



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

REBECA MICAELA DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM OS RECEPTORES DE
ESTRÓGENO α E β (*ESR1* E *ESR2*) E SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO
GÊNICA DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS *NLRP3* E *IL-1 β* EM MULHERES
COM SÍNDROME METABÓLICA NA PÓS-MENOPAUSA**

Recife
2023

REBECA MICAELA DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM OS RECEPTORES DE
ESTRÓGENO α E β (*ESR1* E *ESR2*) E SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO
GÊNICA DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS *NLRP3* E *IL-1 β* EM MULHERES
COM SÍNDROME METABÓLICA NA PÓS-MENOPAUSA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
título de mestra em Genética. Área de
concentração: Genética.

Orientadora: Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva

Coorientadora: Dra. Suelen Cristina de Lima

Recife

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Rebeca Micaela da

Análise da expressão dos genes que codificam os receptores de estrógeno α e β (ESR1 e ESR2) e sua correlação com a expressão gênica dos marcadores inflamatórios NLRP3 e IL-1 β em mulheres com síndrome metabólica na pós-menopausa / Rebeca Micaela da Silva- 2023.

109 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva

Coorientadora: Suelen Cristina de Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética, 2023.

Inclui referências, apêndice e anexos.

1. Expressão gênica 2. Estrógenos 3. Síndrome metabólica I. Silva, Jaqueline de Azevêdo (orient.) II. Lima, Suelen Cristina (coorient.) III. Título

572.865

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023 -193

REBECA MICAELA DA SILVA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES QUE CODIFICAM OS RECEPTORES DE
ESTRÓGENO α E β (*ESR1* E *ESR2*) E SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO
GÊNICA DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS *NLRP3* E *IL-1 β* EM MULHERES
COM SÍNDROME METABÓLICA NA PÓS-MENOPAUSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Genética. Área de concentração: Genética.

Aprovado em: 30/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Jaqueline de Azevêdo Silva (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^a. Paula Sandrin Garcia (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Bruno de Melo Carvalho (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Prof^o. Dr. Ronaldo Celerino da Silva (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Jaqueline de Azevêdo pela oportunidade de cursar o mestrado, compartilhando sua experiência com dedicação, sempre incentivando o avanço acadêmico dos seus orientandos e sendo um grande exemplo de profissionalismo.

À minha coorientadora Suelen Lima, uma profissional maravilhosa, que abraçou magicamente esse trabalho com dedicação, criatividade e excelente sugestões.

A todos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular Humana, José, Eduarda, Débora, Brenda, Mariana e Pedro, pela amizade, troca de experiências e trabalho em equipe. Em especial, a Thays pela parceria, ensinamentos e torcidas nas análises e na vida.

À Aldiane e à Giovana, juntamente com Thays, por dividir a árdua jornada de cursar disciplinas online em uma pandemia e pelas horas de estudo em um grupo que se encantava com a beleza dos mecanismos genéticos.

Aos membros da banca examinadora pelo aceite do convite e pelas sugestões para melhoria desse trabalho.

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida, possibilitando a realização desta pesquisa.

Às minhas amigas que compartilhamos nossas vidas, lutas e vitórias diárias deixando-a mais leve e memorável: Felícia, minha partícula gêmea e irmã de outra mãe que o destino me presenteou; Alanna, que sempre me motivou a ser melhor há tantos anos e espero que possa retribuir; Mariana, sempre na torcida desde o primeiro momento dessa jornada.

À minha família, mas principalmente aos meus primos Arthur e Maria Valentina, os quais nessa árdua jornada da pós-graduação longe de casa não pude estar perto de parte do crescimento de vocês, mas sempre com muita saudade no coração.

Por último e mais importante, agradeço à minha mãe pelo incentivo aos meus objetivos e por dividirmos sozinhas essa trajetória durante as etapas da minha vida. Chegamos aonde duvidamos e iremos alcançar bençãos até onde nunca imaginamos.

RESUMO

A Síndrome Metabólica (SM) é uma associação de patologias cardiometabólicas como obesidade, hipertensão, dislipidemia e *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2), as quais ocasionam individualmente um estado pró-inflamatório crônico de baixo grau. Um maior risco de desenvolvimento da SM é observado na pós-menopausa, uma vez que a redução nos níveis de 17 β -estradiol (E₂) nessa fase pode influenciar no metabolismo de lipídeos, glicose e insulina. Essa influência depende da ligação do E₂ aos receptores de estrógeno α e β , codificados pelos genes *ESR1* e *ESR2*. Sendo assim, este trabalho visou investigar a expressão relativa dos genes *ESR1* e *ESR2* em mulheres pós-menopausadas com SM e como essa se correlaciona com a expressão dos marcadores inflamatórios *NLRP3* e *IL-1 β* , através de ensaios de RT-qPCR. Mulheres com SM, que formavam o grupo de estudo, tiveram uma redução na expressão do gene *ESR1* ($FC = -2,02$; $p = 0,0466$) em comparação ao controle saudável. Entre o grupo de estudo, as mulheres com obesidade apresentaram um aumento na expressão de *ESR2* ($FC = 1,61$; $p = 0,0004$) em comparação às com sobrepeso, enquanto às com DM2 uma redução na expressão de *ESR1* ($FC = -1,87$; $p = 0,0071$) em comparação às sem DM2. Adicionalmente, correlações positivas foram observadas entre a expressão do gene *NLRP3* com *ESR1* ($r_s = 0,4113$; $p = 0,0379$) e a circunferência abdominal ($r_s = 0,4099$; $p = 0,0303$). Por sua vez, o avanço da faixa etária esteve negativamente correlacionado com a expressão dos genes *ESR1* ($r = -0,4218$; $p = 0,0181$) e *ESR2* ($r_s = -0,5405$; $p = 0,0064$). Nossos resultados sugerem uma expressão diferencial dos receptores de estrógeno em mulheres com SM de acordo com as doenças cardiometabólicas diagnosticadas.

Palavras-chave: Receptor de estrógeno alfa; Receptor de estrógeno beta; Inflamassoma NLRP3; Interleucina-1 β ; Doenças Cardiometabólicas.

ABSTRACT

Metabolic Syndrome (MetS) is a cluster of cardiometabolic disorders such as obesity, hypertension, dyslipidemia and Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM), which individually cause a low-grade chronic inflammatory state. A higher risk of developing MetS is observed in postmenopausal women, as the decreased levels of 17 β -estradiol (E₂) in this phase may influence the metabolism of lipids, glucose and insulin. This influence depends on the binding of E₂ to estrogen receptors α and β , encoded by the genes *ESR1* and *ESR2*. Therefore, the aim of this study was to investigate the relative expression of *ESR1* and *ESR2* genes in postmenopausal women with MetS and how these expressions correlate with the expression of inflammatory markers such as *NLRP3* and *IL-1 β* , and the gene expression assays were performed by RT-qPCR. Women with MetS, who comprised the case group, showed a down regulation in *ESR1* gene expression (-2.02 FC, $p = 0.0466$) compared to the healthy control group. Among the case group, those with obesity had an up regulation in *ESR2* expression (1.61 FC, $p = 0.0004$) compared to those with overweight, while those with T2DM had a down regulation in *ESR1* expression (-1.87 FC, $p = 0.0071$) compared to those without T2DM. In addition, positive correlations were observed between *NLRP3* gene expression with the expression of *ESR1* ($r_s = 0.4113$, $p = 0.0379$) and waist circumference ($r_s = 0.4099$, $p = 0.0303$). However, increasing age was negatively correlated with *ESR1* ($r = -0.4218$, $p = 0.0181$) and *ESR2* ($r_s = -0.5405$, $p = 0.0064$) gene expressions. Our results suggest an estrogen receptors differential expression in MetS after menopause according to the diagnosed cardiometabolic diseases.

Keywords: Estrogen receptor alpha; Estrogen receptor beta; NLRP3 Inflammasome; Interleukin-1 beta; Metabolic diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais patologias cardiometabólicas que caracterizam o diagnóstico da Síndrome Metabólica.....	16
Figura 2 – Mecanismo compensatório para suprir a demanda de insulina no estágio inicial de desenvolvimento da resistência à insulina.....	21
Figura 3 – Níveis séricos de 17 β -estradiol (E ₂) em mulheres saudáveis na pré e pós-menopausa.....	26
Figura 4 – Estrutura de multidomínios dos Receptores de Estrógeno (ERs).	28
Figura 5 – Estrutura gênica e de multidomínios proteicos dos Receptores de Estrógeno humanos	29
Figura 6 – Influência e ação dos receptores de estrógeno (ERs), ER α e ER β , na obesidade	32
Figura 7 – Influência e ação dos receptores de estrógeno (ERs), ER α e ER β , na <i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 2 (DM2)	34
Figura 8 – Influência e ação dos receptores de estrógeno (ERs), ER α e ER β , na dislipidemia.....	35
Figura 9 – Influência e ação dos receptores de estrógeno (ERs), ER α e ER β , nas doenças cardiovasculares (DCVs)	37
Figura 10 – Ativação do complexo proteico inflamassoma NLRP3 e a liberação da forma ativa da citocina IL-1 β	40
Figura 11 – Influência dos receptores de estrógeno (ER α e ER β) na expressão gênica ou proteica do inflamassoma NLRP3 e seus componentes.....	42
Figura 12 – Delineamento experimental, demonstrando a divisão entre o grupo de estudo e o controle saudável.....	45
Figura 13 – Metodologia para o isolamento de RNA total de amostras de sangue venoso periférico utilizando o regente TRIzol®.....	47
Figura 14 – Metodologia para a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit comercial <i>High Capacity cDNA Reverse Transcription</i> (Applied Biosystems).....	48
Figura 15 – Reações para cada um dos ensaios de expressão dos genes alvo e endógenos.....	50

Figura 16 – Expressão relativa dos genes <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i> em mulheres com síndrome metabólica na pós-menopausa e controles na pós-menopausa	54
Figura 17 – Expressão relativa dos genes <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i> em mulheres na pós-menopausa com obesidade e sobrepeso.....	55
Figura 18 – Expressão relativa dos genes <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i> em mulheres na pós-menopausa com SM e DM2 ou com SM e sem DM2.....	56
Figura 19 – Expressão relativa dos genes <i>ESR1</i> e <i>ESR2</i> em mulheres na pós-menopausa com SM e dislipidemia ou com SM e sem dislipidemia	57
Figura 20 – Expressão relativa do gene <i>ESR1</i> em mulheres na pós-menopausa com SM em comparação a faixa etária 50-59 anos: 60-69 anos; 70-79 anos; 80 anos ou mais	58
Figura 21 – Expressão relativa do gene <i>ESR2</i> em mulheres na pós-menopausa com SM em comparação a faixa etária 50-59 anos: 60-69 anos; 70-79 anos; 80 anos ou mais	59
Figura 22 – Análises de correlações entre as quantidades relativas normalizadas da expressão dos genes <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> , <i>NLRP3</i> e <i>IL-1β</i> em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica.....	61
Figura 23 – Análises de correlações entre a idade e as quantidades relativas normalizadas da expressão dos genes <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> , <i>NLRP3</i> e <i>IL-1β</i> , em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica.	62
Figura 24 – Análises de correlações entre a circunferência abdominal e as quantidades relativas normalizadas da expressão dos genes <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> , <i>NLRP3</i> e <i>IL-1β</i> , em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Critérios para o diagnóstico clínico da síndrome metabólica.....	18
Tabela 2 – Níveis adequados de colesterol total, LDL (do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i>), HDL (do inglês <i>High Density Lipoprotein</i>) e triglicérides, segundo a Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.	24
Tabela 3 – Genes de referência utilizados para normalização da expressão dos genes alvos.	49
Tabela 4 – Interpretação do grau de correlação entre variáveis.	50
Tabela 5 – Características clínicas e demográficas das mulheres na pós-menopausa com Síndrome Metabólica e mulheres controles.....	53
Tabela 6 – Coeficientes de correlação entre as quantidades relativas normalizadas da expressão dos genes <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> , <i>NLRP3</i> e <i>IL-1β</i> , adicionalmente as características clínicas, idade e circunferência abdominal, em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β HSD1	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1
AF-1	<i>Transcriptional activation function 1</i>
AF-2	<i>Transcriptional activation function 2</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
ASC	<i>Apoptosis-associated Speck-like Protein</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DCVs	Doenças cardiovasculares
DIP	4-(2-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)-1H-indol-3-yl)phenol
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DM1	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 1
DM2	<i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2
DP	Desvio Padrão
DPN	Diarylpropionitrile
E ₁	Estrona
E ₂	17 β -estradiol
E ₃	Estriol
EDTA	etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERes	<i>Estrogen-Response Elements</i>
ERs	<i>Estrogen receptors</i>
ER α	Receptor de Estrógeno subtipo α
ER β	Receptor de Estrógeno subtipo β
GLUT4	Proteína transportadora de glicose 4
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HDL-C	<i>High-density lipoprotein cholesterol</i>
HSP90	<i>Heat shock protein 90</i>
IAS	<i>International Atherosclerosis Society</i>
IASO	<i>International Association for the Study of Obesity</i>

IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de Massa Corpórea
LBD	<i>Ligand-binding domain</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LGBMH	Laboratório de Genética e Biologia Molecular Humana
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
NCEP ATP III	<i>National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III</i>
NHLBI	<i>National Heart, Lung, and Blood Institute</i>
NLRP3	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptor Protein 3</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPT	Propyl pyrazole triol
r	Coeficiente de correlação de Pearson
<i>RPLP0</i>	<i>60S acidic ribosomal protein P0</i>
r_s	Coeficiente de correlação de Spearman
SERMs	<i>Selective Estrogen Receptor Modulators</i>
SM	Síndrome Metabólica
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF β 1	<i>Transforming growth factor receptor beta 1</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRH	Terapia de reposição hormonal
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>Very Low-Density Lipoprotein</i>
WHF	<i>World Heart Federation</i>
WT	<i>Wild-type</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	15
1.1.1 Objetivo geral	15
1.1.2 Objetivos específicos.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 SÍNDROME METABÓLICA E PATOLOGIAS CARDIOMETABÓLICAS ASSOCIADAS.....	16
2.1.1 Síndrome metabólica	16
2.1.2 Obesidade	18
2.1.3 <i>Diabetes Mellitus</i> tipo 2 (DM2).....	20
2.1.4 Dislipidemia	22
2.1.5 Hipertensão arterial sistêmica	24
2.2 ESTRÓGENOS E SEUS RECEPTORES	26
2.2.1 Estrógenos.....	26
2.2.2 Receptores de estrógenos	27
2.2.3 Influência dos estrógenos e seus receptores no desenvolvimento de doenças cardiometabólicas	30
2.2.3.1 Estrógenos e seus receptores na obesidade	30
2.2.3.2 Estrógenos e seus receptores na <i>Diabetes Mellitus</i> Tipo 2.....	32
2.2.3.3 Estrógenos e seus receptores na dislipidemia	34
2.2.3.4 Estrógenos e seus receptores nas doenças cardiovasculares.....	35
2.2.4 Estrógenos e seus receptores em processos inflamatórios na síndrome metabólica	37
2.2.4.1 Estrógenos, seus receptores e o complexo inflamassoma NLRP3 na síndrome metabólica	39
2.2.4 Expressão dos receptores de estrógenos durante a menopausa e o envelhecimento	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 LOCAL DE ESTUDO.....	44
3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO NO ESTUDO.....	44
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
3.4 ISOLAMENTO DE RNA	45

3.5 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA).....	47
3.6 ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	48
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	51
4 RESULTADOS.....	52
4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DO GRUPO DE ESTUDO E DO GRUPO CONTROLE	52
4.2 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NA SÍNDROME METABÓLICA.....	53
4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO NAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS À SÍNDROME METABÓLICA.....	54
4.4 PERFIL DE EXPRESSÃO DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA	57
4.5 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> , <i>NLRP3</i> , <i>IL-1B</i> E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	59
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS.....	71
APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY, ISSN: 0303-7207, FATOR DE IMPACTO 4.369	83
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	101
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	104
ANEXO C – CARTA DE ANUÊNCIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO	109

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada pela associação de doenças cardiometabólicas como obesidade, *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica (HAS), as quais são associadas a um estado pró-inflamatório crônico de baixo grau.

Mulheres após a menopausa apresentam uma maior predisposição a obesidade, as doenças cardiovasculares e ao DM2, levando a um maior risco de desenvolver a SM. Nessa fase há uma redução significativa nos níveis do principal hormônio esteroide feminino, o 17 β -estradiol (E₂), em comparação a idade fértil.

A influência dos níveis de E₂ no metabolismo de lipídeos, glicose e insulina está relacionada ao efeito protetivo ao desenvolvimento da SM em mulheres em idade fértil. Esse efeito ocorre através de mecanismos como o aumento da lipólise e da sensibilidade à insulina, e a redução da lipogênese no tecido adiposo.

O E₂ exerce os seus efeitos celulares por meio da ligação aos seus principais receptores: ER α , codificado pelo gene *ESR1* localizado no cromossomo 6; e ER β , codificado pelo gene *ESR2* localizado no cromossomo 14. Ao abordar a relação entre os receptores de estrógeno (ERs) com as doenças que caracterizam o diagnóstico da SM foi demonstrado em modelos murinos que níveis reduzidos de expressão de ER α levam ao aumento da massa de tecido adiposo, resistência à insulina e intolerância à glicose. A redução dos níveis de expressão de ER β leva a consequências similares, com o aumento da adipogênese, além de uma maior quantidade de ácidos graxos livres e aumento do risco à apoptose em células β pancreáticas.

Quanto ao estado pró-inflamatório crônico de baixo grau observado nas doenças cardiometabólicas, um dos fatores contribuintes é a resposta imune inata mediada pelo complexo proteico do inflamassoma NLRP3. Esse complexo sofre oligomerização após o receptor citosólico NLRP3 identificar padrões relacionados a danos celulares ou patógenos, recrutando a proteína adaptadora ASC e a protease caspase-1. Após ativação, a caspase-1 é responsável por converter a pro-IL-1 β em IL-1 β , citocina que estimula a inflamação e morte celular.

Mulheres com SM apresentam aumento dos níveis séricos do inflamassoma NLRP3, o qual pode estar relacionado a quantidade de patologias

cardiometabólicas diagnosticadas e ao avanço da idade. Entretanto, o papel do NLRP3 no envelhecimento natural feminino e durante a transição da fase reprodutiva para não reprodutiva ainda não é amplamente compreendido.

Diante das evidências observadas em modelos murinos, nos quais baixos níveis de expressão dos genes que codificam ER α e ER β aumentam o risco de desenvolver desregulações metabólicas associadas a SM, e a maior prevalência dessa síndrome na pós-menopausa, o presente estudo visou avaliar os níveis de expressão dos genes *ESR1* e *ESR2* na SM e suas doenças cardiometabólicas em mulheres na pós-menopausa. Além de correlacionar a expressão dos genes *ESR1* e *ESR2* com a expressão dos marcadores inflamatórios *NLRP3* e *IL-1 β* , uma vez que mulheres com SM, em uma faixa etária mais avançada, apresentam um aumento dos níveis séricos de NLRP3.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão dos genes *ESR1* e *ESR2* em mulheres com SM na pós-menopausa e sua correlação com a expressão gênica dos marcadores inflamatórios *NLRP3* e *IL-1 β* .

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de expressão dos genes *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3* e *IL-1 β* em mulheres com SM e mulheres controle na pós-menopausa.
- Comparar os níveis de expressão dos genes *ESR1* e *ESR2* entre mulheres na pós-menopausa com SM de acordo com a ausência ou presença das seguintes doenças cardiometabólicas: obesidade, DM2, dislipidemia e HAS.
- Correlacionar os níveis de expressão dos genes *ESR1* e *ESR2* no grupo de estudo com a expressão gênica dos marcadores inflamatórios *NLRP3* e *IL-1 β* .
- Associar os níveis de expressão dos genes *ESR1* e *ESR2* no grupo de estudo com as características clínicas idade e circunferência abdominal.

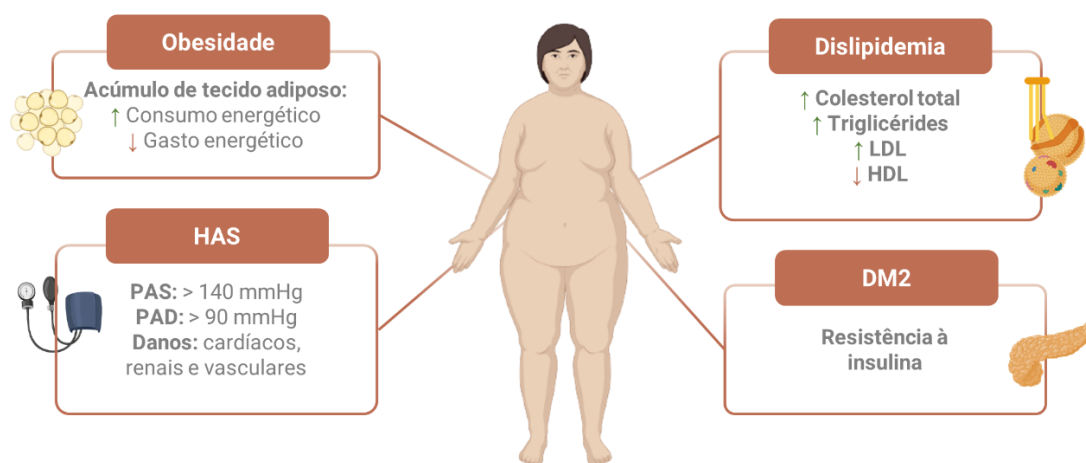
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SÍNDROME METABÓLICA E PATOLOGIAS CARDIOMETABÓLICAS ASSOCIADAS

2.1.1 Síndrome metabólica

A síndrome metabólica (SM) é caracterizada pela presença em conjunto de patologias cardiometabólicas intrinsecamente associadas (Figura 1), como obesidade, *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2), dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica (HAS) (MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018). A resistência à insulina e a obesidade central são os principais fatores de risco para o desenvolvimento dessas patologias (ALBERTI *et al.*, 2009; MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018).

Figura 1 – Principais patologias cardiometabólicas que caracterizam o diagnóstico da Síndrome Metabólica (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2006; BRAY *et al.*, 2016; CHO *et al.*, 2018; FOROUHI; WAREHAM, 2010; GILES *et al.*, 2009; KOPIN; LOWENSTEIN, 2017). DM2: *Diabetes Mellitus* tipo 2; HDL: *High Density Lipoprotein*; LDL: *Low Density Lipoprotein*; PAS: Pressão arterial sistólica; PAD: Pressão arterial diastólica.



Fonte: A autora (2023).

A prevalência da SM na população adulta brasileira é de aproximadamente 30%, influenciada, principalmente por causas ambientais como: o estilo de vida sedentário, consumo de comidas hipercalóricas e a diminuição da prática de atividade física (SAKLAYEN, 2018; VIDIGAL *et al.*, 2013).

O primeiro relato do aparecimento em conjunto das patologias associadas a SM foi publicado em 1923, com pacientes que possuíam hipertensão, hiperglicemia e hiperuricemia (PARIKH; MOHAN, 2012), uma definição para esse agrupamento de patologias só foi proposta em 1988 com o termo “Síndrome X” para pacientes que apresentassem resistência à insulina, intolerância à glicose, hiperinsulinemia, dislipidemia e HAS (REAVEN, 1988). Em 1999, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu o termo “Síndrome Metabólica”, caracterizando pela presença de resistência à insulina, intolerância à glicose ou DM2, em conjunto com duas ou mais condições que poderiam incluir HAS, dislipidemia, obesidade central e microalbuminúria (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

Diversos critérios de diagnóstico da SM já foram propostos por diferentes organizações, com destaque aos publicados nos anos de: 2001, pelo *National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III* (NCEP ATP III) (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 2001); 2005, com a modificação do critério NCEP ATP III pela *American Heart Association* (AHA) e o *National Heart, Lung, and Blood Institute* (NHLBI) (GRUNDY *et al.*, 2005); 2006, com atualização dessas modificações pela *International Diabetes Federation* (IDF) (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2006).

A IDF em conjunto com o NHLBI, a AHA, a *World Heart Federation* (WHF), a *International Atherosclerosis Society* (IAS) e a *International Association for the Study of Obesity* (IASO), propuseram em 2009 a unificação dos critérios diagnósticos para a SM (Tabela 1), solucionando principalmente as diferenças observadas nos limiares adotados para o diagnóstico de obesidade central em diferentes populações (ALBERTI *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Critérios para o diagnóstico clínico da síndrome metabólica. ^{*(1)} Circunferência abdominal recomendada pela IDF (*International Diabetes Federation*) para a população da América do Sul. ^{*(2)} O uso de tratamento farmacêutico recomendado para essas medidas é considerado um indicador alternativo aos pontos de corte categóricos. HDL-C: *High-density lipoprotein cholesterol*.

Critérios diagnósticos	Pontos de corte categóricos
Circunferência abdominal elevada ^{*(1)}	≥ 80 cm para mulheres ≥ 90 cm para homens
Triglicérides elevados ^{*(2)}	≥ 150 mg/dL (1,7 mmol/L)
HDL-C reduzido ^{*(2)}	< 50 mg/dL (1,3 mmol/L) para mulheres < 40 mg/dL (1,0 mmol/L) para homens
Pressão sanguínea elevada ^{*(2)}	≥ 130 mm Hg sistólica e/ou ≥ 85 mm Hg diastólica
Glicemia em jejum elevada ^{*(2)}	≥ 100 mg/dL

Fonte: Adaptado de Alberti et al. (2009).

2.1.2 Obesidade

A obesidade alcança cada vez mais níveis pandêmicos, em 2016 39% da população mundial adulta acima de 18 anos apresentava sobrepeso e 13% eram considerados obesos (BLÜHER, 2019; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021). O Índice de Massa Corpórea (IMC) é utilizado para definir obesidade, no qual o peso em quilogramas é dividido pelo quadrado da altura em metros (kg/m²) (CATENACCI; HILL; WYATT, 2009). As categorias do IMC definem que um indivíduo: abaixo do peso saudável, um IMC < 18,5 kg/m²; com peso saudável, um IMC 18,5-24,9 kg/m²; com sobrepeso, um IMC 25-29,9 kg/m²; com obesidade, um IMC de 30-39,9 kg/m²; com obesidade extrema, um IMC ≥ 40 kg/m² (CATENACCI; HILL; WYATT, 2009).

O IMC possui como vantagem a simplicidade na sua utilização em acompanhamentos clínicos e em estudos epidemiológicos. Entretanto, não diferencia entre tecido adiposo e massa magra corporal, ou na distribuição corporal do tecido adiposo. Assim medidas adicionais como a circunferência abdominal podem contribuir para a previsão de fatores de riscos associados à obesidade central (BRAY et al., 2016).

A obesidade central refere-se ao acúmulo de tecido adiposo na região intra-abdominal e visceral, e está associada aos maiores níveis de marcadores inflamatórios, DM2, dislipidemia e doença arterial coronariana, características fortemente relacionadas à síndrome metabólica (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006; JACOBS, 2010).

Essa maior predisposição ao acúmulo de gordura na região abdominal pode estar associada com o próprio tecido adiposo visceral, o qual apresenta mais efeitos deletérios, como a indução a resistência à insulina, desenvolvimento de DM2 e doenças cardiovasculares, em comparação ao tecido adiposo abdominal subcutâneo que apresenta menor influência nessas condições (JACOBS, 2010; SAM, 2018).

O acúmulo de tecido adiposo e consequente ganho de peso tem como principal causa o desbalanço energético, devido a um consumo superior ao gasto energético em um longo período de tempo (BRAY *et al.*, 2016). Esse desbalanço é influenciado por diversos fatores, entre eles: ambientais, como o consumo de alimentos hipercalóricos, ricos em açúcares e altamente processados; genéticos e epigenéticos, os quais podem influenciar a resposta individual à dieta e exercícios físicos; comportamentais, como a manutenção de um estilo de vida sedentário com baixo esforço físico (ROMIEU *et al.*, 2017).

As estratégias iniciais para reduzir o peso corporal se concentram em mudanças de estilo de vida, visando alcançar um balanço energético negativo, através de uma alimentação com menor consumo calórico, aumento da prática de atividade física ou a combinação de ambos (BRAY *et al.*, 2016; CHIN; KAHATHUDUWA; BINKS, 2016).

Uma alimentação que alcance o balanço energético negativo deve conter menos energia consumida do que o gasto diário. A escolha do tipo de dieta depende da qual o paciente melhor aderir, uma vez que diversas dietas, como as com menor ingestão de gordura ou de carboidratos, levam a redução de peso considerável se praticadas e mantidas durante períodos adequadamente recomendados (JOHNSTON *et al.*, 2014).

