

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

LUANA OLIVEIRA DOS SANTOS

**Avaliação de genes relacionados a resposta imune em pacientes
com Síndrome de Turner**

Recife
2018

LUANA OLIVEIRA DOS SANTOS

**Avaliação de genes relacionados a resposta imune em pacientes com
Síndrome de Turner**

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

Orientadora: Profa. Dra. Neide Santos
Coorientadora: Profa. Dra. Jaqueline de Azevêdo
Silva

**Recife
2018**

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

Santos, Luana Oliveira dos

Avaliação de genes relacionados a reposta imune em pacientes com síndrome de Turner / Luana Oliveira dos Santos. – 2018.

173 f. : il.

Orientadora: Neide Santos.

Coorientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Doenças hereditárias. 2. Cromossomos humanos – Anomalias. 3. Turner, Síndrome. I. Santos, Neide (orientadora). II. Silva, Jaqueline de Azevêdo (coorientadora). III. Título.

616.042

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 138

LUANA OLIVEIRA DOS SANTOS

**Avaliação de genes relacionados a resposta imune em pacientes com
Síndrome de Turner**

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

Aprovado em: 21/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Dra. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ronaldo Celerino da Silva
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

Dra. Vilma Loreto da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

***Aos meus pais, Luiz e Ana,
com amor, dedico***

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz e Ana, agradeço a compreensão por tantos momentos de ausência da minha parte. Agradeço a confiança e por trabalharem dobrado, para que pudesse levar adiante a conclusão de mais uma etapa profissional. É por vocês que eu luto todos os dias!

Aos meus irmãos, Luciane, Lúcio, Carlos, Marta e Neide, e sobrinhos, Carlinhos, Tavinho e Vitinho pelos momentos de convivência! Cada um de vocês ajudou de uma forma diferente e serei eternamente grata por isso! A Vivi e Heitor, meus lindinhos, que mesmo distantes, só de ouvir a voz ou ver uma foto, me deram ânimo e alegrias ao longo desse tempo!

À Prof^a Neide Santos, por tantos anos de orientação e por todas as oportunidades que me foram concedidas! Obrigada pela confiança e por sempre arranjar uma forma de me ajudar quando eu mais precisei. Muitíssimo obrigada pelos incentivos diários, sem eles teria sido tudo mais difícil!

À Prof^a Jaqueline de Azevedo Silva, que aceitou me orientar em um momento decisivo do doutorado!! Obrigada por todas as suas contribuições e por acreditar no potencial do nosso trabalho! Muito obrigada!

Ao Dr^o João Bosco, por disponibilizar o espaço do Genomika, para que eu pudesse realizar análises. À Dra Nara Diniz, pelas ajudas nas interpretações de resultados! À Dra Bethania Amaral, que além de me ajudar em experimentos, me escutou e aconselhou! Muito obrigada!!!

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Genética, pelos valiosos ensinamentos.

Ao secretário da Pós-Graduação, Manassés, que não mediu esforços para ajudar com questões burocráticas, sempre se prontificando ajudar! Muito obrigada!

À Raysa Samanta, pelo companheirismo e trabalho dividido em todas as etapas desse projeto! Obrigada por sua amizade, pelo carinho, conversas e momentos de gordices, os quais foram fundamentais durante o doutorado!

A todos que fazem parte da equipe da Citogenética Humana, pela amizade e inúmeros momentos compartilhados! À Adriana que auxiliou na parte experimental deste trabalho, e mesmo distante, continua contribuindo! À Juliana Vieira, que se desdobrou entre sua pesquisa e as análises citogenéticas! À Rafaela e Rarysa, pelas ajudas em coletas e análises! Obrigada por estarem presentes, pelas conversas, pela paciência e pelo carinho! Adoro vocês!

Aos colegas do LIKA: Camilla, Anna, Jéssica, Ronaldo, Natássia, Jorge e Suellen por toda ajuda e disponibilidade de vocês! À Maria Eduarda, pela colaboração na parte de expressão gênica e pelas inúmeras ajudas! Muito obrigada!

Aos amigos que fazem ou fizeram parte do LGCAH por estarem presentes em minha trajetória acadêmica! À Prof^a Vilma Loreto e Cibele Caio, pelos ensinamentos e conselhos; à Cirlene, pela convivência e amizade, a seu Romildo e dona Zizi, pela convivência e carinho diários. À João, Rafael e Darlene pelas conversas, apoio e pela amizade! Adoro vocês!

Aos amigos da UFPE, em especial, a Carol, que me ajudou desde o início, me escutou, apoiou e vibrou junto comigo em todos os momentos! A Izaquiel Andrade, pelas inúmeras ajudas na área da informática, sempre disposto a me ajudar! A Helena Maria, Marcos Regueira, Cinho, Cheila e Manassés pelos momentos de amizade! Aos amigos da informática, Dudu, Iuri e Jymmy, por tornarem esse último semestre muito mais divertido! Obrigada pela convivência e amizade!

Aos amigos Alice, Cris, Milla, Karyni e “Fravinha” pelos momentos compartilhados ao longo destes anos. Obrigada pela amizade!

À Dr^a Gabriela Ferraz e Dr^a Andrea Resende do IMIP e Dr^a Jacqueline Araújo e Dr^a Barbara Gomes do HC, pela indicação das pacientes e todas as ajudas fornecidas para a realização deste trabalho!

Aos enfermeiros, Kiara do HC e Fábio e Ana Maria do IMIP, por coletarem o sangue dos pacientes. Muito obrigada pela disponibilidade! A contribuição de vocês foi fundamental!

À equipe do SAME do HC, pela colaboração ao disponibilizar os prontuários. À Victor, Janete e Dimas do Arquivo do IMIP, bem como à Mauricio e Marivaldo, que fazem parte da equipe de informática, por me auxiliarem com as pesquisas dos prontuários!

Aos pacientes e pais e/ou responsáveis que aceitaram participar deste estudo e “deram o sangue” por este trabalho.

Aos componentes da banca examinadora pela gentileza ao aceitarem o convite para avaliarem esta tese.

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a FACEPE pelo auxílio financeiro.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.

Paulo Beleki, 2018

RESUMO

A síndrome de Turner (ST) é caracterizada por diversas condições clínicas, incluindo doenças autoimunes/inflamatórias e infecciosas, que comprometem a qualidade de vida dessas pacientes. O objetivo deste trabalho foi determinar se polimorfismos nos genes *PTPN22*, *CTLA-4*, *MBL2* e *VDR*, bem como o perfil de expressão do gene *VDR*, conferem susceptibilidade a diferentes condições clínicas em pacientes com ST. O estudo, tipo caso-controle, incluiu 86 pacientes com ST e 179 indivíduos saudáveis para os genes *CTLA-4*, *PTPN22*, *MBL2*, e 100 pacientes com ST e 116 controles para avaliar o gene *VDR*. A expressão do gene *VDR* foi avaliada em 15 pacientes ST e 15 controles. Uma associação foi observada para o genótipo A/G do *CTLA-4* +49 nas pacientes ST ($p=0.043$; odds ratio [OR]=0.54) quando comparadas ao controle. O genótipo *CTLA-4* G/G foi associado a obesidade em pacientes ST ($p=0.02$; [OR]=6.04) quando comparado a pacientes ST com outros genótipos. Em relação a região promotora -550(H/L) do *MBL2*, a frequência do genótipo H/L foi significativamente maior em pacientes comparadas ao controle ($p=0.01$; [OR]=1.96). Não foram observadas diferenças na distribuição alélica e genotípica de -221(X/Y) e éxon 1 do *MBL2* e *PTPN22* +1858G/A em ambos grupos. A frequência do alelo T ($p=0.006$; [OR]=1.80) e do genótipo T/T ($p=0.01$; [OR]=3.59) de *FokI* do gene *VDR* foi significativamente maior em pacientes ST quando comparadas aos controles. Níveis reduzidos de expressão do gene *VDR* foram detectados em pacientes ST (-2.84 FC) em relação ao controle ($p<0.001$). Nós sugerimos que a distribuição diferencial de polimorfismos nos genes *CTLA-4*, *MBL2* e *VDR*, e níveis reduzidos de expressão do gene *VDR*, podem conduzir a um desbalanço imunológico em pacientes ST.

Palavras-chave: Síndrome de Turner. Autoimunidade. Polimorfismos. Expressão gênica.

ABSTRACT

Turner syndrome (TS) is characterized by a set of clinical conditions, including autoimmune/inflammatory diseases and infectious conditions, which can compromise a patient's quality of life. Here, we assessed if polymorphisms in *CTLA-4*, *PTPN22*, *MBL2* and *VDR* genes, and *VDR* expression profile confer differential susceptibility to clinical conditions in TS. Case-control genetic association study was performed in 86 TS patients compared to 179 healthy control group for *CTLA-4*, *PTPN22*, *MBL2* genes, and 100 TS patients and 116 healthy controls for *VDR* gene. In addition, *VDR* gene expression was also evaluated in 15 TS patients and 15 HC. An association was observed for the A/G genotype of *CTLA-4* +49A/G in TS patients ($p=0.043$, odds ratio [OR]=0.54). The genotype *CTLA-4* G/G was associated with obesity in TS patients ($p=0.02$; [OR]=6.04) as compared to patients with the other genotypes. Regarding, the -550(H/L) polymorphism in the *MBL2* promoter, the frequency of the H/L genotype was significantly higher in the TS group than healthy controls ($p=0.01$; [OR]=1.96). No differences were observed in the distribution of -221(X/Y), *MBL2* exon 1 variants, and *PTPN22* +1858G/A in any assessed groups. We detected statistically significant distribution for *FokI* T allele ($p=0.006$; [OR]=1.80) as well as T/T genotype ($p=0.01$; [OR]=3.59) in TS patients when compared to HC. When assessing *VDR* expression we identified a down-regulation in TS woman (-2.84 FC) versus HC ($p<0.001$). We suggest that different distribution of *CTLA-4*, *MBL2* and *VDR* gene polymorphisms in TS patients, and *VDR* gene downregulation expression, may lead to an immunological imbalance in TS patients.

Key-words: Turner syndrome. Autoimmunity. Polymorphisms. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - (I) Cariótipo com bandeamento G: 45,X. (II, III, IV e V) Alterações cromossômicas envolvendo o segundo cromossomo sexual. Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH), UFPE.....23
- Figura 2** - Achados clínicos na Síndrome de Turner. Redundância de pele (I), linfendema nas mãos e pés (II e III) e paciente portadora de síndrome de Turner com baixa estatura (IV), apresentando (A) pescoço alado; (B) cúbito valgo; (C) linfedema dos pés. Fonte: Sybert e McCauley, 2004; Nat clin pract endocrinol metab, Nature 2008.....25
- Figura 3** - Genes candidatos na síndrome de Turner. Fonte: Adaptado de Ranke e Saenger (2001).....27
- Figura 4** - Os sistemas imunes inato e adaptativo e a sobreposição entre eles. Fonte: Gregersen e Behrens (2006).....30
- Figura 5** - Mecanismos de tolerância central e periférica. Fonte: Adaptado de Gregersen e Behrens (2006).....33
- Figura 6.-** O gene *PTPN22* codifica uma tirosina fosfatase com três domínios distintos. O SNP G1858A resulta em uma substituição (Arg620Trp) no primeiro motivo rico em prolina (em azul). Fonte: Adaptado de Stanford e Bottini (2014).....36
- Figura 7-** A interação LYP/Csk é mediada através do primeiro motivo de prolina em LYP e o domínio SH3 da Csk. A interação entre Lyp e Csk inativa Lck. Fonte: Adaptado de Burn et al. (2011).....37
- Figura 8** - Estrutura tridimensional do complexo de interação Lyp/Csk. (A) Sequência de aminoácidos para os dois alelos, com o motivo P1 indicado (B) Estrutura do peptídeo do motivo P1 ligado ao SH3 de Csk. O peptídeo ligante é mostrado em cinza, com ambos arginina (verde) ou com triptofano (vermelho) na posição correspondente ao resíduo 620 de Lyp. A superfície do domínio SH3 é mostrado em azul escuro (porção básica) e esverdeada (superfície ácida). (C) Interação de R620 de Lyp (amarelo) com triptofano (Trp47) da SH3 de Csk (vermelho). Fonte: Botiini et al.

(2004).....	37
Figura 9 - Mediadores de transdução de sinal associados ao TCR. Fonte: Adaptado de Bottini e Peterson (2013).....	39
Figura 10 - Estrutura do gene <i>CTLA-4</i> . <i>ICOS</i> , inducible costimulatory molecule; UTR, untranslated region. Fonte: Adaptado de Gough et al. (2005).	41
Figura 11 - Isoformas do gene <i>CTLA-4</i> . Fonte: Adaptado de Valk et al. (2008).....	42
Figura 12 - Inibição da ativação do linfócito T CD4+ pelo CTLA-4. Fonte: Silva et al. (2008).....	43
Figura 13 - Complexidade da via co-estimulatória das células T: CD28/CD152–B7-1/B7-2. Fonte: Adaptado de Sayegh (1999).....	43
Figura 14 - A estrutura do gene <i>CTLA-4</i> e alguns polimorfismos. Presença de 4 éxons, duas regiões não traduzíveis, precedendo o éxon 1 e a outra <i>drownstream</i> do éxon 4 e uma região promotora. Fonte: Adaptado de Valk et al. (2008).....	44
Figura 15 - Estrutura do gene <i>MBL2</i> , (A) o exon 0 não é traduzido em proteína. (B) Organização do polipeptídeo MBL, que consiste de 4 domínios: I. região N-terminal rica em cisteína; II. Região semelhante ao colágeno; III. Curta região om flexibilidade e IV. Domínio C-terminal de reconhecimento de carboidrato. Fonte: Adaptado de Beltrame et al. (2015).....	45
Figura 16 - Estrutura da MBL. Fonte: Adaptado de Beltrame et al. (2015).....	46
Figura 17 - MBL tetramérica constituída por quatro subunidades idênticas. Fonte: Adaptado de Turner (1996).....	47
Figura 18 - A MBL possui diferentes funções: I. Ativação do sistema complemento; II. Opsonização e fagocitose; III. Modulação da inflamação; IV. Remoção de células apoptóticas. Fonte: Adaptado de Turner et al. (2003).....	48
Figura 19 - A via das lectinas de ativação do complemento. Fonte: Adaptado de Garred et al. (2009).....	49

Figura 20 - Estrutura do gene <i>MBL2</i> . Mutações na região promotora e mutações pontuais no éxon 1 resultam em mudanças de aminoácidos e diminuição do nível e função da MBL. Fonte: Adaptado de Dommett et al. (2006).....	49
Figura 21 - Variantes alélicas do gene <i>MBL2</i> alteram as regiões colagenosas e formam oligômeros não funcionais. Fonte: Adaptado de Eisen e Minchinton (2003).....	50
Figura 22 - Mecanismo de ação da vitamina D dentro do núcleo de células alvo. Fonte: Adaptado de Yang et al. (2013).....	52
Figura 23 - Metabolismo da Vitamina D. Fonte: Adaptado de Holick (2017).....	53
Figura 24 - Estrutura do gene <i>VDR</i> e posição dos polimorfismos. Fonte: Adaptado de Uitterlinden et al. (2004).....	54
 FOKI (C/T) POLYMORPHISM IS RISK VARIANT AND VDR GENE IS DOWN-REGULATED IN TURNER SYNDROME	
Figure 1 - <i>VDR</i> mRNA levels in TS patients and healthy controls. <i>VDR</i> expression was downregulated (-2.8 FC) in TS patients when compared to HC (n = 15; $p < 0.001$).....	102
Figure 2 - <i>VDR</i> expression in TS patients according to each <i>Cdx-2</i> polymorphism. There is no significant difference of <i>VDR</i> mRNA levels in TS when G/G genotype was compared to A/A and A/G genotypes ($p > 0.05$).....	102
Figure 3 - <i>VDR</i> gene expression in TS patients according to each <i>FokI</i> genotype. There is a statistical difference between <i>VDR</i> mRNA levels when C/T and T/T genotypes were compared to CC genotype ($p < 0.001$).....	103

LISTA DE TABELAS

CTLA-4 GENE POLYMORPHISMS ARE ASSOCIATED WITH OBESITY IN TURNER SYNDROME

Table 1 - Clinical Characterization of all Turner syndrome patients enrolled in our study.....	74
Table 2 - Genotype and allele distribution of <i>PTPN22</i> and <i>CTLA-4</i> genes polymorphisms in TS and controls group.....	75
Table 3 - Genotype distribution of <i>CTLA-4</i> gene polymorphisms in TS group.....	76
Table 4 - Genotype and allele distribution of <i>MBL2</i> gene polymorphisms in TS and controls group.....	77
Table 5 - Analyses of Combined Alleles of <i>PTPN22</i> and <i>CTLA4</i> genes, haplotypes and genotypes of -550 and -221 promoter region and exon 1 of <i>MBL2</i> gene in TS patients and controls.....	78

FOKI (C/T) POLYMORPHISM IS RISK VARIANT AND VDR GENE IS DOWN-REGULATED IN TURNER SYNDROME

Table 1 - Chromosomal alterations compatible with Turner syndrome in 100 analyzed individuals.....	97
Table 2 - Clinical features of the 100 patients with Turner syndrome.....	98
Table 3 - Allele and genotype distribution of <i>VDR</i> polymorphisms in TS patients and HC.....	99
Table 4 - Relationship between <i>Cdx-2</i> and <i>FokI</i> polymorphisms with clinical conditions in TS patients.....	100
Table 5 - Karyotypes, <i>Cdx-2</i> and <i>FokI</i> polymorphisms, and clinical data of TS patients included in <i>VDR</i> expression assay.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1-OHase	- 1 α -hidroxilase
1,25(OH) ₂ D	- 1,25 diidroxi-vitamina D
7-DHC	- 7-deidrocolesterol
25 (OH) D	- 25-hidroxivitamina D ₃
25-OHase	- Vitamina D-25-hidroxilase
A	- Adenina
Aa	- Aminoácido
APCs	- Células apresentadoras de antígeno
BCR	- Receptor de célula B
β – hCG	- Gonadotrofina coriônica humana
C	- Citosina
CDs	- Células dendríticas
CRD	- Domínio de reconhecimento de carboidrato
Csk	- C-terminal Src kinase
CTLA-4	- <i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
CYP24A1	- 25-hidroxivitamina D 24-hidroxilase
DAI	- Doença autoimune
DBD	- Domínio N- terminal de ligação ao DNA
DBP	- <i>Vitamin D binding protein</i>
FISH	- Hibridação <i>in situ</i> Fluorescente
FOXP3	- Forkhead Transcription Factor 3
G	- Guanina
HNF-3	- Fator nuclear do hepatócito
IFN	- Interferon tipo I
Ig	- Imunoglobulina
ITAMs	- Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs
LDB	- Domínio C-terminal de ligação ao ligante
Lyp	- <i>Lymphoid-specific phosphatase</i>
MAC	- Complexo de ataque a membrana
MASPs	- Serina protease associada à lectina ligante de manana
MBL	- Mannan-binding lectin
MBL2	- <i>Mannose-binding lectin 2</i>

MHC	- <i>Major histocompatibility complex</i>
NK	- Células <i>natural killer</i>
Pag	- <i>Phosphoprotein associated with GEMs-glycolipid-enriched membrane domain</i>
PAMPs	- Padrões moleculares associados ao patógenos
PAR1	- Região pseudoautosômica 1
PCR	- C-reactive protein
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
preD3	- Pré-vitamina D3
PRRs	- Receptores de reconhecimento de padrões
PTP	- Tirosina fosfatase
<i>PTPN22</i>	- <i>Protein tyrosine phosphatase, nonreceptor-type, 22</i>
RXR	- Receptor retinóide X
SAP	- Serum Amyloid Protein
SC	- Sistema complemento
SH3	- Src Homology 3
ST	- Síndrome de Turner
SHCE	- Síndrome de hipoplasia do coração esquerdo
T	- Timina
TCR	- Receptores de Células T
TLR	- <i>Toll-like receptor</i>
Tregs	- Células T reguladoras
VDR	- <i>Vitamin D receptor</i>
VDREs	- Elementos de resposta a vitamina D
XIC	- Centro de Inativação do X
<i>XIST</i>	- <i>X-inactive specific transcript</i>
<i>SHOX</i>	- <i>Short stature HOMeobox gene</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 SÍNDROME DE TURNER	21
2.2 O SISTEMA IMUNE	29
2.2.1 O sistema imune inato e adaptativo	29
2.2.2 Tolerância e autoimunidade	32
2.3 GENE <i>PTPN-22</i>	35
2.4 GENE <i>CTLA-4</i>	41
2.5 GENE <i>MBL2</i>	44
2.6 VITAMINA D E O GENE <i>VDR</i>	51
3 OBJETIVOS	55
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
4 <i>CTLA-4</i> GENE POLYMORPHISMS ARE ASSOCIATED WITH OBESITY IN TURNER SYNDROME	56
5 <i>FOKI (C/T) POLYMORPHISM IS RISK VARIANT AND VDR GENE IS DOWN- REGULATED IN TURNER SYNDROME</i>	79
6 DISCUSSÃO GERAL	104
7 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS	108
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS DO INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF FERNANDO FIGUEIRA (IMIP)	118
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES MENORES DE 21 ANOS.....	119
ANEXO C– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES MAIORES DE 21 ANOS	121
ANEXO D - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (CEP/CCS/UFPE)	123
ANEXO E - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 12 a 18 ANOS - Resolução 466/12)	124

ANEXO F - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)	128
ANEXO G - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)	132
ANEXO H - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (CEP/CCS/UFPE)	136
ANEXO I - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 12 a 18 ANOS - Resolução 466/12)	139
ANEXO J - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)	143
ANEXO K - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)	147
ANEXO L - NORMAS DO PERIÓDICO: GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY	151
ANEXO M - NORMAS DO PERIÓDICO: THE JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY.....	163

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Turner (ST) é uma das mais comuns cromossomopatias em humanos, afetando cerca de 1:2500 nascimentos femininos. É caracterizada pela presença de um cromossomo X e perda total ou parcial do segundo cromossomo sexual. Ocorre devido à uma não disjunção cromossômica, em geral, na meiose paterna.

Clinicamente indivíduos com ST apresentam baixa estatura e disgenesia gonadal, atraso puberal e amenorreia primária. Outras condições clínicas estão presentes como: osteoporose, dislipidemia, obesidade, doenças inflamatórias, doenças cardiológicas, renais e desordens autoimunes.

Um aumento na incidência de autoanticorpos tem sido detectado nestas pacientes com ST, o que pode ser relacionado a um risco aumentado para desenvolverem doenças autoimunes tais como: tireoidite de Hashimoto, diabetes mellitus tipo 1, doença celíaca, doença de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatóide juvenil, psoríase, vitiligo e alopecia.

Uma variedade de doenças autoimunes/inflamatórias e infecciosas tem sido associada à um conjunto de genes que atuam no sistema imunológico, os quais estão incluídos *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 (lymphoid) (PTPN22)*, *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4 (CTLA-4)*, *Mannose Binding Lectin 2 (MBL2)* e *the vitamin D receptor (VDR)*. Polimorfismos nesses genes vem sendo associados a um grande número de doenças autoimunes, infecciosas e inflamatórias, devido a sua importância no equilíbrio imunológico e homeostase do organismo.

Mesmo que na ST exista um conjunto de evidências relacionadas à desregulação do sistema imunológico, apenas um SNP no gene *PTPN22* e variantes do *VDR* foram avaliados em um grupo de pacientes com ST da região Sudeste do Brasil, contudo, não há informações sobre estes genes em mulheres portadoras da ST na região Nordeste.

Estudos avaliando a associação entre polimorfismos nos genes *CTLA-4* e *MBL2* na ST ainda não foram realizados até o momento, bem como estudos de expressão gênica para o *VDR* em pacientes portadoras dessa síndrome. Dessa forma, dada a relevância destes importantes complexos gênicos envolvidos no

desenvolvimento da autoimunidade, polimorfismos que alteram as proteínas codificadas pelos genes *PTPN-22*, *CTLA-4*, *MBL2* e *VDR* podem ser importantes fatores genéticos de predisposição ao risco de diferentes condições clínicas em pacientes portadoras da ST.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SÍNDROME DE TURNER

A síndrome de Turner (ST) é uma das mais prevalentes cromossomopatias encontrada em humanos, acometendo cerca de 1:2500 nascimentos vivos do sexo feminino (STOCHHOLM et al., 2006).

Cerca de 1 a 1,5% de todas as concepções femininas na espécie humana apresentam constituição cromossômica 45,X sem um mosaicismo aparente. Entretanto, aproximadamente 99% destas são espontaneamente abortadas, portanto, o número de recém-nascidas corresponde a uma pequena fração do total de conceitos com ST. Assim, Hook e Warburton (2014) levantaram a hipótese de que para ser viável, um conceito 45,X deve possuir, ao menos em alguns órgãos ou períodos embriogênicos críticos, uma “linhagem resgate”, a qual é definida como um cariótipo viável, cuja presença permite a sobrevivência de um embrião aneuploide supostamente não-mosaico.

