia.luckwu@ufpe.br, aldiadne.milene@ufpe.br, raysa.samanta@ufpe.br, thays.mclucena@ufpe.br, jaqueline.azevedo@ufpe.br

20-Nov-2023

Dear Dr. Santos:

Your manuscript entitled "Expression profile of inflammasome genes in individuals with Down syndrome" has been successfully submitted online and is and is presently being analyzed by the editors with respect to its suitability for publication in the Genetics and Molecular Biology.

Your manuscript ID is GMB-2023-0339.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>.

Note that Genetics and Molecular Biology has established a publication charge for accepted manuscripts. For detailed information, please consult our homepage <http://www.gmb.org.br>.

Thank you for submitting your manuscript to the Genetics and Molecular Biology.

Sincerely,
Genetics and Molecular Biology Editorial Office