A combinação da prática de dieta com a realização de atividade física aumenta o gasto energético, resultando em um aumento na perda de peso de pelo menos 3-5% em comparação a realização da dieta isoladamente. A intensidade

do exercício físico influencia na perda de peso, exercícios aeróbicos, podem levar uma redução significativa de 2-3% no peso corporal, durante 12 meses sem a realização de dietas, enquanto exercícios de baixa intensidade, como caminhadas leves, que aumentem o número de passos diários, levam a uma perda de peso 1-1,5%, em 3-6 meses (CHIN; KAHATHUDUWA; BINKS, 2016). Em contrapartida, o aumento do consumo de alimentos processados, hipercalóricos, ricos em açúcares, em conjunto a um estilo de vida sedentário é um grande risco à obesidade, pois levam a um balanço energético positivo (ROMIEU *et al.*, 2017).

Outras estratégias podem ser utilizadas para alcançar o balanço energético negativo em pacientes que apresentem obesidade severa como: a utilização de fármacos, entretanto os usuários devem estar cientes dos possíveis efeitos adversos (BRAY *et al.*, 2016); procedimentos cirúrgicos, tais como a cirurgia bariátrica, por levarem a redução do peso de forma duradoura e melhorias nas patologias metabólicas associadas à obesidade, além de pacientes que foram acompanhados 12 anos após a realização da cirurgia tiveram alta remissão dos casos de DM2, HAS e dislipidemia (ADAMS *et al.*, 2017).

2.1.3 Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)

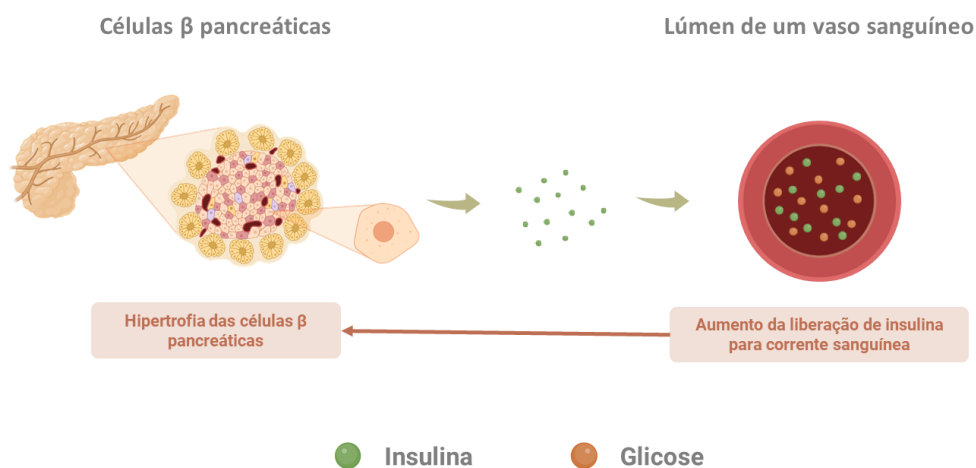
A *diabetes mellitus* (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pelo aumento dos níveis de glicose no sangue, a hiperglicemia (CHO *et al.*, 2018). A DM é classificada em DM Tipo 1 (DM1) causada pela destruição autoimune das células β pancreáticas ou DM tipo 2 (DM2) devido ao desenvolvimento de resistência à insulina (CHO *et al.*, 2018; FOROUHI; WAREHAM, 2010).

Aproximadamente 5 milhões de mortes são atribuídas a DM na população adulta mundial (20-99 anos), essa mortalidade está associada a complicações vasculares ocasionadas pela hiperglicemia, sejam macrovasculares, com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares ou microvasculares, como doença renal diabética, retinopatia e neuropatia (CHO *et al.*, 2018; COLE; FLOREZ, 2020). Estima-se que 451 milhões de pessoas convivam com DM na população mundial, entretanto 90-95% dos casos são de DM2 (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; CHO *et al.*, 2018).

O desenvolvimento da DM2 irá depender do histórico familiar, da presença de comorbidades, como obesidade, de uma alimentação rica em gorduras e com baixo teor de fibras, da inatividade física e do próprio envelhecimento natural (FOROUHI; WAREHAM, 2010). Aproximadamente metade dos casos mundiais de DM (49,7%) não são diagnosticados, principalmente devido ao aumento lento e gradual da hiperglicemia na DM2 ao longo dos anos e de poucos sintomas perceptíveis (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; CHO *et al.*, 2018).

A principal causa da DM2 é o desenvolvimento de resistência à insulina, no qual há uma redução na capacidade da insulina de induzir adequadamente a assimilação de glicose pelas células, devido a uma redução na ligação ao seu próprio receptor ou alguma alteração após essa ligação (PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHETA JR., 2003; ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2013). No desenvolvimento inicial da resistência à insulina (Figura 2), o pâncreas, através de um mecanismo compensatório, aumenta a liberação de insulina para a corrente sanguínea, tal aumento contínuo acarreta na hipertrofia das células β pancreáticas (ROBERTS; HEVENER; BARNARD, 2013).

Figura 2 – Mecanismo compensatório para suprir a demanda de insulina no estágio inicial de desenvolvimento da resistência à insulina.



Fonte: A autora (2023).

A resistência à insulina também pode ser ocasionada por um processo de lipólise inadequado (McCracken *et al.* 2018). Em níveis normais, a insulina além de induzir a entrada da glicose no meio intracelular, estimula a síntese de lipídeos e inibe a lipólise (Roberts *et al.* 2013). Na dislipidemia o aumento da concentração

de ácidos graxos livres na circulação sanguínea ocasiona a inibição da entrada de glicose no meio intracelular em células musculares esqueléticas e estimula o aumento da liberação de glicose, triglicerídeos e VLDLs (McCracken et al. 2018).

O músculo esquelético é o principal tecido responsável pela assimilação da glicose, a captação ocorre através da ligação da insulina ao seu receptor, ativando uma cascata de fosforilação que culmina com a translocação da proteína transportadora de glicose 4 (GLUT4) das vesículas citoplasmáticas para a membrana plasmática, a qual por sua vez permite a captação da glicose para o interior da célula. A disponibilidade de GLUT4 é um fator limitante na captação da glicose (BARROS; GUSTAFSSON, 2011; KLIP; MCGRAW; JAMES, 2019). A GLUT4, é codificada pelo gene *SLC2A4* e em camundongos a interrupção do gene *Slc2a4*, nas células musculares ocasiona resistência à insulina (ZISMAN et al., 2000).

Os indivíduos com DM2, em sua maioria, possuem sobrepeso ou obesidade, que podem causar algum grau de resistência à insulina e favorecer condições que aumentem os riscos à síndrome metabólica, como a dislipidemia, pressão sanguínea elevada e a hiperglicemia (ALBERTI et al., 2009). Ainda que classificados com IMC na categoria saudável, esses possuem uma maior tendência a apresentar acúmulo de tecido adiposo na região abdominal (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018).

O tratamento inicial da DM2 se concentra em mudanças no estilo de vida, com a prática de atividade física e mudanças na alimentação com recomendações individualizadas para cada caso, ou intervenções farmacológicas que reduzam a hiperglicemia, como o uso de metformina (VIJAN, 2015).

2.1.4 Dislipidemia

A dislipidemia é um conjunto de anormalidades lipídicas caracterizadas pela presença de níveis plasmáticos elevados de colesterol total, triglicérides e lipoproteína de baixa densidade (LDL, do inglês *Low Density Lipoprotein*), associados a níveis reduzidos de lipoproteína de alta densidade (HDL, do inglês *High Density Lipoprotein*) (KOPIN; LOWENSTEIN, 2017). Tais alterações lipídicas

acarretam um maior risco cardiovascular, diretamente relacionado ao desenvolvimento da aterosclerose (FERRARA *et al.*, 2021).

O colesterol e os triglicérides fazem parte das principais formas de lipídeos nos seres humanos (FERENCE; KASTELEIN; CATAPANO, 2020). O colesterol é um esteroide que possui papel essencial nas células de mamíferos, regulando a fluidez e permeabilidade da bicamada lipídica (LUO; YANG; SONG, 2020), além de ser o precursor para a biossíntese dos hormônios esteroides como a testosterona e os estrógenos (HU *et al.*, 2010). Os triglicérides são formados por três ácidos graxos ligados por esterificação a uma única molécula de glicerol e são a principal reserva energética armazenada em adipócitos (AHMADIAN *et al.*, 2007; SHAH; LIMKETKAI, 2017). Níveis altos de triglicérides predisõem ao desenvolvimento da síndrome metabólica (KOPIN; LOWENSTEIN, 2017).

Devido à natureza hidrofóbica do colesterol e triglicérides, esses têm seu transporte na corrente sanguínea facilitado por meio de lipoproteínas carreadoras de lipídeos, as quais são principalmente classificadas de acordo com sua densidade em: VLDL (do inglês *Very Low-Density Lipoprotein*), LDL e HDL (HOLMES; ALA-KORPELA, 2019).

As VLDLs são secretadas pelo fígado na corrente sanguínea e liberam seus triglicérides transportados, para exercerem suas funções nas células alvo, através da ação da lipase lipoprotéica, se tornando cada vez menores e passando a serem denominadas LDLs. Devido ao seu tamanho as VLDLs são incapazes de atravessar a camada endotelial das artérias, com a redução para LDLs através da ação das lipases essas passam a conseguir atravessar o endotélio, podendo permanecer retidas na parede arterial e se tornarem aterogênicas (HOLMES; ALA-KORPELA, 2019; LUO; YANG; SONG, 2020).

Concentrações baixas de colesterol HDL (HDL-C) também representam um risco para o desenvolvimento da aterosclerose (ROHATGI *et al.*, 2014). Esse risco é aumentado pelo papel desempenhado pela HDL na facilitação do transporte reverso do colesterol dos tecidos periféricos do organismo até o fígado, no qual o colesterol é convertido em sais biliares e eliminado nas fezes, contribuindo para a regulação dos níveis celulares de colesterol (RADER *et al.*, 2009; ROHATGI *et al.*, 2014). Os níveis adequados de colesterol total, LDL, HDL e triglicérides, segundo

a Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2017) são demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2 – Níveis adequados de colesterol total, LDL (do inglês *Low Density Lipoprotein*), HDL (do inglês *High Density Lipoprotein*) e triglicérides, segundo a Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.

Lípídeo	Nível adequado
Colesterol total	< 190 mg/dL
Colesterol LDL	< 130 mg/dL
Colesterol HDL	> 40 mg/dL
Triglicérides	< 150 mg/dL em jejum < 175 mg/dL sem jejum

Fonte: Adaptado de Sociedade Brasileira de Cardiologia (2017).

2.1.5 Hipertensão arterial sistêmica

A HAS é uma das principais causas mundiais de risco cardiovascular e mortalidade, diagnosticada principalmente por uma pressão arterial elevada, acima de 140 mmHg para a pressão arterial sistólica e acima de 90 mmHg para a pressão arterial diastólica (GILES *et al.*, 2009; MILLS; STEFANESCU; HE, 2020; STANAWAY *et al.*, 2018).

O diagnóstico da HAS, como uma síndrome cardiovascular complexa, não é realizado somente pelos níveis de pressão arterial, mas também em associação com demais biomarcadores hipertensivos, como danos a estrutura e função cardíaca, renal e vascular, que podem aumentar o risco de morte prematura (GILES *et al.*, 2009). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da HAS incluem: alto consumo de sódio, falta de atividade física, obesidade e envelhecimento natural (JOFFRES *et al.*, 2013; MILLS; STEFANESCU; HE, 2020).

As mortes causadas pela HAS estão relacionadas ao maior risco de desenvolver: doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral (AVC) isquêmico ou hemorrágico, os quais são ocasionados por aumentos agudos na pressão arterial que levam a vasoconstrição, alterando o fluxo sanguíneo e suprimento de oxigênio para o cérebro, episódios recorrentes causam danos vasculares que aumentam o risco de AVCs (MILLS; STEFANESCU; HE, 2020;

PISTOIA *et al.*, 2016); doença renal crônica, em condições normais o mecanismo de autorregulação da pressão arterial renal protege contra mudanças repentinas de pressão sanguínea, elevações na pressão sanguínea que excedem o limite dessa autorregulação aumentam a pressão do sangue nos próprios glomérulos, causando danos a estrutura glomerular, favorecendo a glomeruloesclerose e com perda progressiva da função renal (MENNUNI *et al.*, 2014; RUIZ-HURTADO; RUILOPE, 2018).

O aumento da pressão sanguínea tem como principal fator determinante o ganho de peso, principalmente a proporção entre a quantidade de massa muscular e de tecido adiposo (LITWIN; KUŁAGA, 2021). A prevalência da HAS entre indivíduos obesos é de 42,5%, em comparação a 15,3% em indivíduos que não estão acima do peso na população dos Estados Unidos (WANG; WANG, 2004).

Os fatores que causam a HAS relacionada a obesidade são complexos e interagem entre si, dentre eles podem se mencionar: o aumento da ativação do sistema nervoso simpático em indivíduos com obesidade visceral, devido ao consumo de dietas hipercalóricas que levam a uma maior liberação de noradrenalina e o aumento da pressão arterial; a produção local pelo próprio tecido adiposo de componentes do sistema renina-angiotensina, o angiotensinogênio e a formação final de Angiotensina II, causando vasoconstrição; A redução na disponibilidade de óxido nítrico (NO), ocasionada pela maior exposição aos ácidos graxos livres que aumentam a formação de superóxidos, reduzido a função vasodilatadora do NO (JIANG *et al.*, 2016; SERAVALLE; GRASSI, 2017).

O controle da pressão arterial pode reduzir o risco de morte associados à HAS, podendo ser realizado por intervenções farmacêuticas, com o uso de anti-hipertensivos (como diuréticos, betabloqueadores, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da enzima conversora de angiotensina e antagonistas dos receptores de angiotensina II) e/ou com mudanças no estilo de vida, através da redução da massa corporal, do consumo de sódio, de álcool e o aumento da prática de atividade física (SINHA; AGARWAL, 2019; WEBER *et al.*, 2014).

2.2 ESTRÓGENOS E SEUS RECEPTORES

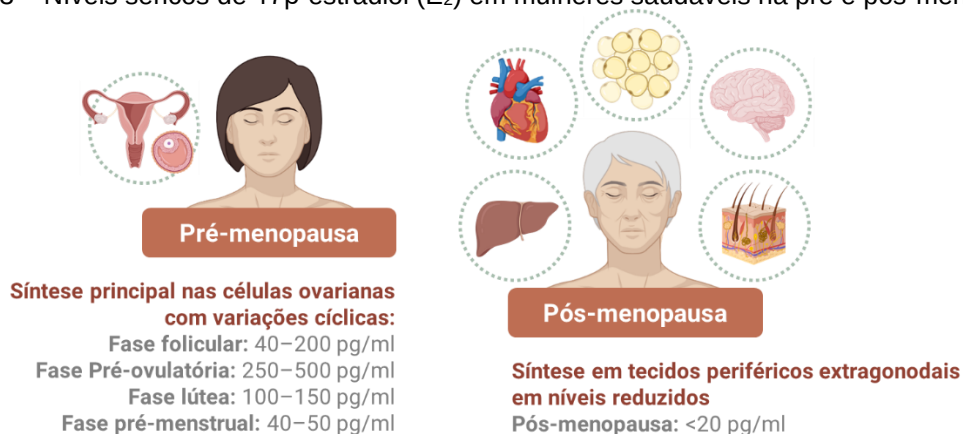
2.2.1 Estrógenos

Os estrógenos são hormônios esteroides derivados do colesterol, incluindo formas como a estrona (E_1), o estradiol (E_2 ou 17β -estradiol) e o estriol (E_3), sintetizados através da redução sucessiva no número de carbonos de 27 para 18, catalisada pelo citocromo P450 aromatase, processo conhecido como aromatização (FUENTES; SILVEYRA, 2019).

O E_2 é o principal hormônio esteroide sexual feminino, suas principais fontes são as células ovarianas da teca e da granulosa, porém também é sintetizado em tecidos extragonadais periféricos que expressam a enzima aromatase, como fígado, coração, pele, cérebro e tecido adiposo (CUI; SHEN; LI, 2013).

Durante o ciclo de vida feminino os níveis séricos de E_2 sofrem variações (Figura 3). As mulheres na pré-menopausa, com a manutenção do ciclo menstrual, têm a sua síntese principal nos ovários com variações cíclicas, maiores níveis no período pré-ovulatório e menores no período pré-menstrual. Na perimenopausa ocorre a redução dessa síntese pelas células ovarianas com níveis variáveis de E_2 e na pós-menopausa o E_2 é sintetizado em níveis mais reduzidos em tecidos periféricos extragonadais através da conversão da testosterona pela aromatase (CUI; SHEN; LI, 2013; GRUBER *et al.*, 2002).

Figura 3 – Níveis séricos de 17β -estradiol (E_2) em mulheres saudáveis na pré e pós-menopausa.



Fonte: Adaptado de Gruber *et al.* (2002) e Cui *et al.* (2013).

Os estrógenos exercem diversas funções fisiológicas em órgãos e tecidos: estimulam o desenvolvimento nos órgãos sexuais; regulam o ciclo menstrual e a reprodução; modulam a densidade óssea, inibindo a função dos osteoclastos; exercem efeitos neuronais protetivos, reduzindo o risco de Alzheimer e do declínio da função cognitiva; apresentam efeitos protetivos nos tecidos cardiovasculares, como a vasodilatação pela maior liberação de NO pelas células endoteliais, a redução da progressão da aterosclerose e a inibição da apoptose de células endoteliais. Entretanto, níveis elevados de estrógenos em mulheres aumentam a incidência de câncer de mama e do endométrio, através da indução da proliferação celular e redução da apoptose (GRUBER *et al.*, 2002; LIANG; SHANG, 2013).

2.2.2 Receptores de estrógenos

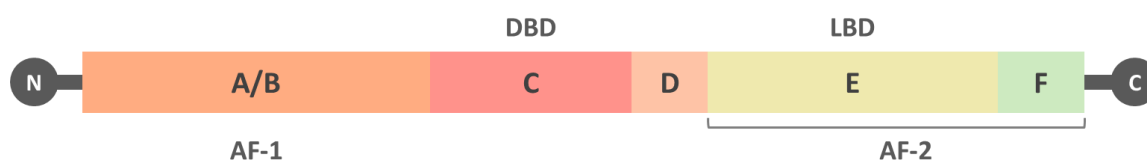
Os estrógenos exercem suas funções através da ligação aos seus transdutores de sinais, os receptores de estrógenos (ERs, do inglês *estrogen receptors*), os quais são receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição induzidos por hormônios (FUENTES; SILVEYRA, 2019; HEWITT; KORACH, 2018). Os ERs, após sua ativação, influenciam na transcrição de genes que têm sua expressão influenciada pelos estrógenos, através da ligação aos elementos de resposta ao estrógeno (EREs, do inglês *Estrogen-Response Elements*), sequências de DNA presente nas regiões regulatórias desses genes (GRUBER *et al.*, 2002).

As funções primordiais que permitem a ligação com afinidade e especificidade aos estrógenos e aos EREs são exercidas, respectivamente, pelo domínio de ligação ao ligante (LBD, do inglês *ligand-binding domain*) e pelo domínio de ligação ao DNA (DBD, do inglês *DNA-binding domain*) (HEWITT; KORACH, 2018).

Os ERs possuem uma estrutura formada por multidomínios (Figura 4), identificados de A até F: o domínio A/B, ou amino-terminal, é o mais extenso contendo a região de ativação da transcrição AF-1 (do inglês *transcriptional activation function 1*) responsável pelo aumento da taxa de transcrição de RNA através da interação com co-reguladores da transcrição; o domínio C contém o

DBD, formado por duas estruturas de dedos de zinco que reconhecem as sequências EREs; o domínio D, também denominado região da dobradiça (*hinge region*) contém parte da extensão carboxi-terminal do DBD; o domínio E, contém o LBD, o qual possui altíssima afinidade com o seu ligante, os estrógenos, além da região de ativação da transcrição AF-2 (*transcriptional activation function 2*), que influencia a taxa de transcrição e acessibilidade a cromatina; o domínio F, ou carboxi-terminal, é único aos ERs, não tendo sua função ainda bem compreendida, entretanto sabe-se que contribui para as interações e estabilidade da proteína dos ERs (HEWITT; KORACH, 2018).

Figura 4 – Estrutura de multidomínios dos Receptores de Estrógeno (ERs).

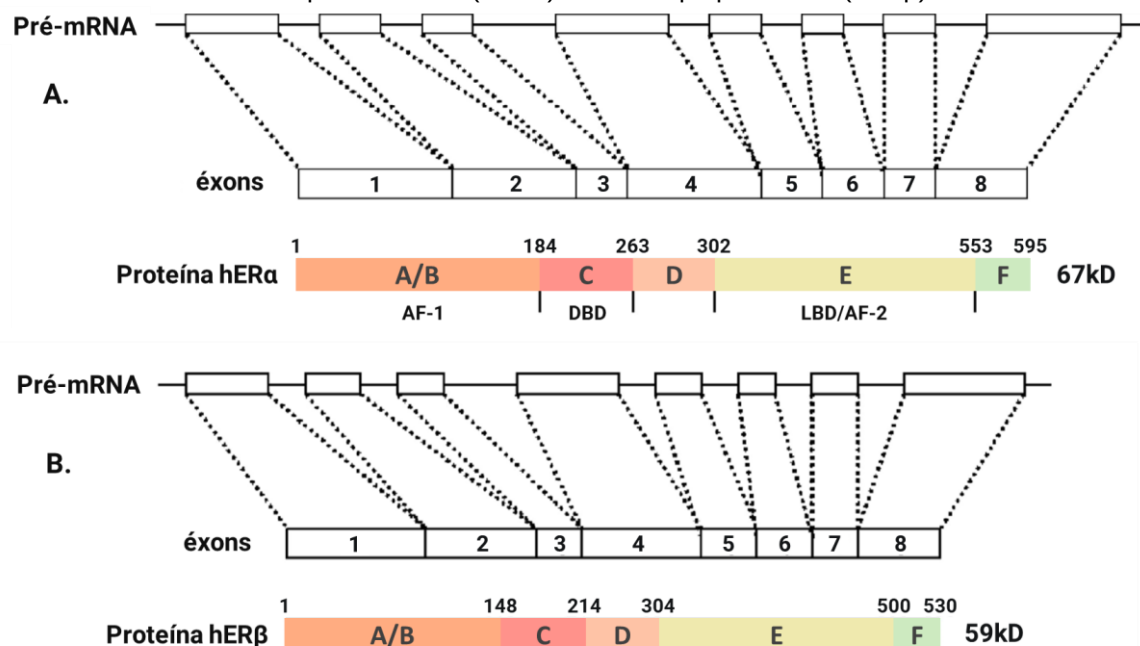


Fonte: Adaptado de Hewitt and Korach (2018) e Liang and Shang (2013).

Estruturalmente o DBD de ambos os subtipos são muitos similares, entretanto compartilham somente 53% das sequências de aminoácidos do LBD. Essa homologia reduzida leva aos receptores possuírem diferentes afinidades dependendo do tipo de estrógeno que está atuando como ligante (HEWITT; KORACH, 2018; ZWART *et al.*, 2010).

Mamíferos possuem dois principais subtipos de ERs, o ER α (Receptor de Estrógeno subtipo α), descrito em 1986, e o ER β (Receptor de Estrógeno subtipo β), descrito em 1996 (GREEN *et al.*, 1986; KUIPER *et al.*, 1996). Seus genes codificadores são localizados em cromossomos distintos, o *ESR1*, gene que codifica o ER α , é localizado no cromossomo 6, enquanto o *ESR2* que codifica o ER β no cromossomo 14 (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015). Os genes *ESR1* e *ESR2* possuem uma estrutura gênica composta por 8 éxons separados por 7 íntrons, as regiões exônicas codificam os respectivos domínios (Figura 5): o éxon 1 codifica o domínio A/B; éxons 2 e 3, parte do domínio C; éxon 4, o restante do domínio C, o domínio D e parte do domínio E; éxons 4, 5, 6, 7 e 8, o restante do domínio E; além do éxon 8 também codificar o domínio F (ASCENZI; BOCEDI; MARINO, 2006; ZHAO; O'NEILL; DIAZ BRINTON, 2005).

Figura 5 – Estrutura gênica e de multidomínios proteicos dos Receptores de Estrógeno humanos A. Subtipo α humano (hER α) e B. Subtipo β humano (hER β).



Fonte: Adaptado de Zhao et al. (2005).

Ambos subtipos são expressos em diversos tipos celulares e tecidos: o ER α é mais expresso em células de órgãos gonadais como útero, ovários, testículos, epidídimo, próstata, além de glândula mamária, tecido ósseo, fígado, rins, linfócitos e tecido adiposo; o ER β é mais expresso em tecidos extragonadais como cólon, medula óssea, linfócitos, endotélio vascular, pulmões, bexiga, tecido adiposo, além da próstata e dos ovários; ambos possuem níveis de expressão consideráveis no sistema cardiovascular e nervoso central (CUI; SHEN; LI, 2013; PATERNI *et al.*, 2014; SCARIANO *et al.*, 2008).

A função dos ERs nesses tecidos pode ser influenciada por moduladores seletivos de receptores de estrógeno (SERMs, do inglês *Selective Estrogen Receptor Modulators*). Os SERMs são compostos diversos que possuem efeitos agonistas ou antagonistas ao se ligarem aos ERs. Esses efeitos são específicos e seletivos a depender do tipo celular ou tecidual, do subtipo de receptor ao qual se ligam, de mudanças conformacionais induzidas por ligantes e da expressão tecidual de proteínas co-ativadoras ou co-repressoras (MARTINKOVICH *et al.*, 2014; MIRKIN; PICKAR, 2015).

2.2.3 Influência dos estrógenos e seus receptores no desenvolvimento de doenças cardiometabólicas

Os estrógenos exercem efeitos protetivos em relação ao desenvolvimento de patologias cardiometabólicas associadas à SM, principalmente através da influência no metabolismo de lipídeos, glicose e insulina (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015; MORSELLI *et al.*, 2017).

Esses efeitos podem ser observados pelo menor risco de desenvolver essas patologias em mulheres na pré-menopausa quando comparadas a homens na mesma faixa etária. Após a menopausa, com a redução dos níveis de E₂ e a perda dos efeitos protetivos, as mulheres passam a apresentar riscos similares aos homens (PUCCI *et al.*, 2017).

As funções e modulação da sinalização dos estrógenos através de seus receptores, ER α e ER β , nas doenças cardiometabólicas são elucidadas, em sua maioria, pelo uso de modelos murinos de *knockout* genético ou de SERMs (BARROS; GUSTAFSSON, 2011).

2.2.3.1 Estrógenos e seus receptores na obesidade

Após a menopausa, observa-se uma redução dos níveis de E₂ e uma maior prevalência da obesidade, com o maior acúmulo de tecido adiposo e visceral em comparação ao tecido adiposo subcutâneo, ocasionando a obesidade central (LEENERS *et al.*, 2017; LIZCANO; GUZMÁN, 2014).

Essa maior prevalência pode ser ocasionada por modificações no metabolismo do tecido adiposo na pós-menopausa, com um acúmulo de lipídeos e uma redução na sua utilização. Esse efeito se dá pela perda da ação dos estrógenos na indução da lipólise, pela ativação da Lipase Hormônio Sensível, e redução da lipogênese do tecido adiposo, pela diminuição da atividade proteica e expressão do gene da Lipoproteína Lipase (HOMMA *et al.*, 2000; JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015; PALIN *et al.*, 2003).

A realização da terapia de reposição hormonal (TRH), pode também induzir esses efeitos, levando a um menor ganho de massa corporal na pós-menopausa em comparação a mulheres que não realizam. Essa diferença no ganho de massa

é atribuída ao menor acúmulo da massa de tecido adiposo (JENSEN *et al.*, 2003; SANTEN *et al.*, 2010).

Quanto aos relatos da influência dos ERs na obesidade e no metabolismo do tecido adiposo (Figura 6), primeiramente em modelos de *knockout* genético, camundongos machos e fêmeas ER α -/- apresentam aumento considerável da massa de tecido adiposo em comparação a camundongos WT (do inglês *wild-type*), ocasionado pelo aumento na quantidade e tamanho dos adipócitos (HEINE *et al.*, 2000). Efeito semelhante observado em camundongos com ER β -/- sob dieta hiperlipídica, além de *knockout duplo* de ER α -/- e ER β -/- (FORYST-LUDWIG *et al.*, 2008; OHLSSON *et al.*, 2000).

Enquanto na utilização de SERMs agonistas para o estímulo da ação dos ERs, camundongos machos e fêmeas WT tratados com acolbifeno, agonista de ER α no tecido adiposo, apresentaram redução do ganho de massa corporal em comparação a animais tratados com placebo, o mesmo não ocorreu em camundongos ER α -/- (LEMIEUX *et al.*, 2005).