Com base no estudo de Urbach e Benvenitsy (2009) que demonstraram a necessidade obrigatória do gene *PSF2RA*, localizado na região pseudoautosômica dos cromossomos X e Y, para a viabilidade da placenta, Hook e Warburton (2014) sugeriram que a placenta poderia ser um forte candidato para a localização da “linhagem resgate” em indivíduos 45,X aparentemente não-mosaicos. Isso porque a deleção do gene *PSF2RA* poderia ser responsável pela elevada letalidade embrionária desses conceitos, e a presença de uma “linhagem resgate” na placenta proporcionaria a sobrevivência embrionária e fetal de indivíduos em que um mosaicismo críptico não é detectado em análises de linfócitos em sangue periférico e / ou outros tecidos. Além disso, estes estudos reforçam a ideia de que todos os indivíduos 45,X são na verdade mosaicos crípticos, e que dessa forma, a monossomia do cromossomo X em embriões viáveis é causada, primariamente, pela não disjunção mitótica.

Para um diagnóstico definitivo de ST é necessário a confirmação do cariótipo do indivíduo, sendo comumente realizado a partir de cultura de linfócitos de sangue periférico. Embora este tecido não represente os demais, a análise de outras amostras teciduais geralmente depende de procedimentos invasivos

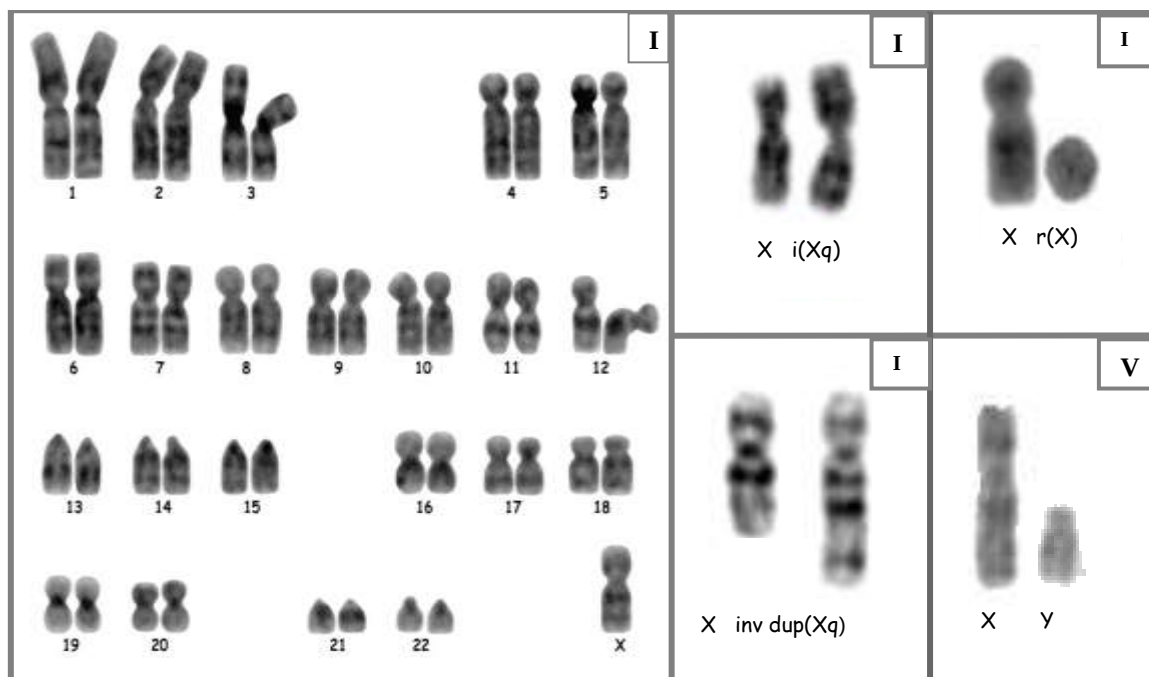
(JUNG et al., 2010). Além disso, em casos de mosaicismo oculto, uma análise citogenética clássica, geralmente realizada em até 30 células, pode não ser informativa e uma investigação molecular se torna necessária nestes casos. No estudo realizado por Araujo e Ramos (2008), a detecção de mosaicismo envolvendo um segundo cromossomo X foi positiva em 25% das pacientes com cariótipo 45,X (9 de 36 pacientes). Neste mesmo estudo, as pacientes também foram investigadas para sequências específicas do Y, visando excluir mosaicismo para este cromossomo.

A ST é caracterizada pela presença do cariótipo contendo um cromossomo X e ausência total ou parcial do segundo cromossomo sexual, associado com uma ou mais manifestações clínicas típicas da síndrome (GRAVHOLT et al., 2017). Existe uma grande variedade de alterações cromossômicas associadas a ST, sendo o cariótipo 45,X, presente em 40% a 60% dos casos (Figura 1). Alterações estruturais do cromossomo X, como isocromossomo do braço longo [i(Xq)], deleções do braço curto ou longo [del(Xp), del(Xq)], cromossomo em anel [r(X)] estão presentes em aproximadamente 30% dos casos, com cariótipos homogêneos ou mosaicos que incluem uma linhagem celular 45,X. Mosaicismo com uma segunda linhagem celular normal (46,XX) está presente em cerca de 15% das pacientes com ST (SYBERT; MCCAULEY, 2004; DJORDJEVIĆ et al., 2010; BISPO et al., 2013a; SILVA-GRECCO et al., 2015).

As translocações cromossômicas são rearranjos raros em pacientes com ST (DJORDJEVIĆ et al., 2010; PORTNOI et al., 2012; BISPO et al., 2013b), bem como a formação de cariótipos que envolvem rearranjos complexos (BURÉGIO-FROTA et al., 2010; VILLA et al., 2017). Material derivado do cromossomo Y está presente em cerca de 2 a 12% dos casos (LIEHR et al., 2007; BISPO et al., 2013b; FRERIKS et al., 2013; YEŞILKAYA et al., 2015; BUCERZAN et al., 2017).

O quadro clínico das pacientes portadoras da ST é bastante variável e distintos sinais dismórficos e malformações são encontrados, como a baixa estatura (95 a 100% dos casos). Além disso, essas pacientes apresentam disgenesia gonadal (usualmente gônadas em fita, refletindo a falência ovariana), onde níveis de esteroides sexuais femininos levam ao atraso no desenvolvimento puberal, amenorreia primária e esterilidade (MIGUEL-NETO et al., 2016; GRAVHOLT et al., 2017).

Figura 1 - (I) Cariótipo com bandeamento G: 45,X. (II, III, IV e V) Alterações cromossômicas envolvendo o segundo cromossomo sexual.



Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH), UFPE (2017).

Sinais dismórficos também são encontrados na ST, como face triangular, pescoço curto e alado (*pterygium colli*), micrognatia, palato em ogiva, estrabismo, mamilos hipoplásicos, baixa implantação dos cabelos na nuca, orelhas proeminentes e de implantação baixa, ptose palpebral, pregas epicânticas, entre outras condições clínicas. Anomalias decorrentes de distúrbio da embriogênese, como alterações em órgãos como rins e coração também estão presentes nestas pacientes. Além disso, diferentes anormalidades esqueléticas são detectadas, tais como tórax largo e em escudo, cúbito valgo, geno valgo e encurtamento do quarto metacarpo e metatarso (CARVALHO et al., 2010; BISPO et al., 2013a; MIGUEL-NETO et al., 2016).

É possível detectar a ST em qualquer fase da vida, seja durante a fase pré-natal, na infância e mais tardiamente, na fase adulta, e os sinais clínicos mais evidentes que apontam para um diagnóstico de ST estão relacionados à idade do indivíduo. A suspeita de ST no início da gravidez acontece através da ultrassonografia. A busca de marcadores no segundo trimestre e uso de ecocardiografia aumenta a taxa de detecção desta síndrome. Durante a fase pré-natal, a suspeita é baseada na presença de achados clínicos sugestivos, tais

como: hidropsia fetal, higroma cístico, aumento da translucência nuchal, anomalias renais, coarctação da aorta e síndrome de hipoplasia do coração esquerdo (SHCE). O cariótipo 45,X é comumente detectado na amostragem de vilosidades coriônicas, após a detecção do aumento da translucência nuchal por volta da 11-14 semanas. Além disso, na triagem materna tríplice, níveis alterados das dosagens de gonadotrofina coriônica humana (β - hCG), estriol não conjugado e α -fetoproteína podem sugerir o diagnóstico de ST (HAAK et al., 2002; BRONSHTEIN; ZIMMER; BLAZER, 2003; SURERUS; ALLAN, 2003; PAPP et al., 2006; RADTKE et al., 2014; ALVAREZ-NAVA et al., 2015).

Cerca de 1/5 a 1/3 das meninas afetadas recebem um diagnóstico clínico quando recém-nascidas devido à presença de sinais clínicos como, edema nas mãos e pés e a redundância de pele no pescoço, resultante da redução do higroma cístico no útero (Figura 2). A suspeita de ST deve ocorrer em qualquer menina recém-nascida com edema, SHCE ou coarctação da aorta, uma vez que a frequência destas condições é aumentada entre as crianças portadoras da síndrome. Na infância e adolescência, a baixa estatura é um sinal clínico que leva à suspeita diagnóstica da ST (Figura 2). Uma suspeita de ST deve ser considerada em qualquer adolescente com amenorreia primária ou secundária, especialmente se houver a baixa estatura. Em até 10% das mulheres, o diagnóstico pode ser retardado até a idade adulta, particularmente naquelas que entram espontaneamente na puberdade e subsequentemente exibem amenorreia secundária e abortos recorrentes (ELSHEIKH et al., 2002; SYBERT; MCCAULEY, 2004; JUNG et al., 2010).

A ampla variedade de sinais clínicos ocorre segundo a idade e constituição cromossômica que as pacientes com ST apresentam, existindo relações entre o cariótipo e o fenótipo das mesmas. Pacientes com linhagem 45,X em sangue periférico tendem a apresentar um fenótipo mais severo quando comparadas com as pacientes mosaicos. Malformações congênitas (anomalias do coração e do sistema urinário) são mais frequentes nas pacientes com cariótipo 45,X. Ademais, a dificuldade de aprendizagem é maior quando comparadas a pacientes portadoras de mosaicismo com uma linhagem normal (45,X/46,XX) (GRAVHOT et al., 1998; HJERRILD; MORTENSEN; GRAVHOLT, 2008; AGRAWAL; GUPTA; WANGNOO, 2009; BISPO et al., 2013a; BUCERZAN et al., 2017).

Figura 2 - Achados clínicos na Síndrome de Turner. Redundância de pele (I), linfedema nas mãos e pés (II e III) e paciente portadora de síndrome de Turner com baixa estatura (IV), apresentando (A) pescoço alado; (B) cúbito valgo; (C) linfedema dos pés.



Fonte: Sybert e McCauley. (2004); Nat clin pract endocrinol metab, Nature (2008).

Pacientes portadoras do $i(Xq)$ são mais propensas ao desenvolvimento de patologias autoimunes da tireoide, sendo indicado um monitoramento dos hormônios tireoidianos, visando a detecção de hipotireoidismo e consequentemente o início de um tratamento adequado (GROSSI et al., 2013). Um estudo realizado por Yeşilkaya et al. (2015) indicou que doenças autoimunes da tireoide foram mais frequentes em pacientes com ST portadoras de um cariótipo contendo um $i(Xq)$ (16.7%), quando comparada a outras pacientes com cariótipos diversos (9.2%) ($p=0.008$).

As translocações balanceadas em indivíduos com cariótipos 45,X, entre cromossomos autossomos e sexuais, bem como, entre cromossomos sexuais (X e Y) também são eventos raros, porém estão associados ao fenótipo encontrado em pacientes com ST (DJORDJEVIĆ et al., 2010; PORTNOÏ et al., 2012; BISPO et al., 2013a,b).

O gene *X-inactive specific transcript* (*XIST*), localizado dentro do centro de inativação do Xq13.2 (XIC), está relacionado com a inativação do X. Na ausência deste gene, o cromossomo X anormal não é inativado, levando a uma dissomia

funcional, a qual está associada a um fenótipo mais grave, como o retardo mental, e pequenos r(X) são associados a um grave fenótipo (STAVROPOULOU et al., 1998; TOMKINS et al., 2002). Entretanto, há relatos de pacientes portadoras de pequenos cromossomos em anel com um fenótipo mais brando (BOUAYED ABDELMOULA et al., 2004; CAPPELLA et al., 2015).

Pacientes com ST quando em mosaicismo com uma linhagem do cromossomo Y ou quando segmentos Y-específicos estão presentes, exibem um risco aumentado de desenvolverem tumores gonadais (gonadoblastoma e disgerminoma) (BIANCO et al., 2009; LIU et al., 2014; YÜCE et al., 2015; KWON et al., 2017).

A investigação molecular para as sequências específicas do cromossomo Y é indicada em pacientes com ST, independentemente do cariótipo, como um complemento para o diagnóstico citogenético. A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta um baixo custo, com alta sensibilidade e rapidez, sendo possível o rastreamento de várias sequências do cromossomo Y simultaneamente (BIANCO et al., 2009; BISPO et al., 2013b; LIU et al., 2014; MARQUI; DA SILVA-GRECCO; BALARIN, 2016; BUCERZAN et al., 2017; KWON et al., 2017).

Naquelas pacientes com sequências positivas do Y se faz necessário a investigação do gonadoblastoma. Além disso, a análise de mosaicismo oculto de sequências Y-específicas através da PCR ou Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) tem sido estimulada para nortear a indicação da gonadectomia como método profilático (BIANCO et al., 2009; BISPO et al., 2013b; LIU et al., 2014; MARQUI; DA SILVA-GRECCO; BALARIN, 2016; BUCERZAN et al., 2017; KWON et al., 2017).

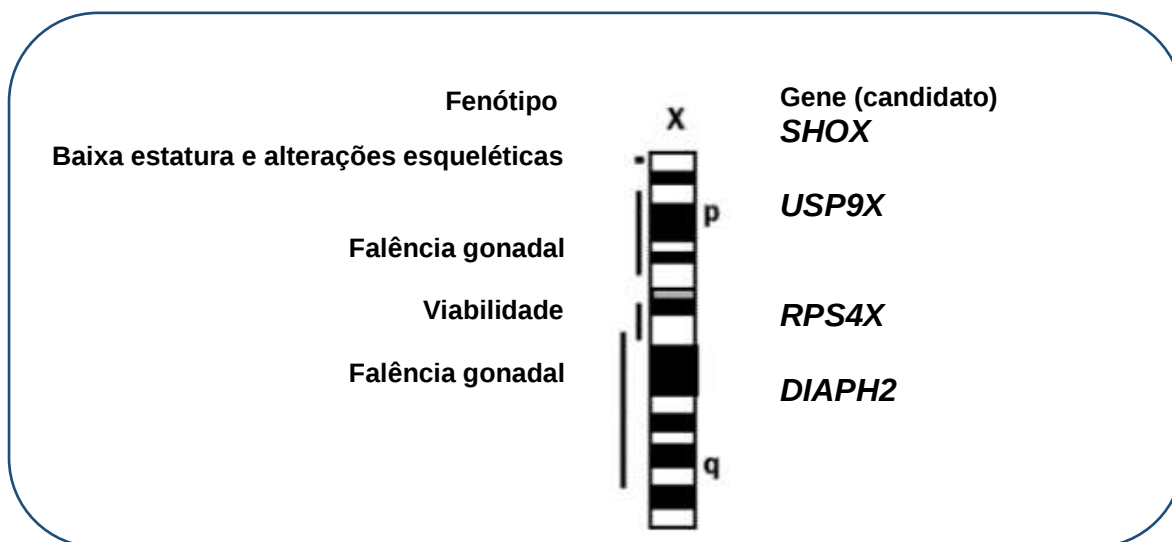
A variedade de características somáticas na ST indica que diferentes genes localizados no cromossomo X são responsáveis pelas características fenotípicas desses indivíduos. As consequências fenotípicas seriam explicadas pela haploinsuficiência de genes do cromossomo X que escapam à inativação, onde uma única cópia do material genético é incapaz de efetuar as funções normalmente desempenhadas em diploidia, prejudicando o desenvolvimento humano normal, e / ou pelo *imprinting* genético, definido como um fenômeno epigenético, em que certos genes se expressam exclusivamente em um dos cromossomos parentais. Neste caso, a perda do cromossomo X não “imprimado”

resultaria na ausência total de expressão de genes específicos em algumas células. Outros problemas comuns à ST são provavelmente causados pela haploinsuficiência de outros genes ainda não elucidados (URBACH; BENVENISTY, 2009; LEPAGE et al., 2012).

O gene *Short stature HOMeobox gene (SHOX)* (Figura 3) localizado na região pseudoautossômica 1 (PAR1) dos cromossomos sexuais (Xp22 e Yp11.3), foi descrito por Rao et al. (1997) como sendo um gene candidato para a baixa estatura nas pacientes com ST. Adicionalmente, a haploinsuficiência desse gene seria responsável por outras alterações esqueléticas como: fácies característica com micrognatia, cubitus valgus, pescoço curto, peito escavado, tórax em escudo, encurtamento de metacarpianos e metatarsianos, particularmente do IV metacarpiano, palato ogival, genu valgum, escoliose e deformidade de Madelung. Pacientes com ST que apresentam uma cópia a mais do gene *SHOX* apresentam alta estatura, uma condição clínica pouco frequente nos indivíduos portadores desta síndrome (DEL REY et al., 2010; SEO et al., 2015).

O gene *USP9X*, candidato para a disgeneia gonadal na ST, escapa da inativação do X e mapeia a região Xp11.4, que está implicada na falência ovariana. Dois outros genes candidatos têm sido descritos no braço longo do X: *RPS4X*, que se localiza dentro de uma região crítica para o linfedema e pode também se relacionar com a pouca viabilidade no útero, e o gene *DIAPH2*, que é necessário para a função ovariana normal (Figura 3) (RANKE; SAENGER, 2001).

Figura 3 - Genes candidatos na síndrome de Turner.



Fonte: Adaptado de Ranke e Saenger (2001).

Tem sido proposto que o elevado risco de desenvolvimento de DAIs em pacientes com ST se deve, em parte, à haploinsuficiência de genes ligados ao cromossomo X, uma vez que a quantidade de genes nesse cromossomo sexual é crítica para a manutenção ou perda da tolerância imune (JØRGENSEN et al., 2010). Células T auto-reativas, mas também células B e outras células relacionadas à imunidade, podem não se tornar tolerantes por autoantígenos codificados por um dos dois cromossomos X, desencadeando uma resposta autoimune em tecidos alvos (BIANCHI et al., 2012).

Um aumento na incidência de autoanticorpos tem sido detectado nestas pacientes com ST, bem como uma elevada frequência de doenças autoimunes, como tireoidite de Hashimoto, diabetes mellitus tipo I, doença celíaca, doença de Crohn, colite ulcerativa, artrite reumatoide juvenil, doença de Addison, hepatite autoimune, psoríase, vitiligo e alopecia. Além disso, um aumento da frequência de deficiência de cobalamina foi recentemente relatado, entretanto, isso não foi apresentado como secundário à anemia perniciosa com produção de autoanticorpos (LARIZZA; CALCATERRA; MARTINETTI, 2009; MORTENSEN et al., 2009; LLEO et al., 2012).

Diversas alterações imunológicas têm sido descritas nestas pacientes, incluindo baixos níveis de imunoglobulinas G e M, fraca quimiotaxia e resposta diminuída a mitógenos das células T (STENBERG et al., 2004; LARIZZA; CALCATERRA; MARTINETTI, 2009).

Embora os dados da literatura demonstrem um elevado risco para o desenvolvimento de doenças autoimunes na ST, os mecanismos fisiopatológicos e etiológicos relacionados à imunidade permanecem não definidos (MORTENSEN et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009). Alguns autores têm sugerido que a ocorrência do i(Xq) pode induzir ao hipotireoidismo ou diabetes por autoimunidade devido à presença aumentada de anticorpos (ELSHEIKH et al., 2002; EL-MANSOURY et al., 2005). Entretanto, estudos posteriores não encontraram associação entre cariótipos específicos e o risco de doenças autoimunes (MORTENSEN et al., 2009; ELLEUCH et al., 2010; JØRGENSEN et al., 2010).

As doenças autoimunes ocorrem como resultado da perda à tolerância fisiológica aos autoantígenos, sendo caracterizada pela ativação persistente das células imunes, levando a danos nos tecidos (DAVIDSON; DIAMOND, 2001).

2.2 O SISTEMA IMUNE

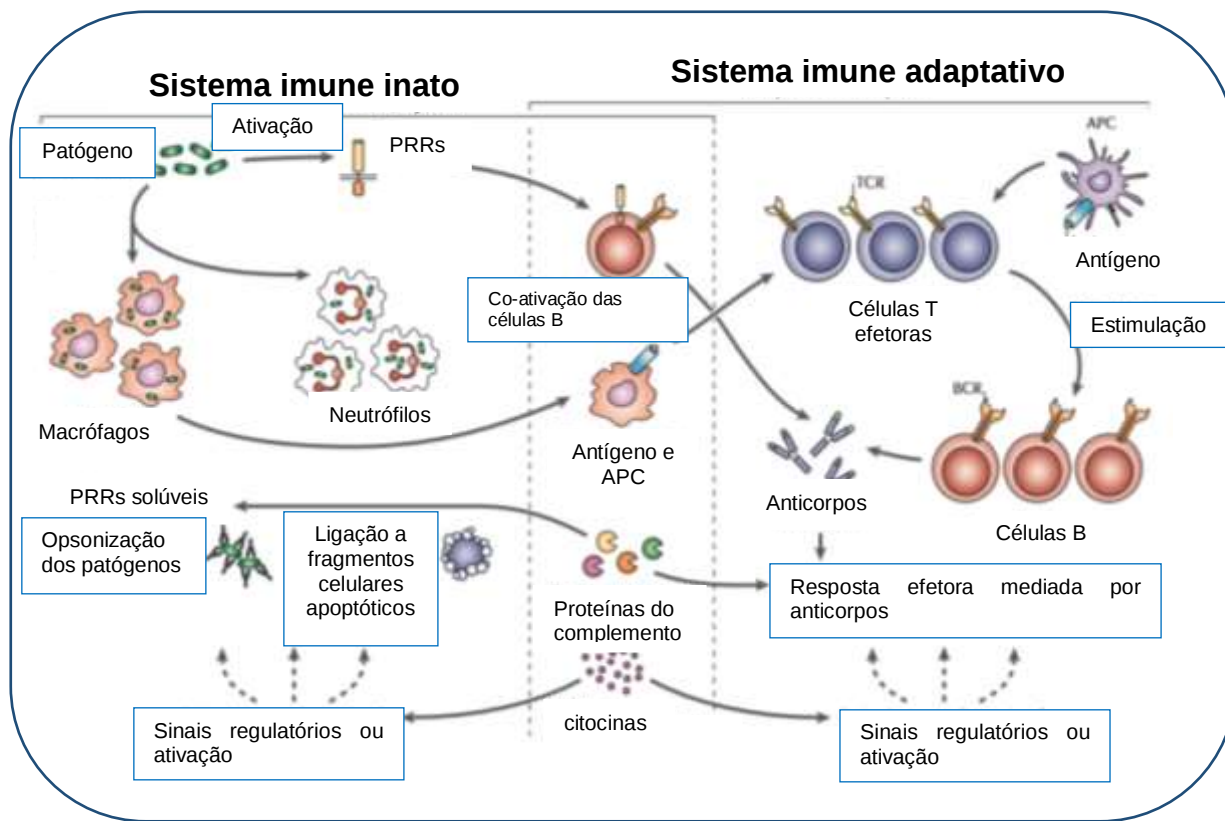
2.2.1 O sistema imune inato e adaptativo

O sistema imune possui a função de identificar elementos estranhos ao organismo, comunicar e produzir uma resposta imunológica, eliminando agentes invasores (FRUMAN; WALSH, 2007). A defesa imunológica é mediada por dois braços complementares: o sistema imune inato e o sistema imune adaptativo (Figura 4).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores, sendo filogeneticamente antigo e envolvendo respostas imediatas contra os agentes infecciosos. Em contrapartida, a imunidade adaptativa é específica e está associada ao desenvolvimento de uma resposta de longa duração e memória imunológicas contra possíveis ameaças subsequentes. O sistema imune adaptativo utiliza um diverso grupo de receptores, gerados por recombinação somática, expressos por linfócitos T e B, específicos para antígenos (PASARE; MEDZHITOV, 2004; KAWAI; AKIRA, 2006).

O sistema imune inato é composto por barreiras físicas, químicas, flora e por diferentes tipos celulares. As células que compõem o sistema imune inato, que se tornam ativadas durante a resposta inflamatória, incluem células *natural killer* (NK), mastócitos, macrófagos, células dendríticas (CDs) e granulócitos. Os mecanismos da imunidade inata incluem as funções celulares, tais como fagocitose e a endocitose por macrófagos e neutrófilos. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) reconhecem padrões moleculares associados ao patógenos (PAMPs) presentes em uma variedade de microrganismos. O sistema imune inato utiliza uma variedade de PRRs que podem ser expressos na superfície da célula, em compartimentos intracelulares, ou secretados para a corrente sanguínea. As funções principais dos PRRs incluem a opsonização, a ativação do complemento, a fagocitose, a ativação das vias de sinalização pró inflamatória e a indução de apoptose (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

Figura 4 - Os sistemas imunes inato e adaptativo e a sobreposição entre eles.



Fonte: Gregersen e Behrens. (2006).

A Mannan-binding lectin (MBL), C-reactive protein (PCR) e (serum amyloid protein (SAP) são moléculas de reconhecimento de padrões secretadas, produzidas pelo fígado durante as respostas de fase aguda nos estágios iniciais da infecção (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Os receptores *Toll-like receptor* (TLR) são PRRs que reconhecem e se ligam a PAMPs, desencadeando vias de sinalização intracelular que culminam com a indução de citocinas inflamatórias, como: interferon tipo I (IFN) e quimiocinas. Além disso, a sinalização de TLRs atua na maturação de CDs, sendo esse processo essencial para a indução de respostas imunes adaptativas específicas, indicando assim que TLRs estão ligados ao sistema imune inato e adaptativo (PASARE; MEDZHITOV, 2004; KAWAI; AKIRA, 2006).

O sistema complemento (SC) possui um papel importante nos mecanismos de defesa imune inata e adaptativa, sendo formado por proteínas efetoras que facilitam a eliminação de patógenos invasores. O SC é constituído por três vias

distintas (clássica, lectina e alternativa) que desencadeiam uma cascata de ativação através da proteólise de zimogênios. Cada via de ativação envolve a formação de um complexo de iniciação, seguido pela formação da C3-convertase e C5-convertase para a ativação de C3 e C5, respectivamente, culminando com a formação de complexos de ataque da membrana (MAC ou C5b–C9) na superfície do patógeno. Os fragmentos C3a e C5a são anafilatoxinas produzidas durante as vias de ativação do sistema complemento (LINTNER et al., 2016). O fragmento C5a é um potente quimioatrato, está envolvido no recrutamento de células inflamatórias e na ativação de células fagocíticas com liberação de enzimas granulares e geração de oxidantes, todos os quais contribuem nas funções do sistema imune inato e dano tecidual (CHEN; DAHA; KALLENBERG, 2010).

Embora os sistemas imunes inato e adaptativo funcionem de formas distintas, há uma interconexão entre eles, os quais interagem para gerar uma resposta imunológica efetiva (Figura 4). Os linfócitos T e B, pertencentes ao sistema imune adaptativo, expressam uma diversidade de receptores, entretanto, a ativação dessas células depende da indução de moléculas co-estimuladoras e a secreção de citocinas e quimiocinas pelas células do sistema imune inato. No caso de infecção, a presença microbiana é detectada pelos TLRs expressos por CDs, resultando em uma série de eventos de sinalização que iniciam o processo de maturação dessas células. Esse processo inclui elevada expressão de moléculas do *major histocompatibility complex* (MHC), moléculas da família B7 e a expressão, no citosol, de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que quando secretadas, atraem e estimulam células T imaturas à responderem aos antígenos específicos dos patógenos (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002; PASARE; MEDZHITOV, 2004).

Além disso, a co-estimulação dos linfócitos B é feita através de TLRs, resultando na produção de anticorpos. As proteínas do sistema complemento também medeiam as respostas efectoras induzidas por anticorpos e, por conseguinte, têm um papel em ambas as funções imunológicas, inata e adaptativa, assim como as citocinas (Figura 1) (PASARE; MEDZHITOV, 2004; GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

2.2.2 Tolerância e autoimunidade

A tolerância é definida como a ausência de resposta imunológica a antígenos próprios. No sistema imunológico, o discernimento do próprio e não-próprio é um processo que envolve a manutenção da tolerância a antígenos próprios, enquanto o potencial para gerar uma resposta imune eficaz contra patógenos invasores é preservado. Entretanto, pode haver desequilíbrio nos mecanismos do sistema imunológico, e assim, ocorrer falha desse sistema em "tolerar" tecidos próprios, resultando em condições fisiopatológicas, como a autoimunidade e a imunodeficiência. Fatores genéticos e ambientais são responsáveis pela indução da autoimunidade (SINHA; LOPEZ; MCDEVITT, 1990; KYEWSKI; KLEIN, 2006; FRUMAN; WALSH, 2007; WANG; WANG; GERSHWIN, 2015).

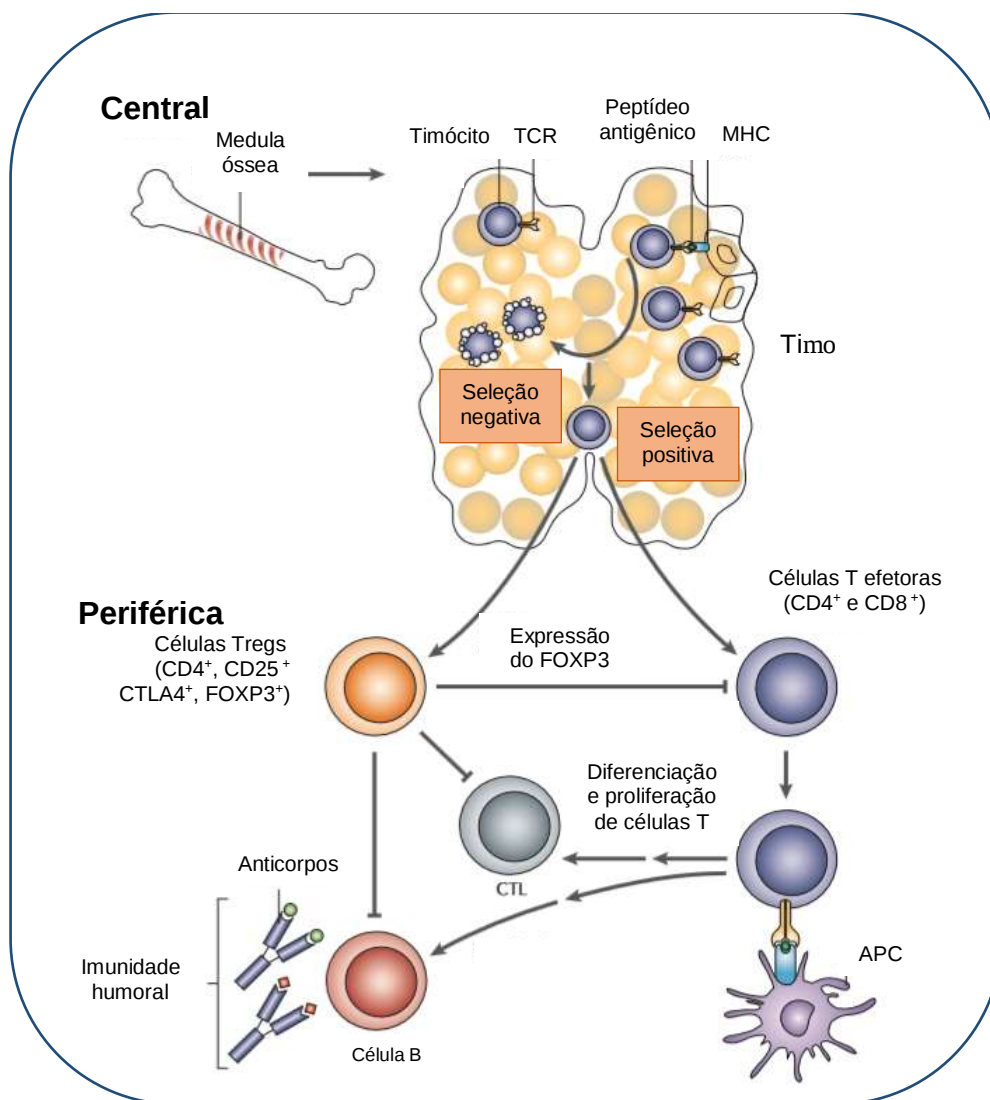
A tolerância dos linfócitos T e B aos autoantígenos é feita por mecanismos centrais e periféricos. A tolerância central se refere aos eventos iniciais do desenvolvimento dos linfócitos, sendo induzida nos órgãos linfóides primários (medula óssea e timo) e abrange todos os mecanismos pelos quais o reconhecimento de antígenos próprios nestes locais resultam em autotolerância. Os mecanismos de tolerância central não podem eliminar todos os linfócitos autoreativos, pois nem todos os antígenos próprios são expressos na medula óssea e no timo. Portanto, existem mecanismos de tolerância periférica, que induzem os linfócitos que encontram seu autoantígeno correspondente a se tornarem tolerantes (HOGQUIST; BALDWIN; JAMESON, 2005).

As células T, especialmente o subconjunto CD4⁺, desempenham um papel central no controle da autotolerância, sendo exercida em dois níveis: em primeiro lugar, a seleção tímica das células T pressiona as células T imaturas contra a auto reatividade (tolerância central). Em segundo lugar, as células T maduras são submetidas a seleção secundária em órgãos não linfóides (tolerância periférica). Além disso, as células T reguladoras (Tregs) podem suprimir a ativação das células T auto reativas que escapam da seleção (LISTON et al., 2005; KYEWSKI; KLEIN, 2006).

A seleção de linfócitos T e o processo de tolerância central ocorre no timo (Figura 2). Os timócitos, precursores dos linfócitos T, expressam os receptores de Células T (TCR) sendo submetidos aos processos de seleção positiva e negativa.

Apenas timócitos cujos TCRs reconhecem peptídeos próprios e moléculas do MHC com baixa afinidade são selecionados positivamente e migram para a periferia, como células T maduras. Os timócitos nos quais seus TCRs se ligam com alta avidade ao complexo peptídeo-MHC próprio, sofrem um processo de seleção negativa e são eliminados. Da mesma forma, os timócitos não funcionais sofrem apoptose (Figura 5) (LISTON et al., 2005; GREGERSEN; BEHRENS, 2006; KYEWSKI; KLEIN, 2006).

Figura 5 - Mecanismos de tolerância central e periférica.



Fonte: Adaptado de Gregersen e Behrens (2006).

A maioria das células T maduras se desenvolvem em células efectoras $CD4^+$ e $CD8^+$, que medeiam respostas imune adaptativa humoral e celular. As

Tregs representam uma subpopulação de células T que saem do timo, sendo caracterizadas pela expressão do fator de transcrição FOXP3 (*forkhead transcription factor 3*) e da molécula CD25⁺ (linfócitos CD4⁺ CD25⁺), e também expressam outros marcadores de superfície como o CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*). Uma vez na periferia, estas células são mediadores-chaves da tolerância periférica, pois induzem a supressão das células T efectoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos. Podem inibir a ativação de células T pelas células apresentadoras de antígeno (APCs) e a diferenciação de células T em células efectoras citotóxicas, bem como impedir as células T de proporcionar ajuda às células B para a produção de anticorpos (Figura 2) (GREGERSEN; BEHRENS, 2006).

O desenvolvimento dos linfócitos B acontece na medula óssea, sendo que o primeiro passo da maturação dessas células (tolerância central) envolve o rearranjo das cadeias pesadas das imunoglobulinas (Ig), resultando na formação do receptor de célula B (BCR). O BCR que se liga com alta avidéz a antígenos próprios direciona a célula B à edição do receptor, um processo através do qual o rearranjo de gene de cadeia leve da Ig permite a substituição do BCR, de alta avidéz para antígeno próprio, por um BCR com menor afinidade. Aquelas células B que ainda exibem Ig autoreativas após o processo de edição do receptor, irão sofrer apoptose, enquanto as células B sobreviventes no órgão linfóide central migram para a periferia, onde irão completar sua maturação, transformando-se em linfócitos *naïve* imunocompetentes (LLEO et al., 2010).

A perda da autotolerância, ou seja, quando o sistema imunológico perde a capacidade de diferenciar o próprio (*self*) do não próprio (*non-self*), resulta no desenvolvimento de um grupo heterogêneo de doenças complexas, as doenças autoimunes (DAI). Na primeira fase do desenvolvimento destas doenças, a imunidade é normal no contexto de susceptibilidade genética. Na segunda fase, ocorre uma resposta imune anormal, mas sem manifestações clínicas (imunidade pré-clínica), podendo nesta etapa, auto anticorpos ou anormalidades celulares serem evidenciados. Essas alterações podem, eventualmente, aumentar nos meses ou anos seguintes, levando aos sintomas clínicos iniciais e ao diagnóstico (BIANCHI et al., 2012; TOBÓN et al., 2012).

Respostas imunes alteradas contra células e tecidos normais caracterizam as DAIs, no qual as susceptibilidades genéticas de um determinado indivíduo

desempenham um papel central (BIRD, 2007). Juntas, essas doenças afetam cerca de 10% da população e podem se desenvolver em qualquer fase da vida, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, devido à sua natureza, muitas vezes crônica e grave. DAIs ocorrem com maior preponderância em mulheres, embora as causas não sejam esclarecidas (BIANCHI et al., 2012). Hormônios sexuais, fatores reprodutivos, fatores ambientais, fatores genéticos, como o padrão de inativação do cromossomo X e a dosagem de genes ligados ao cromossomo X podem estar envolvidos na etiologia dessas doenças. Entre os múltiplos complexos gênicos envolvidos na regulação da autoimunidade, os genes clássicos da resposta imune Inata e adaptativa: *PTPN-22*, *CTLA-4* e *MBL2*, figuram entre os mais importantes. Além disso, o *VDR*, um gene da resposta imune – não clássico, atua modulando a resposta imunológica.

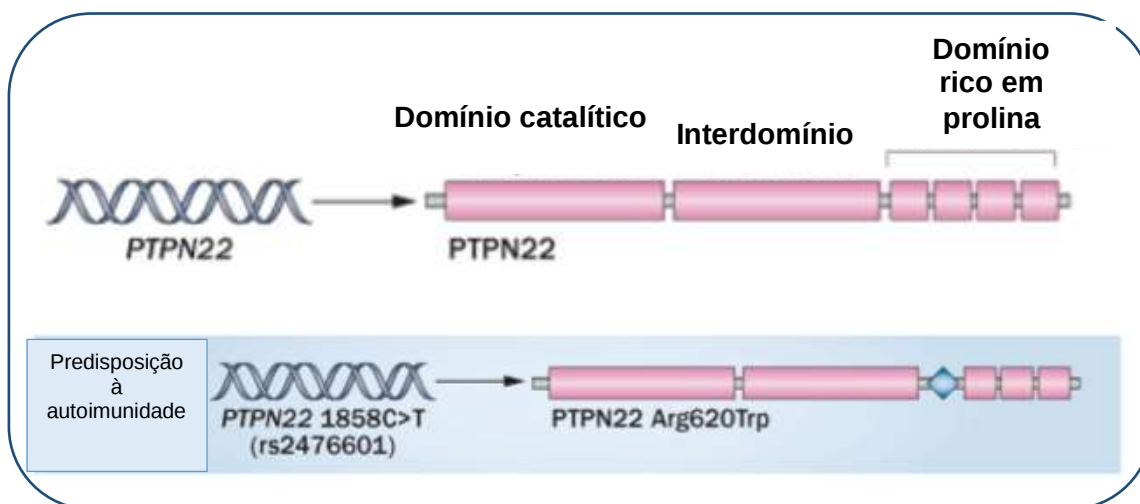
2.3 GENE *PTPN-22*

O gene *PTPN22* está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p13.3–p13.1), contém 16 éxons e codifica a proteína Lyp (*lymphoid-specific phosphatase*), uma tirosina fosfatase (PTP) de 110 KDa. A Lyp é expressa em células hematopoiéticas e atua inibindo a ativação de células T, restringindo a sinalização de TCR (COHEN et al., 1999; BOTIINI et al., 2004; STANFORD; BOTTINI, 2014; XIAOHENG et al., 2017). Essa proteína é composta por três domínios distintos: um domínio catalítico N-terminal [1-300 aminoácidos (aa)], uma região de interdomínio (301-600 aa) e um domínio C-terminal com quatro regiões ricas em prolina (P1-P4) (601-807 aa), que funcionam como motivos para interação com outras proteínas (Figura 6) (STANFORD; MUSTELIN; BOTTINI, 2010; STANFORD; BOTTINI, 2014).

Uma isoforma da Lyp (Lyp2), descrita por Cohen et al. (1999), é o produto do *splicing* alternativo do transcrito gerado pelo gene *PTPN22*. Em contraste com Lyp, a proteína Lyp2 é detectada apenas nas células T em repouso. O RNAm de Lyp2 é menor, sendo produzido através do *splicing* alternativo de um íntron do transcrito. Uma sequência intrônica de 3,5 kb contém um éxon alternativo, que codifica os 7 aa da região C-terminal de Lyp2. Consequentemente, 116 aa da

região C-terminal da isoforma Lyp1 são substituídos por 7 aminoácidos alternativos em Lyp2. Outra variante, a Lyp3, foi descrita por Wang et al. (2010), a qual difere de Lyp1 por apresentar uma deleção de 28 aa entre a região P1 e P2, sendo constituída por 779 aa.

Figura 6 - O gene *PTPN22* codifica uma tirosina fosfatase com três domínios distintos. O SNP G1858A resulta em uma substituição (Arg620Trp) no primeiro motivo rico em prolina (em azul).

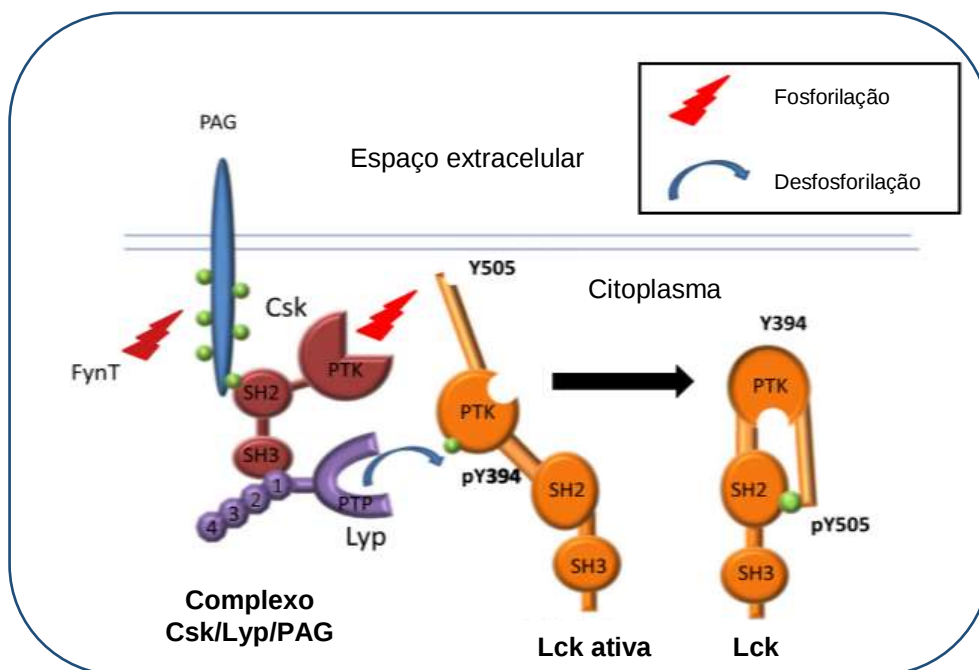


Fonte: Adaptado de Stanford e Bottini. (2014).

Lyp é uma proteína intracelular que interage com a quinase Csk (C-terminal Src kinase), um potente supressor da ativação de células T, formando um complexo que inibe a ativação dessas células, o qual é dependente da interação entre o motivo P-1 da região de Lyp e o domínio SH3 (Src Homology 3) de Csk (Figura 7). A estrutura tridimensional do complexo mostra que a cadeia lateral de Arg620 se encaixa em uma depressão ácida dentro da fenda de ligação do domínio SH3, onde interage com um triptofano (Trp47) de Csk (BOTINI et al., 2004) (Figura 8). Lyp contém quatro potenciais sítios de ligação ao domínio SH3, comparado com o único motivo em Lyp2, sugerindo que as isoformas podem interagir com diferentes grupos de domínios SH3 (COHEN et al., 1999). Além disso, o encurtamento da região entre P1-P2 da Lyp3 pode afetar a interação entre CSK/LYP (WANG et al., 2010). No domínio SH3 de CsK, o Trp47 é o resíduo chave para que ocorra a interação, embora a associação seja

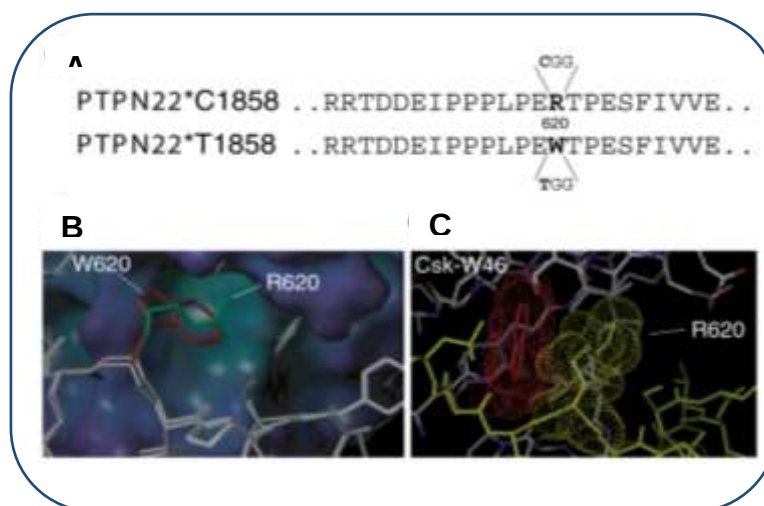
primeiramente estabelecida entre o domínio SH3 de Csk e Lyp, o domínio SH2 de Csk também participa dessa interação (DE LA PUERTA et al., 2013).

Figura 7 - A interação LYP/Csk é mediada através do primeiro motivo de prolina em LYP e o domínio SH3 da Csk. A interação entre Lyp e Csk inativa Lck.



. Fonte: Adaptado de Burn et al. (2011).

Figura 8 - Estrutura tridimensional do complexo de interação Lyp/Csk. (A) Sequência de aminoácidos para os dois alelos, com o motivo P1 indicado (B) Estrutura do peptídeo do motivo P1 ligado ao SH3 de Csk. O peptídeo ligante é mostrado em cinza, com ambos arginina (verde) ou com triptofano (vermelho) na posição correspondente ao resíduo 620 de Lyp. A superfície do domínio SH3 é mostrada em azul escuro (porção básica) e esverdeada (superfície ácida). (C) Interação de R620 de Lyp (amarelo) com triptofano (Trp47) da SH3 de Csk (vermelho).



Fonte: Botiini et al. (2004).

A proteína Lyp é um potente inibidor da ativação de células T por desfosforilação inibitória de mediadores da transdução de sinal *downstream* TCR. A ativação de células T envolve eventos de fosforilação e desfosforilação mediados por proteínas tirosina quinases e fosfatases, respectivamente. Juntas, essas proteínas atuam no controle da sinalização celular, que resultam em vários processos fisiológicos. O TCR é um receptor transmembrana formado por cadeias α e β , e se associa à proteína CD3 (ϵ , γ e δ) e às cadeias ζ (zeta), que contém motivos que são fosforilados em tirosina, chamados ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) (Figura 9). A transdução do sinal através do TCR se inicia quando o receptor se liga a um complexo peptídeo-MHC apresentado por uma célula apresentadora de antígeno. Esta interação gera uma cascata de eventos de sinalização, que induz a proliferação, a mobilização e a diferenciação de células T (STANFORD; RAPINI; BOTTINI, 2012).

O complexo peptídeo-MHC acoplado ao TCR conduz à ativação de quinases da família Src (Lck e Fyn), que fosforilam ITAMs associados ao TCR. A fosforilação de ITAMs cria sítios de ligação de alta afinidade para o domínio SH2 de Zap70 (ζ -associated protein), uma proteína tirosina quinase de 70 kD da família Syk, que é subsequentemente recrutada para o complexo TCR e ativada por Lck. Uma vez ativada, a ZAP-70 fosforila outras proteínas, ativando-as, e assim, desencadeia múltiplas vias de sinalização intracelulares. A fosfatase Lyp inibe a sinalização do TCR por desfosforilar resíduos que levam à ativação de Lck, Fyn, ZAP-70 e ITAMs da cadeia ζ e CD3 (Figuras 7 e 9) (WU et al., 2006; STANFORD; RAPINI; BOTTINI, 2012; STANFORD; BOTTINI, 2014).

A interação entre Lyp e Csk inativa Lck. Pag (*phosphoprotein associated with GEMs-glycolipid-enriched membrane domain*), quando fosforilada por Fyn, recruta Csk através do domínio SH2, que se liga a proteínas fosforiladas. CSK fosforila Y505 criando um sítio de ligação em SH2 que resulta em uma dobra interna e a desativação parcial da Lck. Para Lck ser totalmente inativada, Lyp deve desfosforilar o resíduo ativatório Y394 dentro do domínio quinase de Lck para inativar a sua atividade catalítica. Ambas as ações resultam na inibição da sinalização do TCR (Figura 7) (BURN et al., 2011).

Bianco et al. (2010) sugeriram que o polimorfismo G1858A do gene *PTPN22*, pode ser um importante fator genético de predisposição ao risco de doenças autoimunes na ST em uma população da região Sudeste do Brasil. Entretanto, em uma análise com 109 pacientes portadoras da ST recrutadas na cidade do México, realizada por Villanueva-Ortega et al. (2017), não houve relação com doenças autoimunes na ST, ressaltando os diferentes efeitos desse polimorfismo em populações diversas.

A substituição Arg620Trp ocorre no domínio P1 na Lyp, resíduo crítico para ligação à Csk. A presença do alelo 1858A, responsável pelo Trp620 na Lyp, perturba a capacidade de Lyp de se associar com Csk, com o qual forma um complexo de sinalização inibitório, uma vez que apenas a proteína Lyp contendo Arg620 (alelo 1858G) forma um complexo com Csk (BOTINI et al., 2004). Assim, indivíduos heterozigotos em relação ao alelo *PTPN22* 1858A possuem complexos Lyp-CSK reduzidos, e indivíduos homozigóticos não apresentam estes complexos. Portanto, as células T hiperativas são mais propensas a desenvolverem uma resposta imunitária destrutiva contra autoantígenos, após a infecção viral ou outras condições imunes (BOTINI et al., 2004).