Agonistas de ER β , tais como o DIP (4-(2-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)-1H-indol-3-yl)phenol) e β -LGND2 (GTx-878), também levam uma redução no ganho de massa corporal associada a redução da massa de tecido adiposo, tanto visceral como subcutâneo, em camundongos (GONZÁLEZ-GRANILLO *et al.*, 2019; PONNUSAMY *et al.*, 2017). A utilização do agonista de ER β β -LGND2 (GTx-878), permitiu compreender os mecanismos que levam a essa redução, através da identificação da expressão de marcadores genéticos relacionados ao aumento das funções mitocondriais e geração de ATP. Demonstrando que a redução no ganho de peso pode estar relacionada ao aumento do gasto energético e a termogênese gerada pela ativação do ER β (PONNUSAMY *et al.*, 2017).

Além disso, a expressão gênica de ER β apresenta uma forte correlação positiva com a expressão da enzima 11 β HSD1 (11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1) principalmente em mulheres na pós-menopausa. A 11 β HSD1 catalisa a ativação da forma inerte da cortisona na forma ativa cortisol no tecido adiposo. A sua expressão aumentada leva a níveis aumentados de cortisol que estão relacionados ao maior acúmulo de gordura visceral e o

desenvolvimento de obesidade central e SM em humanos e camundongos (MCINNES *et al.*, 2012).

Figura 6 – Influência e ação dos receptores de estrógeno (ERs), ER α e ER β , na obesidade.
Receptores de estrógenos e a obesidade



Fonte: A autora (2023).

2.2.3.2 Estrógenos e seus receptores na *Diabetes Mellitus* Tipo 2

O aumento do risco de desenvolver DM2 na pós-menopausa ainda é controverso, pois pode estar diretamente relacionado ao declínio nos níveis de E₂ ou as mudanças causadas pelo envelhecimento, tais como a redução na massa do principal tecido responsável pela assimilação da glicose, o tecido muscular (BARROS; GUSTAFSSON, 2011; SZMUILOWICZ; STUENKEL; SEELY, 2009).

Em um estudo prospectivo, com acompanhamento de 1407 mulheres na pré e pós-menopausa durante 15 anos, 132 desenvolveram DM2, e aquelas com níveis endógenos maiores de E₂ na pré-menopausa tiveram um menor risco de desenvolver DM2 na pós-menopausa (PARK *et al.*, 2017).

A influência dos níveis de E₂ na DM2 pode ser explicada pelos seus efeitos no metabolismo da glicose e da insulina. Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, observou-se que o uso de E₂ normalizou os níveis de glicose e a sensibilidade à insulina (BRYZGALOVA *et al.*, 2008), além do E₂ aumentar a expressão dos receptores de insulina nos adipócitos (JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015).

Além do E₂ endógeno, a TRH com E₂ via oral, associado ou não ao uso de progesterona, levou a uma menor incidência de DM2 nas que a utilizavam em

comparação a mulheres que nunca realizaram reposição hormonal (LAUZON-GUILLAIN *et al.*, 2009).

Em relação aos estudos que abordam a Influência dos ERs na DM2 e no metabolismo da glicose e insulina (Figura 7), camundongos ER α -/- apresentaram hiperinsulinemia e hiperglicemia em jejum, além de tolerância diminuída à glicose em comparação a camundongos WT, provavelmente devido a uma produção desbalanceada de insulina. Enquanto nos camundongos ER β -/- os níveis de glicose e tolerância à glicose estavam normais, reforçando a influência principal do ER α na ação dos estrógenos no controle da glicemia e insulinemia (BRYZGALOVA *et al.*, 2006).

As células β pancreáticas de camundongos ER α -/-, apresentam maior expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e apoptose, *Chop* e *Oma1*. Em condições normais, o ER α , atua como um fator de transcrição se ligando a sequência consenso ERE das regiões promotoras dos genes *Chop* e *Oma1* reprimindo sua transcrição. Essa repressão promove a sobrevivência das células β , diminuindo o estresse oxidativo e a apoptose, fenômenos comuns na DM2 na fase em que as células β não mais conseguem compensar o fornecimento de insulina para superar a resistência à insulina nos demais tecidos (ZHOU *et al.*, 2018).

A proteção das células β pancreáticas à apoptose não está restrita somente ao ER α , ambos ERs levam a esse efeito, o ER α possuindo uma maior diminuição da susceptibilidade à apoptose em comparação ao ER β , uma vez que células tratadas com PPT (Propyl pyrazole triol), agonista de ER α , apresentam uma prevenção da apoptose similar as tratadas com E₂, enquanto células tratadas com DPN (Diarylpropionitrile), um agonista de ER β , promoveram uma prevenção, porém reduzida (LIU *et al.*, 2009).

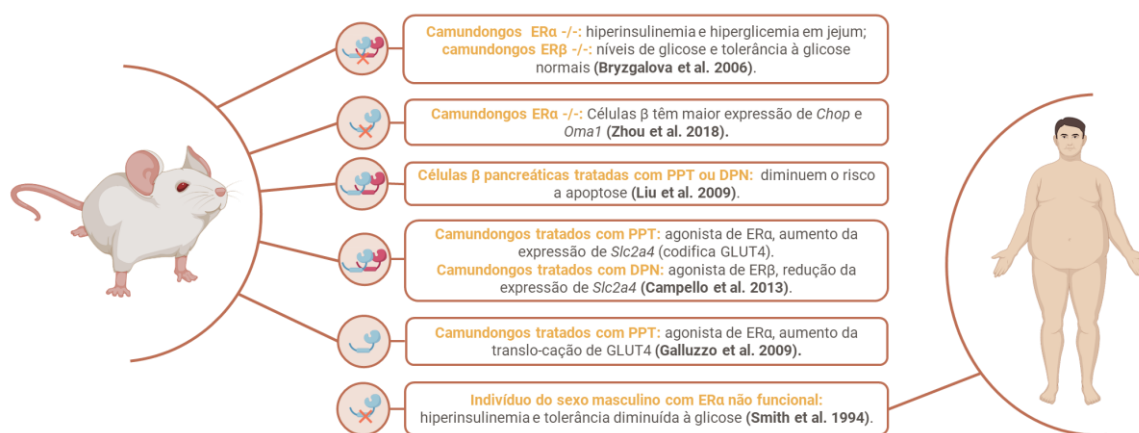
Em adipócitos de camundongos tratados com PPT apresentaram um aumento da expressão do gene *Slc2a4*, que codifica a Glut4, responsável pela captação da glicose para o meio intracelular. Enquanto que o tratamento com DPN, um agonista de ER β , levou a redução da expressão do gene *Slc2a4*. Assim, os subtipos dos ERs possuem funções opostas na expressão da proteína Glut4 nos adipócitos, o ER α possui um papel de induzir a expressão, ocasionando o aumento da captação de glicose, enquanto o ER β leva a uma repressão

(CAMPELLO *et al.*, 2013). Em miócitos de camundongos tratados com PPT, aumenta-se também a translocação da Glut4 (GALLUZZO *et al.*, 2009).

O único caso clínico relatado de uma mutação do tipo *nonsense* não letal do gene que codifica ER α , *ESR1*, formando uma proteína ER α não funcional, em um indivíduo do sexo masculino, apresentou hiperinsulinemia e tolerância diminuída à glicose (SMITH *et al.*, 1994).

Figura 7 – Influência e ação dos receptores de estrógeno (ERs), ER α e ER β , na *Diabetes Mellitus* Tipo 2 (DM2).

Receptores de estrógenos e a *Diabetes Mellitus* Tipo 2



Fonte: A autora (2023).

2.2.3.3 Estrógenos e seus receptores na dislipidemia

Na dislipidemia, o perfil lipídico na pós-menopausa passa a ser caracterizado como aterogênico, com o aumento dos níveis de colesterol total, LDL, triglicérides e redução dos níveis de HDL (ANAGNOSTIS *et al.*, 2015). O uso de TRH apresenta efeitos benéficos nos níveis lipídicos em mulheres na pós-menopausa, reduzindo os níveis de LDL e aumentando os níveis de HDL (SALPETER *et al.*, 2006).

Estudos relatando a Influência dos ERs na dislipidemia e metabolismo de lipídeos (Figura 8) incluem camundongos ER α -/- que apresentaram maior expressão do gene *Scd1*, que codifica a enzima estearoil-CoA dessaturase que catalisa a produção de substratos para a síntese de triglicerídes, os ácidos graxos monoinsaturados (BRYZGALOVA *et al.*, 2006). Adicionalmente, camundongos adultos ER α -/- apresentaram partículas de LDL menores e mais densas com

maiores níveis de colesterol, além de níveis aumentados de HDL, o mesmo não ocorreu em camundongos somente ER β -/-. (OHLSSON *et al.*, 2000);

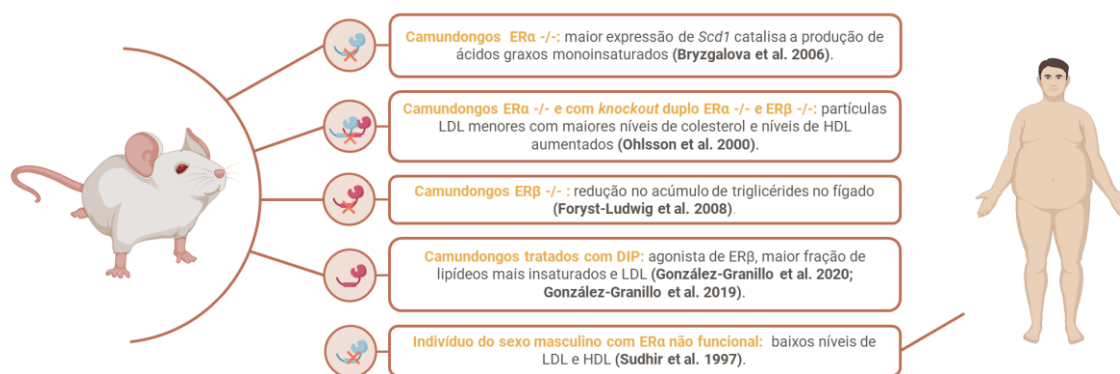
Entretanto, camundongos ER β -/- sob dieta hiperlipídica apresentaram uma redução no acúmulo de triglicérides no fígado e menor massa hepática em comparação a camundongos WT, mesmo com o aumento da massa de tecido adiposo (FORYST-LUDWIG *et al.*, 2008).

O estímulo a ação de ER β pela utilização do agonista DIP em camundongos sob dieta hiperlipídica ocasionou uma mudança no perfil lipídico hepático com uma maior fração de lipídeos mais insaturados e menos lipídeos saturados em comparação aos camundongos com somente dieta hiperlipídica, além de níveis de LDL reduzidos (GONZÁLEZ-GRANILLO *et al.*, 2019, 2020);

Além do único caso clínico humano da proteína ER α não funcional, apresentar baixos níveis de LDL, resultantes da liberação reduzida do seu precursor de VLDL e também menores níveis de HDL, devido a perda do estímulo dos estrógenos para produção de maiores níveis de HDL (SUDHIR *et al.*, 1997).

Figura 8 – Influência e ação dos receptores de estrógeno (ERs), ER α e ER β , na dislipidemia.

Receptores de estrógenos e a dislipidemia



Fonte: A autora (2023).

2.2.3.4 Estrógenos e seus receptores nas doenças cardiovasculares

Os efeitos do E₂ também acarretam uma menor incidência e severidade das DCVs em mulheres na pré-menopausa em comparação a homens na mesma faixa etária e essa proteção cardiovascular reduz gradativamente após a menopausa (IORGA *et al.*, 2017).

Os efeitos cardioprotetivos do E₂ incluem diminuição ao risco de complicações como: falência cardíaca, aumentando a sobrevivência celular através da redução do estresse oxidativo e apoptose, e induzindo a angiogênese devido a uma maior expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endothelial growth factor*); fibrose cardíaca, modulando a matriz extracelular no miocárdio através da inibição da síntese de colágeno fibrilares, da proliferação de fibroblastos e da expressão de genes que induzem a fibrose; HAS, induzindo a vasodilatação, também pela maior expressão de VEGF, que por sua vez estimula a produção de óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *Nitric oxide synthase*) levando a uma maior síntese de NO; aterosclerose, pelo controle da dislipidemia e redução na produção de citocinas pró-inflamatórias (IORGA *et al.*, 2017; JIA; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFSSON, 2015; YANG; RECKELHOFF, 2011).

Ainda carece de mais estudos se a utilização de TRH tem impacto na proteção cardiovascular, entretanto evidências demonstram que os benefícios na prevenção de DCVs são melhor obtidos se a TRH for realizada nos anos iniciais a menopausa, antes que os efeitos deletérios dos baixos níveis de E₂ sejam estabelecidos (YANG; RECKELHOFF, 2011).

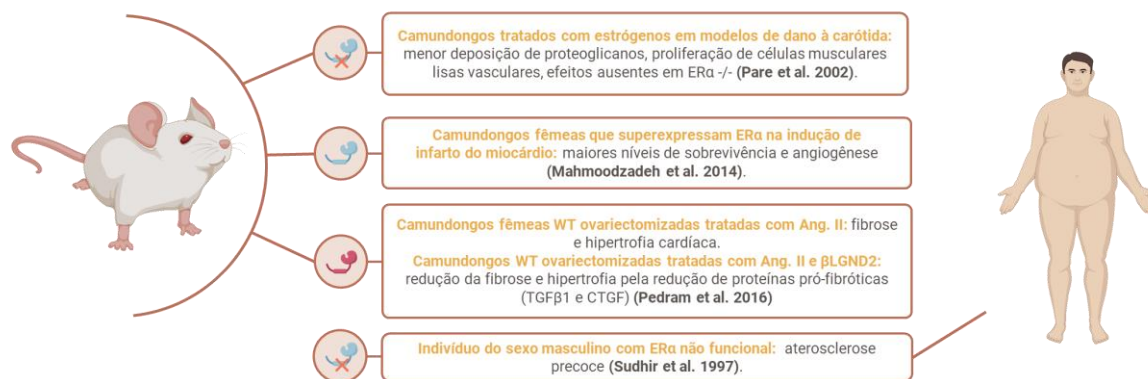
Entre os estudos murinos que relatam a Influência dos ERs no desenvolvimento DCVs (Figura 9) estão a observação de um menor risco à fibrose e hipertrofia cardíaca. Em camundongos WT tratados com reposição de estrógeno observou-se uma menor deposição de proteoglicanos, juntamente a uma proliferação de células musculares lisas vasculares em modelos de danos vasculares à carótida e esses efeitos protetivos foram ausentes em camundongos ER α -/- (PARE *et al.*, 2002). Juntamente a camundongos fêmeas tratadas com β LGND2, agonista de ER β , apresentarem redução da expressão de TGF β 1 (do inglês *transforming growth factor receptor beta 1*) e CTGF (do inglês *Connective tissue growth factor*), proteínas pró-fibróticas, essa redução não foi observada em camundongos ER β -/- (PEDRAM *et al.*, 2016).

Já a superexpressão ER α em camundongos fêmeas leva a proteção a danos cardiovasculares após a indução de infarto do miocárdio, com maiores níveis de sobrevivência e angiogênese e níveis atenuados de fibrose em comparação aos camundongos WT (MAHMOODZADEH *et al.*, 2014).

O indivíduo do sexo masculino relatado com a proteína ER α não funcional apresentou desenvolvimento precoce de aterosclerose e calcificação na artéria coronária descendente (SUDHIR *et al.*, 1997).

Figura 9 – Influência e ação dos receptores de estrógeno (ERs), ER α e ER β , nas doenças cardiovasculares (DCVs).

Receptores de estrógenos e as doenças cardiovasculares



Fonte: A autora (2023).

2.2.4 Estrógenos e seus receptores em processos inflamatórios na síndrome metabólica

As doenças cardiometabólicas que constituem a SM apresentam uma associação com um estado pró-inflamatório. Essa associação pode estar relacionada ao excesso de tecido adiposo observado em indivíduos com obesidade central, uma vez que esse tecido influencia no metabolismo através do aumento da produção de citocinas que estimulam a inflamação como Fator de Necrose Tumoral (TNF), Interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1 β) (HE; YUAN; MAEDLER, 2019; SCARPELLINI; TACK, 2012).

Os níveis aumentados de TNF no tecido adiposo de indivíduos obesos induzem a resistência à insulina (LONTCHI-YIMAGOU *et al.*, 2013). Essa indução se dá através do aumento da lipólise, que acarreta no aumento da liberação de ácidos graxos livres, levando a uma maior liberação de glicose e lipídeos hepáticos, além de uma menor assimilação da glicose (MCCRACKEN; MONAGHAN; SREENIVASAN, 2018; RUAN *et al.*, 2002).

A exposição a níveis aumentados de glicose *in vitro* em células β pancreáticas humanas leva ao aumento dos níveis de IL-1 β , através da ativação

da via NF- κ B, e ocasiona aumento da apoptose e perda de função dessas células. Em concordância, níveis baixos de IL-1 β aumentam a proliferação e a sobrevivência das células β pancreáticas (MAEDLER *et al.*, 2002, 2006).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias também pode participar do desenvolvimento da HAS (AGITA; THAHA, 2017). Maiores níveis de TNF estão associados com uma menor produção de NO, ocasionada pela menor expressão de eNOS (Óxido Nítrico Sintase endotelial), diminuindo a capacidade de vasodilatação (ZHANG *et al.*, 2009). Além de níveis maiores de IL-6 serem observados em pacientes hipertensos em comparação a pacientes normotensos e em ambos os grupos é demonstrada uma relação dessa maior liberação de IL-6 com a ativação do sistema RAS, através de um aumento significativo da produção de IL-6 em resposta a infusão de angiotensina II (CHAMARTHI *et al.*, 2011).

O E₂ pode modular a produção dessas citocinas pró-inflamatórias em monócitos e macrófagos em modelos *in vitro*, nos quais o E₂ atua inibindo a síntese de TNF, IL-6 e IL-1 β , e na ausência do tratamento com E₂ seus níveis são aumentados (FISH, 2008; KRAMER; KRAMER; GUAN, 2004).

Assim, a ação dos estrógenos nos seus receptores (ERs) ocasiona a modulação da resposta imune, evidências dessa modulação podem ser reforçadas pela expressão de ambos os receptores em linfócitos e monócitos circulantes do sangue periférico (PHIEL *et al.*, 2005; SCARIANO *et al.*, 2008). Quando comparadas proporcionalmente a expressão de ER α e ER β : linfócitos T CD4⁺ possuem maior expressão de ER α ; Linfócitos T CD8⁺, não possuem diferença de expressão significativa; linfócitos B, apresentam maior expressão de ER β ; monócitos, também não possuem diferença de expressão significativa; Monócitos no estágio de diferenciação para macrófagos, apresentam maior expressão de ER α (MURPHY *et al.*, 2009; PHIEL *et al.*, 2005).

O tratamento com E₂ em monócitos e macrófagos aumenta a expressão do ER α em macrófagos, mas não em monócitos, o mesmo efeito não é observado na expressão de ER β em nenhum dos tipos celulares (MURPHY *et al.*, 2009).

A modulação do processo inflamatório pelos ERs pode ser observada em modelo animal utilizando camundongos ovariectomizados, os quais foram tratados com PPT, um ligante agonista de ER α , obtendo redução significativa das

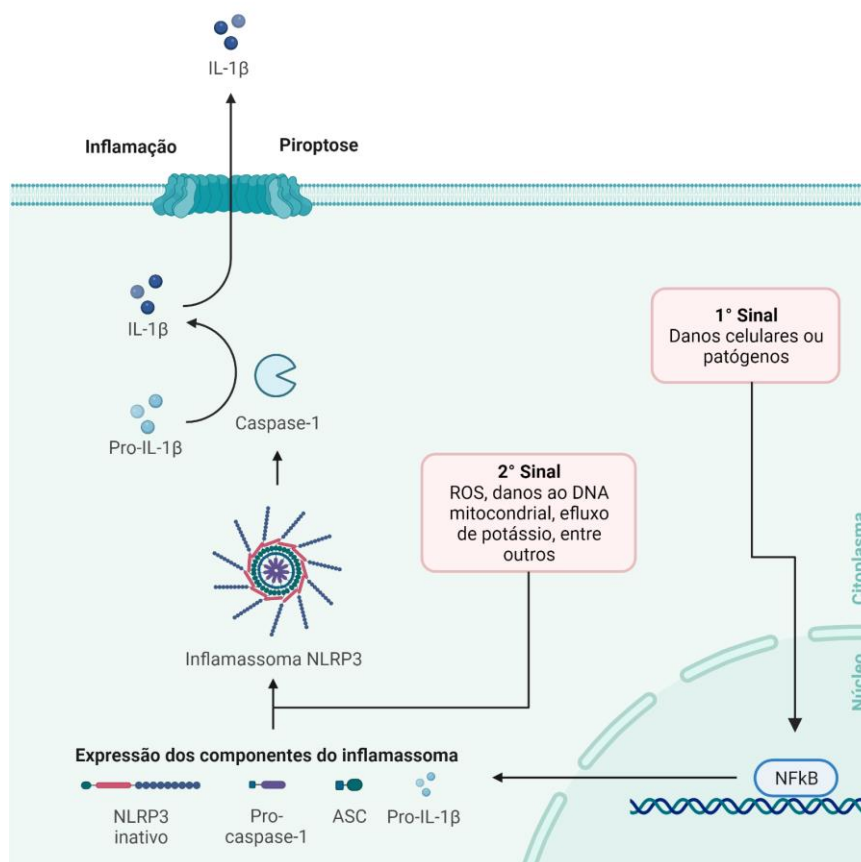
citocinas pró-inflamatórias TNF, Interferon- γ (IFN- γ) e IL-6, entretanto o tratamento com DPN, um ligante agonista de ER β , não levou há alterações nos níveis dessas citocinas (TIWARI-WOODRUFF *et al.*, 2007).

2.2.4.1 Estrógenos, seus receptores e o complexo inflamassoma NLRP3 na síndrome metabólica

Dentre as citocinas que têm seus níveis aumentados nas doenças cardiometabólicas associadas à SM, existe o interesse na investigação da influência no estado pró-inflamatório da IL-1 β e o complexo proteico responsável pela sua maturação e liberação, o inflamassoma NLRP3 (do inglês *Nucleotide-binding oligomerization domain-Like Receptor Protein 3*), na SM e nas patologias que compõem o seu diagnóstico (WANG; MO, 2020)

A maturação e liberação da IL-1 β pelo inflamassoma NLRP3 ocorre através de um mecanismo de duas etapas (Figura 10). Primeiramente ocorre a ativação do fator de transcrição NF- κ B pela identificação de danos celulares ou patógenos, o qual irá induzir a expressão das formas inativas do NLRP3 e pro-IL-1 β . Após um segundo sinal - como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos ao DNA mitocondrial ou efluxo celular de potássio - o NLRP3 sofre oligomerização, recrutando uma proteína adaptadora ASC (*Apoptosis-associated Speck-like Protein*) e uma protease caspase-1 formando o inflamassoma NLRP3. A caspase-1 é responsável por converter a pro-IL-1 β em IL-1 β , citocina que estimula a inflamação e induz a piroptose, uma forma lítica de morte celular (BROZ; DIXIT, 2016).

Figura 10 – Ativação do complexo proteico inflamassoma NLRP3 e a liberação da forma ativa da citocina IL-1 β .



Fonte: Adaptado de Broz and Dixit (2016) e Rheinheimer et al. (2017).

Os níveis séricos de NLRP3 são aumentados em mulheres com SM, o mesmo não é observado em indivíduos do sexo masculino. Esse aumento possui uma tendência crescente conforme aumentam o número de patologias associadas a SM que essas mulheres são diagnosticadas, estando correlacionado positivamente com o IMC, a circunferência abdominal e a idade (AL-DAGHRI *et al.*, 2021).

O aumento de processos inflamatórios com relação a idade pode estar associado ao acúmulo de moléculas relacionadas aos danos celulares devido ao estresse metabólico (LATZ; DUEWELL, 2018). Entretanto, apesar de pouco ser conhecido sobre o papel do NLRP3 no avanço da idade e envelhecimento natural feminino humano, observações em modelos murinos demonstram que camundongos *Nlrp3*^{-/-} possuem um menor envelhecimento ovariano e têm maior fertilidade (NAVARRO-PANDO *et al.*, 2021).

A influência do E₂ e dos seus receptores na expressão do NLRP3 e seus componentes possui uma especificidade ao depender dos tipos celulares e teciduais, além de diferentes patologias na qual é investigada (Figura 11). Em células humanas normais do cólon, após o uso de agonistas da ação de ER α ou ER β , respectivamente, PPT ou ERB-041, é verificado o aumento dos níveis de transcrição do *NLRP3* e o estímulo ao recrutamento da pro-caspase-1 e ASC (FAN *et al.*, 2019).

Um aumento da expressão de *Nlrp3* também é observado nos mastócitos de camundongos fêmeas em tecido com lesões de endometriose, esse aumento é ocasionado por uma interação de ER α com uma sequência ERE funcional do promotor do gene *Nlrp3* (GUO *et al.*, 2021). Em concordância, camundongos que superexpressam ER β , em modelos de indução de endometriose, possuem níveis elevados de NLRP3, IL-1 β e caspase-1 em lesões endometriais ectópicas (HAN *et al.*, 2015). Células cancerígenas hepáticas também tiveram uma correlação positiva significativa entre os níveis de expressão de ER β com os do inflamassoma juntamente aos seus componentes, *NLRP3*, *caspase-1*, *ASC* e *IL-1 β* (WEI *et al.*, 2015).

Enquanto em monócitos humanos uma variante de *splicing* de ER α com 36kD inibe a ativação do fator de transcrição NF- κ B, responsável por induzir a transcrição dos componentes do inflamassoma NLRP3, através de uma interação direta com o componente p65 do NF- κ B (BISWAS *et al.*, 2005; BROZ; DIXIT, 2016; PELEKANOU *et al.*, 2016).

O ER β também pode possuir um efeito inibitório na expressão do NLRP3 em diferentes tecidos. Sinoviócitos semelhantes a fibroblastos, provenientes de tecidos sinoviais de indivíduos com osteoartrite, possuem níveis de mRNA e proteicos de NLRP3, e a produção de IL-1 β drasticamente reduzidos pelo tratamento com E₂, o uso do antagonista da ação de ER β PHTPP levou a perda dessa redução, demonstrando que os efeitos inibitórios do E₂ nessas células são mediados por ER β (SHI *et al.*, 2018). No hipocampo de camundongos fêmeas, a ação do E₂ sob ER β ocasiona a inibição da expressão do *Nlrp3*, uma vez que camundongos ovariectomizadas e com níveis reduzidos de E₂ possuíam níveis de expressão gênica do *Nlrp3* aumentados e esses níveis foram reduzidos pelo uso do agonista da ação de ER β , o DPN (XU *et al.*, 2016).

Figura 11 – Influência dos receptores de estrógeno (ER α e ER β) na expressão gênica ou proteica do inflamassoma NLRP3 e seus componentes.



Fonte: A autora (2023).

2.2.5 Expressão dos receptores de estrógenos durante a menopausa e o envelhecimento

A redução da expressão de ER α de acordo com o envelhecimento fisiológico já foi observada em: células do átrio direito e da mucosa do cólon, ocasionada pela metilação das áreas ricas em citosina e guanina, conhecidas como ilhas CpG, do promotor do gene *ESR1* (ISSA *et al.*, 1994; POST *et al.*, 1999); glomérulos de camundongos fêmeas, podendo estar associada com o maiores níveis de estresse oxidativo causado pelo próprio envelhecimento natural (PEREIRA-SIMON *et al.*, 2012); tecidos do endotélio, músculo liso vascular e aorta de camundongos fêmeas com fenótipo envelhecido, quando comparadas às de fenótipo jovem (NOVENSÀ *et al.*, 2011).

Entretanto, a expressão de ER β nos tecidos do endotélio, músculo liso vascular e aorta, comparando camundongos com fenótipo envelhecido ao jovem, se demonstrou aumentada (NOVENSÀ *et al.*, 2011). Em concordância, os níveis de expressão de ER β no tecido adiposo de mulheres pós-menopausa estavam regulados positivamente em cerca de duas vezes mais quando em comparação a mulheres na pré-menopausa, ambos os grupos com mulheres saudáveis e com o peso normal (MCINNES *et al.*, 2012).

A expressão dos ER em monócitos provenientes do sangue periférico foi avaliada por citometria de fluxo, de acordo com as fases da vida após a menopausa, sem e posterior a TRH, em relação a mulheres jovens na pré-menopausa. As mulheres na pós-menopausa que não realizavam TRH apresentaram expressão reduzida do ER em comparação a mulheres jovens na pré-menopausa. A TRH foi realizada nas mulheres pós-menopausa avaliadas anteriormente e após 3 meses do seu início ocorreu o aumento na expressão do ER (BEN HUR *et al.*, 1995).

Quando avaliados os níveis de expressão de ER α e ER β em células mononucleares do sangue periférico, por RT-qPCR, em mulheres na pré e pós-menopausa, não houve diferença de expressão significativa entre células T (CD4⁺ e CD8⁺) e B, entretanto em monócitos observou-se um aumento de expressão de ER α na pós-menopausa e não houve diferença significativa da expressão de ER β (PHIEL *et al.*, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Humana (LGBMH) e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - setor de Biologia Molecular, ambos na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O banco de amostras foi derivado de pacientes com suspeita de desenvolvimento de aterosclerose, coletadas no período entre fevereiro e dezembro de 2022, sendo provenientes dos setores de Hemodinâmica, do Hospital da Ilha do Leite e Hospital das Clínicas da UFPE - Recife/Pernambuco, Brasil.

3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO NO ESTUDO

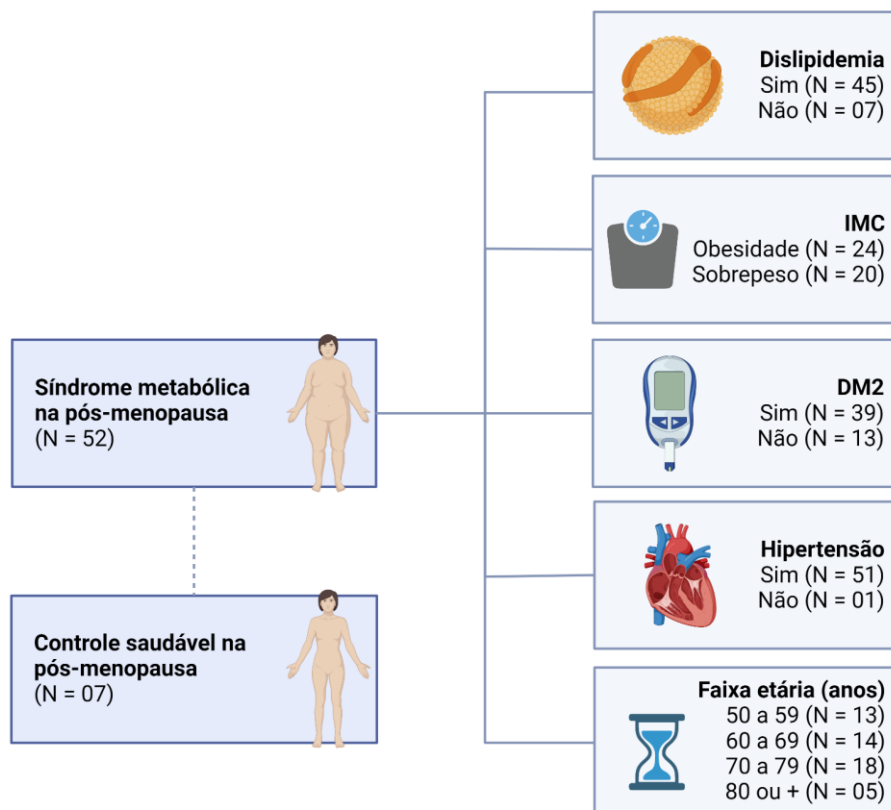
Os critérios de inclusão e definição da SM e suas patologias associadas para o grupo de estudo foram definidos pela classificação da IDF (Alberti et al. 2009), demonstrados na Tabela 1. Enquanto para o grupo controle, as mulheres não possuíam SM ou demais doenças cardiometabólicas, como obesidade, dislipidemia, HAS e DM. A fase pós-menopausa foi designada como um período acima de 12 meses de amenorreia sem nenhuma condição clínica associada.

Os critérios de exclusão para o grupo de estudo e controle foram o diagnóstico prévio de doenças autoimunes, infecciosas, cancerígenas ou que estejam realizando reposição hormonal.

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo incluiu um total de 59 indivíduos. Os indivíduos estavam divididos em dois grupos, o grupo de estudo composto por mulheres com SM na pós-menopausa (N = 52) e o grupo controle de mulheres que não possuíam doenças cardiometabólicas e nenhum dos critérios de exclusão (N = 7). O grupo de estudo foi subdividido de acordo com o diagnóstico de patologias associadas a SM e faixa etária (Figura 12).

Figura 12 – Delineamento experimental, demonstrando a divisão entre o grupo de estudo (mulheres com síndrome metabólica na pós-menopausa) e o controle saudável (mulheres sem doenças cardiometabólicas na pós-menopausa). O Grupo de estudo foi subdividido de acordo com o diagnóstico das doenças cardiometabólicas e faixa etária. IMC: Índice de Massa Corpórea; DM2: *Diabetes Mellitus* tipo 2.



Fonte: A autora (2023).

3.4 ISOLAMENTO DE RNA

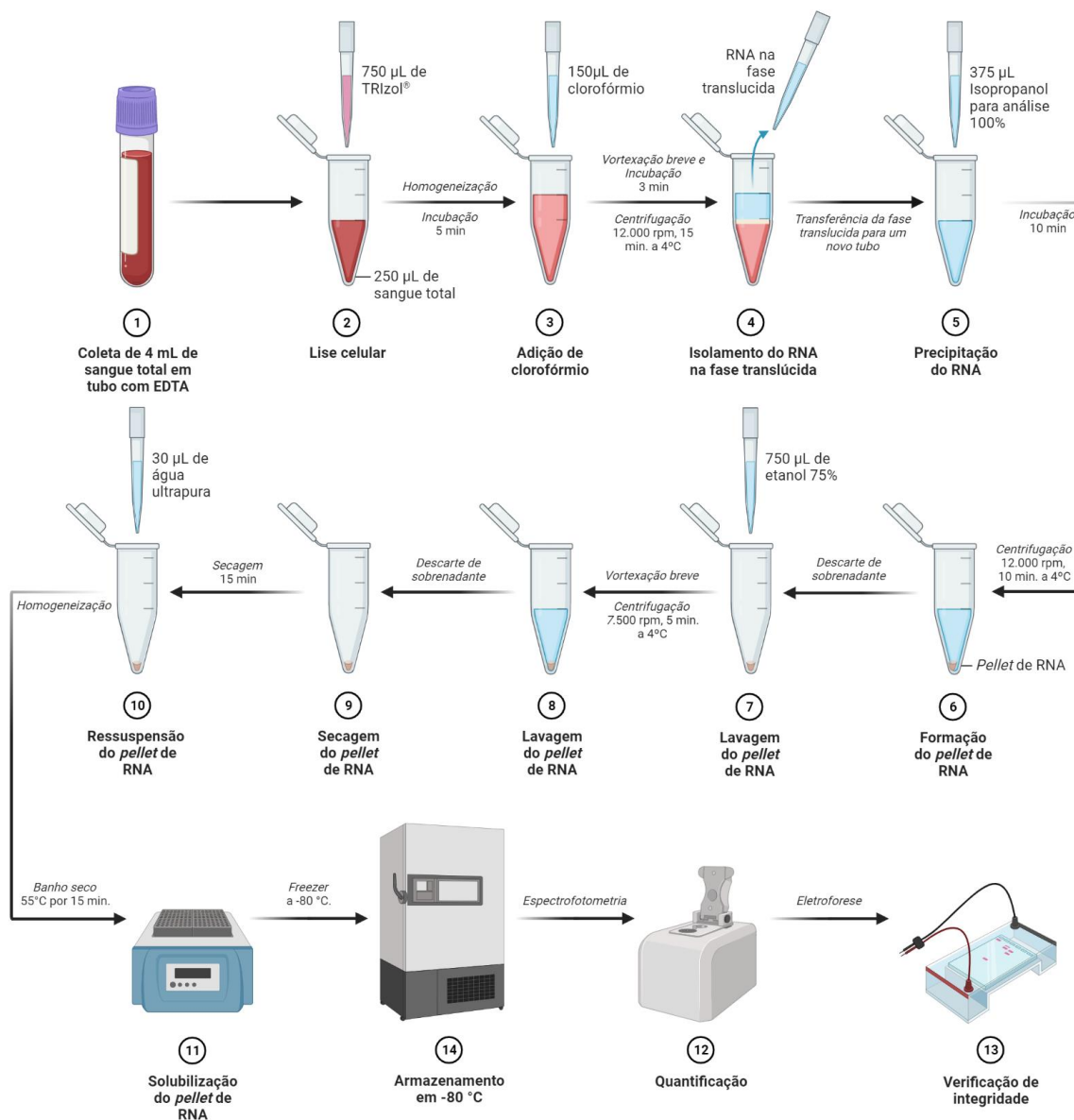
O RNA total foi isolado de sangue total usando o reagente TRIzol® e seguindo as instruções do fabricante (Figura 13). Após a coleta de 4 mL sangue periférico em tubo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 250µL do sangue foram transferidos para um tubo com 750µL de Trizol® e homogeneizado vigorosamente, seguindo a um período de incubação de 5 minutos em temperatura ambiente, após o qual foram acrescentados 150µL de clorofórmio e agitado vigorosamente, seguido por um novo período de incubação por 3 minutos, e os tubos centrifugados a 12.000 rpm, durante 15 minutos a 4°C .

Após a separação por gradiente de densidade, apenas a fase translúcida do material foi transferida para um novo tubo, no qual acrescentou-se a amostra 375 µL de isopropanol (100%) para fixação do RNA.

A amostra foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e ao pellet adicionado 750 µL de etanol (75%). O tubo foi vortexado brevemente e centrifugado a 7.500 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e após secagem completa da amostra por 15 minutos, o pellet foi ressuspendido em 30µL água ultrapura. A amostra homogeneizada foi incubada em banho seco a 55°C por 15 minutos.

O controle de qualidade das amostras foi realizado através de espectrofotometria (Nanodrop 2000c – Thermo Scientific) para quantificação de ácidos nucleicos e por eletroforese para verificação da integridade do material. A eletroforese foi feita em gel de agarose a 0,8%, tampão TBE a 0,5x (tris, ácido bórico e EDTA) e 4µL de brometo de etídio RNase free a 1%, durante 20 minutos a 60 volts, para posterior visualização no transiluminador.

Figura 13 – Metodologia para o isolamento de RNA total de amostras de sangue venoso periférico utilizando o regente TRIzol®.



Fonte: A autora (2023).

3.5 SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA)

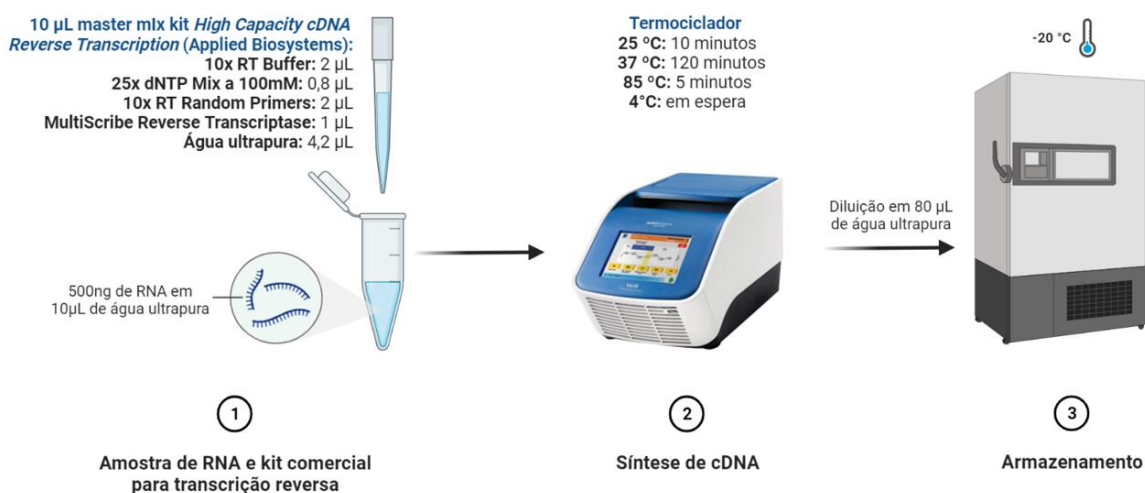
A concentração de RNA total para síntese de cDNA foi de 500ng. O cDNA foi sintetizado usando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) (Figura 14).

Inicialmente 500ng de RNA, mensurados por espectrofotometria (Nanodrop 2000c - Thermo Scientific), foram diluídos em 10µL de água ultrapura.

A cada amostra foi adicionado um mix de 10µL composto por 10x RT Buffer (2 µL), 25x dNTP Mix a 100mM (0,8 µL), 10x RT Random Primers (2 µL) e MultiScribe Reverse Transcriptase (1 µL) e água ultrapura (4,2 µL).

Em seguida, a amostra foi encaminhada ao termociclador (Applied Biosystems™ Veriti™) para um ciclo de 10 minutos a 25 °C, 120 minutos a 37 °C e 5 minutos a 85°C. Por fim, a amostra foi diluída em 80 µL de água ultrapura e armazenada em freezer a -80 °C.

Figura 14 – Metodologia para a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems).



Fonte: A autora (2023).

3.6 ENSAIOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Os ensaios de expressão gênica foram realizados de acordo com as normas propostas de padronização por Livak (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) e (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Sondas fluorescentes específicas do tipo Taqman (Thermo Fisher Scientific) foram utilizadas para os genes alvo *ESR1* (Hs01046816_m1), *ESR2* (Hs01100353_m1), *NLRP3* (Hs00918082_m1) e *IL-1β* (Hs01555410_m1).

Os genes endógenos utilizados para a expressão relativa normalizada dos genes alvo foram *RPLP0* e *HSP90* (Tabela 3), o ensaio sendo realizado pela metodologia de SyBR Green e foram escolhidos após análise da estabilidade de

expressão em sangue periférico através do software geNorm e a ferramenta web RefFinder.

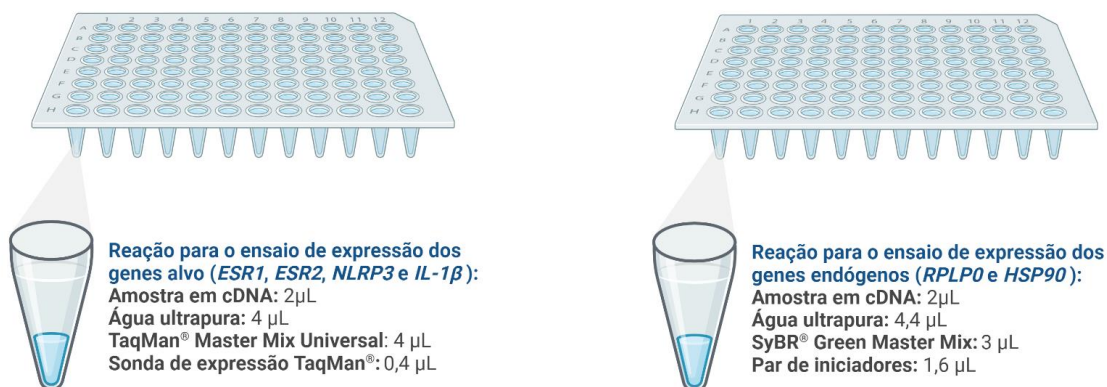
Tabela 3 – Genes de referência utilizados para normalização da expressão dos genes alvos.

Gene	Nome	Função proteíca	Sequência de iniciadores
<i>RPLP0</i>	60S <i>acidic ribosomal protein</i> P0	Codifica uma proteína ribossomal que compõe a subunidade 60S	F: GCGACCTGGAAGTCCAACTA R: TCTGCTTGGAGCCCACATTG
<i>HSP90</i>	<i>Heat shock protein</i> 90	Codifica uma proteína que atua na transdução de sinal, enovelamento e degradação de proteínas	F: GCCTACTTGGTGGCAGAGAA R: CAGCAGAAGACTCCCAAGCA

Fonte: A autora (2023).

O preparo da reação para os genes alvo, *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3* e *IL-1 β* , iniciou-se aplicando 2 μ L da amostra em placa óptica e adicionado uma reação composta de água ultrapura (4 μ L), TaqMan® Master Mix Universal - Thermo Fisher Scientific (4 μ L) e a sonda de expressão TaqMan® (0,4 μ L). Para a reação dos genes endógenos, *RPLP0* e *HSP90*, a cada amostra (2 μ L) foram adicionados 1,6 μ L do par de iniciadores, 3 μ L de SyBR Green Master Mix e 4,4 μ L de água ultrapura. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica. Os ensaios de quantificação relativa foram realizados no equipamento ABI 7500 (Applied biosystems) (Figura 15).

Figura 15 – Reações para cada um dos ensaios de expressão dos genes alvo e endógenos.



Fonte: A autora (2023).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios de expressão gênica foram apresentados por média do grupo e desvio padrão. As análises estatísticas foram realizadas no *software* R (versão 4.2.2) e para visualização gráfica dos resultados obtidos utilizou-se o *software* GraphPad Prism (versão 9.5.1). O teste de normalidade Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a distribuição das amostras. Seguido do teste paramétrico T de Student ou análise de correlação de Pearson para as análises normalizadas, e o teste não-paramétrico Mann-Whitney e análise de correlação de Spearman para as análises não normalizadas, considerando como estatisticamente significativa $p < 0,05$ em um intervalo de confiança de 95%. A interpretação utilizada para análise dos coeficientes de correlação é demonstrada na Tabela 4.

Tabela 4 - Interpretação do grau de correlação entre variáveis.

Grau de correlação	Interpretação
0,90 a 1,00 (-0,90 a -1,00)	Correlação positiva (negativa) muito forte
0,70 a 0,90 (-0,70 a -0,90)	Correlação positiva (negativa) forte
0,50 a 0,70 (-0,50 a -0,70)	Correlação positiva (negativa) moderada
0,30 a 0,50 (-0,30 a -0,50)	Correlação positiva (negativa) fraca
0,00 a 0,30 (0,00 a -0,30)	Correlação positiva (negativa) negligenciável

Fonte: Adaptado de Mukaka (2012).

3.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os indivíduos incluídos no estudo se enquadravam nos critérios de inclusão/exclusão e só participaram da pesquisa após concordarem e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO A). Com aprovações no Comitê de Ética em Pesquisa, sob o número de registro na PLATAFORMA BRASIL: 51931521.9.0000.5208 (ANEXO B) e do Hospital das Clínicas da UFPE/ Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (ANEXO C).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DO GRUPO DE ESTUDO E DO GRUPO CONTROLE

As características clínicas e demográficas das mulheres com SM na pós-menopausa são apresentadas na Tabela 5. A etnia apresentou maior percentual de autodeclaração de mulheres pardas com 44,2%, seguidas por brancas 40,4%, negras 9,6%, amarela 1,9% e não informado 3,8%. A média da idade foi de 67,2 anos ($\pm 10,4$); a média do IMC foi de 29,9 Kg/m² ($\pm 4,4$). A média da circunferência abdominal foi de 102,8 cm ($\pm 12,7$). Quanto as doenças cardiometabólicas associadas a SM, 98,1% apresentaram HAS, 75,0% apresentaram DM2 e 86,5% apresentaram dislipidemia.

Na Tabela 5 também são apresentadas as características clínicas e demográficas das mulheres do grupo controle saudável: quanto a etnia, a autodeclaração de mulheres brancas e pardas apresentaram o mesmo percentual 42,9% e negras 14,3%; a média da idade foi de 58,9 anos ($\pm 6,8$); a média do IMC foi de 22,7 Kg/m² ($\pm 3,3$); a média da circunferência abdominal foi de 78,2 cm ($\pm 9,7$). Nenhuma das mulheres apresentavam doenças cardiometabólicas no grupo controle.

Tabela 5 - Características clínicas e demográficas das mulheres na pós-menopausa com Síndrome Metabólica e mulheres controles. DP: Desvio Padrão, IMC: Índice de Massa Corpórea, HAS: Hipertensão arterial sistêmica, DM2: *Diabetes Mellitus* tipo 2.

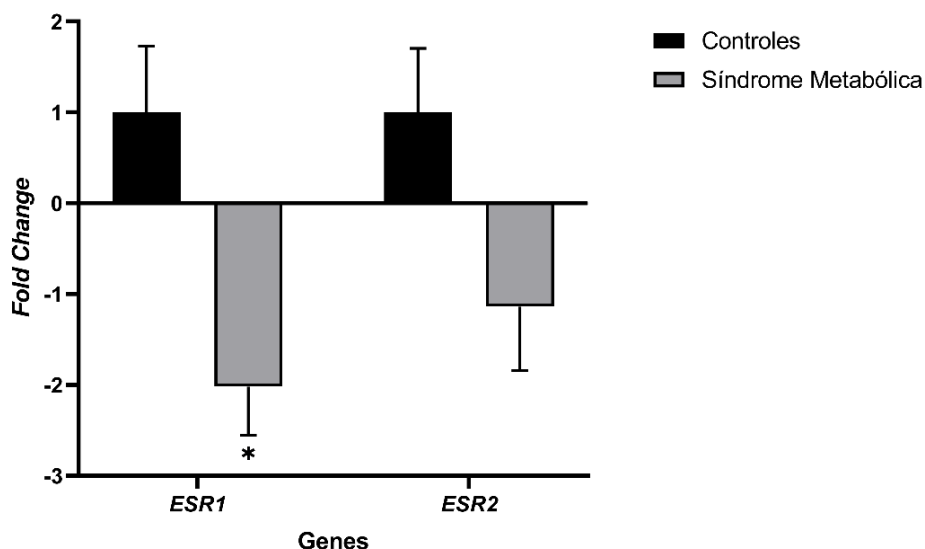
Variáveis	Indivíduos com Síndrome Metabólica (N = 52)	Controles saudáveis na pós-menopausa (N = 7)
Etnia		
Branca	21 (40,4%)	3 (42,9%)
Parda	23 (44,2%)	3 (42,9%)
Negra	5 (9,6%)	1 (14,3%)
Amarela	1 (1,9%)	0 (0,0%)
Não informado	2 (3,8%)	0 (0,0%)
Idade (anos)		
Média (DP)	67,2 ($\pm$ 10,4)	58,9 ($\pm$ 6,8)
IMC (Kg/m²)		
Média (DP)	29,9 ($\pm$ 4,4)	22,7 ($\pm$ 3,3)
Circunferência Abdominal (cm)		
Média (DP)	102,8 ($\pm$ 12,7)	78,2 ($\pm$ 9,7)
HAS		
Sim	51 (98,1%)	0 (0,0%)
Não	1 (1,9%)	7 (100,0%)
DM2		
Sim	39 (75,0%)	0 (0,0%)
Não	13 (25,0%)	7 (100,0%)
Dislipidemia		
Sim	45 (86,5%)	0 (0,0%)
Não	7 (13,5%)	7 (100,0%)

Fonte: A autora (2023).

4.2 PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA NA SÍNDROME METABÓLICA

Ao analisar a expressão dos genes *ESR1* e *ESR2* no grupo de estudo, composto de mulheres na pós-menopausa com SM, em comparação aos controles saudáveis na pós-menopausa (Figura 16), observou-se a regulação negativa do gene *ESR1* de 2,02 vezes ($p = 0,0466$) e do gene *ESR2* de 1,14 vezes ($p = 0,5509$), sendo estatisticamente significativa somente para o gene *ESR1*.

Figura 16 – Expressão relativa dos genes *ESR1* e *ESR2* em mulheres com síndrome metabólica na pós-menopausa (N = 52) e controles na pós-menopausa (N = 7). A expressão do gene *ESR1* teve um *fold change* de -2,02 (DP = 0,54, $p = 0,0466$) em mulheres com síndrome metabólica em comparação ao controle saudável com um *fold change* de 1,00 (DP = 0,73). A expressão do gene *ESR2* teve um *fold change* de -1,14 (DP = 0,70, $p = 0,5509$) em mulheres com síndrome metabólica em comparação ao controle saudável com um *fold change* de 1,00 (DP = 0,71). * $p < 0,05$.



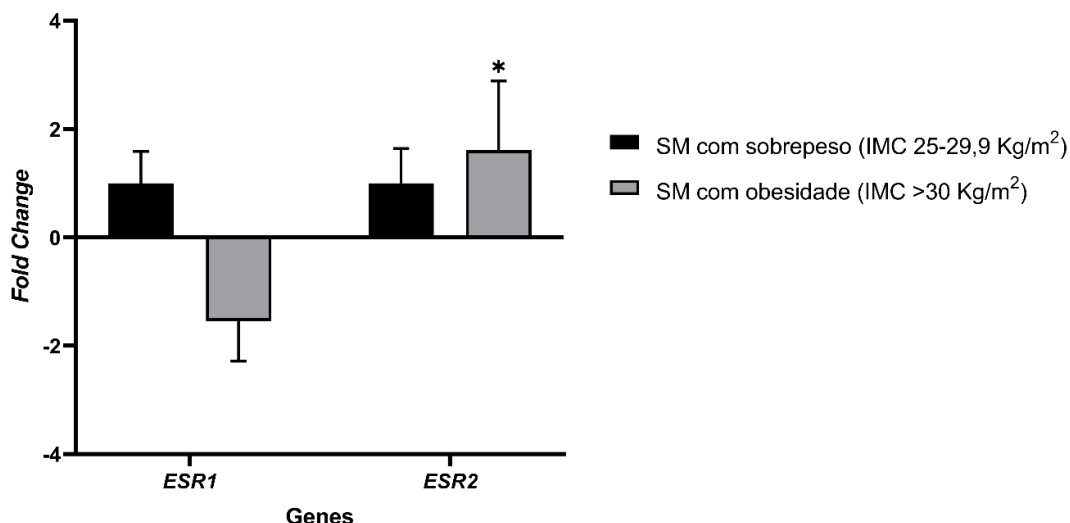
Fonte: A autora (2023).

4.3 PERFIL DE EXPRESSÃO NAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS À SÍNDROME METABÓLICA

A expressão dos genes *ESR1* e *ESR2* foi avaliada, entre o grupo de mulheres na pós-menopausa com SM, comparando-se grupos de indivíduos com a presença ou ausência das seguintes doenças cardiometabólicas: obesidade, DM2 e dislipidemia.

Quando avaliada a relação entre obesidade ou sobrepeso e a expressão do gene *ESR1* (Figura 17), verificou-se que as mulheres com obesidade apresentaram uma regulação negativa da expressão do gene de 1,54 vezes em comparação às mulheres com sobrepeso, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,2315$). Por outro lado, a expressão do gene *ESR2* possuiu uma regulação positiva significativa de 1,61 ($p = 0,0004$) entre as mulheres com obesidade em comparação às mulheres com sobrepeso.

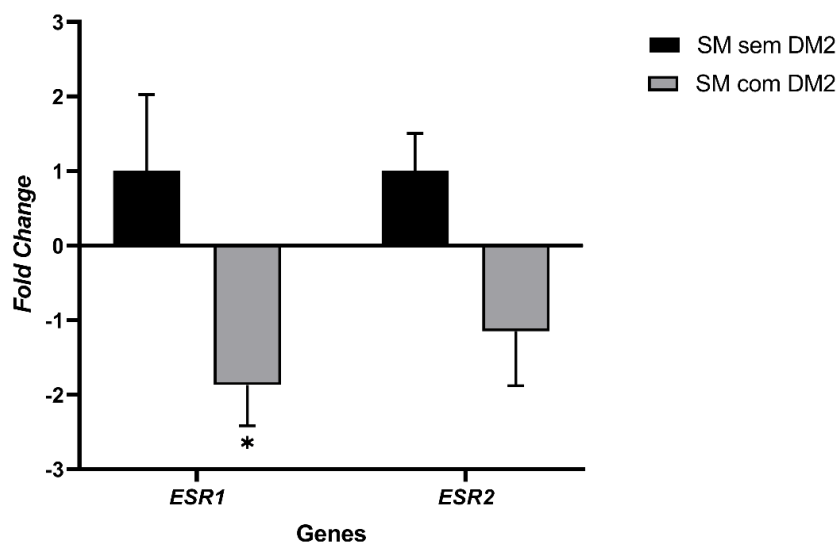
Figura 17 – Expressão relativa dos genes *ESR1* e *ESR2* em mulheres na pós-menopausa com obesidade (N = 24) e sobrepeso (N = 20). A expressão do gene *ESR1* teve um *fold change* de -1,54 (DP = 0,74, $p = 0,2315$) em mulheres com obesidade em comparação às com sobrepeso com um *fold change* de 1,00 (DP = 0,59). A expressão do gene *ESR2* teve um *fold change* de 1,61 (DP = 1,28, $p = 0,0004$) em mulheres com obesidade em comparação às com sobrepeso com um *fold change* de 1,00 (DP = 0,64). SM: Síndrome Metabólica; * $p < 0,05$.