O alelo 1858A codifica uma fosfatase mais ativa, resultando em um ganho de função da proteína e tornando este um inibidor mais eficaz que a enzima tipo selvagem. O aumento da eficácia de LYP-Trp620 pela supressão da sinalização TCR resulta na sobrevivência de células T autoreativas durante a seleção negativa no timo ou atividade insuficiente de células Tregs. Isto explicaria porque LYP-Trp620 aumenta a susceptibilidade a um certo número de doenças e confere predisposição à desordens autoimunes (VANG et al., 2005). Em contrapartida, Zikherman et al. (2009) demonstraram que LYP-Trp620 é uma variante com perda de função, no contexto de transdução de sinal do TCR.

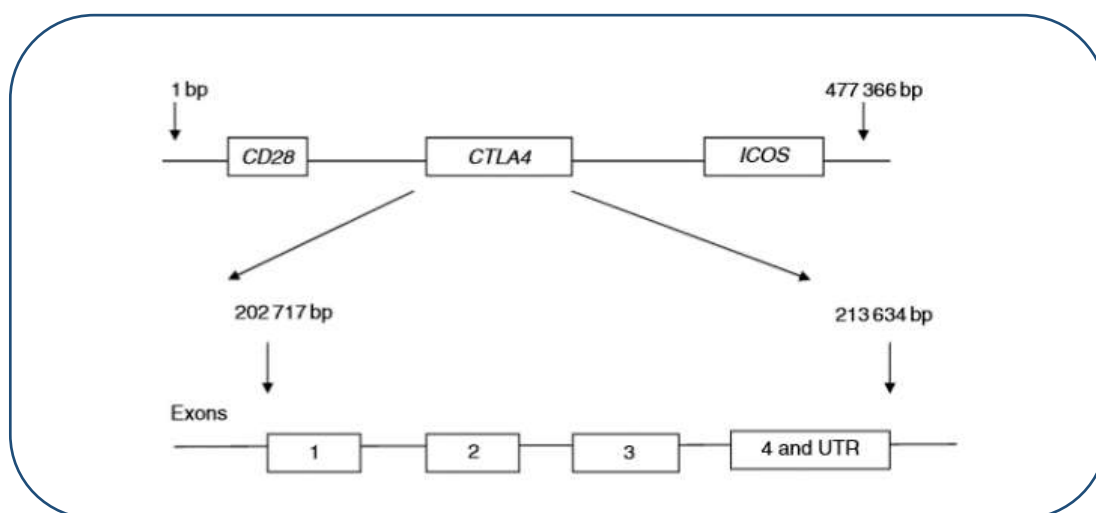
A inibição recíproca entre Lyp e Lck é um importante modulador da sinalização do TCR. A Lck regula a atividade Lyp através da fosforilação inibitória do resíduo Tyr536 no interdomínio da fosfatase, sendo este processo reduzido na variante Arg620Trp. Essa variante interfere na interação entre Lck e Lyp, levando à reduzida fosforilação de Lyp no resíduo Tyr536, que assim, pelo ganho de função, contribui para a sinalização inibitória de células T. Após acoplamento do TCR, o aumento da fosforilação de Lyp por Lck atua como um loop fechado de realimentação positiva, aumentando ainda mais a ativação de Lck. Ao reduzir a

inibição da sinalização por Lyp no momento inicial de ativação da quinase, este sistema de *feedback* pode ser importante para garantir a propagação correta de transdução de sinal do TCR (FIORILLO et al., 2010).

2.4 GENE *CTLA-4*

O gene *CTLA-4* foi mapeado no cromossomo 2 (2q33) por Dariavach et al. (1988). É composto por 4 éxons, onde o éxon 1 codifica o peptídeo sinal, o éxon 2 codifica o domínio de ligação, éxon 3 expressa o domínio transmembrana, e o éxon 4 a extremidade citoplasmática da proteína (Figura 10) (LING et al., 1999).

Figura 10 - Estrutura do gene *CTLA-4*. *ICOS*, inducible costimulatory molecule; UTR, untranslated region.



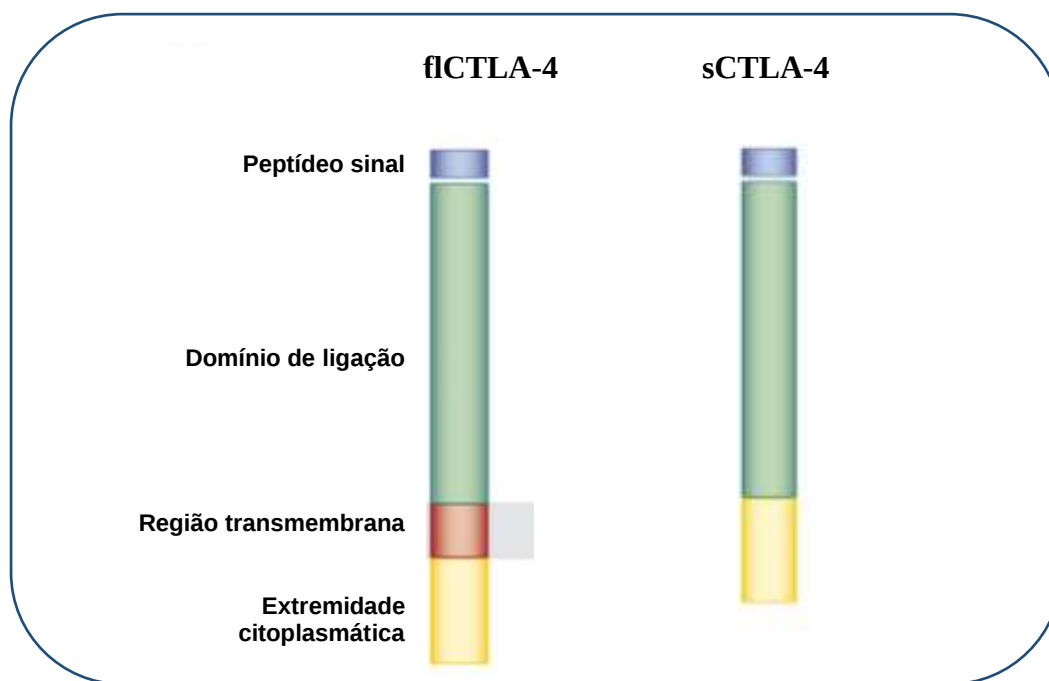
Fonte: Adaptado de Gough et al. (2005).

Em humanos, diferentes isoformas podem ser geradas por *splicing* alternativo: a flCTLA-4 de 650 pb (isoforma de comprimento total) gerada pelos éxons 1, 2, 3 e 4 e a sCTLA-4 de 550 pb (molécula solúvel) formada a partir dos éxons 1, 2 e 4 (Figura 11). O transcrito alternativo que dá origem à forma solúvel de CTLA-4 é mais instável que o mRNA que gera flCTLA-4 (OAKS et al., 2000; WANG et al., 2001; VALK; RUDD; SCHNEIDER, 2008).

A CTLA4 é uma molécula da superfamília das imunoglobulinas, importante na regulação da ativação de células T. A expressão tanto na superfície celular como em compartimentos intracelulares é induzida pela ativação das células T

CD4⁺ e CD8⁺. Adicionalmente, IL-2 induz a co-expressão de CTLA-4 e CD25 nas células CD4⁺ e CD8⁺ (WANG et al., 2001; VALK; RUDD; SCHNEIDER, 2008).

Figura 11 - Isoformas do gene *CTLA-4*.

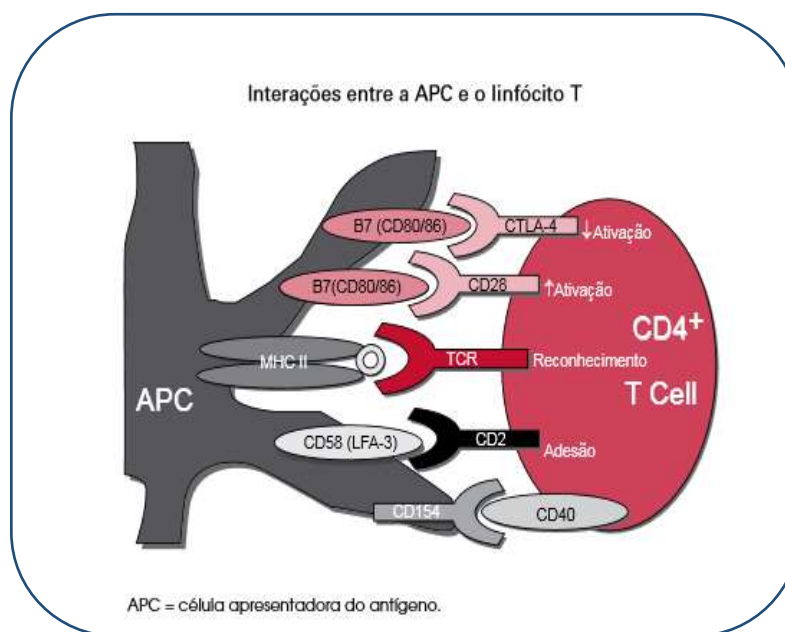


Fonte: Adaptado de Valk et al. (2008).

As células T precisam de 2 sinais para sua ativação, sendo o primeiro sinal promovido pelo TCR após interagir com o complexo peptídeo antigênico-MHC; e o segundo passo é o sinal co-estimulatório, que é promovido por ligações entre receptores específicos nos linfócitos T e seus respectivos ligantes presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos (APC). A via co-estimulatória das células T CD28/CD152–B7-1/B7-2 regula a ativação de células T. A molécula CD28, expressa nas células T, interage com B7-2 e B7-1, expressos nas APCs, promovendo o segundo sinal positivo co-estimulatório para a célula T. Este sinal resulta em ativação total de células T, com a produção de citocinas, expansão clonal, prevenção da anergia e morte celular. Uma vez ativadas, as células T expressam então o CTLA-4, homólogo ao CD28, porém sua interação com B7-1 e B7-2 promove um sinal negativo para a célula T, resultando em inibição da produção de citocinas e da progressão do ciclo celular, finalizando a resposta imune. O uso de agentes biológicos como anticorpos monoclonais anti-B7 ou

CTLA-4Ig resulta em anergia da célula T *in vitro*, e em anergia, deleção ou indução de células T regulatórias *in vivo* (Figuras 12 e 13) (SAYEGH, 1999).

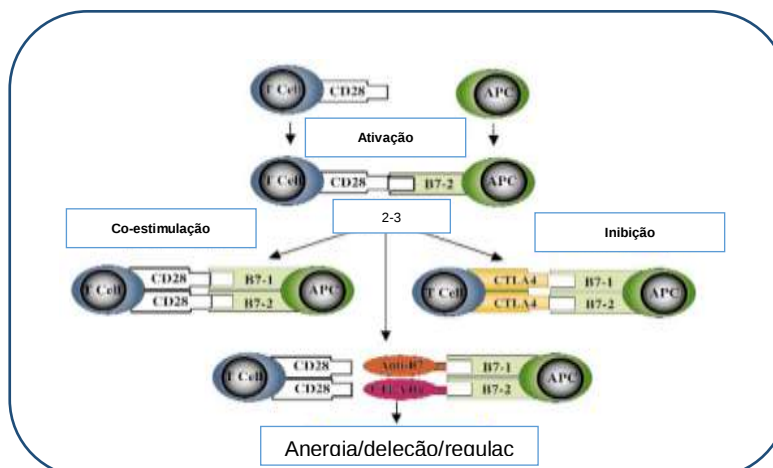
Figura 12 - Inibição da ativação do linfócito T CD4⁺ pelo CTLA-4.



Fonte: Silva et al. (2008).

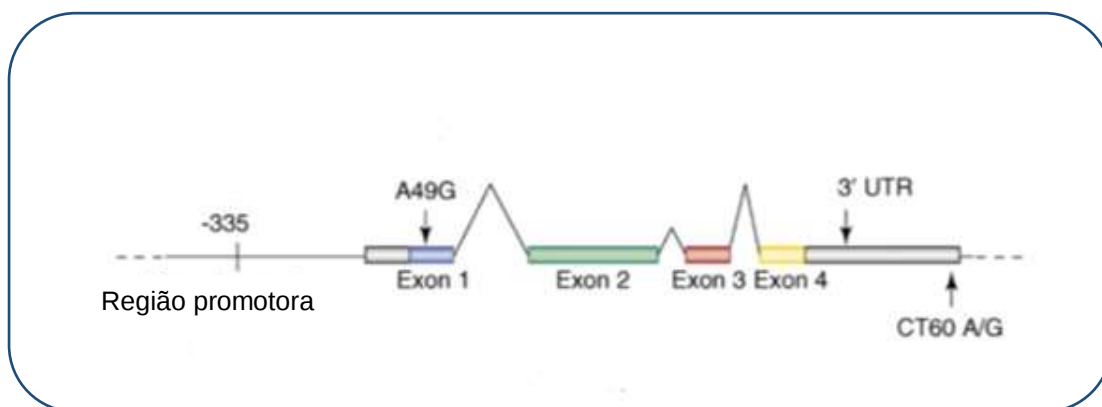
Diversos polimorfismos foram identificados no gene *CTLA-4* em humanos. Entre os mais estudados e associados à doenças autoimunes, estão os SNPs A49G (rs231775), que corresponde a uma substituição de bases adenina por uma guanina (ACC – GCC) na posição 49 no éxon 1 e CT60 (rs3087243G>A) na posição +6230 na região 3' UTR (Figura 14) (TING et al., 2016).

Figura 13 - Complexidade da via co-estimatória das células T: CD28/CD152–B7-1/B7-2.



Fonte: Adaptado de Sayegh (1999).

Figura 14 - A estrutura do gene *CTLA-4* e alguns polimorfismos. Presença de 4 éxons, duas regiões não traduzíveis, precedendo o éxon 1 e a outra *downstream* do éxon 4 e uma região promotora.



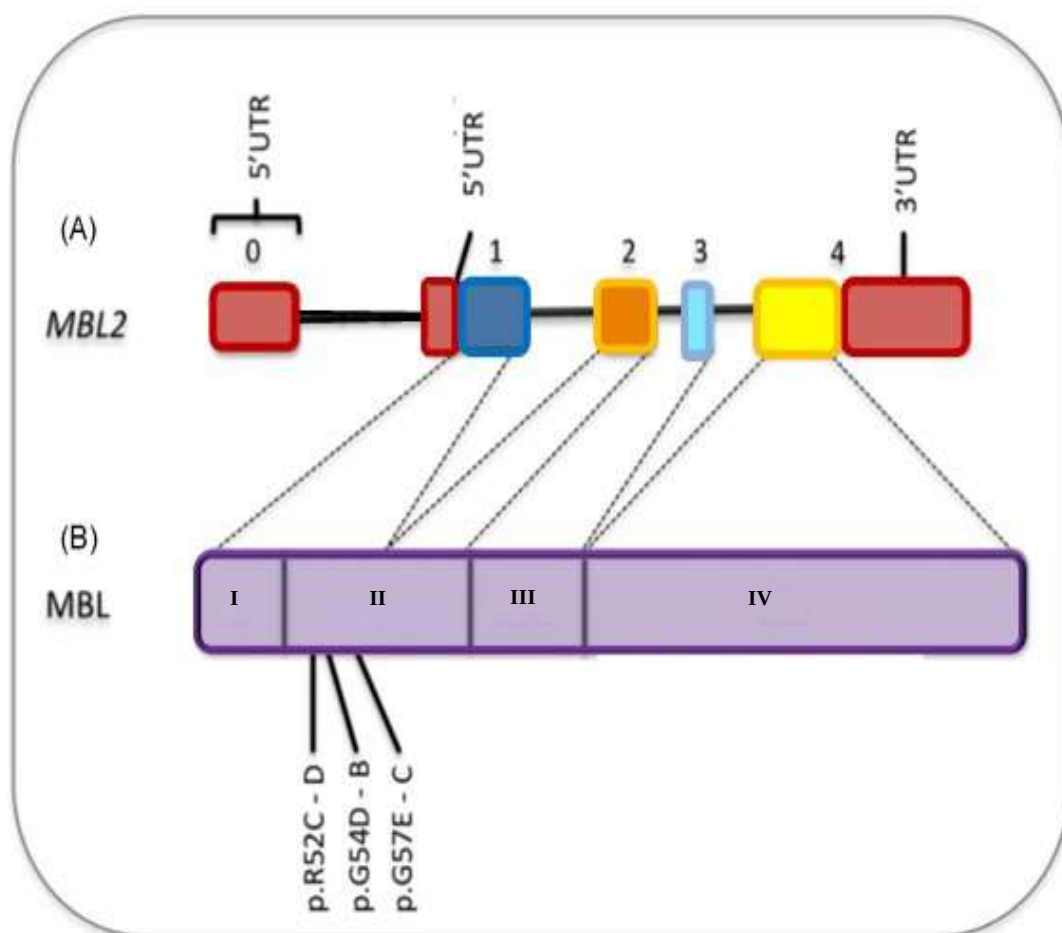
Fonte: Adaptado de Valk et al. (2008).

2.5 GENE *MBL2*

O gene *MBL2* codifica a proteína MBL em humanos e está localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q11.2–q21). A região codificante é composta por 4 éxons (251 pb, 117 pb, 69 pb, e 3,1 kb) interrompidos por 3 íntrons (600, 1350 e 800 pb) (SASTRY et al., 1989; TAYLOR et al., 1989). Em aproximadamente 1 kb *upstream* do éxon 1, há um éxon alternativo, denominado éxon 0, não codificante (NAITO et al., 1999) (Figura 15).

A MBL humana é codificada a partir de dois transcritos, sendo o transcrito alternativo iniciado a partir do promotor *upstream* ao éxon 0. O transcrito que inicia a partir do éxon 1 é menor que o produzido no éxon 0, que contem cerca de 100 pb a mais. O mRNA de MBL proveniente, em sua maior parte, do éxon 1. Ambas as sequências do promotor incluem um TATA box para início da transcrição dos mRNAs. Além disso, o fator de transcrição HNF-3 (fator nuclear do hepatócito) desenvolve um papel importante na expressão deste gene. Previamente, a MBL foi considerada uma proteína expressa apenas no fígado, entretanto, níveis de ambos os transcritos foram detectados em diferentes tecidos, como o intestino delgado e testículo (NAITO et al., 1999; SEYFARTH; GARRED; MADSEN, 2006).

Figura 15 - Estrutura do gene *MBL2*, (A) o exon 0 não é traduzido em proteína. (B) Organização do polipeptídeo MBL, que consiste de 4 domínios: I. região N-terminal rica em cisteína; II. Região semelhante ao colágeno; III. Curta região com flexibilidade e IV. Domínio C-terminal de reconhecimento de carboidrato.



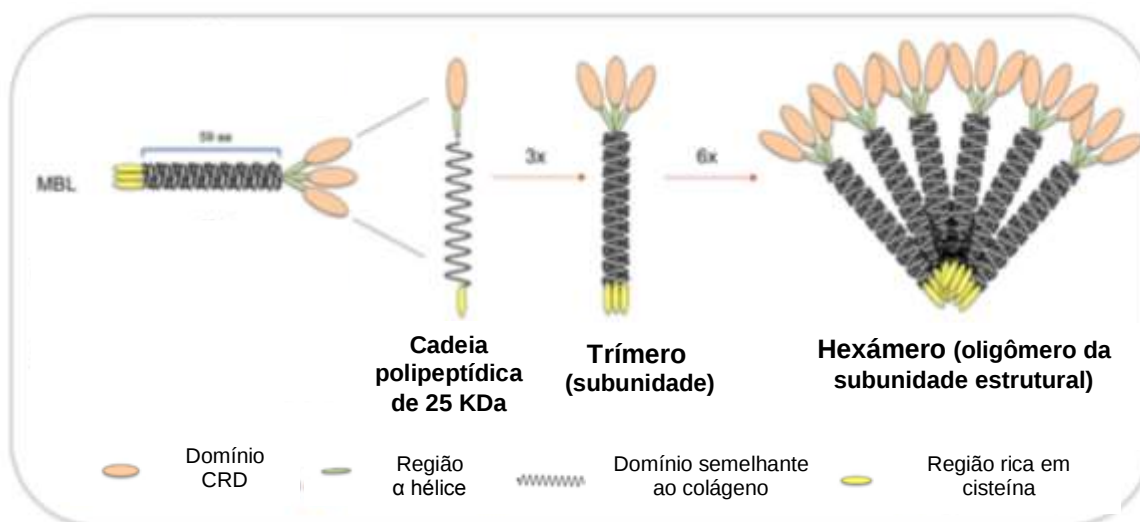
Fonte: Adaptado de Beltrame et al. (2015).

Todos os quatro éxons (1 ao 4) do gene *MBL2* codificam domínios distintos da proteína. O éxon 1 codifica um peptídeo sinal, um domínio N-terminal (21 aa) rico em cisteína, e cópias de um motivo repetido em tandem, Glicina-Xaa-Yaa (Xaa e Yaa indica qualquer aminoácido), para a formação de uma tripla helix da região colagenosa. O éxon 2 codifica repetições adicionais de Glicina-Xaa-Yaa na região do colágeno. Assim, o domínio colagenoso contém 59 aa, consistindo de 20 repetições em tandem de Glicina-Xaa-Yaa (exceto a repetição 8, que consiste de apenas Glicina-glutamina). O éxon 3 codifica uma curta região com flexibilidade (30 aa) e o éxon 4 codifica o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) C-terminal, que é dependente de cálcio (118 aa). Esta região

reconhece tanto carboidratos, como manose e N-acetilglicosamina, presentes na superfície de patógenos, bem como estruturas moleculares, como ácidos nucléicos. Desta forma, a cadeia polipeptídica da MBL secretada é composta por 228 aa (não incluindo o peptídeo sinal com resíduos de 20 aa) (Figura 15) (TAYLOR et al., 1989; SASTRY et al., 1989; EISEN; MINCHINTON, 2003; PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003; GARRED et al., 2009).

A MBL, possui uma estrutura tridimensional similar à C1q, pertence à subfamília de proteínas chamadas colectinas, os quais possuem tanto a região de colágeno como domínios de lectina. Cada cadeia polipeptídica de MBL (25 KDa) é caracterizada por: uma lectina (domínio CRD), uma curta região hidrofóbica alfa-hélice, uma região colagenosa e uma região N-terminal rica em cisteína. Três polipeptídeos interagem através da região colagenosa, originando uma tripla hélice (trímero) (Figura 16) (TURNER, 1996; PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003; TURNER, 2003).

Figura 16 - Estrutura da proteína MBL.

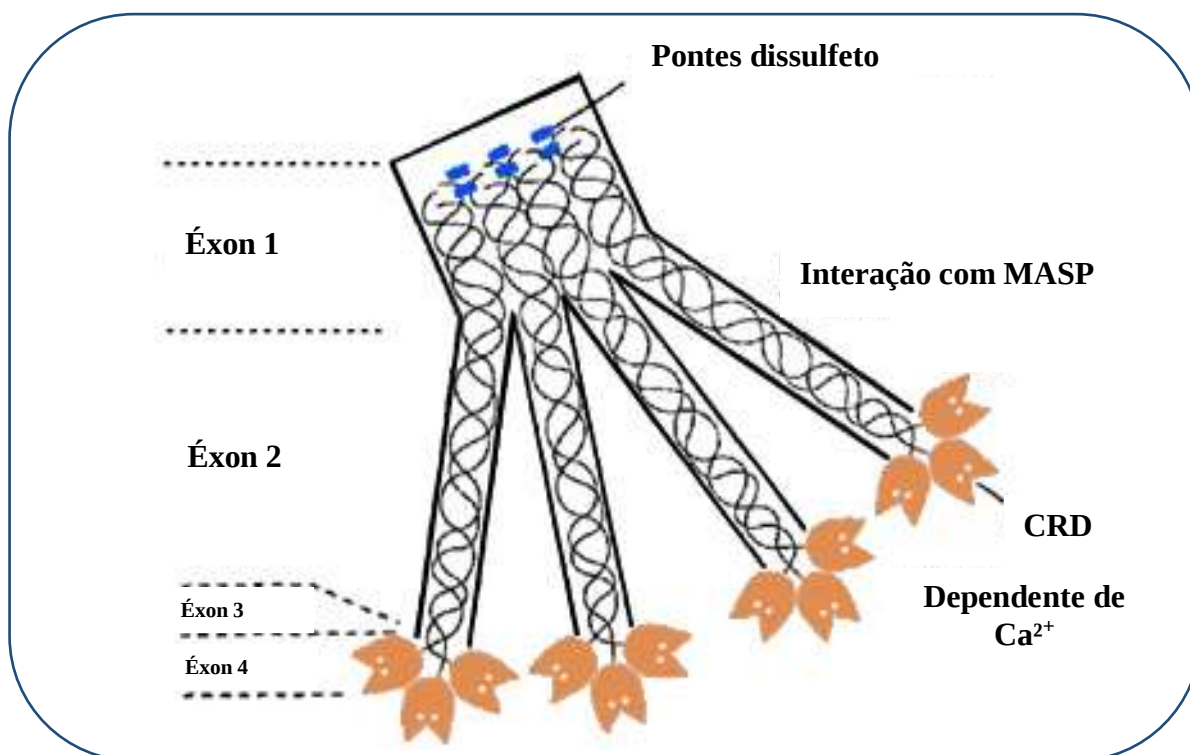


Fonte: Adaptado de Beltrame et al. (2015).