Fonte: A autora (2023).

Na análise de expressão relacionada à DM2 (Figura 18), verificou-se que no gene *ESR1* as mulheres com DM2 apresentaram uma regulação negativa estatisticamente significativa de 1,87 vezes ($p = 0,0071$) em comparação as mulheres sem DM2. A expressão do gene *ESR2*, em mulheres com DM2, também apresentou uma regulação negativa de 1,15 vezes em comparação a mulheres sem DM2, no entanto, sem significância estatística ($p = 0,5727$).

Figura 18 – Expressão relativa dos genes *ESR1* e *ESR2* em mulheres na pós-menopausa com SM e DM2 (N = 39) ou com SM e sem DM2 (N = 13). A expressão do gene *ESR1* teve um *fold change* de -1,87 (DP = 0,55, $p = 0,0071$) em mulheres com DM2 em comparação às sem DM2 com um *fold change* de 1,00 (DP = 1,03). A expressão do gene *ESR2* teve um *fold change* de -1,15 (DP = 0,73, $p = 0,5727$) em mulheres com DM2 em comparação às sem DM2 com um *fold change* de 1,00 (DP = 0,51). DM2: *Diabetes mellitus* tipo 2; SM: Síndrome Metabólica; * $p < 0,05$.

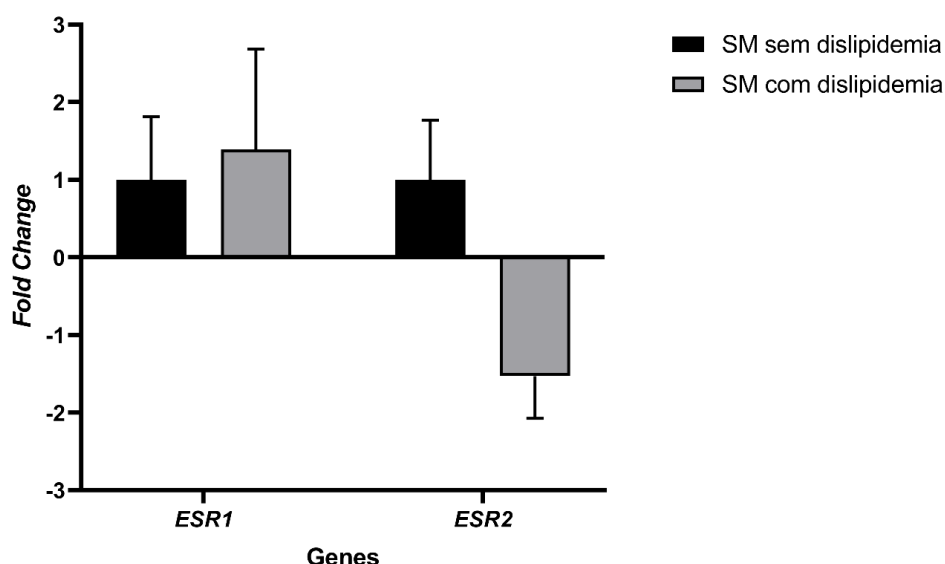


Fonte: A autora (2023).

Em relação à dislipidemia (Figura 19), verificou-se que as mulheres com dislipidemia apresentaram uma regulação positiva da expressão gênica de *ESR1* de 1,39 vezes ($p = 0,2538$) em comparação às mulheres sem dislipidemia. Enquanto a expressão do gene *ESR2* apresentou uma regulação negativa de 1,53 vezes ($p = 0,2831$). Entretanto, ambas comparações não possuíram diferença estatisticamente significativa de expressão.

Figura 19 – Expressão relativa dos genes *ESR1* e *ESR2* em mulheres na pós-menopausa com SM e dislipidemia (N = 45) ou com SM e sem dislipidemia (N = 7). A expressão do gene *ESR1* teve um *fold change* de 1,39 (DP = 1,29, $p = 0,2538$) em mulheres com dislipidemia em comparação às sem dislipidemia com um *fold change* de 1,00 (DP = 0,81). A expressão do gene *ESR2* teve um *fold change* de -1,53 (DP = 0,54, $p = 0,2831$) em mulheres com dislipidemia em comparação às sem dislipidemia com um *fold change* de 1,00 (DP = 0,77).

SM: Síndrome Metabólica.



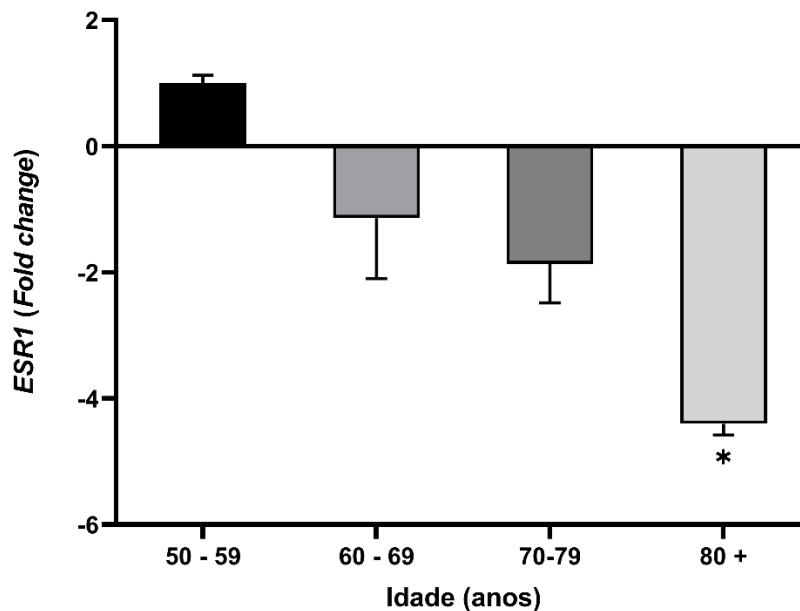
Fonte: A autora (2023).

4.4 PERFIL DE EXPRESSÃO DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA

A expressão dos genes *ESR1* e *ESR2* relacionada à idade das mulheres na pós-menopausa com SM apresentou uma regulação negativa, com uma diminuição gradativa conforme o avanço da faixa etária.

Na expressão gênica de *ESR1* (Figura 20) quando comparada à faixa etária de 50 a 59 anos, houve uma redução de 1,14 vezes na faixa etária de 60 a 69 anos ($p = 0,9976$), 1,87 vezes na faixa etária de 70 a 79 anos ($p = 0,2105$) e 4,40 vezes na faixa etária de 80 anos ou mais ($p = 0,0306$). Apenas a comparação entre as faixas etárias de 50 a 59 anos e 80 anos ou mais foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

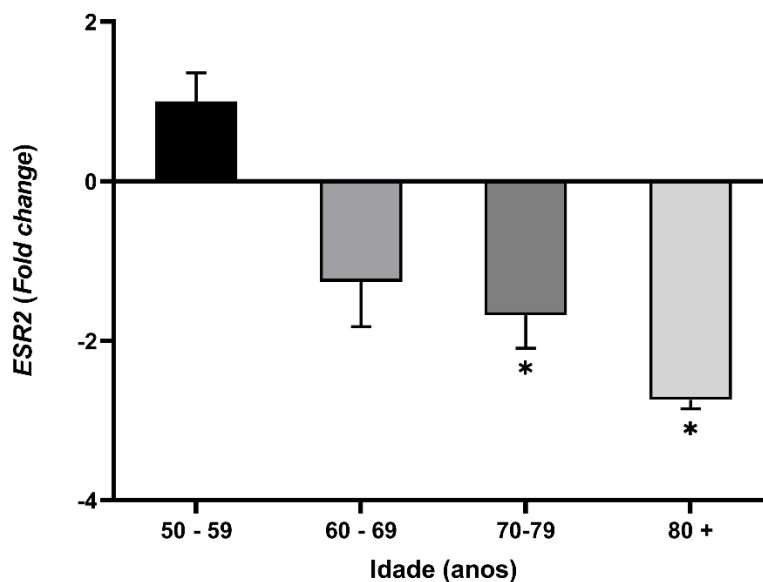
Figura 20 – Expressão relativa do gene *ESR1* em mulheres na pós-menopausa com SM em comparação a faixa etária 50-59 anos com um *fold change* de 1,00 (DP = 0,13, N = 13); 60-69 anos *fold change* de -1,14 (DP = 0,96, N = 14, $p = 0,9976$); 70-79 anos *fold change* de -1,87 (DP = 0,61, N = 18, $p = 0,2105$); 80 anos ou mais *fold change* de -4,40 (DP = 0,18, N = 5, $p = 0,0306$). * $p < 0,05$.



Fonte: A autora (2023).

Também foi observada redução na expressão gênica de *ESR2* (Figura 21) em comparação a mesma faixa etária, 50 a 59 anos, sendo de 1,26 vezes na faixa etária de 60 a 69 anos ($p = 0,6212$), 1,68 vezes na faixa etária de 70 a 79 anos ($p = 0,0317$) e 2,74 vezes na faixa etária de 80 anos ou mais ($p = 0,0189$). Sendo observada significância estatística ($p < 0,05$) nas comparações com os intervalos de 70 a 79 anos e 80 anos ou mais.

Figura 21 – Expressão relativa do gene *ESR2* em mulheres na pós-menopausa com SM em comparação a faixa etária 50-59 anos com um *fold change* de 1,00 (DP = 0,36, N = 13); 60-69 anos *fold change* de -1,26 (DP = 0,56, N = 14, $p = 0,6212$); 70-79 anos *fold change* de -1,68 (DP = 0,41, N = 18, $p = 0,0317$); 80 anos ou mais *fold change* de -2,74 (DP = 0,11, N = 5, $p = 0,0189$). * $p < 0,05$.



Fonte: A autora (2023).

4.5 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO RELATIVA DOS GENES *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3*, *IL-1B* E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As análises de correlação entre as variáveis níveis de expressão relativa normalizada dos genes que codificam os ERs (*ESR1* e *ESR2*), dos marcadores inflamatórios (*NLRP3* e *IL-1 β*) e de características clínicas (idade e circunferência abdominal) do grupo de estudo investigado composto por mulheres na pós-menopausa com SM, são apresentadas na Tabela 6 e podem ser visualizadas graficamente nas Figuras 22, 23 e 24.

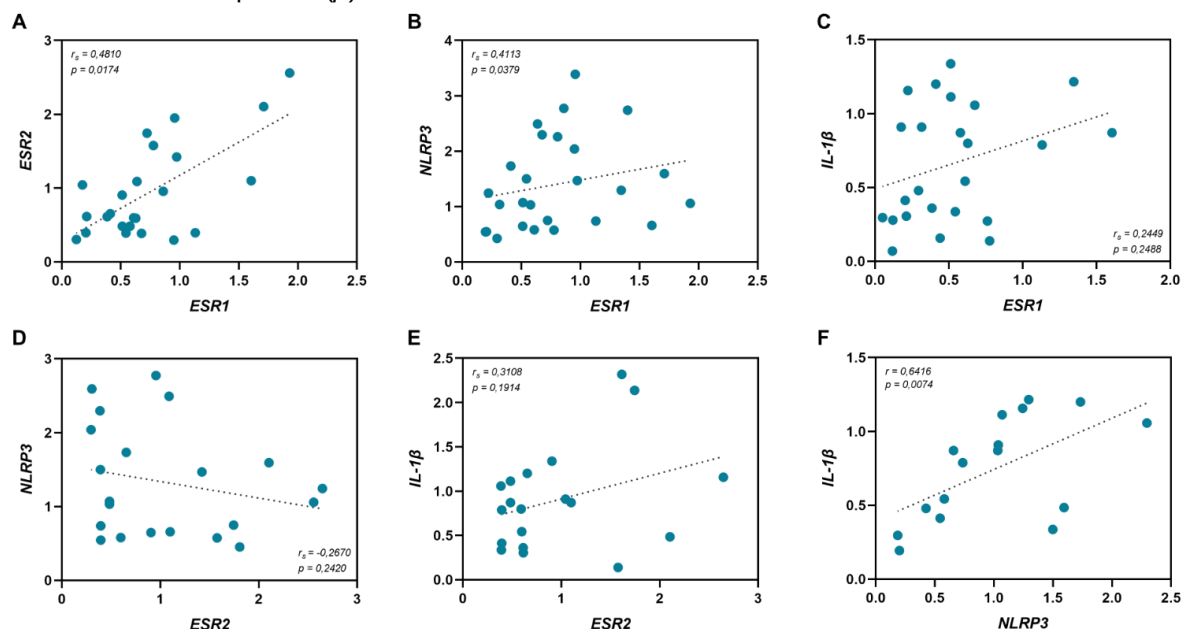
Tabela 6 – Coeficientes de correlação entre as quantidades relativas normalizadas da expressão dos genes *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3* e *IL-1 β* , adicionalmente as características clínicas, idade e circunferência abdominal, em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica. *r* ou *r_s*: coeficiente de correlação de Pearson ou coeficiente de correlação de Spearman; *p*: p-valor; *: *p* < 0,05; - : correlação entre as mesmas variáveis.

Correlações entre as expressões dos genes <i>ESR1</i> , <i>ESR2</i> , <i>IL-1β</i> , <i>NLRP3</i> e características clínicas	<i>ESR1</i>		<i>ESR2</i>		<i>NLRP3</i>		<i>IL-1β</i>	
	<i>r</i> ou <i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r</i> ou <i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r</i> ou <i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r</i> ou <i>r_s</i>	<i>p</i>
<i>ESR1</i>	-	-	0,4810	0,0174*	0,4113	0,0379*	0,2449	0,2488
<i>ESR2</i>	0,4810	0,0174*	-	-	-0,2670	0,2420	0,3108	0,1953
<i>NLRP3</i>	0,4113	0,0379*	-0,2670	0,2420	-	-	0,6416	0,0074*
<i>IL-1β</i>	0,2449	0,2488	0,3108	0,1953	0,6416	0,0074*	-	-
Idade (anos)	-0,4218	0,0181*	-0,5405	0,0064*	0,1329	0,4466	-0,3433	0,0860
Circunferência abdominal (cm)	-0,2342	0,2706	0,1849	0,4353	0,4099	0,0303*	-0,1700	0,4614

Fonte: A autora (2023).

Ao ser analisada a correlação para os níveis de expressão dos genes *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3* e *IL-1 β* (Figura 22) foram observadas correlações significativas (*p* < 0,05) fracas e positivas entre *ESR1* e *ESR2* (*r_s* = 0,4810), *ESR1* e *NLRP3* (*r_s* = 0,4113), e, adicionalmente, uma correlação moderada e positiva entre *NLRP3* e *IL-1 β* (*r* = 0,6416).

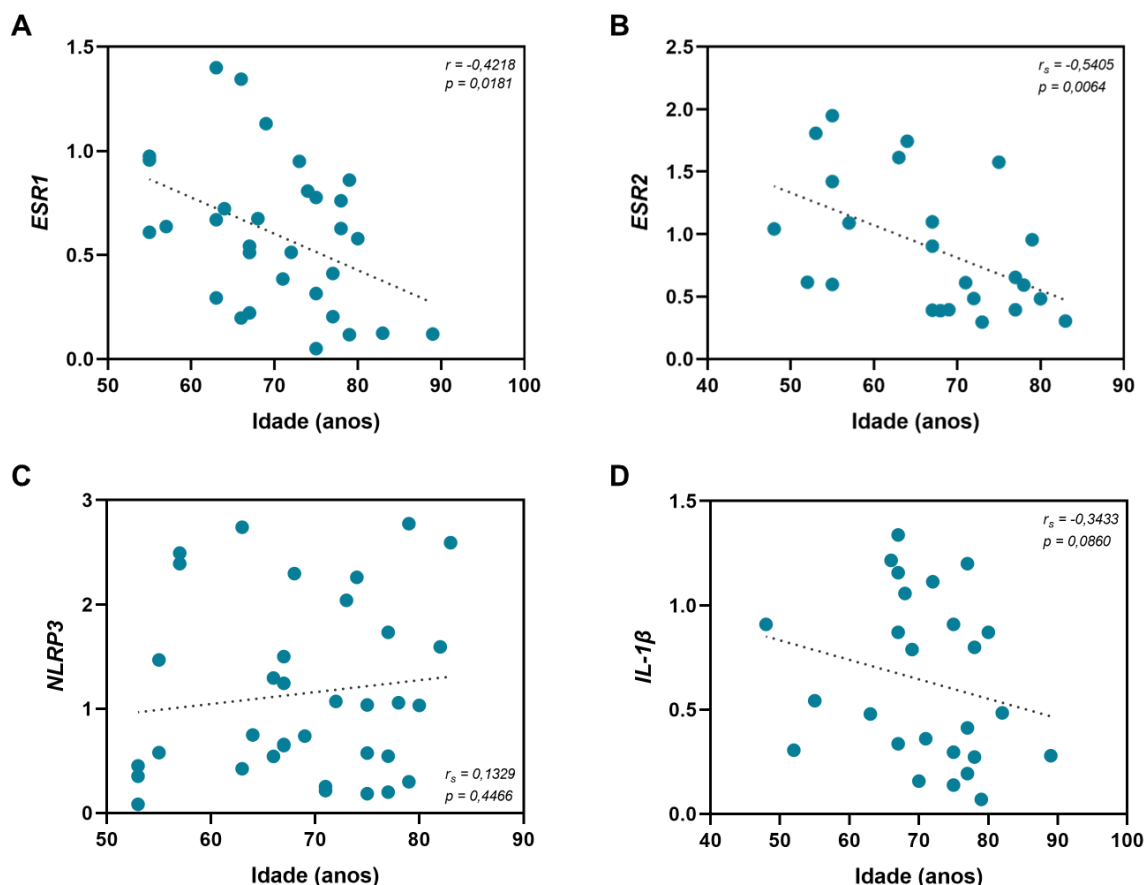
Figura 22 – Análises de correlações entre as quantidades relativas normalizadas da expressão dos genes *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3* e *IL-1 β* em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica. A. Genes *ESR1* e *ESR2*: correlação fraca e positiva. B. Genes *ESR1* e *NLRP3*: correlação fraca positiva. C. Genes *ESR1* e *IL-1 β* : associação negligenciável. D. *ESR2* e *NLRP3*: associação negligenciável. E. *ESR2* e *IL-1 β* : correlação fraca e positiva. F. *NLRP3* e *IL-1 β* : correlação moderada e positiva. Os coeficientes de correlação de Pearson (r)/Spearman (r_s) e o p-valor (p) são demonstrados em cada uma das análises.



Fonte: A autora (2023).

Enquanto ao correlacionarmos a expressão dos genes investigados com a idade das mulheres na pós-menopausa com SM (Figura 23), observa-se que existe correlação negativa e fraca ($r = -0,4218$) com a expressão de *ESR1* e moderada com a de *ESR2* ($r_s = -0,5405$), ambas estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Apesar da expressão de *IL-1 β* apresentar uma correlação negativa e fraca ($r_s = -0,3433$) com a idade está não foi estatisticamente significativa.

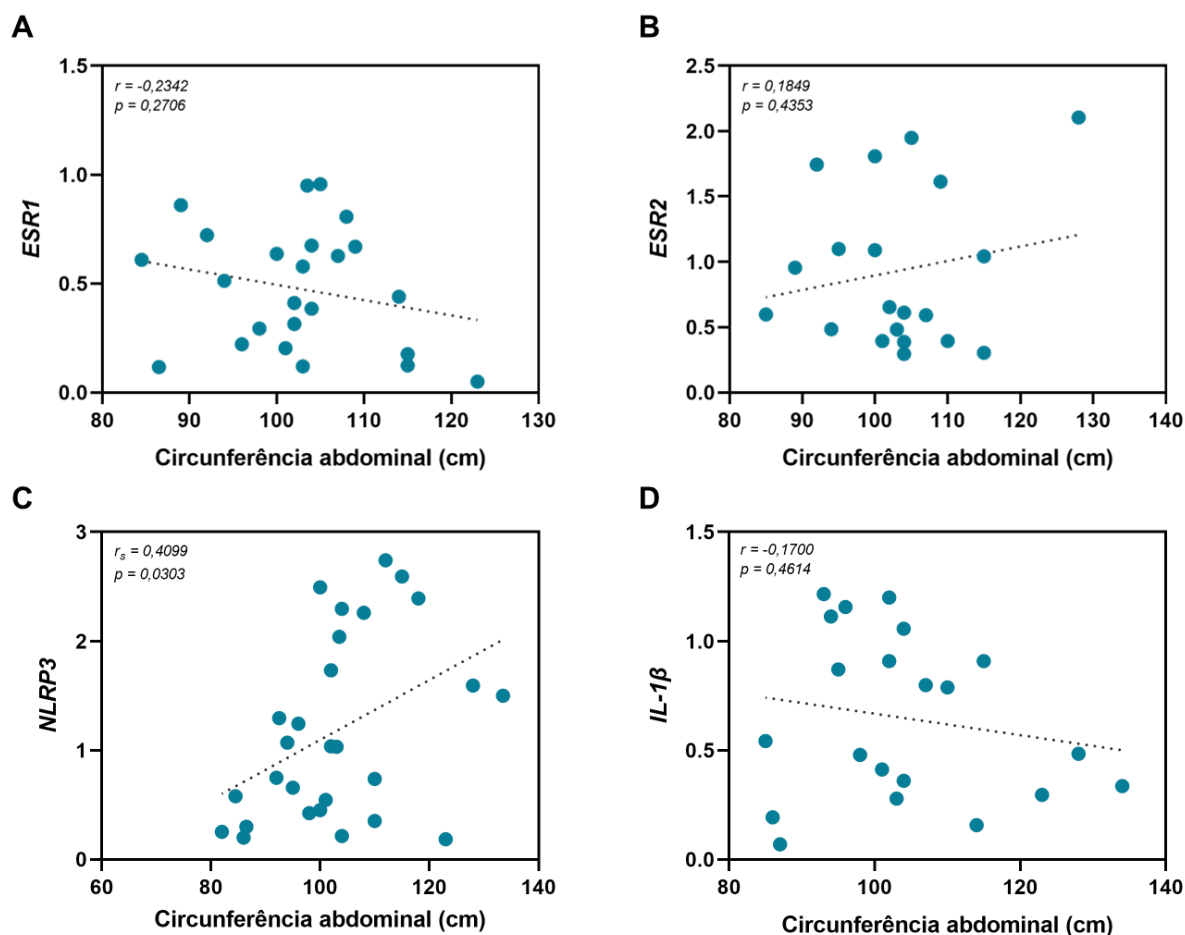
Figura 23 – Análises de correlações entre a idade e as quantidades relativas normalizadas da expressão dos genes *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3* e *IL-1 β* , em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica. A. Idade e *ESR1*: correlação fraca e negativa. B. Idade e *ESR2*: Correlação moderada e negativa. C. Idade e *NLRP3*: associação negligenciável. D. Idade e *IL-1 β* : correlação fraca e negativa. Os coeficientes de correlação de Pearson (r)/Spearman (r_s) e o p-valor (p) são demonstrados em cada uma das análises.



Fonte: A autora (2023).

Quando correlacionados os níveis relativos de expressão dos mesmos genes com a medida de circunferência abdominal das mulheres pós-menopausadas com SM (Figura 24), somente a análise dos níveis de mRNA de *NLRP3* apresentou uma associação significativa positiva e fraca ($r_s = 0,4099$).

Figura 24 – Análises de correlações entre a circunferência abdominal e as quantidades relativas normalizadas da expressão dos genes *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3* e *IL-1 β* , em mulheres na pós-menopausa com síndrome metabólica. A. Circunferência abdominal e *ESR1*: associação negligenciável. B. Circunferência abdominal e *ESR2*: associação negligenciável. C. Circunferência abdominal e *NLRP3*: correlação fraca e positiva. D. Circunferência abdominal e *IL-1 β* : associação negligenciável. Os coeficientes de correlação de Pearson (r)/Spearman (r_s) e o p-valor (p) são demonstrados em cada uma das análises.



Fonte: A autora (2023).

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo foram analisados os níveis de expressão dos genes que codificam os ERs, *ESR1* e *ESR2*, em mulheres com SM na fase após a menopausa, e sua associação com a expressão de marcadores pró-inflamatórios, *NLRP3* e *IL-1 β* . Dentre os nossos achados encontram-se reduções significativas na expressão de *ESR1* no grupo de estudo de mulheres com SM e em mulheres com SM que possuem DM2, e um aumento na expressão de *ESR2* em mulheres do grupo de estudo que possuem obesidade. Também foram observadas correlações positivas significativas entre a expressão de *ESR1* e *ESR2*, *ESR1* e *NLRP3*, além de *NLRP3* e a medida de circunferência abdominal. Juntamente a uma redução gradual na expressão de *ESR1* e *ESR2* mediante o avanço na faixa etária.

Com relação a expressão gênica de *ESR1* em mulheres com SM na pós-menopausa observou-se uma redução estatisticamente significativa de 2,02 vezes em comparação ao controle saudável, a qual pode estar relacionada a diminuição dos efeitos benéficos resultantes da ação do ER α , principalmente no tecido avaliado nesse estudo, o sangue venoso periférico, no qual os efeitos do E₂ sob o ER α levam a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias em células do sistema imune, como TNF e IL-6 (FISH, 2008; KRAMER; KRAMER; GUAN, 2004; TIWARI-WOODRUFF *et al.*, 2007). Citocinas que têm seus níveis aumentados nas doenças que compõem a SM, como dislipidemia, obesidade, DM2 e HAS (CHAMARTHI *et al.*, 2011; HE; YUAN; MAEDLER, 2019; LONTCHI-YIMAGOU *et al.*, 2013; SCARPELLINI; TACK, 2012; ZHANG *et al.*, 2009).

Em demais tecidos a redução na expressão de *ESR1* também pode acarretar na perda dos efeitos benéficos da ação de ER α observados principalmente em modelos murinos, aumentando o risco de desenvolver doenças cardiometabólicas, como a redução do ganho de massa corporal e de tecido adiposo, melhorias na manutenção da homeostase dos níveis de glicose, insulina e lipídeos, como é amplamente discutido na literatura (BRYZGALOVA *et al.*, 2006; CAMPELLO *et al.*, 2013; GALLUZZO *et al.*, 2009; HEINE *et al.*, 2000; LEMIEUX *et al.*, 2005; OHLSSON *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2018). Embora essa redução tenha apresentado níveis de significância estatística, um fator limitante para

comparação é o número de indivíduos que compõem o grupo controle, assim, estudos com tamanho amostral maior comparado ao grupo de estudo podem ser conduzidos para replicação e validação dos resultados observados.

Apesar de também serem observados efeitos metabólicos benéficos da ação de ER β em modelos animais, como melhora do perfil lipídico e redução de acúmulo de tecido adiposo (FORYST-LUDWIG *et al.*, 2008; GONZÁLEZ-GRANILLO *et al.*, 2019, 2020), a expressão gênica de *ESR2* apresentou uma redução de 1,14 vezes, não estatisticamente significativa, em mulheres com SM em comparação ao controle saudável.

Quanto as análises de expressão gênica das doenças cardiometabólicas associadas a SM, DM2, dislipidemia e obesidade, no grupo de mulheres na pós-menopausa com SM, foram realizadas em comparação àquelas que não apresentavam essas comorbidades.

Primeiramente, as mulheres com obesidade apresentaram uma redução de 1,54 vezes na expressão de *ESR1* em comparação às com sobrepeso, no entanto não estatisticamente significativa, mesmo com a ação preventiva do ER α na obesidade por meio da redução do ganho de massa corporal e de tecido adiposo em camundongos (HEINE *et al.*, 2000; LEMIEUX *et al.*, 2005; OHLSSON *et al.*, 2000).

A ação do ER β também diminui o risco do desenvolvimento da obesidade, através da redução da massa de tecido adiposo visceral e cutâneo, além do estímulo ao maior gasto energético e termogênese (GONZÁLEZ-GRANILLO *et al.*, 2019; PONNUSAMY *et al.*, 2017). Entretanto, no presente estudo observa-se um aumento significativo na expressão de *ESR2* de 1,61 vezes nas mulheres com obesidade comparadas às com sobrepeso, essa regulação positiva pode estar relacionada com a associação relatada da maior expressão concomitante de ER β e da enzima 11 β HSD1 em mulheres na pós-menopausa em comparação a mulheres pré-menopausa, a 11 β HSD1 tem seus níveis aumentados na obesidade central em humanos e camundongos, atuando na liberação da forma ativa do cortisol, o qual em níveis aumentados estimula o acúmulo de gordura visceral (MCINNIS *et al.*, 2012).

A expressão do gene *ESR1* nas mulheres com DM2 apresentou uma redução estatisticamente significativa de 1,87 vezes, essa pode estar relacionada

com a perda dos efeitos benéficos do ER α na prevenção da DM2. Uma vez que em modelos murinos a redução ou supressão da expressão de *esr1* ocasiona o aumento na glicemia e intolerância à glicose (BRYZGALOVA *et al.*, 2006), o uso de agonistas de ER α como PPT levam ao aumento da expressão e translocação da Glut-4 em adipócitos e miócitos de murinos, melhorando a captação de glicose (CAMPELLO *et al.*, 2013), além da redução da morte celular das células β pancreáticas, pela repressão da expressão dos genes *Chop* e *Oma1*, ambos os genes relacionados a apoptose induzida pelo estresse oxidativo (ZHOU *et al.*, 2018).

Quanto a expressão do gene *ESR2* nos indivíduos com DM2, observou-se uma redução de 1,15 vezes em comparação aos sem DM2, sem significância estatística, apesar dos efeitos protetivos observados de ER β pela também proteção das células β pancreáticas murinas da morte celular por apoptose, mesmo que em uma menor intensidade que ER α (LIU *et al.*, 2009). Entretanto, a ação do ER β também exerce um efeito diabetogênico, através da repressão da expressão da Glut-4 em modelos murinos, podendo diminuir a disponibilidade dessa para captação de glicose (CAMPELLO *et al.*, 2013).

Os ERs apresentam um papel benéfico para o metabolismo de lipídeos, demonstrado através da supressão da ação de ER α que ocasiona em camundongos a formação de partículas LDL mais densas em colesterol e maior produção de precursores dos triglicérides (BRYZGALOVA *et al.*, 2006; OHLSSON *et al.*, 2000), e pela maior ação de ER β acarretar na redução dos níveis de LDLs e uma maior proporção de lipídeos hepáticos insaturados em comparação a saturados (GONZÁLEZ-GRANILLO *et al.*, 2019, 2020). Contudo as mulheres com dislipidemia avaliadas nesse estudo tiveram um aumento na expressão do gene *ESR1* de 1,39 vezes e redução de 1,53 vezes do gene *ESR2* em comparação as que não apresentavam dislipidemia, ambas comparações não estaticamente significativas.

A ação do E₂ também possui papel na prevenção da HAS, uma vez que estimula a produção de NOS, e conseqüentemente NO, induzindo a vasodilatação, além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias que levariam a perda da capacidade vasodilatadora pela redução dos níveis de NO (FISH, 2008; IORGA *et al.*, 2017; KRAMER; KRAMER; GUAN, 2004; ZHANG *et*

al., 2009). Apesar desse efeito protetivo a avaliação da expressão dentre as mulheres na pós-menopausa com SM que apresentavam HAS (N = 51) e que não apresentavam HAS (N = 1) não foi realizada devido ao número insuficiente de indivíduos para comparação.

Em relação a influência da idade na expressão do gene *ESR1*, foi observada uma redução gradativa na expressão de conforme o aumento da faixa etária, significativa na faixa etária de 80 anos ou mais. Essa redução condiz com estudos que demonstram uma redução na expressão gênica do ER α ao longo do envelhecimento natural, pela metilação das ilhas CpG do promotor de *ESR1* e aumento do estresse oxidativo, em células do endotélio, músculo liso vascular, aorta, átrio direito, mucosa do cólon e glomérulo (NOVENSÀ *et al.*, 2011; PEREIRA-SIMON *et al.*, 2012; POST *et al.*, 1999). Monócitos de mulheres na pós-menopausa que não realizavam TRH também apresentaram menores níveis de ER α , em comparação a mulheres na pré-menopausa, além da realização de TRH levar ao aumento desses níveis na pós-menopausa (BEN HUR *et al.*, 1995). Entretanto, Phiel *et al.* (2005) relataram um aumento na expressão de ER α em monócitos de mulheres na pós-menopausa em comparação a mulheres na pré-menopausa e sem diferença significativa de expressão em células T e B.

Similarmente, a expressão gênica de *ESR2* diminuiu gradativamente com o avanço da idade, sendo significativa nas faixas etárias de 70-79 anos e 80 anos ou mais. Contudo em demais tecidos, como do sistema cardiovascular de camundongos envelhecidos comparados a jovens e no tecido adiposo de mulheres na pós-menopausa em comparação a mulheres na pré-menopausa, é observado um aumento na expressão de ER β (MCINNIS *et al.*, 2012; NOVENSÀ *et al.*, 2011). Quanto ao tecido de escolha nesse estudo, o sangue venoso periférico, células do sistema imune, como linfócitos T, B e Monócitos não demonstram diferença significativa da expressão de ER β após a menopausa em relação a pré-menopausa, além do estímulo com E₂ não alterar a expressão de ER β em monócitos e macrófagos (MURPHY *et al.*, 2009; PHIEL *et al.*, 2005).

Acerca das análises de correlação entre a expressão normalizada relativa dos genes *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3* e *IL-1 β* , no grupo de estudo, com ênfase nas análises estatisticamente significativas, foram observadas correlações positivas e

fracas, com um aumento em conjunto de ambas as expressões, entre *ESR1* e *ESR2*, como também *ESR1* e *NLRP3*.

Considerando a associação positiva entre os níveis de expressão entre *ESR1* e *ESR2*, é importante enfatizar que é necessário existir um balanço entre as proporções de ER α e ER β , visto que ao depender do tipo tecidual ou celular esses podem exercer atividades semelhantes, como ambos subtipos aumentarem o gasto energético reduzindo o acúmulo de tecido adiposo (DESPRÉS; LEMIEUX, 2006; PONNUSAMY *et al.*, 2017), ou atuarem de forma antagônica, tal qual o estímulo a expressão da proteína GLUT4 por ER α e a repressão dessa expressão por ER β (CAMPELLO *et al.*, 2013). Além da influência direta dos próprios receptores em outras doenças, como o próprio ER β inibir a atividade de ER α como fator de transcrição em linhagens celulares (T47D) de câncer mamário (MATTHEWS *et al.*, 2006).

Quanto ao significativo aumento em conjunto da expressão de *ESR1* e *NLRP3*, as mulheres com SM apresentam níveis séricos aumentados de *NLRP3* (AL-DAGHRI *et al.*, 2021), entretanto a relação entre os ERs e os níveis de expressão do gene *NLRP3/Nlrp3* possui uma especificidade relativa ao tipo celular, tecidual ou até mesmo da patologia investigada (FAN *et al.*, 2019; WEI *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2016). Ainda assim, a regulação positiva da expressão gênica do *NLRP3/Nlrp3* devido a ação de ER α já foi observada em células humanas do cólon saudáveis e em mastócitos provenientes de lesões causadas pela endometriose em modelos murinos (FAN *et al.*, 2019; GUO *et al.*, 2021).

Adicionalmente, foi observado moderadamente correlacionado de forma significativa, o aumento em conjunto da expressão gênica do *NLRP3* com a de *IL-1 β* , uma vez que representam o início da via intracelular do inflamassoma *NLRP3* e sua principal citocina produzida, a *IL-1 β* (BROZ; DIXIT, 2016).

Ao correlacionar as características clínicas e a expressão dos genes investigados nas mulheres com SM, verificou-se correlações significativas negativas com a idade, fraca para o gene *ESR1* e moderada para o gene *ESR2*. Reforçando assim os resultados obtidos na análise de expressão em intervalos de 10 anos de acordo com idade, ou seja, em ambas as análises conforme ocorre o avanço da faixa etária há a redução na expressão de *ESR1* e *ESR2*.

Enquanto, o aumento da circunferência abdominal se correlacionou positivamente com a expressão de *NLRP3* de forma significativa, condizente com a expressão aumentada de *NLRP3/Nlrp3* no tecido adiposo de humanos e camundongos com obesidade (ESSER *et al.*, 2013; RHEINHEIMER *et al.*, 2017), e com o aumento dos níveis séricos de *NLRP3* mediante o aumento da circunferência abdominal em mulheres com SM (AL-DAGHRI *et al.*, 2021).

Assim, sabendo sobre a atuação dos ERs na SM e nas patologias associadas ao seu diagnóstico se concentram em modelos animais e modelos *in vitro*, espera-se que os resultados os quais foram demonstrados no presente estudo contribuam na compreensão em humanos da influência e padrões de expressão dos genes que codificam os ERs, *ESR1* e *ESR2*, na SM, como também nos marcadores inflamatórios a ela associados, em especial nas mulheres após a menopausa.

6 CONCLUSÕES

1. As mulheres na pós-menopausa com SM apresentaram uma regulação negativa da expressão do gene *ESR1* em comparação ao controle saudável, a qual pode ocasionar uma redução dos efeitos benéficos da ação do ER α na prevenção de doenças cardiometabólicas relacionadas a SM.

2. Mulheres com SM que possuíam diagnóstico para DM2 tiveram uma regulação negativa da expressão do gene *ESR1*;

3. Mulheres com SM e obesidade possuíram uma regulação positiva da expressão do gene *ESR2*;

4. A expressão gênica de *ESR1* obteve uma correlação positiva com a de *NLRP3*;

5. A expressão gênica de *ESR1* e *ESR2* em mulheres com SM apresentou uma correlação negativa com a idade, demonstrando que a expressão de ambos os genes reduz conforme o avanço da faixa etária;

6. A expressão do gene *NLRP3* se correlacionou positivamente com a circunferência abdominal.

REFERÊNCIAS

ADAMS, Ted D. *et al.* Weight and Metabolic Outcomes 12 Years after Gastric Bypass. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 377, n. 12, p. 1143–1155, 2017.

AGITA, Arisya; THAHA, Mochammad. Inflammation, Immunity, and Hypertension. **Acta medica Indonesiana**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 158–165, 2017.

AHMADIAN, Maryam *et al.* Triacylglycerol Metabolism In Adipose Tissue. **Future Lipidology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 229–237, 2007.

ALBERTI, K.G.M.M. *et al.* Harmonizing the Metabolic Syndrome. **Circulation**, [s. l.], v. 120, n. 16, p. 1640–1645, 2009.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. Metabolic syndrome a new worldwide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. **Diabetic Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 469–480, 2006.

AL-DAGHRI, Nasser M. *et al.* Sex-Specific Signature in the Circulating NLRP3 Levels of Saudi Adults with Metabolic Syndrome. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 15, p. 3288, 2021.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in Diabetes 2018. **Diabetes Care**, [s. l.], v. 41, n. January, p. S13–S27, 2018.

ANAGNOSTIS, Panagiotis *et al.* Effects of menopause, gender and age on lipids and high-density lipoprotein cholesterol subfractions. **Maturitas**, [s. l.], v. 81, n. 1, p. 62–68, 2015.

ASCENZI, Paolo; BOCEDI, Alessio; MARINO, Maria. Structure–function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 299–402, 2006.

BARROS, Rodrigo P.A.; GUSTAFSSON, Jan-Åke. Estrogen Receptors and the Metabolic Network. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 289–299, 2011.

BEN HUR, H. *et al.* Menopause is associated with a significant increase in blood monocyte number and a relative decrease in the expression of estrogen receptors in human peripheral monocytes. **American journal of reproductive Immunology**, Rehovot, v. 34, p. 363–369, 1995.

BISWAS, Debajit K. *et al.* Crossroads of Estrogen Receptor and NF- κ B Signaling. **Science's STKE**, [s. l.], v. 2005, n. 288, p. pe27–pe27, 2005.

BLÜHER, Matthias. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019.

BRAY, George A. *et al.* Management of obesity. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10031, p. 1947–1956, 2016.

BROZ, Petr; DIXIT, Vishva M. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 407–420, 2016.

BRYZGALOVA, G. *et al.* Evidence that oestrogen receptor- α plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. **Diabetologia**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 588–597, 2006.

BRYZGALOVA, Galyna *et al.* Mechanisms of antidiabetogenic and body weight-lowering effects of estrogen in high-fat diet-fed mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 295, n. 4, p. E904–E912, 2008.

CAMPELLO, R. *et al.* Estrogen Receptor 1 Agonist PPT Stimulates Slc2a4 Gene Expression and Improves Insulin-Induced Glucose Uptake in Adipocytes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 12, n. 19, p. 2059–2069, 2013.

CATENACCI, Victoria A.; HILL, James O.; WYATT, Holly R. The Obesity Epidemic. **Clinics in Chest Medicine**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 415–444, 2009.

CHAMARTHI, Bindu *et al.* Inflammation and hypertension: The interplay of interleukin-6, dietary sodium, and the renin-angiotensin system in humans. **American Journal of Hypertension**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 1143–1148, 2011.

CHIN, S.-H.; KAHATHUDUWA, C. N.; BINKS, M. Physical activity and obesity: what we know and what we need to know*. **Obesity Reviews**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 1226–1244, 2016.

CHO, N.H. *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], v. 138, p. 271–281, 2018.

COLE, Joanne B.; FLOREZ, Jose C. Genetics of diabetes mellitus and diabetes complications. **Nature Reviews Nephrology**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 377–390, 2020.

CUI, Jie; SHEN, Yong; LI, Rena. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. **Trends in Molecular Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 197–209, 2013.

DESPRÉS, Jean-Pierre; LEMIEUX, Isabelle. Abdominal obesity and metabolic syndrome. **Nature**, [s. l.], v. 444, n. 7121, p. 881–887, 2006.

ESSER, Nathalie *et al.* Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. **Diabetologia**, [s. l.], v. 56, n. 11, p. 2487–2497, 2013.

FAN, Wentao *et al.* Estrogen receptors participate in carcinogenesis signaling pathways by directly regulating NOD-like receptors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 511, n. 2, p. 468–475, 2019.

REFERENCE, Brian A.; KASTELEIN, John J. P.; CATAPANO, Alberico L. Lipids and Lipoproteins in 2020. **JAMA**, [s. l.], v. 324, n. 6, p. 595, 2020.

FERRARA, Pietro *et al.* The economic impact of hypercholesterolemia and mixed dyslipidemia: A systematic review of cost of illness studies. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. e0254631, 2021.

FISH, Eleanor N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 737–744, 2008.

FOROUHI, Nita Gandhi; WAREHAM, Nicholas J. Epidemiology of diabetes. **Medicine**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 602–606, 2010.

FORYST-LUDWIG, Anna *et al.* Metabolic Actions of Estrogen Receptor Beta (ER β) are Mediated by a Negative Cross-Talk with PPAR γ . **PLoS Genetics**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. e1000108, 2008.

FUENTES, Nathalie; SILVEYRA, Patricia. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Em: CANCER RESEARCH*. [S. l.: s. n.], 2019. v. 64, p. 135–170.

GALLUZZO, Paola *et al.* 17 β -Estradiol regulates the first steps of skeletal muscle cell differentiation via ER- α -mediated signals. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, [s. l.], v. 297, n. 5, p. C1249–C1262, 2009.

GILES, Thomas D. *et al.* Definition and Classification of Hypertension: An Update. **The Journal of Clinical Hypertension**, [s. l.], v. 11, n. 11, p. 611–614, 2009.

GONZÁLEZ-GRANILLO, Marcela *et al.* ER β activation in obesity improves whole body metabolism via adipose tissue function and enhanced mitochondria biogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 479, p. 147–158, 2019.

GONZÁLEZ-GRANILLO, Marcela *et al.* Selective estrogen receptor (ER) β activation provokes a redistribution of fat mass and modifies hepatic triglyceride composition in obese male mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 502, p. 110672, 2020.

GREEN, Stephen *et al.* Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. **Nature**, [s. l.], v. 320, n. 6058, p. 134–139, 1986.

GRUBER, Christian j *et al.* Production and Actions of Estrogens. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 346, n. 5, p. 340–352, 2002.

GRUNDY, Scott M. *et al.* Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome. **Circulation**, [s. l.], v. 112, n. 17, p. 2735–2752, 2005.

GUO, Xinyue *et al.* NLRP3 Inflammasome Activation of Mast Cells by Estrogen via the Nuclear-Initiated Signaling Pathway Contributes to the Development of Endometriosis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021.

HAN, Sang Jun *et al.* Estrogen Receptor β Modulates Apoptosis Complexes and the Inflammasome to Drive the Pathogenesis of Endometriosis. **Cell**, [s. l.], v. 163, n. 4, p. 960–974, 2015.

HE, Wei; YUAN, Ting; MAEDLER, Kathrin. Macrophage-associated pro-inflammatory state in human islets from obese individuals. **Nutrition & Diabetes**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 36, 2019.

HEINE, P. A. *et al.* Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 97, n. 23, p. 12729–12734, 2000.

HEWITT, Sylvia C.; KORACH, Kenneth S. Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. **Endocrine Reviews**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 664–675, 2018.

HOLMES, Michael V.; ALA-KORPELA, Mika. What is 'LDL cholesterol'? **Nature Reviews Cardiology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 197–198, 2019.

HOMMA, Hiroaki *et al.* Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 15, p. 11404–11411, 2000.

HU, Jie *et al.* Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. **Nutrition & Metabolism**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 47, 2010.

IORGA, Andrea *et al.* The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy. **Biology of Sex Differences**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 33, 2017.

ISSA, Jean-Pierre J. *et al.* Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 536–540, 1994.

JACOBS, Eric J. Waist Circumference and All-Cause Mortality in a Large US Cohort. **Archives of Internal Medicine**, [s. l.], v. 170, n. 15, p. 1293, 2010.

JENSEN, LB *et al.* Hormone Replacement Therapy Dissociates Fat Mass and Bone Mass, and Tends to Reduce Weight Gain in Early Postmenopausal

Women: A Randomized Controlled 5-Year Clinical Trial of the Danish Osteoporosis Prevention Study. **Journal of Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 333–342, 2003.

JIA, Min; DAHLMAN-WRIGHT, Karin; GUSTAFSSON, Jan Åke. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 557–568, 2015.

JIANG, Shu Zhong *et al.* Obesity and hypertension. **Experimental and Therapeutic Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 2395–2399, 2016.

JOFFRES, Michel *et al.* Hypertension prevalence, awareness, treatment and control in national surveys from England, the USA and Canada, and correlation with stroke and ischaemic heart disease mortality: a cross-sectional study. **BMJ Open**, [s. l.], v. 3, n. 8, p. e003423, 2013.

JOHNSTON, Bradley C. *et al.* Comparison of weight loss among named diet programs in overweight and obese adults: A meta-analysis. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 312, n. 9, p. 923–933, 2014.

KLIP, Amira; MCGRAW, Timothy E.; JAMES, David E. Thirty sweet years of GLUT4. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 294, n. 30, p. 11369–11381, 2019.

KOPIN, Laurie; LOWENSTEIN, Charles J. Dyslipidemia. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 167, n. 11, p. ITC81, 2017.

KRAMER, P. R.; KRAMER, S. F.; GUAN, G. 17 β -estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. **Arthritis & Rheumatism**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 1967–1975, 2004.

KUIPER, George G.J.M. *et al.* Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 93, n. 12, p. 5925–5930, 1996.

LATZ, Eicke; DUEWELL, Peter. NLRP3 inflammasome activation in inflammaging. **Seminars in Immunology**, [s. l.], v. 40, p. 61–73, 2018.

LAUZON-GUILLAIN, B. de *et al.* Menopausal hormone therapy and new-onset diabetes in the French Etude Epidemiologique de Femmes de la Mutuelle Générale de l'Education Nationale (E3N) cohort. **Diabetologia**, [s. l.], v. 52, n. 10, p. 2092–2100, 2009.

LEENERS, Brigitte *et al.* Ovarian hormones and obesity. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 300–321, 2017.

LEMIEUX, C. *et al.* Estrogen receptor α -mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator

acolibifene. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 1236–1244, 2005.

LIANG, Jing; SHANG, Yongfeng. Estrogen and Cancer. **Annual Review of Physiology**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 225–240, 2013.

LITWIN, Mieczysław; KUŁAGA, Zbigniew. Obesity, metabolic syndrome, and primary hypertension. **Pediatric Nephrology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 825–837, 2021.

LIU, Suhuan *et al.* Importance of Extranuclear Estrogen Receptor- α and Membrane G Protein–Coupled Estrogen Receptor in Pancreatic Islet Survival. **Diabetes**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 2292–2302, 2009.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LIZCANO, Fernando; GUZMÁN, Guillermo. Estrogen Deficiency and the Origin of Obesity during Menopause. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 1–11, 2014.

LONTCHI-YIMAGOU, Eric *et al.* Diabetes Mellitus and Inflammation. **Current Diabetes Reports**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 435–444, 2013.

LUO, Jie; YANG, Hongyuan; SONG, Bao-Liang. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 225–245, 2020.

MAEDLER, Kathrin *et al.* Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 851–860, 2002.

MAEDLER, Kathrin *et al.* Low Concentration of Interleukin-1 β Induces FLICE-Inhibitory Protein–Mediated β -Cell Proliferation in Human Pancreatic Islets. **Diabetes**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 2713–2722, 2006.

MAHMOODZADEH, Shokoufeh *et al.* Cardiomyocyte-specific Estrogen Receptor Alpha Increases Angiogenesis, Lymphangiogenesis and Reduces Fibrosis in the Female Mouse Heart Post-Myocardial Infarction. **Journal of Cell Science & Therapy**, [s. l.], v. 05, n. 01, p. 1–10, 2014.

MARTINKOVICH, Stephen *et al.* Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. **Clinical Interventions in Aging**, [s. l.], v. 9, p. 1437, 2014.

MATTHEWS, Jason *et al.* Estrogen Receptor (ER) β Modulates ER α -Mediated Transcriptional Activation by Altering the Recruitment of c-Fos and c-Jun to

Estrogen-Responsive Promoters. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 534–543, 2006.

MCCRACKEN, Emma; MONAGHAN, Monica; SREENIVASAN, Shiva. Pathophysiology of the metabolic syndrome. **Clinics in Dermatology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 14–20, 2018.

MCINNES, Kerry J. *et al.* Association of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I expression and activity with estrogen receptor β in adipose tissue from postmenopausal women. **Menopause**, [s. l.], v. 19, n. 12, p. 1347–1352, 2012.

MENNUNI, S. *et al.* Hypertension and kidneys: Unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. **Journal of Human Hypertension**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 74–79, 2014.

MILLS, Katherine T.; STEFANESCU, Andrei; HE, Jiang. The global epidemiology of hypertension. **Nature Reviews Nephrology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 223–237, 2020.

MIRKIN, Sebastian; PICKAR, James H. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): A review of clinical data. **Maturitas**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 52–57, 2015.

MORSELLI, Eugenia *et al.* The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 352–364, 2017.

MUKAKA, M M. **Statistics Corner: A guide to appropriate use of Correlation coefficient in medical research** Malawi Medical Journal. [S. l.: s. n.], 2012.

MURPHY, Amy J. *et al.* Estradiol Regulates Expression of Estrogen Receptor ER α 46 in Human Macrophages. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. e5539, 2009.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 285, n. 19, p. 2486–2497, 2001.

NAVARRO-PANDO, José M. *et al.* Inhibition of the NLRP3 inflammasome prevents ovarian aging. **Science Advances**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2021.

NOVENSÀ, Laura *et al.* Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 9, 2011.

OHLSSON, Claes *et al.* Obesity and Disturbed Lipoprotein Profile in Estrogen Receptor- α -Deficient Male Mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 278, n. 3, p. 640–645, 2000.

PALIN, S.L. *et al.* 17 β -estradiol and anti-estrogen ICI:Compound 182,780 regulate expression of lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase in isolated subcutaneous abdominal adipocytes. **Metabolism**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 383–388, 2003.

PARE, Gary *et al.* Estrogen receptor- α mediates the protective effects of estrogen against vascular injury. **Circulation Research**, [s. l.], v. 90, n. 10, p. 1087–1092, 2002.

PARIKH, RakeshM; MOHAN, Viswanathan. Changing definitions of metabolic syndrome. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 7, 2012.

PARK, S. K. *et al.* Association between changes in oestradiol and follicle-stimulating hormone levels during the menopausal transition and risk of diabetes. **Diabetic Medicine**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 531–538, 2017.

PATERNI, Ilaria *et al.* Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. **Steroids**, [s. l.], v. 90, n. June, p. 13–29, 2014.

PEDRAM, Ali *et al.* Estrogen receptor beta signals to inhibition of cardiac fibrosis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 434, p. 57–68, 2016.

PELEKANOU, Vasiliki *et al.* Estrogen anti-inflammatory activity on human monocytes is mediated through cross-talk between estrogen receptor ER α 36 and GPR30/GPER1. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 333–347, 2016.

PEREIRA, Luciana O.; FRANCISCHI, Rachel P. de; LANCH JR., Antonio H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, [s. l.], v. 47, n. 2, p. 111–127, 2003.

PEREIRA-SIMON, Simone *et al.* Oxidant Stress and Mitochondrial Signaling Regulate Reversible Changes of ER α Expression and Apoptosis in Aging Mouse Glomeruli and Mesangial Cells. **Endocrinology**, [s. l.], v. 153, n. 11, p. 5491–5499, 2012.

PHIEL, Kristen L. *et al.* Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 97, n. 1, p. 107–113, 2005.

PISTOIA, Francesca *et al.* Hypertension and Stroke: Epidemiological Aspects and Clinical Evaluation. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 9–18, 2016.

PONNUSAMY, Suriyan *et al.* Pharmacologic activation of estrogen receptor β increases mitochondrial function, energy expenditure, and brown adipose tissue. **The FASEB Journal**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 266–281, 2017.

POST, W S *et al.* Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. **Cardiovascular research**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 985–991, 1999.

PUCCI, Giacomo *et al.* Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: A review of the literature. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 120, p. 34–42, 2017.

RADER, Daniel J. *et al.* The role of reverse cholesterol transport in animals and humans and relationship to atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 50, n. SUPPL., p. S189–S194, 2009.

REAVEN, Gerald M. Role of Insulin Resistance in Human Disease. **Diabetes**, [s. l.], v. 37, n. 12, p. 1595–1607, 1988.

RHEINHEIMER, Jakeline *et al.* Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [s. l.], v. 74, p. 1–9, 2017.

ROBERTS, Christian K.; HEVENER, Andrea L.; BARNARD, R. James. Metabolic Syndrome and Insulin Resistance: Underlying Causes and Modification by Exercise Training. *Em: COMPREHENSIVE PHYSIOLOGY*. [S. l.]: Wiley, 2013. v. 3, p. 1–58.

ROHATGI, Anand *et al.* HDL Cholesterol Efflux Capacity and Incident Cardiovascular Events. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 371, n. 25, p. 2383–2393, 2014.

ROMIEU, Isabelle *et al.* Energy balance and obesity: what are the main drivers?. **Cancer Causes & Control**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 247–258, 2017.

RUAN, Hong *et al.* Tissue as an Immediate Target of Tumor Necrosis. **Diabetes**, [s. l.], v. 51, n. November, p. 3176–3188, 2002.

RUIZ-HURTADO, G.; RUILOPE, L.M. Microvascular injury and the kidney in hypertension. **Hipertensión y Riesgo Vascular**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 24–29, 2018.

SAKLAYEN, Mohammad G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Current Hypertension Reports**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 12, 2018.

SALPETER, S. R. *et al.* Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 538–554, 2006.

SAM, Susan. Differential effect of subcutaneous abdominal and visceral adipose tissue on cardiometabolic risk. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 1–9, 2018.

SANTEN, Richard J. *et al.* Postmenopausal Hormone Therapy: An Endocrine Society Scientific Statement. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s. l.], v. 95, n. 7_supplement_1, p. s1–s66, 2010.

SCARIANO, John K. *et al.* Estrogen Receptors Alpha (ESR1) and Beta (ESR2) Are Expressed in Circulating Human Lymphocytes. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 285–293, 2008.

SCARPELLINI, E.; TACK, J. Obesity and Metabolic Syndrome: An Inflammatory Condition. **Digestive Diseases**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 148–153, 2012.

SERAVALLE, Gino; GRASSI, Guido. Obesity and hypertension. **Pharmacological Research**, [s. l.], v. 122, p. 1–7, 2017.

SHAH, Neha D.; LIMKETKAI, Berkeley N. The use of medium-chain triglycerides in gastrointestinal disorders. **Practical Gastroenterology**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 20–28, 2017.

SHI, Jianfeng *et al.* Estradiol inhibits NLRP3 inflammasome in fibroblast-like synoviocytes activated by lipopolysaccharide and adenosine triphosphate. **International Journal of Rheumatic Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 2002–2010, 2018.

SINHA, Arjun D.; AGARWAL, Rajiv. Clinical Pharmacology of Antihypertensive Therapy for the Treatment of Hypertension in CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 757–764, 2019.

SMITH, Eric P. *et al.* Estrogen Resistance Caused by a Mutation in the Estrogen-Receptor Gene in a Man. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 331, n. 16, p. 1056–1061, 1994.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 109, n. 2, p. 1–76, 2017.

STANAWAY, Jeffrey D. *et al.* Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Stu. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10159, p. 1923–1994, 2018.