Os trímeros se associam por pontes dissulfeto intercadeias dentro da região rica em cisteína N-terminal, estabilizados por interações hidrofóbicas. Estas subunidades formam uma unidade única da MBL, polimerizando e gerando estruturas oligoméricas maiores, que variam de dímeros à hexâmeros, dando origem a um "*bouquet de tulipas*". A forma oligomérica comumente encontrada em

humanos é o hexámero (seis subunidades e 18 cadeias polipeptídicas) com uma massa molecular total de cerca de $18 \times 25\,000$ Da. Cada CRD (dependente do íon cálcio) é capaz de fazer ligações com os grupos 3- e 4-hidroxil dos açúcares, tais como N-acetil-d-glucosamina, manose, N-acetilmanosamina, glucose e sacarose (Figuras 16 e 17) (TURNER, 1996; PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003; TURNER, 2003).

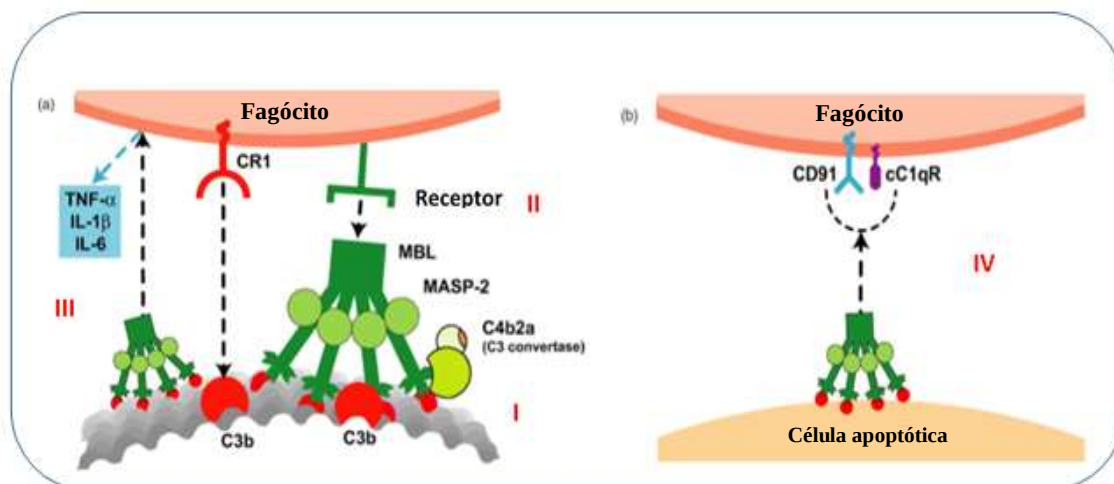
Figura 17 - MBL tetramérica constituída por quatro subunidades idênticas.



Fonte: Adaptado de Turner (1996).

A MBL é uma proteína sérica de fase aguda, atuando como um importante componente da imunidade inata e possuindo diferentes funções como a ativação do sistema complemento, promoção da opsonização, apoptose e modulação no processo inflamatório (THIEL et al., 1992; OGDEN et al., 2001; KANG et al., 2007; GARRED et al., 2009) (Figura 18). Essa proteína atua como uma opsonina, facilitando a fagocitose de patógenos ou células apoptóticas, devido à sua ligação à esses alvos através do seu domínio CRD e interação com a superfície de receptores das células fagocíticas, através do domínio colagenoso (Figura 18) (OGDEN et al., 2001).

Figura 18 - A MBL possui diferentes funções: I. Ativação do sistema complemento; II. Opsonização e fagocitose; III. Modulação da inflamação; IV. Remoção de células apoptóticas.



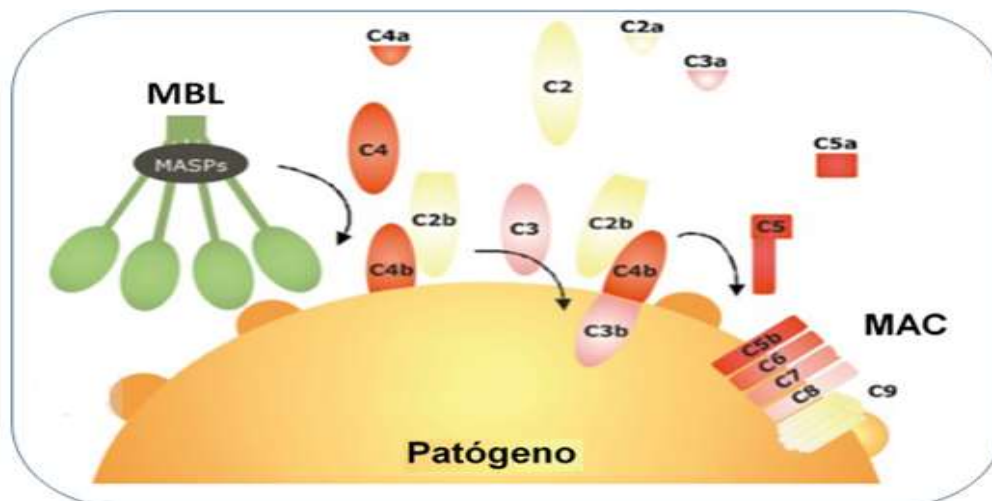
Fonte: Adaptado de Turner et al. (2003).

A via das lectinas de ativação do complemento é ativada por meio da ligação da MBL à carboidratos ou compostos acetilados presentes na superfície de patógenos e células apoptóticas. A MBL então ativa as MASPs (serina protease associada à lectina ligante de manana), que se tornam proteoliticamente ativas. As MASPs clivam C4 e C2, formando o complexo C4b e C2b (C3-convertase), que é capaz de clivar C3 em C3a e C3b. O componente C3b se liga covalentemente à glicoproteínas dispersas por toda a superfície celular do patógeno. Macrófagos e neutrófilos possuem receptores para C3b e podem se ligar à células coberta por C3b e facilitar a fagocitose. Alguns dos componentes C3b se ligam ao complexo C4bC2b e clivam C5 em C5a e C5b. Então, C5b juntamente com C6, C7, C8 e C9 interagem na membrana e formam o MAC, que iniciam a lise celular (Figuras 18 e 19) (GARRED et al., 2009).

Reduções nos níveis séricos de MBL estão associadas com polimorfismos genéticos localizados nos códons 52, 54 e 57, do éxon 1. Uma mutação pontual na posição 230 no códon 54 do éxon 1 (GGC → GAC) do gene *MBL2* causa uma substituição de uma glicina para ácido aspártico na proteína (alelo B, sendo o alelo selvagem nomeado "A") (SUMIYA et al., 1991). Outros estudos revelaram a existência de dois outros alelos adicionais: na posição 239 no códon 57 (GGA → GAA) em que uma glicina é substituída pelo ácido glutâmico (alelo C) (LIPSCOMBE et al., 1992) e no códon 52 (CGT → TGT) na posição 223, onde a arginina é substituída pela cisteína (alelo D). A presença de qualquer um destes

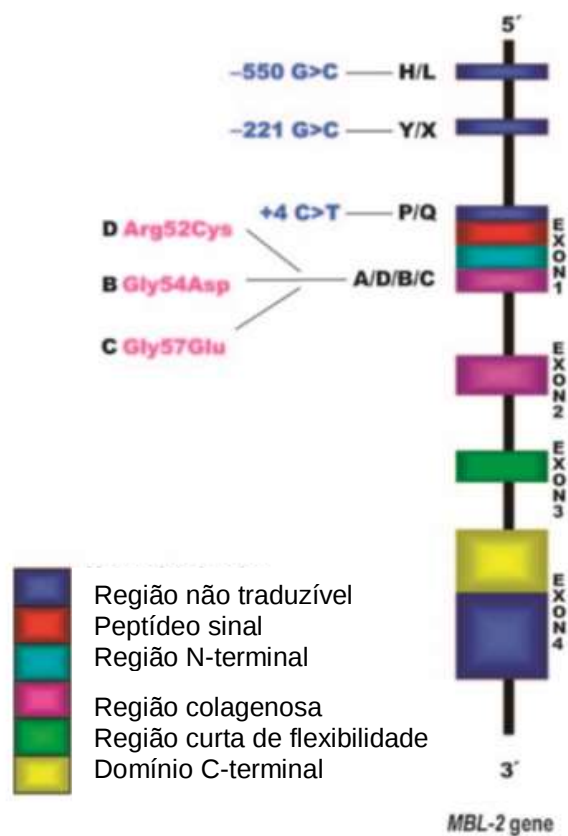
SNPs é designada de "O", enquanto o alelo selvagem é denominado "A" (Figura 20) (MADSEN et al., 1994).

Figura 19 - A via das lectinas de ativação do complemento.



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

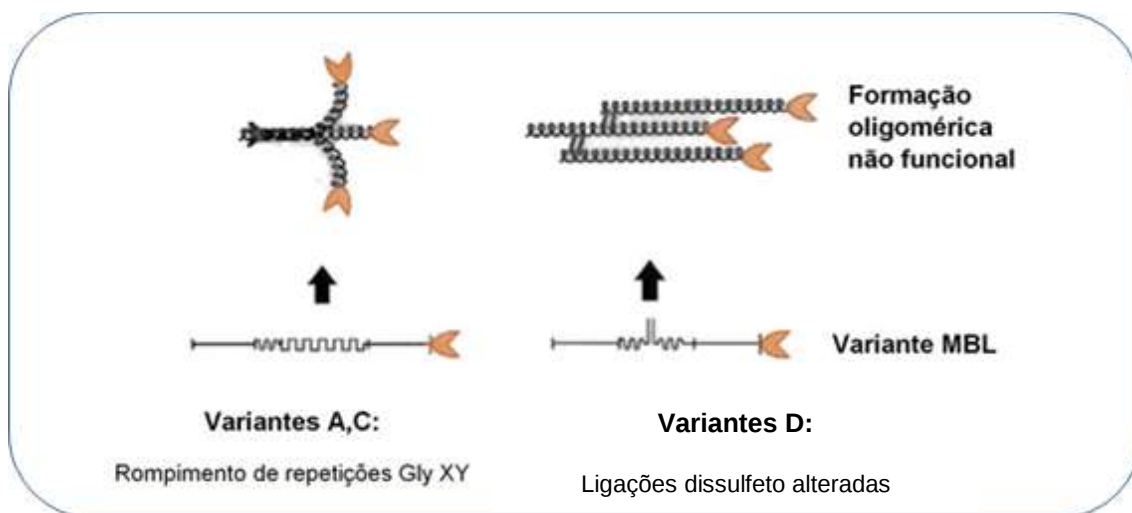
Figura 20 - Estrutura do gene *MBL2*. Mutações na região promotora e mutações pontuais no éxon 1 resultam em mudanças de aminoácidos e diminuição do nível e função da MBL.



Fonte: Adaptado de Dommett et al. (2006).

Embora todas as três variantes apresentem uma mudança estrutural na região de colágeno, a variante D não altera a repetição de Gly-Xaa-Yaa em comparação com as variantes B e C, em que há substituição de resíduo de glicina. Estes polimorfismos interferem na formação de oligômeros de MBL, comprometendo a oligomerização da proteína final e, conseqüentemente, causando uma deficiência funcional da MBL (Figura 21) (MADSEN et al., 1994). Os sítios polimórficos nas posições -550 (variante H/L) e -221 (variante X/Y) são localizados na região promotora do gene *MBL2* (Figura 20) (MADSEN et al., 1995). Os haplótipos da região promotora HYPA e LYQA estão associados a elevados níveis de MBL, enquanto que LYPA está relacionado a concentrações intermediárias. Os haplótipos LXPA, LYPB, HYPD e LYQC se relacionam a baixas quantidades de MBL (STEFFENSEN et al., 2000).

Figura 21 - Variantes alélicas de MBL alteram as regiões colagenosas e formam oligômeros não funcionais.



Fonte: Adaptado de Eisen e Minchinton (2003).

Polimorfismos genéticos associados a reduções nos níveis séricos da MBL têm sido reportados como fatores de risco a diferentes doenças infecciosas, inflamatórias, pulmonares e hematológicas (SCHMIEGELOW et al., 2002; IM et al., 2012; KIM et al., 2017).

Adicionalmente, portadores de mutações no gene *MBL2* estão sob maior risco de desenvolver doenças autoimunes. Baixos níveis de MBL poderiam levar a uma ineficaz exclusão de células apoptóticas e a propagação de autoantígenos,

permitindo, desta forma, uma resposta imunológica em direção à autoimunidade e danos teciduais (BOUWMAN; ROEP; ROOS, 2006; ARAÚJO et al., 2009).

2.6 VITAMINA D E O GENE VDR

A vitamina D é um hormônio secosteróide que regula a homeostase do cálcio-fosfato, metabolismo ósseo e a interação com as glândulas paratireóides, rim e trato gastrointestinal. Além disso, atua no sistema imune inato e adaptativo, influenciando em muitas doenças caracterizadas por inflamação, incluindo doenças autoimunes, infecções, câncer e doenças cardiovasculares. As duas formas biologicamente relevantes de vitamina D são ergocalciferol ou vitamina D₂ e colecalciferol ou vitamina D₃; as quais podem ser obtidas por ingestão nutricional, entretanto, apenas a vitamina D₃ é produzida na pele (GUILLOT et al., 2010; KAMEN; TANGPRICHA, 2010; HOLICK, 2017).

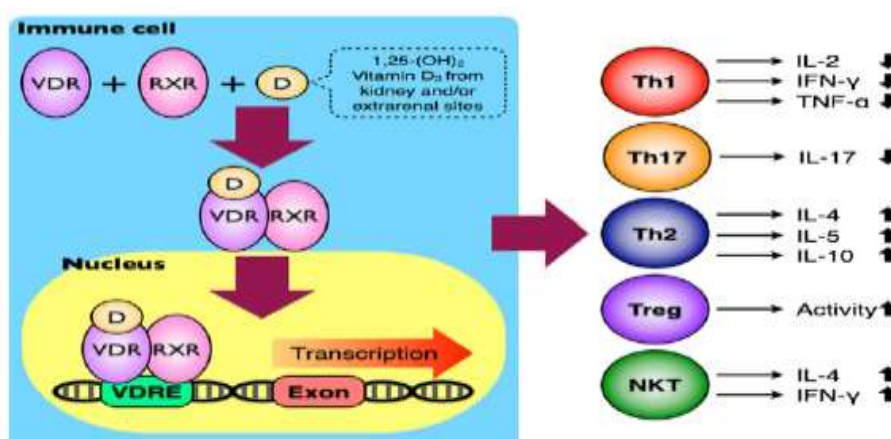
A vitamina D₃ é produzida a partir de uma substância precursora, a 7-deidrocolesterol (7-DHC). Na pele, os raios solares promovem clivagem fotolítica da 7-DHC, a qual é convertida à pré-vitamina D₃ (preD₃). Imediatamente, a preD₃ é transformada, por isomerização espontânea, em vitamina D₃. Embora a vitamina D₃ possa ser obtida através da dieta, a fonte mais importante deste hormônio é a pele, sendo dependente da intensidade de radiação ultravioleta, a qual varia de acordo com a estação e latitude (HOLIK, 2008; CHRISTAKOS et al., 2016).

A vitamina D₃, produzida na pele ou por absorção intestinal de componentes nutricionais, pode ser armazenada e depois liberada a partir de células adiposas. Na circulação, a vitamina D é acoplada a uma proteína carreadora (DBP, *vitamin D binding protein*), uma glicoproteína de ligação à vitamina D que a transporta para o fígado, onde sofre hidroxilação no carbono 25 pela D-25-hidroxilase (25-OHase ou CYP2R1), resultando em calcidiol [25-hidroxivitamina D₃ [25 (OH) D], a qual é biologicamente inativa e precisa ser convertida nos rins. A principal forma circulante de vitamina D é a 25(OH)D, sendo bastante utilizada na prática clínica para dosagem de vitamina D, com o intervalo de referência entre 30 a 60 ng/mL. A DBP transporta 25 (OH) D para o rim, sendo filtrado pelo glomérulo. No túbulo renal proximal, 25 (OH) D é

hidroxilada na posição de carbono 1 do anel A, pela 1 α -hidroxilase (1-OHase ou CYP27B1), culminando na formação de calcitrol [1,25 diidroxi-vitamina D (1,25(OH)₂D)], a forma funcional da vitamina D, responsável pela maioria de suas ações biológicas (HOLICK, 2008; KAMEN; TANGPRICHA, 2010; CHRISTAKOS et al., 2016; HOLICK, 2017).

As ações biológicas da 1,25(OH)₂D são mediadas pelo receptor de vitamina D, o VDR (Vitamin D Receptor), um fator de transcrição presente em quase todas as células humanas, pertencente à classe de fatores de transcrição nuclear (BOUILLON et al., 2008). VDR possui dois domínios: o N- terminal de ligação ao DNA (DBD) e o C-terminal de ligação ao ligante (LDB). Após 1,25 (OH)₂D entrar nas células alvo, uma ligação de alta afinidade deste metabólito ao LBD induz heterodimerização do VDR com o receptor retinóide X (RXR). O heterodímero VDR-RXR se liga a sequências específicas de DNA, os elementos de resposta a vitamina D (VDREs), controlando, assim, a transcrição de genes envolvidos no metabolismo do cálcio e resposta imune. Os VDREs estão localizados em regiões promotoras de genes alvos, sendo caracterizados por repetições diretas de motivos PuG(G/T)TCA separados por 3pb (Figura 22) (BAEKE et al., 2010; GUILLOT et al., 2010).

Figura 22 - Mecanismo de ação da vitamina D dentro do núcleo de células alvo.

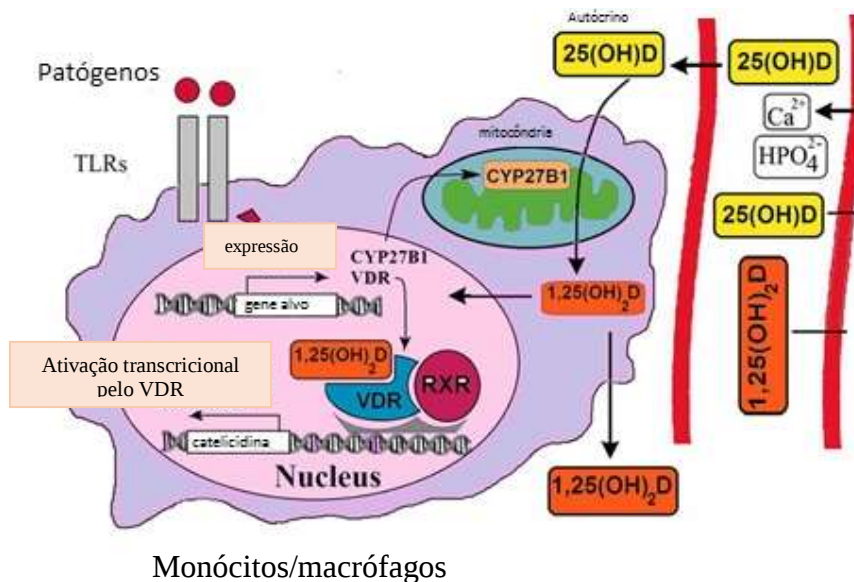


Fonte: Adaptado de Yang et al. (2013).

A vitamina D regula diferentes proteínas de transporte de cálcio no intestino delgado, permitindo o aumento da absorção de cálcio. Na via - não clássica - do

sistema imune, a 25(OH)D circulante é absorvida por macrófagos, neutrófilos ou células epiteliais, os quais possuem 1 α -OHase e VDR e, portanto, são capazes de produzir a forma hormonal de vitamina D e responder de forma autocrina ou paracrina para formar 1,25 (OH) $_2$ D (Figura 23) (KAMEN; TANGPRICHA, 2010).

Figura 23- Metabolismo da Vitamina D.



Fonte: Adaptado de Holick (2017).

Quando um agente infeccioso se liga ao receptor TLR2/1, um macrófago ou monócito é estimulado, resultando em um aumento da expressão de VDR e 1-OHase. Um nível de 25(OH)D em torno de 30 ng/ml promove um substrato adequado para a 1-OHase promover a conversão em 1,25(OH) $_2$ D, na mitocôndria. A 1,25(OH) $_2$ D, produzida endogenamente, se direciona ao núcleo da célula, formando um complexo com VDR-RXR, onde aumenta a expressão da catelicidina, um peptídeo anti-microbiano, capaz de promover a resposta imune inata, induzindo a destruição de agentes infecciosos (Figura 23) (KAMEN; TANGPRICHA, 2010; HOLICK, 2017).

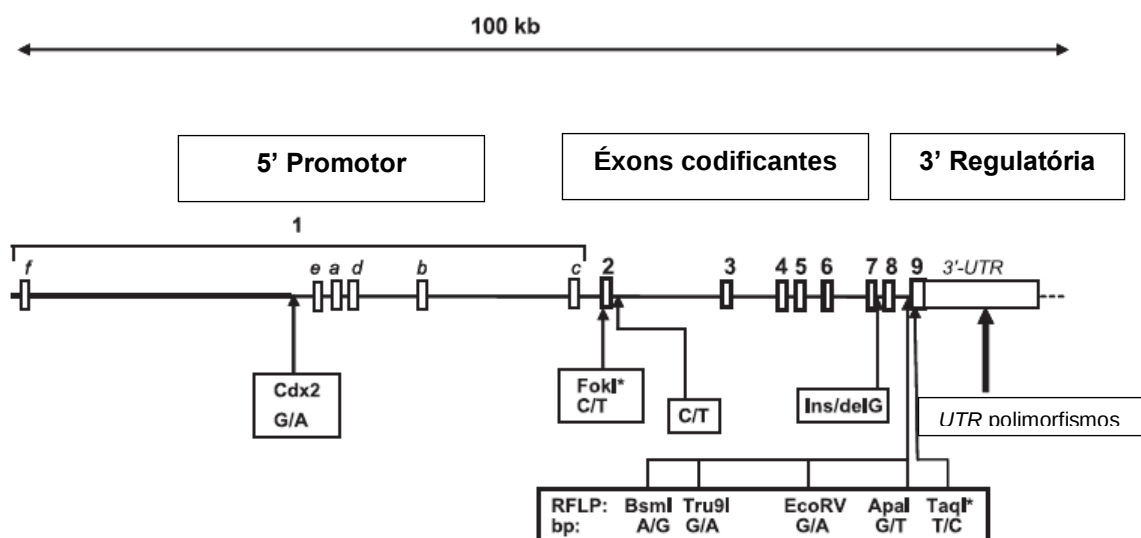
A 1,25(OH) $_2$ D produzida por monócitos ou macrófagos, uma vez liberada, atua localmente em linfócitos T e linfócitos B ativados, os quais, respectivamente, regulam a síntese de citocinas e inibe a produção de imunoglobulinas, agindo assim, no sistema imune adaptativo. A vitamina D também atua nas APCs, particularmente nas DCs, onde 1,25(OH) $_2$ D modula a maturação dessas células,

as quais são importantes na manutenção da imunidade e auto-tolerância (KAMEN; TANGPRICHA, 2010).

Além disso, a produção local de 1,25(OH)₂D na mama, cólon, próstata e outros tecidos regula uma variedade de genes que controlam a proliferação, além de genes que inibem a angiogênese e induzem a diferenciação e apoptose. Uma vez que 1,25(OH)₂D mantém a proliferação e diferenciação celular normal, atua induzindo a expressão da enzima 25-hidroxivitamina D 24-hidroxilase (CYP24A1), o que aumenta o catabolismo de 1,25 (OH) ₂D ao ácido calcitróico biologicamente inerte (HOLICK, 2017).

A proteína VDR é codificada pelo gene *VDR* (*vitamin D receptor*), localizado no cromossomo 12q13.1. Apresenta 8 éxons (2-9) e seis regiões de *splicing* alternativo (1a–1f), no qual está incluído a região promotora. Diferentes polimorfismos têm sido identificados, dentre eles *FokI* (C/T), no éxon 2, e *Cdx2* (G/A), localizado na região promotora do gene, bem como os polimorfismos *BsmI* (A/G), *ApaI* (G/T) e *TaqI* (T/C) presentes na região 3' UTR do gene *VDR* (Figura 24) (UITTERLINDEN et al., 2004).

Figura 24- Estrutura do gene *VDR* e posição dos polimorfismos.



Fonte: Adaptado de Uitterlinden et al. (2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a possível associação de polimorfismos dos genes *PTPN-22*, *CTLA-4*, *MBL2* e *VDR* e a susceptibilidade a diferentes condições clínicas na síndrome de Turner, bem como avaliar o perfil de expressão do gene *VDR* nessas pacientes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar as frequências alélicas e genotípicas dos genes *PTPN-22* +1858 G>A (rs2476601), *CTLA-4* +49A>G (rs231775), *MBL2* -550(H>L) (rs11003125), -221(X>Y) (rs7096206), exon 1 (A/O) e *VDR* *Cdx-2* G>A (rs11568820), *FokI* C>T (rs2228570), nas pacientes portadoras de ST e controles;
2. Investigar uma possível associação entre os polimorfismos dos genes *PTPN-22*, *CTLA-4*, *MBL2* e o risco a diferentes manifestações clínicas entre as pacientes com ST;
3. Investigar uma possível associação entre os polimorfismos do gene *VDR* e o risco a diferentes manifestações clínicas em pacientes com ST, bem como comparar o perfil de expressão deste gene em pacientes com ST e controles.