SUDHIR, Krishnankutty *et al.* Premature Coronary Artery Disease Associated With a Disruptive Mutation in the Estrogen Receptor Gene in a Man. **Circulation**, [s. l.], v. 96, n. 10, p. 3774–3777, 1997.

SZMUILOWICZ, Emily D.; STUENKEL, Cynthia A.; SEELY, Ellen W. Influence of menopause on diabetes and diabetes risk. **Nature Reviews Endocrinology**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 553–558, 2009.

TIWARI-WOODRUFF, Seema *et al.* Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER) α and ER β ligand treatment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 104, n. 37, p. 14813–14818, 2007.

VANDESOMPELE, Jo *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002.

VIDIGAL, Fernanda de Carvalho *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in Brazilian adults: a systematic review. **BMC Public Health**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1198, 2013.

VIJAN, Sandeep. Type 2 Diabetes. **Annals of Internal Medicine**, Hoboken, NJ, USA, v. 162, n. 5, p. ITC1–ITC16, 2015.

WANG, Fang; MO, Zhaohui. NLRP3 inflammasome in metabolic syndrome. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 56, 2020.

WANG, Youfa; WANG, Qiong Joanna. The Prevalence of Prehypertension and Hypertension Among US Adults According to the New Joint National Committee Guidelines. **Archives of Internal Medicine**, [s. l.], v. 164, n. 19, p. 2126, 2004.

WEBER, Michael A. *et al.* Clinical Practice Guidelines for the Management of Hypertension in the Community. **The Journal of Clinical Hypertension**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 14–26, 2014.

WEI, Qing *et al.* Estrogen suppresses hepatocellular carcinoma cells through ER β -mediated upregulation of the NLRP3 inflammasome. **Laboratory Investigation**, [s. l.], v. 95, n. 7, p. 804–816, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications : report of a WHO consultation. Part 1, Diagnosis and classification of diabetes mellitus.** [S. l.], 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight.** [S. l.], 2021.

XU, Yongjun *et al.* NLRP3 inflammasome activation mediates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behavior and hippocampal inflammation in mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 56, p. 175–186, 2016.

YANG, Xiao Ping; RECKELHOFF, Jane F. Estrogen, hormonal replacement therapy and cardiovascular disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 133–138, 2011.

ZHANG, Hanrui *et al.* Role of TNF- α in vascular dysfunction. **Clinical Science**, [s. l.], v. 116, n. 3, p. 219–230, 2009.

ZHAO, Liqin; O'NEILL, Kathleen; DIAZ BRINTON, Roberta. **Selective estrogen receptor modulators (SERMs) for the brain: Current status and remaining challenges for developing NeuroSERMs**. [S. l.: s. n.], 2005.

ZHOU, Zhenqi *et al.* Estrogen receptor α protects pancreatic β -cells from apoptosis by preserving mitochondrial function and suppressing endoplasmic reticulum stress. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 293, n. 13, p. 4735–4751, 2018.

ZISMAN, Ariel *et al.* Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 8, p. 924–928, 2000.

ZWART, Wilbert *et al.* The hinge region of the human estrogen receptor determines functional synergy between AF-1 and AF-2 in the quantitative response to estradiol and tamoxifen. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 123, n. 8, p. 1253–1261, 2010.

**APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA MOLECULAR AND
CELLULAR ENDOCRINOLOGY, ISSN: 0303-7207, FATOR DE IMPACTO
4.369**



***ESR1* and *ESR2* expression levels influence upon inflammation markers
NLRP3 and *IL-1 β* in postmenopausal women with metabolic syndrome**

Authors: Rebeca Micaela da Silva^{a,b}, Thays Maria Costa de Lucena^{a,b}, Débora Elienai de Oliveira Miranda^{a,b}, Aleide Tavares e Silva^c, Dinaldo Cavalcanti de Oliveira^c, Suelen Cristina de Lima^d, Jaqueline de Azevêdo Silva^{a,b*}

Affiliation:

^a Department of Genetics, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, 50670-901 - CEP, Brazil

^b Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, 50740-465 - CEP, Brazil

^c Department of clinical medicine, Hospital das Clinicas, Federal University of Pernambuco, Recife - PE, 50740-900 - CEP, Brazil

^d Oswaldo Cruz Pernambuco Foundation (FIOCRUZ-PE), Aggeu Magalhães Institute – IAM, Av. Prof. Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária, Recife - PE, 50740-465, Brazil

*Corresponding Author

Jaqueline de Azevêdo Silva

jaqueline.azevedo@ufpe.br

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Recife - PE, 50670-901 - CEP, Brazil

Abstract:

Metabolic syndrome (MetS) is a condition that postmenopausal women are at greater risk of developing, and have an increased pro-inflammatory response, which may be related to the influence of reduced levels of estrogen 17 β -estradiol during this reproductive phase. Therefore, this study aimed to investigate the expression of genes encoding estrogen receptors alpha and beta, *ESR1* and *ESR2*, in postmenopausal women with MetS and how these correlates with the expression of inflammatory markers *NLRP3* and *IL-1 β* . Women with MetS showed downregulation in *ESR1* expression compared to the control group. Among the case group with MetS, those with obesity had an upregulation of *ESR2* expression, while those with T2DM had a downregulation of *ESR1* expression. In addition, positive correlations were observed between *NLRP3* expression with the *ESR1* expression and waist circumference. Our results suggest an estrogen receptors differential expression in MetS after menopause according to the diagnosed cardiometabolic diseases.

Keywords: Estrogen receptor alpha; Estrogen Receptor beta; NLRP3 Inflammasome; Interleukin-1 beta; Metabolic disorders.

1. Introduction

Metabolic syndrome (MetS) is featured as a set of cardiometabolic disorders including obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), dyslipidemia, and systemic arterial hypertension (SAH) (Alberti et al., 2009; McCracken et al., 2018). Since postmenopausal women have higher incidence of cardiometabolic disorders they display increased risk of developing MetS (Morselli et al., 2017; Pucci et al., 2017). After menopause, the levels 17 β -estradiol (E₂) are significantly reduced compared to reproductive age directly influencing upon cardiometabolic conditions (Cui et al., 2013).

E₂ exerts its cellular effects mainly by binding to the estrogen receptors (ERs) ER α and ER β , encoded by *ESR1* and *ESR2* genes, respectively (Fuentes and Silveyra, 2019). The association between ERs and metabolic disorders in

murine models suggests that reduced levels of ER α lead to increased adiposity, insulin resistance, and glucose intolerance (Bryzgalova et al., 2006; Després and Lemieux, 2006; Heine et al., 2000). A reduction in ER β levels leads to similar consequences, increasing adipogenesis, free fatty acids, and the risk of apoptosis in pancreatic β -cells (Foryst-Ludwig et al., 2008; Liu et al., 2009; Ponnusamy et al., 2017).

MetS has a chronic low-grade pro-inflammatory state, and one of the contributing factors is the innate immune response mediated by the NLRP3 inflammasome (Wang and Mo, 2020). When activated, the NLRP3 inflammasome is responsible for the production of IL-1 β , a cytokine that stimulates inflammation and induces pyroptosis, a lytic form of cell death (Broz and Dixit, 2016). The role of NLRP3 in natural aging and reproductive changes in females is still not widely understood (Navarro-Pando et al., 2021). However, elevated serum levels of this inflammasome are observed in women with MetS with increasing age (Al-Daghri et al., 2021).

Despite the evidence observed in murine models, the few studies that investigated the gene expression of ERs in humans had focused only on the cardiometabolic disorders individually but not in MetS. Therefore, herein we evaluated the expression of *ESR1* and *ESR2* genes in MetS in postmenopausal women and their correlation with *NLRP3* and *IL-1 β* genes at a systemic level.

2. Material and methods

2.1. Subjects

A total of 59 postmenopausal women were included in the study, divided into two groups. The study group consisted of women with MetS (N = 52) and the control group (N = 7). The study group was subdivided according to the diagnosis of pathologies associated with MetS and age. Participants were recruited between February and December of 2022 from the hemodynamic laboratories of the hospitals Ilha do Leite and Federal University of Pernambuco Clinics, both located in Recife/Pernambuco, Brazil.

The MetS inclusion criteria were defined according to the International Diabetes Federation (IDF) classification (Alberti et al., 2009). The control group did not present at the moment any of the cardiometabolic disorders: obesity, dyslipidemia, SAH, and T2DM. Exclusion criteria for the study and control groups were a previous diagnosis of autoimmune diseases, cancer, or hormone replacement therapy.

All individuals included in the study met the inclusion/exclusion criteria and only participated in the research after signing a written consent form and with approval by the institutional and national research Ethics committee PLATAFORMA BRASIL under the registration number: 51931521.9.0000.5208.

2.2. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from peripheral whole blood samples using the Trizol™ (Invitrogen) reagent and following the manufacturer's instructions. Quality control of the samples was verified by spectrophotometry for quantification and agarose gel electrophoresis for integrity. The cDNA was synthesized using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

2.3. Gene expression with quantitative reverse-transcription PCR

Gene expression assays were performed according to the proposed normalization rules by Livak and Schmittgen, (2001) and Vandesompele et al. (2002). Taqman specific fluorogenic probes (Thermo Fisher Scientific) were used for the target genes *ESR1* (Hs01046816_m1), *ESR2* (Hs01100353_m1), *NLRP3* (Hs00918082_m1), and *IL-1 β* (Hs01555410_m1). The endogenous control genes used for relative gene expression were *RPLP0* (F: GCGACCTGGAAGTCCAATA; R: TCTGCTTGGAGCCCACATTG) and *HSP90* (F: GCCTACTTGGTGGCAGAGAA; R: CAGCAGAAGACTCCCAAGCA), performed with the SyBR Green methodology and were selected after expression stability analysis using geNorm software and the web-based tool RefFinder.

2.4. Statistical analysis

Gene expression assays were performed in technical triplicate, and the data were presented by group mean and standard deviation. For statistical analysis, the

Shapiro-Wilk normality test was applied to verify data distribution, normalized samples used the parametric Student's *t*-test or Pearson correlation, and for non-normalized samples the non-parametric Mann-Whitney test and Spearman correlation were used, considering as statistically significant $p < 0.05$. These analyses were performed in R software, version 4.2.2, and for graphical visualization was used GraphPad Prism software, version 9.5.1.

3. Results

3.1. Clinical characteristics

The clinical characteristics of the study participants are summarized in Table 1. The study group of postmenopausal women with MetS had a mean age of 67.2 ± 10.4 years, a BMI of 29.9 ± 4.4 kg/m², and a waist circumference of 102.8 ± 12.7 cm. Regarding other clinical conditions, 98.1% had SAH, 75.0% had T2DM, and 86.5% had dyslipidemia. The control group, also postmenopausal, had a mean age of 58.9 ± 6.8 years, a BMI of 22.7 ± 3.3 kg/m², and a waist circumference of 78.2 ± 9.7 cm. None of them had cardiometabolic disorders.

Table 1

Clinical characteristics of postmenopausal women with metabolic syndrome and healthy controls.

Variable	Postmenopausal with metabolic syndrome (N = 52)	Healthy controls (N = 7)
Age (Years)		
Mean $\pm$ SD	67.2 ± 10.4	58.9 ± 6.8
BMI (kg/m ²)		
Mean $\pm$ SD	29.9 ± 4.4	22.7 ± 3.3
Waist circumference (cm)		
Mean $\pm$ SD	102.8 ± 12.7	78.2 ± 9.7
Hypertension		
Yes	51 (98.1%)	0 (0.0%)
No	1 (1.9%)	7 (100.0%)
Type 2 Diabetes Mellitus		
Yes	39 (75.0%)	0 (0.0%)
No	13 (25.0%)	7 (100.0%)
Dyslipidemia		
Yes	45 (86.5%)	0 (0.0%)
No	7 (13.5%)	7 (100.0%)

N: Number of participants per group.

3.2. *ESR1* and *ESR2* gene expression in metabolic syndrome

When analyzing the expression of *ESR1* and *ESR2* genes in the study group (N = 52) compared to healthy controls (N = 7) (Fig. 1A), a downregulation of the *ESR1* gene (-2.02 FC, $p = 0.0466$) and *ESR2* gene (-1.14 FC, $p = 0.5509$) was observed, which was statistically significant only for the *ESR1* gene.

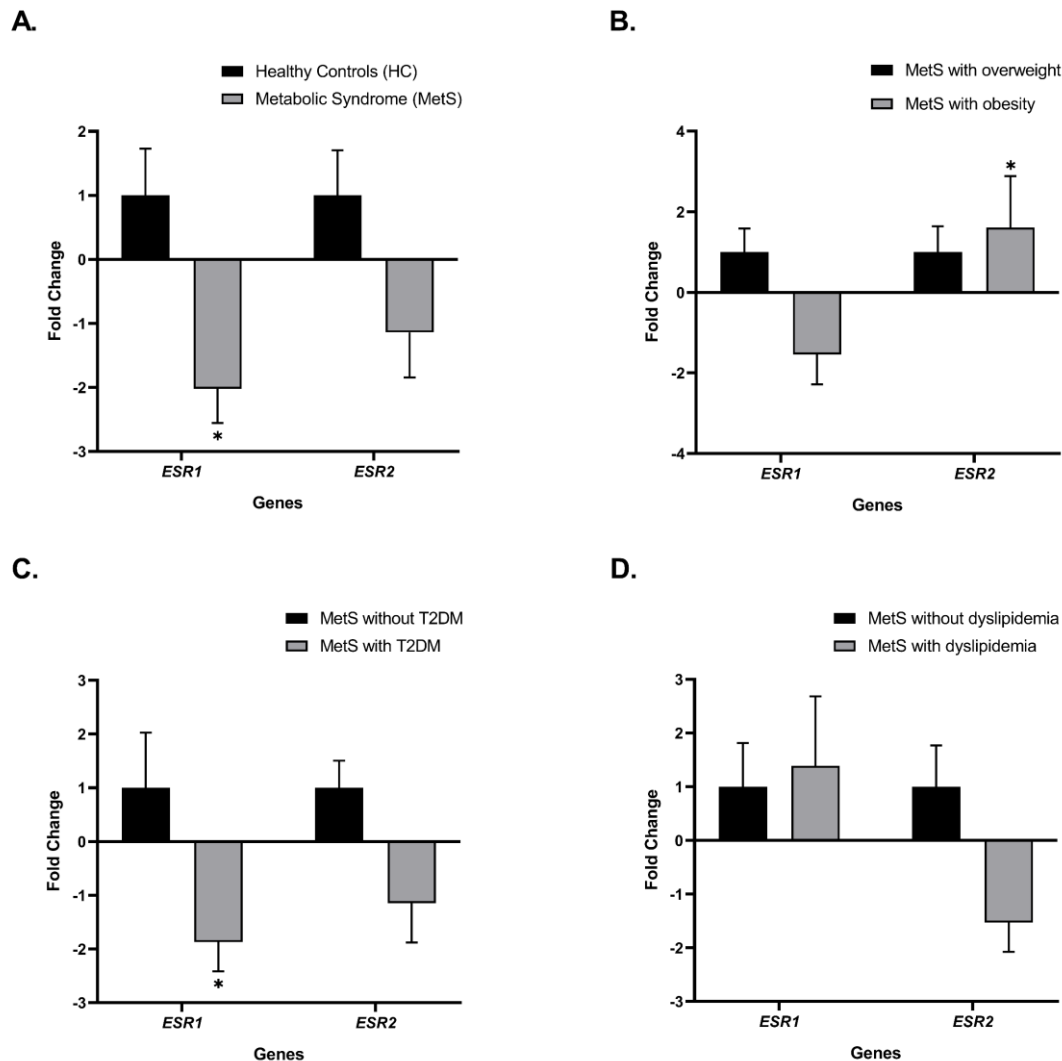


Fig. 1 Relative expression of *ESR1* and *ESR2* mRNAs levels in postmenopausal women. **A.** Metabolic syndrome *versus* controls. **B.** Metabolic syndrome with obesity *versus* metabolic syndrome with overweight. **C.** Metabolic syndrome with type 2 diabetes mellitus *versus* metabolic syndrome without type 2 diabetes mellitus. **D.** Metabolic syndrome with dyslipidemia *versus* metabolic syndrome without dyslipidemia. MetS: Metabolic syndrome; T2DM: type 2 diabetes mellitus. *: $p < 0.05$.

ESR1 and *ESR2* gene expression was also evaluated in postmenopausal women with MetS according to the presence or absence of the following

cardiometabolic disorders: obesity, T2DM, and dyslipidemia. The obese state (N = 24) compared to the overweight state (N = 20) had a downregulation of *ESR1* gene expression (-1.54 FC, $p = 0.2315$) (Fig. 1B), this difference was not statistically significant. On the other hand, *ESR2* gene expression was significantly upregulated (+1.61 FC, $p = 0.0004$) in obese compared to overweight women.

In the T2DM-related expression analysis (Fig. 1C), *ESR1* gene expression was significantly downregulated (-1.87 FC, $p = 0.0071$) in women with T2DM (N = 39) compared to women without T2DM (N = 13). The expression of the *ESR2* gene in women with T2DM also showed a downregulation (-1.15 FC, $p = 0.5727$) when compared to women without T2DM (-1.15 FC, $p = 0.5727$), however, there was no statistical significance.

Regarding dyslipidemia (Fig. 1D), women with this condition (N = 45) showed an upregulation of *ESR1* gene expression (+1.39 FC, $p = 0.2538$) compared to women without dyslipidemia (N = 7). Meanwhile, *ESR2* gene expression had a downregulation (-1.53 FC $p = 0.2831$). Both comparisons were not statistically significant.

Concerning age, the expression of the *ESR1* gene (Fig. 2A) comparing the age interval 50 to 59 years (N = 13) with the other 10-year age intervals individually, there was a downregulation of -1.14 FC in the interval 60 to 69 years (N = 14, $p = 0.9976$), -1.87 FC in 70 to 79 years (N = 18, $p = 0.2105$) and -4.40 FC in the 80 years or older (N = 5, $p = 0.0306$). Only the comparison between the age intervals 50 to 59 years and 80 years or older was statistically significant.

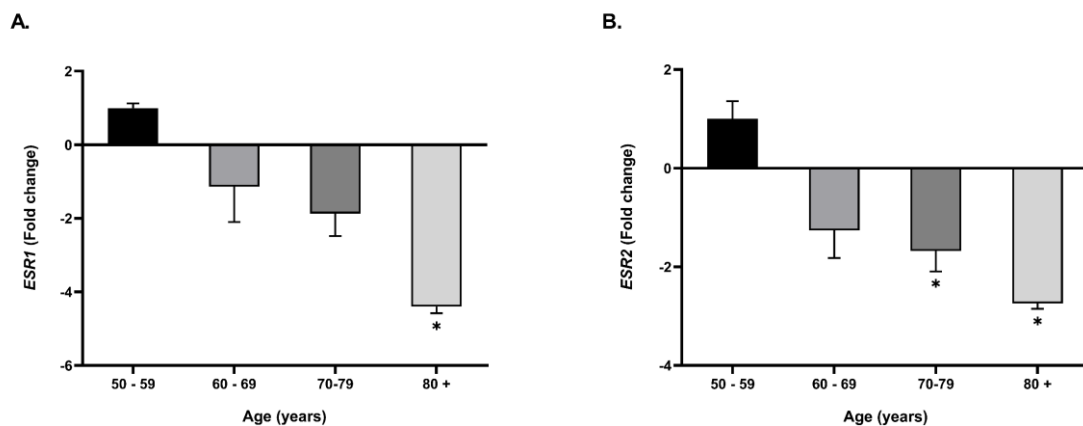


Fig. 2 Relative gene expression of **A. *ESR1*** and **B. *ESR2*** in postmenopausal women with metabolic syndrome as a function of age. *: $p < 0.05$.

A downregulation of *ESR2* gene expression was also observed (Fig. 2B) compared to the same age group, 50 to 59 years, with values of -1.26 FC in the age interval 60 to 69 years ($p = 0.6212$), -1.68 FC in 70 to 79 years ($p = 0.0317$), and -2.74 FC in 80 years or older ($p = 0.0189$). Statistical significance was reached when comparing the age intervals of 70 to 79 years and 80 years or older with 50 to 59 years.

3.3. Correlation between normalized gene expression of *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3* *IL-1 β* , and clinical features

Among the study group, correlation analyses were performed between the variables: expression levels of ERs encoding genes (*ESR1* and *ESR2*), expression levels of inflammatory markers (*NLRP3* and *IL-1 β*), and clinical characteristics (age and waist circumference). The results are summarized in Table 2.

Table 2

Correlation coefficients between normalized gene expression values of *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3*, and *IL-1 β* , and clinical features (age and waist circumference), in postmenopausal women with metabolic syndrome.

Genes and clinical features	<i>ESR1</i>		<i>ESR2</i>		<i>NLRP3</i>		<i>IL-1β</i>	
	<i>r</i> or <i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r</i> or <i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r</i> or <i>r_s</i>	<i>p</i>	<i>r</i> or <i>r_s</i>	<i>p</i>
<i>ESR1</i>	-	-	0.4810	0.0174*	0.4113	0.0379*	0.2449	0.2488
<i>ESR2</i>	0.4810	0.0174*	-	-	-0.2670	0.2420	0.3108	0.1953
<i>NLRP3</i>	0.4113	0.0379*	-0.2670	0.2420	-	-	0.6416	0.0074*
<i>IL-1β</i>	0.2449	0.2488	0.3108	0.1953	0.6416	0.0074*	-	-
Age	-0.4218	0.0181*	-0.5405	0.0064*	0.1329	0.4466	-0.3433	0.0860
Waist circumference	-0.2342	0.2706	0.1849	0.4353	0.4099	0.0303*	-0.1700	0.4614

*: $p < 0.05$; *r*: Pearson correlation coefficient; *r_s*: Spearman correlation coefficient; -: Correlation coefficients between the same observations.

The correlation analysis for the expression levels of *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3*, and *IL-1 β* genes revealed low positive significant correlations between *ESR1* and *ESR2*, *ESR1* and *NLRP3*, and a moderate positive correlation between *NLRP3* and *IL-1 β* .

Examining the correlation between expression of the investigated genes with age there was a significant negative and low correlation with the expression of *ESR1* and a moderate correlation with *ESR2*. Although the expression of *IL-1 β* showed a negative and weak correlation with age, it was not statistically significant.

When associating the expression levels of these genes evaluated with the waist circumference measurement, only the analysis of *NLRP3* expression showed a positive and low significant correlation.

4. Discussion

This study analyzed the expression levels of genes encoding ERs alpha and beta, *ESR1* and *ESR2*, respectively, in postmenopausal women with MetS and their correlation with the expression of pro-inflammatory markers, *NLRP3* and *IL-1 β* . Among our findings were significant reductions in *ESR1* expression in the study group of women with MetS and with MetS who have T2DM, and an increase in *ESR2* expression in women in the study group who have obesity. Significant positive correlations were also observed between the expression of *ESR1* and *ESR2*, *ESR1* and *NLRP3*, and with *NLRP3* and with *NLRP3* and measurement of waist circumference. Along with a gradual reduction in *ESR1* and *ESR2* expression accompanied by age increase.

Related to *ESR1* a reduced gene expression in the study group was observed compared to the control group, which may be related to the decrease in beneficial effects resulting from the action of ER α . The present study evaluated peripheral whole blood, in which the effects of E₂ on ER α are described as leading to decreased production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF and IL-6, in cells of the immune system (Fish, 2008; Kramer et al., 2004; Tiwari-Woodruff et al., 2007). These cytokines are elevated in diseases associated with MetS, such as dyslipidemia, obesity, T2DM, and SAH (Chamarthi et al., 2011; He et al., 2019; Lontchi-Yimagou et al., 2013).

Reduced *ESR1* expression may also lead to the loss of the positive effects of ER α action in mouse models, increasing the risk of developing cardiometabolic disorders, such as reduced body and fat mass (Heine et al., 2000; Lemieux et al., 2005), as well as improvements in the maintenance of glucose, insulin, and lipid homeostasis (Campello et al., 2013; Ohlsson et al., 2000; Zhou et al., 2018).

We also show an increase in *ESR2* expression in obese as compared to overweight participants. However, in mouse models, ER β reduces the risk of developing obesity by reducing the mass of visceral and cutaneous adipose tissue through increased energy expenditure and thermogenesis (González-Granillo et al., 2019; Ponnusamy et al., 2017). This increase may be related to the reported association in postmenopausal women, compared to premenopausal women, of higher concomitant expression of ER β and the enzyme 11 β HSD1, which acts releasing cortisol active form, additionally, 11 β HSD1 levels are also increased in central obesity in humans and mice, which stimulates visceral adipose tissue accumulation (McInnes et al., 2012).

A decrease in *ESR1* gene expression was shown in women with T2DM, which may be related to the loss of ER α action in preventing T2DM. Since in mouse models, the decrease or suppression of *Esr1* expression causes an increase in glycemia and impaired glucose tolerance (Bryzgalova et al., 2006), the use of ER α agonists such as PPT leads to increased expression and translocation of Glut-4 in adipocytes and myocytes, improving glucose uptake (Campello et al., 2013), as well as reducing pancreatic β -cell death by suppressing the expression of *Chop* and *Oma1* genes, both of which are involved in oxidative stress-induced apoptosis (Zhou et al., 2018).

Regarding the influence of age on *ESR1* gene expression, it was observed that with increasing age there is a gradual decrease in gene expression. This reduction is consistent with studies demonstrating a decrease in *ESR1/Esr1* expression during aging through methylation of the CpG islands of the *ESR1* promoter and increased oxidative stress in cells of the endothelium, vascular smooth muscle, aorta, right atrium, colon, and glomerulus (Novensà et al., 2011; Pereira-Simon et al., 2012; Post et al., 1999). Monocytes from postmenopausal women who were not on estrogen replacement, as was the exclusion criterion of this study, also showed lower levels of ER α compared to premenopausal women, in addition to an increase in these levels after estrogen replacement (Ben Hur et al., 1995). In contrast, Phiel et al. (2005) reported an increase in ER α expression in monocytes from postmenopausal women compared to premenopausal women and no significant difference in T and B cells.

Similarly, our results showed that *ESR2* gene expression gradually decreased with older ages. Despite this finding, ER β increased expression was observed in the cardiovascular tissue of aged compared to young mice (Novensà et al., 2011), and in the adipose tissue of postmenopausal compared to premenopausal women (McInnes et al., 2012). This may be due to a potentially different regulation of *ESR2* expression in the MetS compared to an individual approach to their related cardiometabolic diseases.

In terms of the correlation analyses between the relative normalized expression of *ESR1*, *ESR2*, *NLRP3*, and *IL-1 β* genes, positive correlations were observed in the study group between the expressions of *ESR1* and *ESR2*, *NLRP3* and *IL-1 β* , as well as *ESR1* and *NLRP3*.

Given the positive association between the expression levels of *ESR1* and *ESR2*, it is relevant to emphasize that a balance between the proportions of ER α and ER β is necessary to maintain the homeostasis. *ESR1* and *ESR2* levels vary their expression according to tissue or cell type, they also can exert similar effects, such as subtypes increasing energy expenditure by reducing adipose tissue accumulation (Després and Lemieux, 2006; Ponnusamy et al., 2017), or act in an antagonistic manner, such as the stimulation of GLUT4 protein expression by ER α and the repression of this expression by ER β (Campello et al., 2013). Also, the direct influence between ERs, such as ER β itself inhibiting the activity of ER α as a transcription factor in breast cancer cell lines (T47D) (Matthews et al., 2006).

A positive correlation was observed between the gene expression of *NLRP3* and *IL-1 β* , as they represent the initiation of the NLRP3 intracellular inflammasome pathway and its main produced cytokine, IL-1 β (Broz and Dixit, 2016). Regarding the combined increase in *ESR1* and *NLRP3* expression, it has been reported that women with MetS have elevated serum levels of NLRP3 (Al-Daghri et al., 2021). Although the association between ERs and *NLRP3/Nlrp3* gene expression levels has a specificity relative to the cell type, tissue, or even the pathology studied (Fan et al., 2019; Wei et al., 2015; Xu et al., 2016). The increased *NLRP3/Nlrp3* gene expression due the action of ER α has already been demonstrated in healthy human colon cells (Fan et al., 2019) and in mast cells from endometriosis lesions in mouse models (Guo et al., 2021).

When correlating the clinical characteristics with the expression of the investigated genes in women with MetS, negative correlations were observed with age and the *ESR1* and *ESR2* genes. Supporting the results obtained in the analysis of expression at 10-years intervals groups according to age, where in both analyses, with the increase of age there is a reduction in the expression of both genes.

Meanwhile, increased waist circumference was positively correlated with *NLRP3* expression, a finding consistent with higher *NLRP3/Nlrp3* expression observed in adipose tissue of obese humans and mice (Esser et al., 2013; Rheinheimer et al., 2017), and the increased serum *NLRP3* levels reported in women with MetS with increased waist circumference (Al-Daghri et al., 2021).

Given that current researches on the role of ERs in the individual pathologies associated with the diagnosis of MetS focuses on animal and *in vitro* models, it is expected that the findings presented in this study will contribute to the understanding of the influence and expression patterns of the genes encoding the ERs, *ESR1* and *ESR2*, in humans with MetS, as well as for the inflammatory markers *NLRP3* and *IL-1 β* , particularly in women in the reproductive phase after menopause.

5. Conclusions

In summary, the results obtained in this study indicate that postmenopausal women with MetS, who constituted the study group, have a reduction in *ESR1* expression compared to healthy controls in the same reproductive phase, in addition to a gradual decrease in the expression of *ESR1* and *ESR2* with increasing age. Considering the pathologies diagnosed in the study group, those with T2DM have a reduction in *ESR1* expression, and those with obesity have an increase in *ESR2* expression. In terms of correlation with pro-inflammatory markers, *NLRP3* gene expression was positively correlated with *ESR1* expression and with waist circumference measurement. Thus, these findings may expand the knowledge of the expression patterns of the genes encoding ER α and ER β , *ESR1* and *ESR2*, in MetS during the postmenopausal reproductive phase and how this influences the expression of inflammatory markers *NLRP3* and *IL-1 β* .

6. CRediT authorship contribution statement

Rebeca Micaela da Silva: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Writing - Review & Editing, and Visualization.

Thays Maria Costa de Lucena: Formal analysis and Writing - Review & Editing.

Débora Elienai de Oliveira Miranda: Writing - Review & Editing. **Aleide Tavares**

e Silva: Resources and Writing - Review. **Dinaldo Cavalcanti de Oliveira:**

Resources and Writing - Review. **Suelen Cristina de Lima:** Conceptualization,

Writing - Review & Editing and Supervision. **Jaqueline de Azevêdo Silva:**

Conceptualization, Writing - Review & Editing, Supervision and Project administration.

7. Fundings

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

8. Declaration of competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

9. References

- Alberti, K.G.M.M., Eckel, R.H., Grundy, S.M., Zimmet, P.Z., Cleeman, J.I., Donato, K.A., Fruchart, J.-C., James, W.P.T., Loria, C.M., Smith, S.C., 2009. Harmonizing the Metabolic Syndrome. *Circulation* 120, 1640–1645. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
- Al-Daghri, N.M., Wani, K., AlHarthi, H., Alghamdi, A., Alnaami, A.M., Yakout, S.M., 2021. Sex-Specific Signature in the Circulating NLRP3 Levels of Saudi Adults with Metabolic Syndrome. *J Clin Med* 10, 3288. <https://doi.org/10.3390/jcm10153288>
- Ben Hur, H., Mor, G., Inler, V., Blicktein, I., Amir-Zaltsman, Y., Sharp, A., Globerson, A., Kohen, F., 1995. Menopause is associated with a significant increase in blood monocyte number and a relative decrease in the expression of estrogen receptors in human peripheral monocytes. *American journal of reproductive Immunology* 34, 363–369.
- Broz, P., Dixit, V.M., 2016. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 16, 407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>

- Bryzgalova, G., Gao, H., Ahren, B., Zierath, J.R., Galuska, D., Steiler, T.L., Dahlman-Wright, K., Nilsson, S., Gustafsson, J.-Å., Efendic, S., Khan, A., 2006. Evidence that oestrogen receptor- α plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver. *Diabetologia* 49, 588–597. <https://doi.org/10.1007/s00125-005-0105-3>
- Campello, R., Alves-Wagner, A., Lucas, T., Mori, R., Furuya, D., Porto, C., Machado, U., 2013. Estrogen Receptor 1 Agonist PPT Stimulates Slc2a4 Gene Expression and Improves Insulin-Induced Glucose Uptake in Adipocytes. *Curr Top Med Chem* 12, 2059–2069. <https://doi.org/10.2174/1568026611212190004>
- Chamarthi, B., Williams, G.H., Ricchiuti, V., Srikumar, N., Hopkins, P.N., Luther, J.M., Jeunemaitre, X., Thomas, A., 2011. Inflammation and hypertension: The interplay of interleukin-6, dietary sodium, and the renin-angiotensin system in humans. *Am J Hypertens* 24, 1143–1148. <https://doi.org/10.1038/ajh.2011.113>
- Cui, J., Shen, Y., Li, R., 2013. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med* 19, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007>
- Després, J.-P., Lemieux, I., 2006. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881–887. <https://doi.org/10.1038/nature05488>
- Esser, N., L'Homme, L., De Roover, A., Kohnen, L., Scheen, A.J., Moutschen, M., Piette, J., Legrand-Poels, S., Paquot, N., 2013. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia* 56, 2487–2497. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3023-9>
- Fan, W., Gao, X., Ding, C., Lv, Y., Shen, T., Ma, G., Yan, L., Song, S., 2019. Estrogen receptors participate in carcinogenesis signaling pathways by directly regulating NOD-like receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 511, 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.085>
- Fish, E.N., 2008. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol* 8, 737–744. <https://doi.org/10.1038/nri2394>
- Foryst-Ludwig, A., Clemenz, M., Hohmann, S., Hartge, M., Sprang, C., Frost, N., Krikov, M., Bhanot, S., Barros, R., Morani, A., Gustafsson, J.-Å., Unger, T., Kintscher, U., 2008. Metabolic Actions of Estrogen Receptor Beta (ER β) are Mediated by a Negative Cross-Talk with PPAR γ . *PLoS Genet* 4, e1000108. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000108>
- Fuentes, N., Silveyra, P., 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Adv Protein Chem Struct Biol* 116, 135–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- González-Granillo, M., Savva, C., Li, X., Fitch, M., Pedrelli, M., Hellerstein, M., Parini, P., Korach-André, M., Gustafsson, J.-Å., 2019. ER β activation in obesity improves whole body metabolism via adipose tissue function and enhanced mitochondria biogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 479, 147–158. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.10.007>

- Guo, X., Xu, X., Li, T., Yu, Q., Wang, J., Chen, Y., Ding, S., Zhu, L., Zou, G., Zhang, X., 2021. NLRP3 Inflammasome Activation of Mast Cells by Estrogen via the Nuclear-Initiated Signaling Pathway Contributes to the Development of Endometriosis. *Front Immunol* 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.749979>
- He, W., Yuan, T., Maedler, K., 2019. Macrophage-associated pro-inflammatory state in human islets from obese individuals. *Nutr Diabetes* 9, 36. <https://doi.org/10.1038/s41387-019-0103-z>
- Heine, P.A., Taylor, J.A., Iwamoto, G.A., Lubahn, D.B., Cooke, P.S., 2000. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor- α knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12729–12734. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12729>
- Kramer, P.R., Kramer, S.F., Guan, G., 2004. 17 β -estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis Rheum* 50, 1967–1975. <https://doi.org/10.1002/art.20309>
- Lemieux, C., Phaneuf, D., Labrie, F., Giguère, V., Richard, D., Deshaies, Y., 2005. Estrogen receptor α -mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator acolbifene. *Int J Obes* 29, 1236–1244. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803014>
- Liu, S., Le May, C., Wong, W.P.S., Ward, R.D., Clegg, D.J., Marcelli, M., Korach, K.S., Mauvais-Jarvis, F., 2009. Importance of Extranuclear Estrogen Receptor- α and Membrane G Protein–Coupled Estrogen Receptor in Pancreatic Islet Survival. *Diabetes* 58, 2292–2302. <https://doi.org/10.2337/db09-0257>
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lontchi-Yimagou, E., Sobngwi, E., Matsha, T.E., Kengne, A.P., 2013. Diabetes Mellitus and Inflammation. *Curr Diab Rep* 13, 435–444. <https://doi.org/10.1007/s11892-013-0375-y>
- Matthews, J., Wihlén, B., Tujague, M., Wan, J., Ström, A., Gustafsson, J.-Å., 2006. Estrogen Receptor (ER) β Modulates ER α -Mediated Transcriptional Activation by Altering the Recruitment of c-Fos and c-Jun to Estrogen-Responsive Promoters. *Molecular Endocrinology* 20, 534–543. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0140>
- McCracken, E., Monaghan, M., Sreenivasan, S., 2018. Pathophysiology of the metabolic syndrome. *Clin Dermatol* 36, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2017.09.004>
- McInnes, K.J., Andersson, T.C., Šimonytė, K., Söderström, I., Mattsson, C., Seckl, J.R., Olsson, T., 2012. Association of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I expression and activity with estrogen receptor β in adipose tissue from postmenopausal women. *Menopause* 19, 1347–1352. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e318258aad7>

- Morselli, E., Santos, R.S., Criollo, A., Nelson, M.D., Palmer, B.F., Clegg, D.J., 2017. The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health. *Nat Rev Endocrinol* 13, 352–364. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.12>
- Murphy, A.J., Guyre, P.M., Wira, C.R., Pioli, P.A., 2009. Estradiol Regulates Expression of Estrogen Receptor ER α 46 in Human Macrophages. *PLoS One* 4, e5539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005539>
- Navarro-Pando, J.M., Alcocer-Gómez, E., Castejón-Vega, B., Navarro-Villarán, E., Condés-Hervás, M., Mundi-Roldan, M., Muntané, J., Pérez-Pulido, A.J., Bullon, P., Wang, C., Hoffman, H.M., Sanz, A., Mbalaviele, G., Ryffel, B., Cordero, M.D., 2021. Inhibition of the NLRP3 inflammasome prevents ovarian aging. *Sci Adv* 7. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc7409>
- Novensà, L., Novella, S., Medina, P., Segarra, G., Castillo, N., Heras, M., Hermenegildo, C., Dantas, A.P., 2011. Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ER α /ER β balance in female mice. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025335>
- Ohlsson, C., Hellberg, N., Parini, P., Vidal, O., Bohlooly, M., Rudling, M., Lindberg, M.K., Warner, M., Angelin, B., Gustafsson, J.-Å., 2000. Obesity and Disturbed Lipoprotein Profile in Estrogen Receptor- α -Deficient Male Mice. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 640–645. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3827>
- Pereira-Simon, S., Xia, X., Catanuto, P., Elliot, S., 2012. Oxidant Stress and Mitochondrial Signaling Regulate Reversible Changes of ER α Expression and Apoptosis in Aging Mouse Glomeruli and Mesangial Cells. *Endocrinology* 153, 5491–5499. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1379>
- Phiel, K.L., Henderson, R.A., Adelman, S.J., Elloso, M.M., 2005. Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* 97, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2004.10.007>
- Ponnusamy, S., Tran, Q.T., Harvey, I., Smallwood, H.S., Thiagarajan, T., Banerjee, S., Johnson, D.L., Dalton, J.T., Sullivan, R.D., Miller, D.D., Bridges, D., Narayanan, R., 2017. Pharmacologic activation of estrogen receptor β increases mitochondrial function, energy expenditure, and brown adipose tissue. *The FASEB Journal* 31, 266–281. <https://doi.org/10.1096/fj.201600787rr>
- Post, W.S., Goldschmidt-Clermont, P.J., Wilhide, C.C., Heldman, A.W., Sussman, M.S., Ouyang, P., Milliken, E.E., Issa, J.P., 1999. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 43, 985–991. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(99\)00153-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(99)00153-4)
- Pucci, G., Alcidì, R., Tap, L., Battista, F., Mattace-Raso, F., Schillaci, G., 2017. Sex- and gender-related prevalence, cardiovascular risk and therapeutic approach in metabolic syndrome: A review of the literature. *Pharmacol Res* 120, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.03.008>

- Rheinheimer, J., de Souza, B.M., Cardoso, N.S., Bauer, A.C., Crispim, D., 2017. Current role of the NLRP3 inflammasome on obesity and insulin resistance: A systematic review. *Metabolism* 74, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.06.002>
- Tiwari-Woodruff, S., Morales, L.B.J., Lee, R., Voskuhl, R.R., 2007. Differential neuroprotective and antiinflammatory effects of estrogen receptor (ER) α and ER β ligand treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 14813–14818. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703783104>
- Vandesompele, J., Preter, K. De, Pattyn, F., Poppe, B., Roy, N. Van, Paepe, A. De, Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, 1–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Wang, F., Mo, Z., 2020. NLRP3 inflammasome in metabolic syndrome. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 56. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902020000118968>
- Wei, Q., Guo, P., Mu, K., Zhang, Y., Zhao, W., Huai, W., Qiu, Y., Li, T., Ma, X., Liu, Y., Chen, X., Han, L., 2015. Estrogen suppresses hepatocellular carcinoma cells through ER β -mediated upregulation of the NLRP3 inflammasome. *Laboratory Investigation* 95, 804–816. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.63>
- Xu, Y., Sheng, H., Bao, Q., Wang, Y., Lu, J., Ni, X., 2016. NLRP3 inflammasome activation mediates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behavior and hippocampal inflammation in mice. *Brain Behav Immun* 56, 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.022>
- Zhou, Z., Ribas, V., Rajbhandari, P., Drew, B.G., Moore, T.M., Fluit, A.H., Reddish, B.R., Whitney, K.A., Georgia, S., Vergnes, L., Reue, K., Liesa, M., Shiriha, O., van der Bliek, A.M., Chi, N.-W., Mahata, S.K., Tiano, J.P., Hewitt, S.C., Tontonoz, P., Korach, K.S., Mauvais-Jarvis, F., Hevener, A.L., 2018. Estrogen receptor α protects pancreatic β -cells from apoptosis by preserving mitochondrial function and suppressing endoplasmic reticulum stress. *Journal of Biological Chemistry* 293, 4735–4751. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.805069>

ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Laboratório de Genética e Biologia Molecular Humana – LGBMH

Departamento de Genética

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a): _____ para participar como voluntário (a) da pesquisa : **“Avaliação do status inflamatório na fase reprodutiva e pós-menopausa de mulheres com diferentes graus de estenose coronariana”** que está sob a responsabilidade da pesquisadora Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema, Av. da Engenharia, s/nº - 1º andar, Prédio do CCS - Centro de Ciências da Saúde - Cidade Universitária, Recife - PE, 50730-120, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biologia Molecular Humana, LGBMH, Recife - PE, telefone para contato: 2126-8522, e-mail: eduarda.borborema@ufpe.br. Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade. O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores. 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. Os dados coletados nesta pesquisa (questionário e material biológico), ficarão armazenados em pastas de arquivo e em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema, no endereço acima informado, pelo período de 5 anos e após esse prazo o material será devidamente descartado. Os dados coletados estão sujeitos à perda ou destruição por se tratarem de materiais biológicos e também a um futuro encerramento do banco de dados. Considerando a autonomia, integridade e respeito dos participantes dessa pesquisa, os pesquisadores se comprometem a respeitar a Portaria do Ministério da Saúde número 2.201, de 14 de setembro de 2011, e que estabelece as Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa.

ASPECTOS GERAIS DA PESQUISA:

Objetivos: avaliar o perfil da inflamação e da resposta imune de mulheres em diferentes fases hormonais (idade fértil e pós-menopausa) diagnosticadas com diferentes graus de aterosclerose.

Riscos: Para este estudo é necessário a coleta de informações através de questionário que poderá contar perguntas que podem causar algum constrangimento ao voluntário (como por exemplo se é fumante, seingere bebida alcoólica, se possui alguma autoimune, etc.), cabendo ao mesmo se recusar a responder a pergunta caso julgue necessário. O questionário será aplicado individualmente, apenas entre o voluntário e o responsável e/ou condutor da pesquisa. Para este estudo também é necessário coletar 4mL de sangue periférico, em um tubo contendo anticoagulante EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), podendo ocorrer uma leve picada ou hematoma (mancha arroxeadas - no local da punção). Como forma de minimizar os riscos, as coletas serão feitas por profissionais competentes e devidamente treinados, com todo o material necessário: agulhas descartáveis, garrote, canhão, tubos de coleta, *blood stop*, apoio para braço, álcool. Além disso, os profissionais estarão utilizando todos os EPIs necessários: Luvas, jaleco, máscara, touca e propé. Nenhuma coleta será realizada sem a autorização prévia dos voluntários. As coletas e a aplicação do questionário serão realizadas no Laboratório de Hemodinâmica do Hospital da Ilha do Leite, R. Dr. João Asfora, 35 - Ilha do Leite, Recife - PE, 50070-430 e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-90. Todos os dados obtidos na pesquisa serão preservados em arquivos do Laboratório de Biologia Molecular, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE e nos computadores de acesso e responsabilidade do pesquisador principal – Maria Eduarda Bezerra de Albuquerque Borborema, havendo garantia da privacidade, da confidencialidade e do anonimato dos indivíduos pesquisados, pelo período de 5 anos. Passado tal período, os arquivos serão descartados, garantindo o anonimato. A sua participação será no momento da coleta, podendo futuramente ser contatado para nova coleta de dados.

Benefícios: Como benefícios indiretos, o presente projeto poderá contribuir para entender como diferentes fases hormonais podem interferir no perfil inflamatório e imunológico de mulheres com aterosclerose. Ou seja, o projeto vai ajudar a esclarecer se e como os hormônios femininos interferem se e como os hormônios femininos interferem favorecendo ou não o processo de formação da aterosclerose. O (a) Sr (a). tem o direito de ser mantido(a) atualizado(a) sobre os resultados parciais da pesquisa, e caso seja solicitado, daremos todas as informações que solicitar. Nós nos comprometemos a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados através de artigos científicos em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível sua identificação. Se o (a) senhor (a) concordar em colaborar voluntariamente com a pesquisa e se não tiver nenhuma dúvida, gostaríamos que assinasse este termo. Mesmo assinando, o (a) senhor (a) poderá recusar e/ou retirar o consentimento de participar da pesquisa a qualquer momento sem prejuízo para ambas as partes. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-

600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma cópia deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Pesquisador: _____ Data: ____/____/____

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, acredito ter sido suficientemente informado (a) a respeito do que li ou do que foi lido para mim, descrevendo o estudo: "**Avaliação do status inflamatório na fase reprodutiva e pós-menopausa de mulheres com diferentes graus de estenose coronariana**". Ficaram claros quais são os propósitos, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, benefícios e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

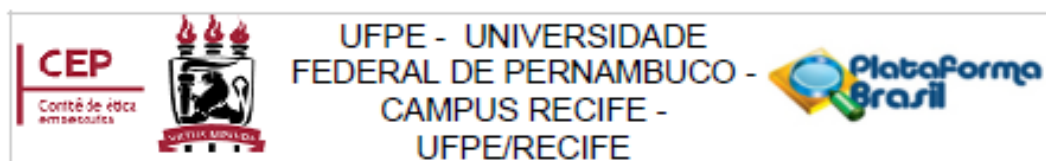
Assinaturas:

Voluntário: _____

Testemunhas: 1 - _____

2 - _____

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do status inflamatório na fase reprodutiva e pós-menopausa de mulheres com diferentes graus de estenose coronariana.

Pesquisador: Maria Eduarda Borborema

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 51931521.9.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.120.261

Apresentação do Projeto:

Trata-se da segunda versão do projeto de pesquisa científica apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa – CEP do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, que tem como orientadora a Prof.^a Dr.^a Jaqueline de Azevêdo Silva.

Será realizado um estudo quantitativo, analítico, experimental, do tipo caso-controle.

As amostras dos pacientes serão oriundas do setor de hemodinâmica do Hospital da Ilha do Leite do Recife/PE. Os indivíduos envolvidos no estudo serão divididos em dois grandes grupos de homens e mulheres. O grupo de mulheres será subdividido em dois grupos conforme a faixa etária, mulheres em idade fértil e mulheres pós-menopausa. Para todos os grupos será realizada a análise conforme os diferentes graus de acometimento da placa aterosclerótica.

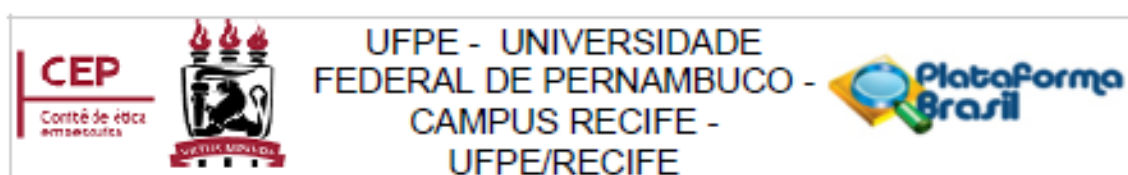
A pesquisa será desenvolvida no Laboratório de Biologia Molecular do LIKA/UFPE e no Laboratório de Genética e Biologia Molecular Humana (LGBMH) do Departamento de Genética da UFPE. A amostragem estimada é de 200 participantes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Avaliar o perfil de expressão de diversos genes da inflamação e da resposta imune em mulheres com diferentes fases hormonais (idade fértil e pós-menopausa) diagnosticadas com diferentes

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.120.281

graus de lesão aterosclerótica;

Objetivo Secundário:

- Criar um banco de dados de amostras biológicas de ácidos nucleicos, dados socio-demográficos e exames laboratoriais de pacientes que preencham os critérios de inclusão,
- Avaliar a expressão do inflamassoma NLRP3,
- Comparar os dados obtidos entre homens e mulheres;
- Comparar os dados obtidos entre mulheres em diferentes fases reprodutivas (durante a menarca e pós-menopausa);
- Comparar os dados obtidos com o grau de lesão evidenciada por angiografia coronariana, bem como com os exames clínicos e características sociodemográficas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para este estudo é necessário a coleta de informações através de questionário que poderá contar perguntas que podem causar algum constrangimento ao voluntário (como por exemplo se é fumante, se ingere bebida alcoólica, se possui alguma autoimune, etc.), cabendo ao mesmo se recusar a responder a pergunta caso julgue necessário. O questionário será aplicado individualmente, apenas entre o voluntário e o responsável e/ou condutor da pesquisa, no laboratório de Hemodinâmica do Hospital da Ilha do Leite.

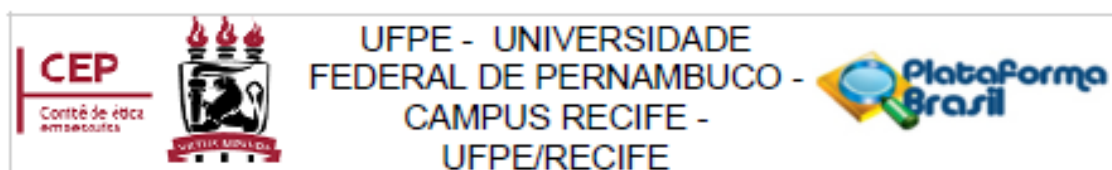
Para este estudo também é necessário coletar 4mL de sangue periférico, em um tubo contendo anticoagulante EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), podendo ocorrer uma leve picada ou hematoma (mancha arroxada - no local da punção). Como forma de minimizar os riscos, as coletas serão feitas por profissionais competentes e devidamente treinados, com todo o material necessário: agulhas descartáveis, garrote, canhão, tubos de coleta, blood stop, apoio para braço, álcool. Além disso, os profissionais estarão utilizando todos os EPIs necessários: Luvas, jaleco, máscara, touca e propé.

BENEFÍCIOS: Como benefícios indiretos, o presente projeto poderá contribuir para entender como a expressão gênica, genes envolvidos no processo inflamatório causador da placa aterosclerótica e como se comporta o padrão de expressão destes em mulheres na pós-menopausa e na idade fértil.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A aterosclerose é um processo multifatorial, inflamatório e crônico causador de doenças como o IAM e o AVE, que apresentam alta taxa de morbidade e mortalidade. O dimorfismo sexual entre

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.120.281

homens e mulheres exerce papel importante frente a patogênese dessa doença, sendo os hormônios esteroides sexuais, como o estrógeno, importantes moléculas reguladoras da resposta imune e da inflamação. Desta forma, no intuito de aprofundar o estudo do caráter inflamatório da aterosclerose e a influência de hormônios sexuais frente a sua patogênese, este projeto visa avaliar o perfil de expressão de diversos genes da inflamação e da resposta imune, e a frequência de polimorfismos de base única (SNPs) funcionais

nestes genes em mulheres com diferentes fases hormonais (idade fértil e pós-menopausa) diagnosticadas com diferentes graus de lesão aterosclerótica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
estão adequadas

Recomendações:
sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:
APROVADO

Considerações Finais a critério do CEP:

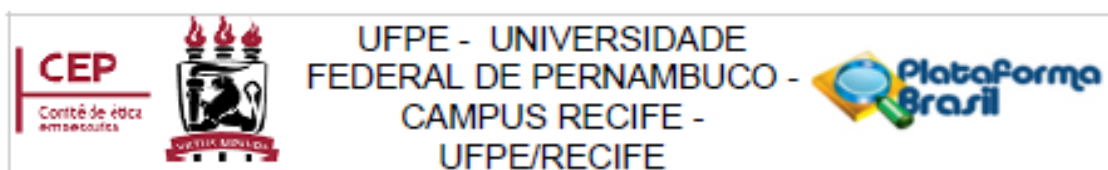
As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", 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).

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.120.281

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1819794.pdf	17/11/2021 13:40:45		Aceito
Outros	Respostas_de_Pendencias.pdf	17/11/2021 13:40:06	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	17/11/2021 13:48:21	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	17/11/2021 13:48:10	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso.pdf	17/11/2021 13:41:56	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	ColetaDados.docx	16/09/2021 14:44:30	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Vinculo.pdf	16/09/2021 14:43:29	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	Termo_Confidencialidade_.pdf	14/09/2021 19:11:27	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CurriculoLattesJaqueline.pdf	14/09/2021 14:18:38	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CurriculoLattesMatheus.pdf	14/09/2021 14:18:18	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CurriculoLattesPedro.pdf	14/09/2021 14:17:57	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CurriculoLattesThays.pdf	14/09/2021 14:17:35	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CuriculoLattesMaria.pdf	14/09/2021 14:15:19	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CartaAnuenciaDGen.pdf	13/09/2021 17:59:14	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CartaAnuenciaLika.png	13/09/2021 17:58:28	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Outros	CartaAnuenciaHapvida.jpeg	13/09/2021 17:58:05	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto.pdf	13/09/2021 17:48:40	PEDRO HENRIQUE DUARTE OLIVEIRA	Aceito

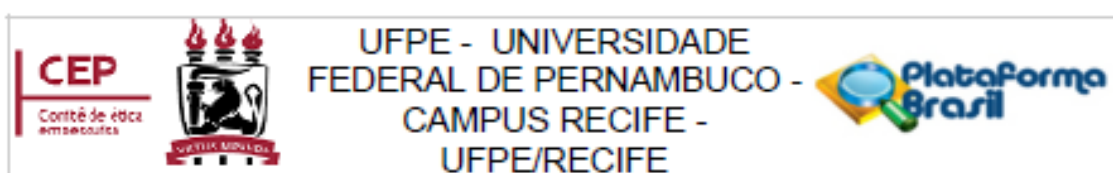
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



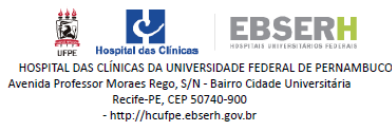
Continuação do Parecer: 5.120.281

RECIFE, 23 de Novembro de 2021

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

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br

ANEXO C – CARTA DE ANUÊNCIA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO



Carta - SEI nº 149/2022/SGPITS/GEP/HC-UFPE-EBSERH

Recife, data da assinatura eletrônica.

CARTA DE ANUÊNCIA

1. Informo para os devidos fins e efeitos legais, objetivando atender as exigências para a obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, e como representante legal da Instituição, estar ciente do projeto de pesquisa: "AVALIAÇÃO DO STATUS INFLAMATÓRIO NA FASE REPRODUTIVA E PÓS-MENOPAUSA DE MULHERES COM DIFERENTES GRAUS DE ESTENOSE CORONARIANA", sob a responsabilidade do Pesquisador Principal MARIA EDUARDA BEZERRA DE ALBUQUERQUE BORBOREMA.
2. Declaro ainda conhecer e cumprir as orientações e determinações fixadas na Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde e demais legislações complementares.
3. No caso do não cumprimento, por parte do pesquisador, das determinações éticas e legais, a Gerência de Ensino e Pesquisa tem a liberdade de retirar a anuência a qualquer momento da pesquisa sem penalização alguma.
4. Considerando que esta instituição tem condição para o desenvolvimento deste projeto, autorizo a sua execução nos termos propostos mediante a plena aprovação do CEP competente.

(assinada eletronicamente)

Gerente de Ensino e Pesquisa



Documento assinado eletronicamente por Raquel Kelnor Silveira, Chefe de Setor, em 11/07/2022, às 08:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ebserh.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 22727725 e o código CRC 989F5127.

Referência: Processo nº 23536.017365/2022-44 SEI nº 22727725