4 CTLA-4 GENE POLYMORPHISMS ARE ASSOCIATED WITH OBESITY IN TURNER SYNDROME

Immune genes and Turner Syndrome

Luana Oliveira dos Santos^{1*}, ^Ψ, Adriana Valéria Sales Bispo², ^Ψ, Juliana Vieira de Barros¹, Raysa Samanta Moraes Laranjeira¹, Rafaela do Nascimento Pinto¹, Jaqueline de Azevêdo Silva¹, Andréa de Rezende Duarte³, Jacqueline Araújo⁴, Paula Sandrin-Garcia¹, Sergio Crovella¹, Marcos André Cavalcanti Bezerra⁵, Taciana Furtado de Mendonça Belmont⁶, Maria do Socorro Cavalcanti⁶ and Neide Santos¹

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Federal Institute of Education, Science and Technology of Sertão Pernambucano. Campus Serra Talhada. Rodovia PE 320, Km 9, 56912-140, Serra Talhada, Pernambuco, Brazil.

³ Medical Genetics Service, Institute of Integral Medicine Professor Fernando Figueira. Rua dos Coelho, 300, Boa Vista, 50070-050, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴ Pediatric Endocrinology Service at Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁶ Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco. Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, 50100-130, Recife, Pernambuco, Brazil.

^Ψ These authors contributed equally to this work.

Manuscrito aceito para publicação no Periódico: Genetics and Molecular Biology. Qualis: B1 / Impact Factor (2015): 1.341

Your manuscript entitled "CTLA-4 gene polymorphisms are associated with obesity in Turner Syndrome" submitted for publication in Genetics and Molecular Biology has been evaluated by the assigned Associate Editor who concluded that you have adequately addressed the concerns raised by the reviewers.

Therefore, I am pleased to inform you that your manuscript is now accepted for publication.

CTLA-4 gene polymorphisms are associated with obesity in Turner Syndrome

Immune genes and Turner Syndrome

Luana Oliveira dos Santos^{1*}, Ψ , Adriana Valéria Sales Bispo², Ψ , Juliana Vieira de Barros¹, Raysa Samanta Moraes Laranjeira¹, Rafaela do Nascimento Pinto¹, Jaqueline de Azevêdo Silva¹, Andréa de Rezende Duarte³, Jacqueline Araújo⁴, Paula Sandrin-Garcia¹, Sergio Crovella¹, Marcos André Cavalcanti Bezerra⁵, Taciana Furtado de Mendonça Belmont⁶, Maria do Socorro Cavalcanti⁶ and Neide Santos¹

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Federal Institute of Education, Science and Technology of Sertão Pernambucano. Campus Serra Talhada. Rodovia PE 320, Km 9, 56912-140, Serra Talhada, Pernambuco, Brazil.

³Medical Genetics Service, Institute of Integral Medicine Professor Fernando Figueira. Rua dos Coelho, 300, Boa Vista, 50070-050, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴Pediatric Endocrinology Service at Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁶Institute of Biological Sciences, University of Pernambuco. Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, 50100-130, Recife, Pernambuco, Brazil.

Ψ These authors contributed equally to this work.

*Corresponding Author: Neide Santos, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, PE, Brasil.

e-mail: neidesantos.ufpe@gmail.com

Tel.: +55 81 21268569

Fax: + 55 81 21268522

Abstract

Turner syndrome (TS) is characterized by a set of clinical conditions, including autoimmune/inflammatory diseases and infectious conditions, that can compromise a patient's quality of life. Here, we assessed polymorphisms in *CTLA-4* +49A/G (rs231775), *PTPN22* +1858G/A (rs2476601), and *MBL2* -550 (H/L) (rs11003125), -221(X/Y) (rs7096206) and exon 1 (A/O) in women from Northeast Brazil to determine whether polymorphisms within these key immune response genes confer differential susceptibility to clinical conditions in TS. A case-control genetic association study was performed, including 86 female TS patients and compared with 179 healthy women. An association was observed for the A/G genotype of *CTLA-4* +49A/G in TS patients ($p=0.043$, odds ratio [OR]=0.54). In addition, an association between the *CTLA-4* G/G genotype and obesity was detected in TS patients ($p=0.02$, OR=6.04). Regarding, the -550(H/L) polymorphism in the *MBL2* promoter, the frequency of the H/L genotype was significantly higher in the TS group than healthy controls ($p=0.01$, OR=1.96). The H/H genotype indicated a protective effect in TS patients ($p=0.01$, OR=0.23). No differences were observed in the distribution of -221(X/Y), *MBL2* exon 1 variants, and *PTPN22* +1858G/A in any assessed groups. *CTLA-4* variants are potentially involved in obesity in this cohort of TS patients from Northeast Brazil.

Keywords: *CTLA-4* gene; immune genes; obesity; polymorphism; Turner syndrome

Introduction

Turner syndrome (TS) is one of the most common chromosomal abnormalities in humans and is characterized by the presence of one X chromosome and total or partial loss of the second sex chromosome. TS is estimated to affect 1 in every 2500 live female births (Stochholm *et al.*, 2006). Individuals with TS exhibit a set of phenotypic features, including short stature and gonadal dysgenesis. Other clinical conditions, such as osteoporosis, dyslipidemia, obesity and congenital malformations are also observed (Ostberg *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2010; Bispo *et al.*, 2013; Ríos Orbañanos *et al.*, 2015).

Some studies have reported increased levels of autoantibodies (anti-thyroid peroxidase and anti -glutamic-aciddecarboxylase) in TS patients and an increased risk of developing a range of autoimmune diseases, such as Hashimoto's thyroiditis, type I diabetes mellitus, celiac disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, juvenile rheumatoid arthritis, Addison's disease, autoimmune hepatitis, psoriasis, vitiligo, and alopecia (Mortensen *et al.* 2009; Bianco *et al.* 2010; Jørgensen *et al.*, 2010; Bakalov *et al.*, 2012). In addition, ovarian insufficiency and absence of a second normal X chromosome are linked to an increased risk of autoimmune disorders in these patients. However, the underlying pathophysiological mechanisms related to the immune unbalance remain to be fully elucidated (Mortensen *et al.*, 2009; Bakalov *et al.*, 2012).

A wide variety of autoimmune/inflammatory diseases and infectious conditions have been associated with a set of genes related to immune regulation, including the *tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 gene (PTPN22)*, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 gene (CTLA4)*, and *mannose-binding lectin (MBL2)* (Bottini *et al.*, 2004; Filho *et al.*, 2012; Katkam *et al.*, 2015).

Polymorphisms within these three genes have been analyzed due to their importance in immune balance and homeostasis within the body. Even though a body of evidence indicates immune deregulation processes in TS, only *PTPN22* rs2476601 has been assessed in Brazilian TS patients from São Paulo (Southeast region) (Bianco *et al.*, 2010). Furthermore, studies evaluating the role of *MBL2* and *CTLA-4* polymorphisms in TS and its association with clinical features are lacking.

To understand the role of these key genes in immune misbalance and its consequences, we assessed whether *PTPN22*, *CTLA-4*, and *MBL2* polymorphisms confer susceptibility to autoimmune conditions or other inflammation-related features in TS patients from Northeast Brazil.

Materials and Methods

Patients and controls

This study included 86 patients with cytogenetic diagnosis of TS and proposed as a pilot study, which attended at Medical Genetics Service of Institute of Integral Medicine Professor Fernando Figueira and at Pediatric Endocrinology Service of Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco. Patients mean age was 11.48 years old (SD±7.52 years old), ranging from 0.1 to 33 years old, at time of TS diagnosis. Clinical data (shown in the table 1) were obtained from medical records of each patient. Control group included 179 healthy women from the same geographical region, and mean age was 34.62 years old (SD±13.4 years old), ranging from 8 to 72 years old. Exclusion criteria for control group included individuals' history of autoimmune and inflammatory chronic disease also in close relatives such as parents. All individuals (or their legal responsible) included in this research signed an informed consent term, which followed the Declaration of

Helsinki guidelines and presented the approval number from local Ethics Committee (Record: CEP/IMIP N° 802/06; CEP/CCS/UFPE N° 493/11).

Karyotyping

Clinical diagnosis of 86 TS patients was confirmed by chromosome analysis in peripheral blood leucocyte. Karyotypes found were as follows: 45,X (n=47, 54.65%); 45,X/46,X,i(Xq) (n=15, 17.44%); 46,X,i(Xq) (n=4, 4.65%); 45,X/46,XY (n=4, 4.65%); 45,X/46,X,r(X) (n=3, 3.49); other chromosomal constitutions summed 13 individuals (15.12%).

DNA Extraction and Genotyping

Genomic DNA was extracted from whole blood using Illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions. SNPs selection was based on minimum allele frequency (MAF) of 10% and / or SNP consequence / function upon gene action. A total of five SNPs were selected distributed as follows *PTPN22* +1858G/A (rs2476601) at codon 620, *CTLA-4* +49A/G (rs231775) within codon 17 in the first exon and *MBL2* promoter region -550(H/L) (rs11003125), -221(X/Y) (rs7096206). Genotyping was performed using TaqMan SNP genotyping assays and Taqman Universal Master Mix (Applied Biosystems®, CA) according to manufacturer instructions. SNP assessment within *MBL2* exon 1 (A/O) was performed using SYBR Green (Qiagen, Hilden, Germany) as previously described (Hladnik *et al.*, 2002). All Sybr Green endpoint PCRs were performed including all three possible genotypes as positive controls in Rotor-Gene 6000 TM apparatus (Corbett Research Mortlake, Sydney, Australia). Ten randomly chosen *MBL2* genotyped samples have been

sequenced in order to double check the Melting Temperature assay (MTA) results. We found 100% concordance between sequenced samples and the MTA ones.

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using SNPStats available at http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web and R software (<https://www.r-project.org/>). Hardy–Weinberg equilibrium was tested for each polymorphism by comparing observed with expected frequencies using chi-square (χ^2) test. Differences in allele and genotype frequencies from each studied polymorphism in patients and controls were assessed using χ^2 or Fisher's exact test. Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) were also calculated and a p-value <0.05 was considered statistically significant. Combined alleles for the *PTPN22* and *CTLA-4* genes, haplotypes for the *MBL2* gene and a possible association of these combined alleles and haplotype with clinical conditions in TS patients were also assessed. Combined genotypes for the *MBL2* gene were assessed by Arlequin version 3.1 software (Excoffier *et al.*, 2005). Fisher's exact test was performed to evaluate difference between combined genotypes in case-control and associations with clinical data in TS group. We compared genotype and allele distribution for all SNPs assessed in this study in TS patients and control group. Posteriorly, we evaluated a possible association of all polymorphic variants with differential presence of autoimmune diseases such as autoimmune thyroid disease and alopecia and other clinical features as follows: obesity, dyslipidemia, inflammatory and infectious conditions in TS patients. Post-hoc (goodness of fit χ^2 tests) power analysis was performed with the G* Power software (version 3.1.9.2, available at <http://www.gpower.hhu.de/>), with α error probability of 0.05

RESULTS

PTPN22 and CTLA-4 gene polymorphisms

The allele and genotype distributions of *PTPN22* rs2476601 (G>A) and *CTLA-4* rs231775 (A>G) among TS patients and healthy controls are summarized in Table 2. Conformity to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE; $p > 0.05$) was observed in both SNP distributions, and no significant differences were found in the allele and genotype frequencies of these variants in both groups (Table 2).

We did not detect the homozygous A/A genotype of *PTPN22* rs2476601 (G>A) in any of the studied groups. A lower frequency of the A allele and G/A genotype was observed in both TS patients and controls (Table 2). No significant association was identified between the assessed SNPs and the presence of any clinical conditions in women with TS ($p > 0.05$; Fisher's exact test) (data not shown). The power was 80.7% (α -error = 5% confidence) to detect a medium effect size ($w = 0.3$) for *PTPN22* genotypes in both patients and controls.

Concerning *CTLA-4* rs231775, significantly different distributions of genotype frequencies were observed in TS patients compared to the control group. An association was detected for the A/G genotype ($p=0.043$, OR=0.54), indicating a differential distribution for this SNP in TS patients. The power was 99% (α -error = 5% confidence) to detect a medium effect size ($w = 0.3$) for *CTLA4* genotypes comparing patients and controls. Furthermore, when assessing the clinical features of TS and the allele and genotype distribution, we detected an association between the *CTLA-4* allele (recessive model: A/A-A/G vs. G/G) and obesity in TS patients ($p = 0.02$, 95% CI 1.37 - 26.75, OR=6.04) (Table 3).

Combined alleles for PTPN22 and CTLA-4 genes

The combined alleles of *PTPN22* and *CTLA-4* and frequencies for both groups are given in Table 5. No significant differences were observed. Furthermore, no significant association was established between the combined alleles and clinical status of TS patients (data not shown).

MBL2 gene polymorphisms

The *MBL2* genotype and allele distributions in TS patients and controls are given in Table 4. All allelic and genotypic frequencies of *MBL2* polymorphisms were in HWE in the TS and control groups, except for rs11003125 (-550 H/L) in the TS group ($p < 0.05$). The H/L genotype frequency was significantly higher in TS patients than controls (overdominant model: H/L vs. L/L-H/H: $p = 0.01$, OR = 1.96, 95% CI 1.11-3.50). Furthermore, the H/H genotype indicated a protective effect in TS patients compared to healthy controls (recessive model: H/H vs. L/L--H/L: $p = 0.01$, OR = 0.23, 95% CI 0.04-0.83). Again, this result cannot be fully explained due to an absence of HWE in this specific group. The power was 99.9% (5% confidence) to detect a medium effect size ($w = 0.3$) for -550 *MBL2* genotypes in both groups.

Regarding *MBL2* rs7096206 (-221 X/Y), no differences in allele or genotype frequencies were observed between TS patients and controls. The power was 30.5% (5% confidence) to detect a medium effect size ($w = 0.3$) for -221 *MBL2* genotypes when comparing patients and controls. Furthermore, no significant differences were observed in the genotype and allele frequencies of exon 1 variants between TS patients and controls. The power was 91.2% (5% confidence) to detect a medium effect size ($w = 0.3$) for exon 1 *MBL2* genotypes when

comparing TS patients and controls. In patients with TS, no SNP in the *MBL2* gene or promotor region was associated with clinical characteristics (data not shown).

Haplotypes and combined genotypes of MBL2 gene -550, -221, and exon 1 variants

The frequencies of haplotypes and combined genotypes originating from linkage disequilibrium between the *MBL2* -550 and -221 promoter region and exon 1 polymorphisms are given in Table 5. Haplotypes were combined in different groups; haplotypes associated with high expression of MBL (LYA, HYA), low production of MBL (LXA), and deficient expression of MBL (LYO, HYO). No significant differences were found in haplotype frequencies between the analyzed groups. Furthermore, no significant association was established among haplotypes and the clinical data of TS patients (data not shown).

Genotypes were classified as high (HYA/HYA, HYA/LYA, and LYA/LYA); low (LXA/LXA, LYA/LXA, HYA/LXA, HYA/HYO, HYA/LYO, and LYA/LYO); and deficient producers of MBL (HYO/HYO, HYO/LXA, HYO/LYO, LYO/LXA, and LYO/LYO). Significant differences were not found between the evaluated groups. Moreover, no significant difference was observed among combined genotypes and the clinical data of TS patients (data not shown).

Discussion

To date, only a few assays have been performed involving genes linked to innate and adaptive immunity in patients with TS, even though the immune

response seems impaired in these patients (Bianco *et al.*, 2010; Bianco *et al.*, 2012).

We included *PTPN22* in our analyses due to its importance in the host immune system; this gene encodes LYP, an important negative regulator of T cell activation (Bottini *et al.*, 2004). Our results indicate an absence of an association between the selected *PTPN22* SNP and autoimmunity, inflammatory, and infectious conditions in TS women.

Our results differ from Bianco *et al.*, (2010), who found an association between the same SNP (*PTPN22* rs2476601) and the development of autoimmune diseases in TS in another cohort from Southeast Brazil. The frequency of the A allele in women with TS (1.1%) and healthy controls (3.6%), as well as the heterozygote genotype in both groups (2.3% and 7.3%, respectively), was lower in our study than that of Bianco *et al.*, 2010. In their study, the frequency of the A allele and heterozygote genotype were 18.3% and 28.2% in the TS group, and 9.2% and 16.1% in controls, respectively. A disease-associated homozygote genotype was present in 4.2% of patients and 1.1% of controls.

This difference between studies could be due to the variations in the allele frequencies of some disease-associated SNPs in different ethnic groups (Mori *et al.*, 2005) because the Brazilian population exhibits interesting variety in allele distribution. Geographic distributions in Brazil exhibit ethnic disparities, mainly due to the genetic burden of heterogeneous colonization sources (Pena *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2015).

We also evaluated *PTPN22* rs2476601 (G>A) and other clinical features in TS patients, such as obesity, as well as dyslipidemia given its role in modulating inflammatory conditions. As obesity is a disease characterized by chronic mild

inflammation, the concentration of acute phase proteins and cytokines associated with inflammation are higher in obese individuals compared to normal weight individuals (Trayhurn, 2007). However, our analysis did not indicate an association between these clinical manifestations in the TS group, which is similar to a previous study by Salinas-Santander *et al.* 2016 in which *PTPN22* +1858G/A was not associated with differential susceptibility to overweight and the development of obesity in adolescents.

The *CTLA-4* +49A/G polymorphism at exon 1 is involved in the negative regulation of T cells. Our assay showed an association between the rs231775 G/G genotype and obesity in the TS group ($p = 0.02$).

The presence of the *CTLA-4* +49A/G variant has been associated with different diseases, and G/G individuals may possess CTLA-4 protein with a weak suppression function compared to individuals with the A/A genotype (Chistiakov and Turakulov, 2003). Therefore, increased T-cell activation due to this reduced inhibitory signal to T cells would be associated with the pathogenesis of several autoimmune/inflammatory diseases, including obesity, as observed with TS patients in the present study. The adipocytes of obese individuals with TS express fewer anti-inflammatory elements and high amounts of pro-inflammatory factors, leading to a misplaced response in immune cells (Ostberg *et al.*, 2005; Bakalov *et al.*, 2012).

MBL2 polymorphisms and their influence on serum protein levels have been evaluated extensively and found to be associated with recurrent and severe infections (Sumiya *et al.*, 1991; Summerfield *et al.*, 1995), such as tuberculosis (da Cruz *et al.*, 2013) and autoimmune diseases, including celiac disease (Boniotto *et al.*, 2005), systemic lupus erythematosus (Lee *et al.*, 2005), Sjögren's syndrome

(Tsutsumi *et al.*, 2001), and autoimmune thyroid disease (AITD) (Filho *et al.*, 2012).

Polymorphisms at exon 1 and the promotor region of *MBL2* were evaluated in our study due to their role in innate immunity and modulation of the inflammatory response. A relationship between clinical parameters and this genetic variant has not been assessed previously in TS, making our study the first to be performed in women with TS.

No association was found between the *MBL2* -221 (X/Y allele) polymorphism and different clinical conditions in TS patients. This *MBL2* promoter variation has a significant down-regulating effect on the serum MBL concentration, leading to ineffective clearance of apoptotic cells and the spread of self-antigens, permitting an immune response toward autoimmunity and tissue damage (Bouwman *et al.*, 2006; Araujo *et al.*, 2009). The Y variant is associated with high serum MBL expression (Madsen *et al.*, 1995) and has been involved in susceptibility to the development of different diseases da (Lee *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2013).

On the other hand, our results revealed significant differences regarding the -550 (H/L allele) promoter polymorphism between TS patients and controls ($p < 0.05$), revealing a different distribution in both groups.

Notably, in our study population, the -550 H/L *MBL2* variant was not in HWE, though the power analysis excluded type I and II statistical error. Therefore, we suggest that the TS condition acts upon the allelic distribution, causing deviation from HWE. Although differences in the *MBL2* polymorphism distribution have been detected, no significant association was found regarding the *MBL2* -550 (H/L allele) variant and clinical data of the TS group.

In summary, even though our study is a pilot study, due to limited number of TS patients and controls included, our results indicate a differential distribution for some polymorphisms within key inflammation-regulating genes in TS patients. The understanding how key immune genes and its variants are related in TS might help in future therapy strategies. These findings may open up a new potential line of research to improve life's quality in these individuals.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding

The study was supported by the Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE – APQ-0638-2.02/12).

Acknowledgements

The authors wish to thank the patients, parents, and clinicians for the data.

REFERENCES

- Araujo J, Segat L, Guimarães RL, Brandão LAC, Souza PER, Santos S, Soares TS, Falcão EA, Rodrigues F, Carvalho Jr R *et al* (2009) Mannose binding lectin gene polymorphisms and associated auto-immune diseases in type 1 diabetes Brazilian patients. *Clin Immunol* 131: 254-259.
- Bakalov VK, Gutin L, Cheng CM, Zhou J, Sheth P, Shah K, Arepalli S, Vanderhoof V, Nelson LM and Bondy CA (2012) Autoimmune disorders in women with turner syndrome and women with karyotypically normal primary ovarian insufficiency. *J Autoimmun* 38: 315–321.
- Bianco B, Verreschi ITN, Oliveira KC, Guedes AD, Galera BB, Galera MF, Barbosa CP and Lipay MVN (2010) PTPN22 polymorphism is related to autoimmune disease risk in patients with Turner syndrome. *Scandinavian J Immunol* 72: 256-259.
- Bianco B, Verreschi IT, Oliveira KC, Guedes AD, Barbosa CP and Lipay MV (2012) Analysis of vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms in Turner syndrome patients. *Gynecol Endocrinol* 28: 326-329.
- Bispo AVS, Dos Santos LO, Burégio-Frota P, Galdino MB, Duarte AR, Leal GF, Araújo J, Gomes B, Soares-Ventura EM, Muniz MTC, *et al* (2013) Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype. *Genet Mol Res* 12: 4243-4250.
- Boniotto M, Braida L, Baldas V, Not T, Ventura A, Vatta S, Radillo O, Tedesco F, Percopo S, Montico M, *et al* (2005) Evidence of a correlation between mannose-binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. *J Mol Med (Berl)* 83: 308-315.
- Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, MacMurray J, Meloni GF, Lucarelli P, Pellecchia M, *et al* (2004) A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* 36: 337-338.
- Bouwman LH, Roep BO and Roos A (2006) Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. *Hum Immunol* 67: 247-256.

- Carvalho AB, Guerra Júnior G, Baptista MT, de Faria AP, Marini SH and Guerra AT (2010) Cardiovascular and renal anomalies in Turner syndrome. *Rev Assoc Med Bras* 56: 655-659.
- Chistiakov DA and Turakulov RI (2003) CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. *J Mol Endocrinol* 31: 21-36.
- Coelho AVC, Moura RR, Cavalcanti CAJ, Guimarães RL, Sandrin-Garcia P, Crovella S and Brandão LAC (2015) A rapid screening of ancestry for genetic association studies in an admixed population from Pernambuco, Brazil. *Genet Mol Res* 14: 2876-2884.
- da Cruz HLA, da Silva RC, Segat L, de Carvalho MSZMG, Brandao LAC, Guimaraes RL, Santos FCF, de Lira LAS, Montenegro LML, Schindler HC, et al (2013) MBL2 gene polymorphisms and susceptibility to tuberculosis in a northeastern Brazilian population. *Infect Genet Evol* 19: 323-329.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 1: 47–50.
- Filho CB, Rodrigues FF, Segat L, Fonseca AM, Araujo J, Arahata C, Pontes L, Vilar L, de Lima Filho JL and Crovella S (2012) Association of MBL2 gene exon 1 variants with autoimmune thyroid disease in Brazilian patients. *Int J Immunogenet* 39: 357-361.
- Garred P, Madsen HO, Hofmann B and Svejgaard A (1995) Increased frequency of homozygosity of abnormal mannan-binding-protein alleles in patients with suspected immunodeficiency. *Lancet* 346: 941-943.
- Hladnik U, Braida L, Boniotto M, Pirulli D, Gerin F, Amoroso A and Crovella S (2002) Single-tube genotyping of MBL-2 polymorphisms using melting temperature analysis. *Clin Exp Med* 2: 105-108.
- Jørgensen KT, Rostgaard K, Bache I, Biggar RJ, Nielsen NM, Tommerup N and Frisch M (2010) Autoimmune Diseases in Women With Turner's Syndrome. *Arthritis Rheum* 62: 658–666.
- Katkam SK, Kumaraswami K, Rupasree Y, Thishya K, Rajasekhar L and Kutala VK (2015) Association of CTLA4 exon-1 polymorphism with the tumor necrosis factor- α in the risk of systemic lupus erythematosus among South Indians. *Hum Immunol* 77:158-64.

- Lee YH, Witte T, Momot T, Schmidt RE, Kaufman KM, Harley JB and Sestak AL (2005) The mannose-binding lectin gene polymorphisms and systemic lupus erythematosus: two case-control studies and a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 52: 3966-3974.
- Madsen HO, Garred P, Thiel S, Kurtzhals JAL, Lamm LU, Ryder LP and Svejgaard A (1995) Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *J Immunol* 155: 3013-3020.
- Mori M, Yamada R, Kobayashi K, Kawaida R and Yamamoto K (2005) Ethnic differences in allele frequency of autoimmune-disease-associated SNPs. *J Hum Genet* 50: 264-6.
- Mortensen KH, Cleemann L, Hjerrild BE, Nexø E, Locht H, Jeppesen EM and Gravholt CH (2009) Increased prevalence of autoimmunity in Turner syndrome –influence of age. *Clin Exp Immunol* 156: 205–210.
- Ostberg JE, Attar MJ, Mohamed-Ali V and Conway GS (2005) Adipokine dysregulation in turner syndrome: comparison of circulating interleukin-6 and leptin concentrations with measures of adiposity and C-reactive protein. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 2948-2953.
- Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR and Bydlowski SP (2009) DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res* 42: 870-876.
- Ríos Orbañanos I, Vela Desojo A, Martínez-Indart L, Grau Bolado G, Rodríguez Estevez A and Rica Echevarria I (2015) Turner syndrome: From birth to adulthood. *Endocrinol Nutr* 62: 499-506.
- Salinas-Santander MA, León-Cachón RB, Cepeda-Nieto AC, Sánchez-Domínguez CN, González-Zavala MA, Gallardo-Blanco HL, Esparza-González SC and González-Madrazo MA (2016) Assessment of biochemical parameters and characterization of TNF α -308G/A and PTPN22 +1858C/T gene polymorphisms in the risk of obesity in adolescents. *Biomed Rep* 4: 107-111.
- Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa RW and Gravholt CH (2006) Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3897-3902.

- Sumiya M, Super M, Tabona P, Levinsky RJ, Arai T, Turner MW and Summerfield JA (1991) Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. *Lancet* 337: 1569-1570.
- Summerfield JA, Ryder S, Sumiya M, Thursz M, Gorchein A, Monteil MA and Turner MW (1995) Mannose binding protein gene mutations associated with unusual and severe infections in adults. *Lancet* 345: 886-889.
- Trayhurn P (2007) Adipocyte biology. *Obesity rev* 8: 41–44.
- Tsutsumi A, Sasaki K, Wakamiya N, Ichikawa K, Atsumi T, Ohtani K, Suzuki Y, Koik T and Sumida T (2001) Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Genes Immun* 2: 99-104.

Table 1 - Clinical Characterization of all Turner syndrome patients enrolled in our study.

Clinical characteristics	N
Short stature	69
Skeletal abnormalities	72 ^a
Osteopenia/osteoporosis	4
Sexual infantilism	100 ^b
Primary amenorrhea	31
Obesity	9
Dyslipidemia	5
Autoimmune thyroid disease	11
Alopecia	2
Inflammatory diseases	9
Infectious diseases	6
Neurological disease	23
Cardiovascular disease	17
Renal malformations	10
Skin diseases	17
Edema	35
Mammary hypertelorism	22
Hearing impairment	7
Ear malformations	21
Muscle hypotonia	3
Arched palate	7
Nails malformations	33
Eyes anatomic alterations	13
Visual impairment	2
Short and webbed neck	35
Low posterior hairline	21
Skin redundancy in the neck	18

^aMain clinical conditions are cubitus valgus, pectus scavaturn and genu valgus;^bAbsent mammary development, absent axillary and pubic hair, hypoplastic uterus and absent ovaries;

Table 2 - Genotype and allele distribution of *PTPN22* and *CTLA-4* genes polymorphisms in TS and controls group.

Polymorphism	Patients N (%)	Controls N (%)	Odds ratio (95% CI)	p-value
<i>PTPN22</i>				
rs2476601				
Allele	172	358		
G	170 (99 %)	345 (96 %)	1.00	
A	2 (1 %)	13 (4 %)	0.31 (0.03-1.40)	0.16
Genotype	86	179		
GG	84 (97.7 %)	166 (92.7 %)	1.00	
GA	2 (2.3 %)	13 (7.3 %)	0.30 (0.03-1.39)	0.15
AA	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)	0 (0 inf)	1.00
<i>CTLA-4</i>				
rs231775				
Allele	172	340		
A	114 (66 %)	203 (60 %)	1.00	
G	58 (34 %)	137 (40 %)	0.75 (0.50-1.12)	0.17
Genotype	86	170		
AA	41 (47.7%)	59 (34.7%)	1.00	
AG	32 (37.2 %)	85 (50 %)	0.54 (0.29 - 0.99)	0.043*
GG	13 (15.1 %)	26 (15.3 %)	0.72 (0.30-1.66)	0.44

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

*Significant difference using Fisher's exact test.

Table 3 - Genotype distribution of *CTLA-4* gene polymorphisms in TS group.

Model	Polymorphism	Obesity N (%)	Non-obesity N (%)	Odds ratio (95% CI)	p-value
Recessive	<i>CTLA-4</i>				
	rs231775				
	Genotype				
	AA- AG	5 (55.6%)	68 (88.3%)	1.00	
	GG	4 (44.4%)	9 (11.7%)	6.04 (1.37 - 26.75)	0.023

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

Table 4 - Genotype and allele distribution of *MBL2* gene polymorphisms in TS and controls group.

Inheritance Model	Polymorphism	Patients N (%)	Controls N (%)	Odds ratio (95% CI)	p-value
<i>MBL2</i> rs11003125					
Recessive	Allele	172	300		
	L	116 (67.0 %)	198 (66.0 %)	1.00	
	H	56 (33.0 %)	102 (34.0 %)	0.93 (0.61- 1.42)	0.76
	Genotype	86	150		
Overdominant	L/L-H/L	83 (96.5%)	130 (86.7%)	1.00	
	H/H	3 (3.5%)	20 (13.3%)	0.23 (0.04-0.83)	0.01*
	Genotype	86	150		
	L/L-H/H	36 (41.9%)	88 (58.7%)	1.00	
	H/L	50 (58.1%)	62 (41.3%)	1.96 (1.11-3.50)	0.01*
<i>MBL2</i> rs7096206					
Recessive	Allele	172	300		
	Y	147 (85 %)	256 (85%)	1.00	
	X	25 (15 %)	44 (15%)	0.98(0.55-1.73)	1.0
	Genotype	86	150		
	Y/Y-X/Y	84 (97.7%)	144 (96.0%)	1.00	
	X/X	2 (2.3%)	6 (4.0%)	0.57(0.05-3.29)	0.7
<i>MBL2</i> Exon 1					
Dominant	Allele	126	300		
	A	98 (78%)	253 (84 %)	1.00	
	O	28 (22%)	47 (16%)	1.53(0.87-2.66)	0.12
	Genotype	63	150		
	A/A	39 (61.9%)	108 (72%)	1.00	
	A/O - O/O	24 (38.1%)	42 (28%)	1.57(0.80-3.06)	0.14

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

*Significant difference using Fisher's exact test.

Table 5 - Analyses of Combined Alleles of *PTPN22* and *CTLA4* genes, haplotypes and genotypes of -550 and -221 promoter region and exon 1 of *MBL2* gene in TS patients and controls.

<i>PTPN22</i> <i>CTLA4</i>	Frequencies in TS	Frequencies in controls	<i>p</i> - value	OR (95% C.I.)
G A	0.6512	0.5697	Reference	1.00
G G	0.3372	0.3939	0.16	0.76 (0.52-1.11)
A A	0.0116	0.027	0.25	0.39 (0.08 - 1.93)
A G	0	0.0093	1	0.00 (-Inf - Inf)
<i>Global haplotype association p - value: 0.14</i>				
MBL producers and haplotype	Frequencies in TS	Frequencies in controls	<i>p</i> - value	OR (95% C.I.)
High MBL producers				
LYA	0.3827	0.4272	Reference	1.00
HYA	0.2586	0.2694	0.89	1.04 (0.62 1.73)
Low MBL producers				
LXA	0.1453	0.1467	0.69	1.12 (0.64 1.94)
Deficient MBL producers				
LYO	0.1464	0.0861	0.13	1.75 (0.85 3.60)
HYO	0.0669	0.0706	0.84	1.10 (0.45 2.67)
<i>Global haplotype association p - value: 0.63</i>				
MBL producers and genotypes	TS group (n = 65)	Control (n = 150)	<i>p</i> - value	OR (95%C.I.)
High MBL producers				
HYA/HYA	27 (0.42)	76 (0.51)	Reference	Reference
HYA/LYA				
LYA/LYA				
Low MBL producers				
LXA/LXA				
LYA/LXA				
HYA/LXA				
HYA/HYO	32 (0.49)	63 (0.42)	0.278	1.42(0.74-2.76)
HYA/LYO				
LYA/LYO				
Deficient MBL producers				
HYO/HYO				
HYO/LXA				
HYO/LYO	6 (0.09)	11 (0.07)	0.558	1.53(0.42-5.06)
LYO/LXA				
LYO/LYO				

TS = Turner syndrome; *OR* = Odds Ratio; *CI* = Confidence Intervals

5 FOKI (C/T) POLYMORPHISM IS RISK VARIANT AND VDR GENE IS DOWN-REGULATED IN TURNER SYNDROME

Luana O. dos Santos¹, Maria E. B. de A. Borborema¹, Cibele G. de Sotero-Caio¹, Raysa S. M. Laranjeira¹, Juliana V. de Barros¹, Andréa de R. Duarte², Jacqueline Araújo³, Jaqueline de A. Silva^{1,4} and Neide Santos¹

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Medical Genetics Service, Institute of Integral Medicine Professor Fernando Figueira. Rua dos Coelho, 300, Boa Vista, 50070-050, Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Pediatric Endocrinology Service at Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – LIKA, Federal University of Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, 52171-011, Recife, Pernambuco, Brazil.

Manuscrito a ser submetido ao Periódico: The Journal of Clinical Immunology

***FokI* (C/T) polymorphism is risk variant and *VDR* gene is down-regulated in Turner Syndrome**

Luana O. dos Santos¹, Maria E. B. de A. Borborema¹, Cibele G. de Sotero-Caio¹, Raysa S. M. Laranjeira¹, Juliana V. de Barros¹, Andréa de R. Duarte², Jacqueline Araújo³, Jaqueline de A. Silva^{1,4} and Neide Santos¹

¹ Department of Genetics, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Medical Genetics Service, Institute of Integral Medicine Professor Fernando Figueira. Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista, 50070-050, Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Pediatric Endocrinology Service at Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil.

⁴ Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – LIKA, Federal University of Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, 52171-011, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding Author: Neide Santos, Department of Genetics, Federal University of Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, 50740-600, Recife, Pernambuco, Brazil

e-mail: neidesantos.ufpe@gmail.com

Tel.: +55 81 21268569

Fax: + 55 81 21268522

Abstract

Purpose: Vitamin D (VTD) acts as regulator in several immune processes and relies on its nuclear receptor, named Vitamin D receptor (VDR), for proper function. Turner syndrome (TS) patients display considerable immune misregulation, and its hypothesized that VTD activity may fluctuate according to *VDR* polymorphisms or expression. To uncover a possible relationship between *VDR* states and clinical conditions in TS patients, we investigated two functional *VDR* variants (*Cdx-2* and *FokI*) for allele and genotype frequency, as well as expression profiles in TS individuals versus healthy controls (HC).

Methods: We performed a genetic association study including 100 TS patients and 116 HC. The genotyping for *VDR Cdx-2* G>A (rs11568820) and *FokI* C>T (rs2228570) was performed using Taqman Genotyping Assays. *VDR* gene expression was also evaluated in 15 TS patients and 15 HC. In addition, we investigated whether *VDR* mRNA levels were associated with *Cdx-2* and *FokI* variants in TS patients.

Results: We detected a significantly higher frequency of T allele ($p = 0.006$) as well as T/T genotype ($p = 0.01$) for *FokI* in TS patients when compared to HC. When assessing *VDR* expression we identified a downregulation in TS woman (-2.84 FC) versus HC ($p < 0.001$). Furthermore, C/T (11.24 FC; $p = 0.01$) and T/T (9.20 FC; $p = 0.01$) *FokI* genotypes were upregulated when compared to C/C reference genotype.

Conclusions: We identified different distribution from *FokI* polymorphism in TS patients. Additionally, *VDR* mRNA levels are downregulated in those patients, which may contribute in immune misregulation processes in TS.

Keywords: Turner syndrome; autoimmunity; *VDR* gene; polymorphisms; gene expression

1. Introduction

Turner syndrome (TS) is a chromosomal aneuploidy characterized by the presence of a single intact X chromosome and partial or total absence of a second sex chromosome in female individuals. This syndrome is associated with specific clinical features, and an incidence estimate of 1 in 2,500 female births, which makes it one of the most common human chromosome alterations worldwide [1,2].

The incidence of inflammatory disorders and autoimmune diseases are known to be higher in TS when compared to healthy individuals [3-6]. In addition, a high frequency of thyroid autoimmunity has been reported in TS patients, particularly in women with one X isochromosome [4,5]. However, this association has been controversial taking into consideration that some studies have not yet established a relationship between TS karyotypes and gland-associated diseases [6-8]. In this context, genetic mechanisms that lead to immunological disorders in TS are still underinvestigated.

A group of compounds of significant impact on immunological disorders and likely to play a major role in autoimmunity of TS patients are those constituting the Vitamin D (VTD). Vitamin D is a secosteroid hormone well-known for its activity in calcium homeostasis, but also as potent signalling molecules acting in multiple pathways. VTD deficiency has been linked to several illnesses, such as hypertension, obesity, bone-weakening conditions, as well as heart and autoimmune diseases [9]. Two biologically relevant forms of vitamin D are ergocalciferol (vitamin D₂) and cholecalciferol (vitamin D₃), collectively called VTD, which can be obtained by nutritional intake. However, only vitamin D₃ is produced in the skin and depends on solar radiation [10-12].

Biological activity of VTD is mediated by its receptor, named Vitamin D Receptor - VDR [13], which forms a complex with the retinoid X receptor (RXR). VDR-RXR heterodimer binds to specific DNA sequences, the VDREs (vitamin D response elements), thereby controlling the transcription of immune-related genes and calcium metabolism [10,14]. Different *VDR* polymorphisms have been described, including *Cdx-2* (G>A), located at the promoter region, and *FokI* (C>T), within exon 2, which are functional polymorphisms associated with changes in the VDR protein [15]. However, a direct link of the presence of these polymorphisms and clinical conditions displayed by TS patients has not been investigated fully. Indeed, few studies have dealt with a comparative analysis of TS and healthy controls in different populations, as well as the investigation of a relationship between *VDR* genotypes to clinical manifestations in TS patients. Overall, the available data still provide no consensus regarding a positive association between *VDR* polymorphism and clinical conditions in TS [16-18].

Since VTD plays an important role as an immunomodulator in immune responses through VDR, this study focused on uncovering association of expression profiles and frequency of *VDR* (*Cdx-2* and *FokI*) gene polymorphisms in individuals with TS versus healthy control (HC) in one population from northeast Brazil. More specifically, our goals were 1) The assessment of polymorphisms to test whether TS patients have a higher frequency of functional *VDR* mutations when compared to healthy individuals. We expected a differential distribution of these single nucleotide polymorphisms (SNPs) between TS patients and controls; 2) To determine the frequency of these polymorphisms within TS patients. We hypothesize that *VDR* gene polymorphisms are susceptibility factors underlying the development of TS clinical features; 3) To compare expression profiles

between TS and HC in order to identify potential differences in VDR messenger RNA (mRNA) levels, that may be associated to clinical conditions of TS. Finally, we suggest that *VDR* expression profiles of individuals bearing functional mutations will differ from those carrying “wild/ prevalent” genotypes.

2. Materials and Methods

2.1 Patients and healthy controls

Patients were recruited from the Medical Genetics Services of Institute of Integral Medicine Professor Fernando Figueira, as well as the Pediatric Endocrinology Services of Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco. For SNPs analyses, 100 TS patients with mean age of 11.62 years old (range: 0.1 - 33 years old; $SD \pm 7.58$) were included. In addition, 116 healthy females with mean age of 34.62 years old (range: 8 - 72 years old; $SD \pm 13.4$) with no autoimmunity-related history, inflammatory chronic disease or family history were included as a healthy control (HC) group. For expression analysis, a total of 15 TS women and 15 healthy females were included. Clinical data of each patient, including history of autoimmunity/inflammatory disease and osteopenia/osteoporosis, were obtained from medical records. Informed consent was obtained from all participants (or legal responsible), following the Declaration of Helsinki guidelines [19]. This research was approved by the local Ethics Committee (Record: CEP/IMIP N° 802/06; CEP/CCS/UFPE CAAE: 71308817.8.0000.5208).

2.2 Cytogenetics

Karyotyping

Peripheral blood from each patient (4 ml) was collected in tubes containing sodic heparin; lymphocytes were Phytohemagglutinin (PHA)-stimulated and 0.5 ml of each sample was incubated at 37 °C in RPMI 1640 supplemented with 1 ml of fetal bovine serum. Chromosome preparations were obtained from cultured lymphocytes after 72 hours. G-banded karyotypes from 25 peripheral blood leukocytes in metaphase were analyzed per individual. Chromosomal analyses were performed according to ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature [20].

2.3 Molecular Biology

DNA Extraction and Genotyping of VDR

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the Illustra™ Blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare) according to manufacturer's instructions. Two SNPs were selected based on minimum allele frequency (MAF) of 10%: *VDR* *FokI* C>T (rs2228570) at codon 2 and *Cdx-2* G>A (rs11568820) at 5' UTR promoter region. Genotyping was performed using TaqMan SNP genotyping assays and TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems®, CA) following manufacturer's instructions.

Statistical analyses of assessed polymorphisms

Statistical analyses were carried out on SNPStats, available at http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web, and R software (<https://www.r-project.org/>). Hardy–Weinberg equilibrium was tested for both *Cdx-2* and *FokI* polymorphisms using chi-square (χ^2) test p-values, to compare observed and expected genotype and allele frequencies. Differences in allelic and genotypic

frequencies from SNPs between TS patients and HC were assessed using χ^2 and Fisher's exact test. Odds Ratio (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) were obtained and a p-value < 0.05 was considered statistically significant. Allele and genotype distribution of *Cdx-2* and *FokI* SNPs were evaluated in TS patients and HC. To uncover a possible association between genotypes and clinical features, we compared the polymorphism distribution within TS patients displaying or not clinical features. The power analysis (Post-hoc goodness of fit χ^2 tests) was carried out using the G* Power software (version 3.1.9.2, available at <http://www.gpower.hhu.de/>), with an α error probability of 0.05.

RNA Extraction

Peripheral whole blood from 15 of our TS patients and 15 HC was collected in EDTA-containing tubes. Total RNA was isolated using Trizol® Reagent (Invitrogen) following manufacturer's instructions. Quality control of samples was performed through spectrophotometry (Nanodrop 2000c - Thermo Scientific) for nucleic acids. In addition, RNA integrity was assessed through electrophoresis, performed on 0.8% agarose gel.

cDNA synthesis and VDR expression assays

Reverse transcription was performed with a GoScript™ Enzyme Mix included in GoScript™ Reverse Transcription Mix kit, Oligo (dT) (Promega). cDNA products were used in RT- qPCR, for the target, and *GUSB* (Glucuronidase Beta) reference genes. Gene expression assays were carried out according to standards by Livak & Schmittgen [21]. Taqman-type fluorogenic probes (Thermo Fisher Scientific) were used to target *VDR* (Assay ID Hs00172113_m1). Expression

assays for *GUSB* were performed using SyBR Green mix and the following primer set: F'-CACTGTGGCTGTCACCAAGA and R'-TCCGCATCCTCATGCTTGTT. Assays were made in biological duplicates and technical triplicates. Relative quantification assays were performed on an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System and $2^{-\Delta\Delta C_t}$ as method for gene expression analysis. To assess whether our samples were normally distributed we carried out the Shapiro–Wilk test. Finally, statistical analyses were performed using nonparametric Mann-Whitney test, with a 5% significance level ($p < 0.05$) to uncover differences between groups. Statistical analyses were performed using Excel software.

3. Results

- Karyotypes and clinical features of TS patients

One hundred women showed chromosomal alterations compatible with TS. Karyotypes and clinical features are described in Table 1 and Table 2, respectively.

- VDR Cdx-2 (G>A) and FokI (C>T) distribution in TS patients and HC

Allele and genotype distributions of both *Cdx-2* and *FokI* VDR polymorphisms in TS patients, as well as in HC are shown in Table 3. Genotype frequencies in both groups were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p > 0.05$). No significant differences in allelic and genotypic *Cdx-2* frequencies were detected between TS and HC ($p > 0.05$). Power analysis was 95.3 % (with α -error of 5% confidence) to detect a medium effect size ($w = 0.3$) for *Cdx-2* genotypes in both TS and HC.

Allelic and genotypic frequencies of *FokI* polymorphism were significantly different between TS and HC. The T allele showed a risk effect in TS patients when compared to HC ($p = 0.006$, OR = 1.80, 95% CI 1.16 - 2.79). The T/T genotype frequency was statistically higher in TS patients than HC (codominant model: $p = 0.01$, OR = 3.59, 95% CI 1.36-9.46). Furthermore, T/T risk genotype was statistically more prevalent in TS patients when compared to HC in a recessive model (T/T vs. C/C-C/T: $p = 0.02$, OR = 2.97; 95% CI 1.17-7.54). The power analysis indicated the statistical power of 99.9 % (with 5% confidence) to detect a medium effect size ($w = 0.3$) for *FokI* genotypes in patients *versus* HC.

- *VDR* polymorphisms and clinical features of TS patients

One of the goals of the present study was to uncover a possible association between *Cdx-2* and *FokI* variants to different clinical conditions in TS. Therefore, we divided TS patients in two major categories: (1) TS patients with thyroid autoimmune diseases, inflammatory conditions and osteopenia / osteoporosis; and (2) TS patients without these clinical features. Allele and genotype distributions from both *Cdx-2* and *FokI* polymorphisms of *VDR* gene in TS patients are described in Table 4. No significant differences were detected among groups with respect to allelic and genotypic frequencies of *Cdx-2* and *FokI* variants ($p > 0.05$).

- *VDR* expression assay

Karyotypes, *Cdx-2* and *FokI* polymorphisms and clinical data of TS patients included in *VDR* expression assay are described in Table 5. To compare *VDR* mRNA levels between TS patients and HC, a relative gene expression assay was

performed. There was a statistically significant difference in *VDR* gene expression profiles among TS (-2.84 FC) and HC ($p=1,533e^{-6}$), characterized by *VDR* downregulation in TS patients (Figure 1).

- *VDR* expression in *Cdx-2* and *FokI* genotype variants

To test whether expression of *VDR* genotype variants differ in TS individuals, we assessed the expression levels of *Cdx-2* (G>A) and *FokI* (C>T). Our results showed no significant *VDR* expression differences amongst individuals with distinct *Cdx-2* genotypes ($p > 0.05$) (Figure 2). Conversely, our analyses with *FokI* demonstrated that both C/T (11.24 FC; $p = 0.01$) and T/T (9.20 FC; $p = 0.01$) genotypes were associated with up-regulation of *VDR* expression when compared to the C/C reference genotype (Figure 3).

4. Discussion

Immunological imbalance has been described in TS individuals [4, 22], but genetic processes responsible for the associated clinical conditions are poorly understood. It is known however, that genetic polymorphisms can play a key role in susceptibility to disease development. Therefore, we have analyzed *Cdx-2* and *FokI* polymorphisms of *VDR* to provide insights on whether these polymorphisms are correlated with clinical conditions in TS patients. Our analyses have shown that in TS patients *FokI* allele (T) and genotype (T/T) frequencies were statistically higher than in our HC. However, no statistical differences were detected for *Cdx-2* SNPs between TS and control. Other studies, such as that of Bianco *et al.* [17] did not find statistical differences in *FokI* allele and genotypes frequencies among TS

patients and control group. Together, the available data cannot rule out that there is a differential distribution of *FokI* polymorphisms in ST patients, and this specific SNPs should be targeted in further investigations to understand how immunology-related SNPs are organized in ST patients when compared to healthy people.

No association was detected between *VDR* polymorphisms within TS patients and the development of osteopenia / osteoporosis (11 out of the 100 women, 11%). Our results differ from the analysis performed by Peralta López *et al.* [16], which demonstrated that T/T *FokI* genotype in TS patients was more associated with osteopenia than expected by chance when compared to patients with other genotypes. Furthermore, in our assessed group, we did not find an association between inflammatory (15 out of the 100 women, 15%) and autoimmune conditions (16 out of the 100 women, 16%) with *Cdx-2* and *FokI VDR* polymorphisms. Similar outcomes were obtained by Bianco *et al.* [17], in which allelic and genotypic frequencies were not statistically different between TS patients with thyroid alterations.

Therefore, it is still difficult to establish a causal relationship between genetic composition and immunity-related diseases in TS. The causes of increased frequency of inflammatory/autoimmune diseases in TS patients are still not sufficiently clarified, and different pathways can be associated to their pathogenesis. Thus far, no consistent association between clinical conditions in TS patients and polymorphic variants of *VDR* has been established among different studies. At this point we cannot rule out that sampling or geography might be responsible for differential results of association of genotype and disease. Other factors might also hinder a proper correlation of *VDR* polymorphism and clinical phenotypes. For example, our patient group represented a small number of

affected women, which is probably due their young age (average of 11.62 years old $-SD\pm 7.58$), who could develop clinical symptoms only later in life. Another problem is the absence of frequent clinical follow-ups, which might contribute to an increased number of “false negatives” in our affected TS patients pool.

Because disease might sometimes be best correlated to expression profile rather than genotype, we investigated *VDR* gene expression in a TS cohort versus our HC. Our results showed that *VDR* is downregulated in TS patients when compared to HC. Modifications in several immune system cells, such as Th1, Th17, Th2 and Treg, are performed by interaction of VITD and VDR-RXR heterodimer with VDREs in promoter regions of different genes [23]. Given VITD acts as a modulator of immune response through its receptor, appropriate VDR levels are important for the maintenance of immunity cells balance. This is particularly true in TS patients, in which this negative effect may lead to a permanent immune imbalance. Thus, we suggest that these differences in gene expression might play a role in disease susceptibility in TS, given that reduced levels of VDR may compromise the function performed by immune system cells.

Increased *VDR* expression in different cell types has been associated with estrogen levels [24]. Because TS patients commonly show primary/secondary amenorrhea and hypergonadotropic hypogonadism, hormone replacement is usually necessary [2, 25]. The hormone effects are mediated by the alpha and beta estrogen receptor (ER), and different immune cells such as monocytes, T cells, and B cells express transcripts of ER [26]. In summary, estrogens act in the immune system and modulate inflammation-associated processes [27]. Thereby we suggest that, given that chronic estrogen deficiency affects about 95% to 98%

of TS patients, low levels of VDR mRNA in TS may be linked to their estrogen profile.

An association between *FokI* polymorphisms and *VDR* gene expression was detected within TS patients. Namely, T/T and C/T *VDR* genotypes were up-regulated when compared to C/C genotype. We speculate that T/T and C/T genotypes enhance *VDR* mRNA expression as a compensation mechanism, due to the lower efficiency of *FokI* T protein (427 amino acid), which has been associated to lower biological activity [28]. However, it is still necessary to investigate additional pathways that may be contributing to low levels of mRNA *VDR* observed in our TS patients. *VDR* expression can be regulated at different levels; thus promoter elements and transcription factors may be responsible for the decreased *VDR* expression detected in our analysis.

In conclusion, we detected different distribution from *FokI* polymorphism in TS patients, besides that, down – regulation *VDR* gene expression may confer, at least in part an immunological imbalance in TS individuals.

Acknowledgements

The authors wish to thank the patients, parents, and clinicians for availability that facilitated our data acquisition.

Conflicts of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Stochholm K, Juul S, Juel K, Naeraa RW, Gravholt CH. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3897-3902.
2. Gravholt CH, Andersen NH, Conway GS, et al. International Turner Syndrome Consensus Group. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. *Eur J Endocrinol* 2017; 177:G1-G70.
3. Jørgensen KT, Rostgaard K, Bache I, et al. Autoimmune Diseases in Women With Turner's Syndrome. *ARTHRITIS & Rheumatism*. 2010; 62(3): 658–666.
4. Bakalov VK, Gutin L, Cheng CM, et al. Autoimmune disorders in women with turner syndrome and women with karyotypically normal primary ovarian insufficiency. *J Autoimmun*. 2012; 38 (4): 315–321.
5. Grossi A, Crinò A, Luciano R, Lombardo A, Cappa M, Fierabracci A. Endocrine autoimmunity in Turner syndrome. *Ital J Pediatr*. 2013; 20 (39): 79.
6. Witkowska-Sędek E, Borowiec A, Kucharska A, et al. Thyroid Autoimmunity in Girls with Turner Syndrome. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1022: 71-76.
7. Livadas S, Xekouki P, Fouka F, et al. Prevalence of thyroid dysfunction in Turner's syndrome: a long-term follow-up study and brief literature review. *Thyroid*. 2005;15(9):1061-6.
8. Gawlik A, Gawlik T, Januszek-Trzciakowska A, Patel H, Malecka-Tendera E. Incidence and dynamics of thyroid dysfunction and thyroid autoimmunity

- in girls with Turner's syndrome: a long-term follow-up study. *Horm Res Paediatr*. 2011;76(5):314-20.
9. Basit S. Vitamin D in health and disease: a literature review. *Br J Biomed Sci*. 2013;70(4):161-72.
 10. Guillot X, Semerano L, Saidenberg-Kermanac'h N, Falgarone G, Boissier MC. Vitamin D and inflammation. *Joint Bone Spine*. 2010;77(6):552-7.
 11. Kamen DL, Tangpricha V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(5):441-50.
 12. Holick, MF. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. *Rev Endocr Metab Disord* 2017. 18(2):153-165.
 13. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev*. 2008; 29(6):726-76.
 14. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr Opin Pharmacol*. 2010;10(4):482-96.
 15. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms *Gene*. 2004;338(2):143-56.
 16. Peralta López M, Miras M, Silvano L, et al. Vitamin D receptor genotypes are associated with bone mass in patients with Turner syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2011; 24 (5-6): 307-12.
 17. Bianco B, Verreschi IT, Oliveira KC, Guedes AD, Barbosa CP, Lipay MV. Analysis of vitamin D receptor gene (VDR) polymorphisms in Turner syndrome patients. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28 (4): 326-9.

18. Peralta López M, Centeno V, Miras M, et al. Association of vitamin D receptor gene Cdx2 polymorphism with bone markers in Turner syndrome patients. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2012; 25(7-8):669-71.
19. World Medical Association. Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 2013; 310 (20): 2191-2194.
20. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. *ISCN 2013: an international system for human cytogenetic nomenclature.* Karger; 2013.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *METHODS* 2001; **25**: 402–408.
22. Su MA, Stenerson M, Liu W, et al. The role of X-linked FOXP3 in the autoimmune susceptibility of Turner Syndrome patients. *Clin Immunol.* 2009 Apr;131(1):139-44.
23. Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE, Gershwin ME. The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013;45(2):217-26.
24. Liel Y, Shany S, Smirnoff P, Schwartz B. Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinology.* 1999;140(1): 280-5.
25. Gravholt CH. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. *Eur J Endocrinol* 2004;151: 657-87.
26. Suenaga R, Evans MJ, Mitamura K, Rider V, Abdou NI. Peripheral blood T cells and monocytes and B cell lines derived from patients with lupus express estrogen receptor

transcripts similar to those of normal cells. *J Rheumatol.* 1998 Jul;25(7):1305-12.

27. Straub RH. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews* 2007; 28(5):521–574.
28. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, et al. A Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in the Translation Initiation Codon: Effect on Protein Activity and Relation to Bone Mineral Density in Japanese Women. *J Bone Miner Res.* 1997;12(6):915-21.

Table 1 - Chromosomal alterations compatible with Turner syndrome in 100 analyzed individuals

Karyotypes	N (%)
45,X	50 (50%)
45,X/46,i(Xq)	17 (17%)
45,X/46,X,r(X)	6 (6%)
46,X,i(Xq)	6 (6%)
45,X/46,XY	4 (4%)
other chromossomal constitutions	17 (17%)

Table 2 - Clinical features of the 100 patients with Turner syndrome

Clinical Feature	n
Short stature	77
Skeletal abnormalities	58 ^A
Osteopenia/osteoporosis	11
Sexual infantilism	100 ^B
Primary amenorrhea	36
Dyslipidemia	6
Autoimmune thyroid disease	16
Alopecia	2
Inflammatory diseases	15
Infectious diseases	6
Neurological disease	23
Cardiovascular disease	18
Renal malformations	10
Skin diseases	17
Edema	36
Mammary hypertelorism	25
Hearing impairment	10
Ear malformations	25
Muscle hypotonia	3
Arched palate	7
Nails malformations	33
Anatomic eye alterations	13
Visual impairment	2
Short and webbed neck	39
Low posterior hairline	27
Skin redundancy in the neck	19

^aMain clinical conditions are cubitus valgus, pectus scavatum and genu valgus;

^bAbsent mammary development, absent axillary and pubic hair, hypoplastic uterus and absent ovaries;

Table 3 - Allele and genotype distribution of *VDR* polymorphisms in TS patients and HC

Model	Polymorphism	Patients n (%)	Controls n (%)	Odds ratio (95% CI)	p-value
<i>Cdx-2</i> rs11568820					
Codominant	Allele	194	232		
	G	119 (61%)	143 (62%)	1.00	
	A	75 (39%)	89 (38%)	1.01(0.67-1.52)	1.0
	Genotype	97	116		
	G/G	40 (41.2%)	41 (35.3%)	1.00	
	G/A	39 (40.2%)	61 (52.6%)	0.66 (0.36-1.19)	0.18
	A/A	18 (18.6%)	14 (12.1%)	1.32 (0.58-3.00)	0.54
<i>FokI</i> rs2228570					
Codominant	Allele	200	232		
	C	126 (63%)	175 (75%)	1.00	
	T	74 (37%)	57 (25%)	1.80 (1.16-2.79)	0.006*
	Genotype	100	116		
	C/C	42 (42%)	66 (56.9%)	1.00	
	C/T	42 (42%)	43 (37.1%)	1.53 (0.86-2.73)	0.14
	T/T	16 (16%)	7 (6%)	3.59 (1.36-9.46)	0.01*
Recessive	Genotype	100	116		
	C/C-C/T	84 (84%)	109 (94%)	1.00	
	T/T	16 (16%)	7 (6%)	2.97 (1.17-7.54)	0.02*

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

*Significant difference using Fisher's exact test.

Table 4. Relationship between *Cdx-2* and *Fok I* polymorphisms with clinical conditions in TS patients

		Autoimmune diseases				Inflammatory conditions				Osteopenia/osteoporosis			
Polymorphism		Absence	Presence	OR (95% CI)	p-value	Absence	Presence	OR (95% CI)	p-value	Absence	Presence	OR (95% CI)	p-value
<i>Cdx-2</i>	Allele												
	G	89 (62%)	23 (72%)	1.00		93 (64%)	19 (63%)	1.00		99 (63%)	13 (65%)	1.00	
	A	55 (38%)	9 (28%)	0.63(0.24-1.55)	0.32	53 (36%)	11 (37%)	1.01(0.40-2.44)	1.0	57 (37%)	7 (35%)	0.93(0.29- 2.69)	1.0
	Genotype												
	G/G	29 (40.3%)	10 (62.5%)	1.00		32 (43.8%)	7 (46.7%)	1.00		35 (44.9%)	4 (40%)	1.00	
	G/A	31 (43.1%)	3 (18.8%)	0.28 (0.07-1.12)	0.15	29 (39.7%)	5 (33.3%)	0.79 (0.23-2.76)	0.88	29 (37.2%)	5 (50%)	1.51 (0.37-6.14)	0.68
<i>Fok I</i>	A/A	12 (16.7%)	3 (18.8%)	0.72 (0.17-3.11)		12 (16.4%)	3 (20%)	1.14 (0.25-5.16)		14 (17.9%)	1 (10%)	0.63 (0.06-6.09)	
	Allele												
	C	88 (61%)	23 (72%)	1.00		87 (60%)	24 (80%)	1.00		99 (63%)	13 (59%)	1.00	
	T	56 (39%)	9 (28%)	0.61(0.23-1.50)	0.31	59 (40%)	6 (20%)	0.37(0.11- 1.00)	0.03	57 (37%)	9 (41%)	1.20 (0.42-3.25)	0.81
	Genotype												
	C/C	30 (41.7%)	7 (43.8%)	1.00		27 (37%)	10 (66.7%)	1.00		32 (41%)	5 (45.5%)	1.00	
	C/T	28 (38.9%)	9 (56.2%)	1.38 (0.45-4.20)	0.03	33 (45.2%)	4 (26.7%)	0.33 (0.09-1.16)	0.09	35 (44.9%)	3 (27.3%)	0.55 (0.12-2.48)	0.42
	T/T	14 (19.4%)	0 (0%)	0.00 (0.00-NA)		13 (17.8%)	1 (6.7%)	0.21 (0.02-1.80)		11 (14.1%)	3 (27.3%)	1.75 (0.36-8.53)	

OR=odds ratio; CI=confidence interval

Table 5 - Karyotypes, *Cdx-2* and *FokI* polymorphisms, and clinical data of TS patients included in *VDR* expression assay

Patients TS	Karyotypes	<i>VDR</i> genotypes		Clinical conditions
		<i>Cdx-2</i>	<i>FokI</i>	
1	45,X/46,X,i(Xq)	-	C/T	Osteopenia
2	46,X,i(Xq)/45,X	A/G	C/C	Thyroid autoimmune conditions
3	46,X,i(Xq)/45,X	A/A	C/T	Thyroid autoimmune conditions
4	45,X/46,X,i(Xq)	A/A	C/C	Absence of inflammatory/autoimmune or osteopenia/osteoporosis
5	45,X	G/G	C/T	Osteoporosis/ thyroid autoimmune conditions
6	45,X/46,X,r(X)	A/G	C/C	Absence of inflammatory/autoimmune or osteopenia/osteoporosis
7	45,X	A/G	T/T	Absence of inflammatory/autoimmune or osteopenia/osteoporosis
8	45,X/ 46,X,+mar	A/A	C/T	Thyroid autoimmune conditions
9	46,X,i(Xq)	G/G	C/T	Absence of inflammatory/ thyroid autoimmune or osteopenia/osteoporosis
10	46,X,i(Xq)/45,X	G/G	C/C	Absence of inflammatory/ thyroid autoimmune or osteopenia/osteoporosis
11	45,X	G/G	T/T	Inflammatory conditions
12	46,X,del(X)(q22)/45,X	G/G	C/T	Inflammatory/autoimmune conditions
13	45,X	A/G	T/T	Absence of inflammatory/ thyroid autoimmune or osteopenia/osteoporosis
14	46,X,i(Xq)/45,X	G/G	T/T	Osteopenia
15	45,X	A/G	T/T	Absence of inflammatory/autoimmune or osteopenia/osteoporosis

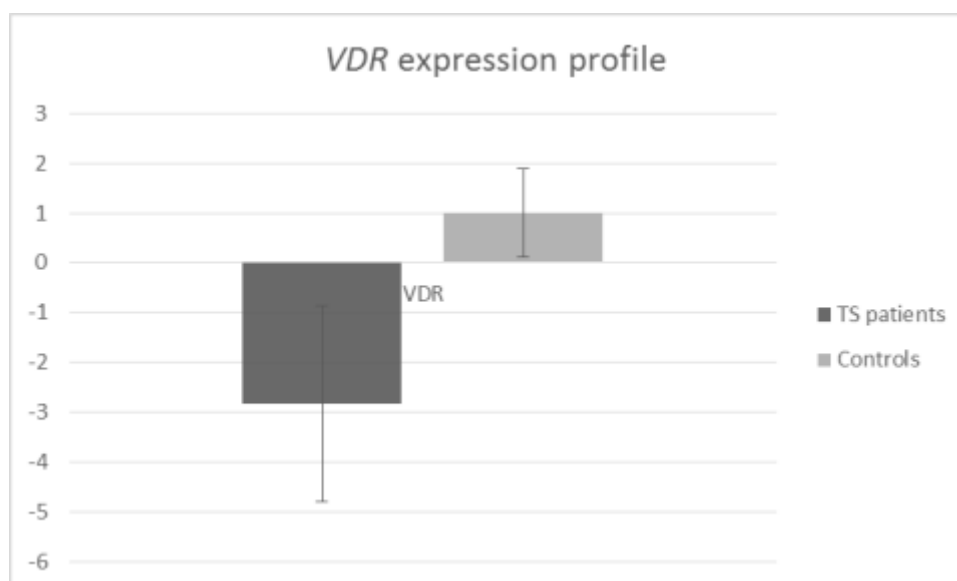


Figure 1 - VDR mRNA levels in TS patients and healthy controls. VDR expression was downregulated (-2.8 FC) in TS patients when compared to HC (n = 15; $p < 0.001$).

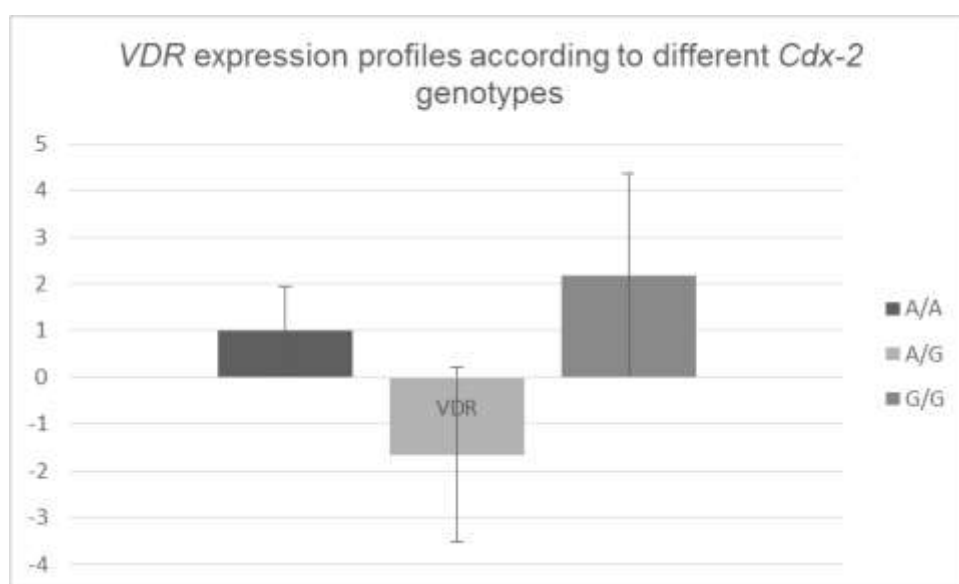


Figure 2 - VDR expression in TS patients according to each Cdx-2 polymorphism. There is no significant difference of VDR mRNA levels in TS when G/G genotype was compared to A/A and A/G genotypes ($p > 0.05$).

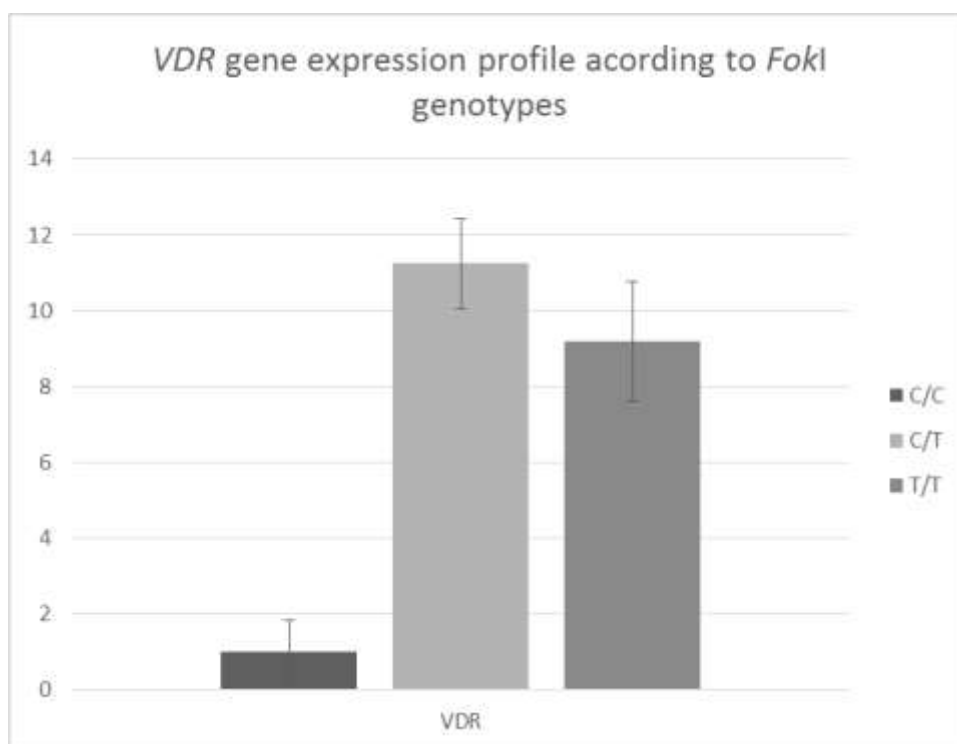


Figure 3 - *VDR* gene expression in TS patients according to each *FokI* genotype. There is a statistical difference between *VDR* mRNA levels when C/T and T/T genotypes were compared to CC genotype ($p < 0.001$).

6 DISCUSSÃO GERAL

A ST é uma das mais comuns alterações cromossômicas, sendo detectada em cerca de 1 a cada 1:2500 nascimentos vivos do sexo feminino (STOCHHOLM et al., 2006). Gravholt et al. (2017) recomendam considerar um diagnóstico de ST em mulheres com estigmas clínicos inerentes à síndrome, que sejam portadoras de um cariótipo contendo um cromossomo X normal e perda total ou parcial do segundo cromossomo sexual.

A confirmação da ST é frequentemente realizada em faixas etárias distintas e, na presente amostra, a média foi 11 anos de idade no momento do diagnóstico. Nessas pacientes, a baixa estatura foi uma manifestação clínica bastante prevalente, assim como infantilismo sexual e malformações esqueléticas. O diagnóstico da ST deve ser considerado primordialmente em indivíduos com fenótipo feminino, apresentando retardo de crescimento e atraso puberal, associado ou não a diversas características clínicas como linfedema, unhas hipoplásicas e pescoço curto e alado (GRAVHOLT et al., 2017).

As pacientes incluídas neste estudo também apresentaram doenças autoimunes, condições inflamatórias e infecciosas. Um elevado risco para o desenvolvimento de doenças autoimunes na ST, bem como processos inflamatórios têm sido relatado. Entretanto, os mecanismos etiológicos relacionados à imunidade não estão bem determinados.

O estudo realizado por Bakalov et al. (2012) confirmou uma associação entre o cariótipo contendo um i(Xq) em pacientes com ST e a presença de doenças autoimunes. Entretanto, essa associação não foi observada em outras análises (MORTENSEN et al., 2009; ELLEUCH et al., 2010; JØRGENSEN et al., 2010).

Embora um desbalanço imunológico seja detectado em pacientes ST, os mecanismos genéticos associados não estão bem estabelecidos. Objetivando identificar fatores genéticos de risco, uma possível associação entre os polimorfismos nos genes *PTPN-22*, *CTLA-4*, *MBL2*, *VDR* e o risco a diferentes manifestações clínicas em pacientes com ST foi realizada no presente trabalho. Adicionalmente, a avaliação do perfil de expressão do gene *VDR* também foi investigada.

Poucos estudos têm buscado uma associação entre a presença de diferentes condições clínicas na ST e polimorfismos genéticos. Bianco et al. (2010) apontaram que o polimorfismo G1858A do gene *PTPN22* pode ser um importante fator genético de predisposição ao risco de doenças autoimunes em pacientes com ST, provenientes da região sudeste do Brasil.

Na presente análise, não houve distribuição diferencial de alelos e genótipos do polimorfismo do gene *PTPN22* entre ST e grupo controle, bem como não foi possível estabelecer uma relação entre o SNP e as diferentes condições clínicas na ST. Resultados similares foram obtidos por Villanueva-Ortega et al. (2017), que analisaram 109 pacientes mexicanas portadoras da ST. Entretanto, a variante alélica 1858A do gene *PTPN22* tem sido associada como um fator de risco a diversas doenças autoimunes (BURN et al., 2011; ZHEBRUM et al., 2011; GALVANI; FOUSTERI, 2017).

Estudos avaliando o papel de polimorfismos dos genes *MBL2* e *CTLA-4* frente às condições clínicas na ST ainda não tinham sido realizados. Desta forma, a presente análise demonstrou que em relação ao gene *CTLA-4*, uma associação do genótipo A/G do *CTLA-4* +49 com proteção em pacientes ST ($p=0.043$). Adicionalmente, o genótipo *CTLA-4* G/G foi associado ao risco de desenvolver obesidade em pacientes ST ($p=0.02$) quando comparado a pacientes ST com outros genótipos.

Em relação a região promotora -550(H/L) do *MBL2*, o genótipo H/L foi significativamente maior em pacientes comparadas ao controle ($p=0.01$). Além disso, nenhuma associação pôde ser estabelecida entre os SNPs -221 (X/Y), -550(H/L) e éxon 1 e as condições clínicas avaliadas. Entretanto, diferentes estudos têm apontado uma relação desses polimorfismos genéticos como fatores de risco a diferentes doenças infecciosas, inflamatórias, pulmonares e hematológicas (SCHMIEGELOW et al., 2002; IM et al., 2012; KIM et al., 2017).

As ações biológicas, incluindo as funções imunomoduladoras da VITD são mediadas pelo seu receptor VDR. Diferentes SNPs no gene *VDR* têm sido avaliados em pacientes ST, dentre eles o *FokI* (C/T), no éxon 2, e *Cdx-2* (G/A), localizado na região promotora do gene, que são os polirmosfismos funcionais. Além disso, outros SNPs foram analisados em pacientes ST, dentre eles os *BsmI* (A/G), *Apal* (G/T) e

TaqI (T/C) presentes na região 3' UTR do gene *VDR* (PERALTA LÓPEZ et al., 2011; BIANCO et al., 2012; PERALTA LÓPEZ et al., 2012).

A frequência do alelo T ($p = 0.006$) e do genótipo T/T ($p=0.01$) de *FokI* do gene *VDR* foi significativamente maior em pacientes ST quando comparadas aos controles. Entretanto, nenhuma distribuição diferencial de *Cdx-2* no gene *VDR* foi detectada em pacientes ST com relação ao grupo controle. Além disso, não foi possível estabelecer uma relação entre *FokI* e *Cdx-2* e as características clínicas avaliadas.

No que se refere às análises de expressão do gene *VDR*, níveis reduzidos foram detectados em pacientes ST (-2.84 FC) comparados ao controle ($p<0.001$). Adicionalmente, em relação ao SNP *FokI*, pacientes portadoras dos genótipos T/T and C/T exibiram níveis aumentados quando comparadas às pacientes com genótipo C/C. Dado que VIT D atua como um modulador das respostas imunes através do seu receptor, níveis adequados de *VDR* são importantes para a manutenção do equilíbrio das células que compõe o sistema immune.

Nesse trabalho sugerimos que a distribuição diferencial de polimorfismos nos genes *CTLA-4*, *MBL2* e *VDR*, e os níveis reduzidos de expressão do gene *VDR* nas pacientes ST podem conduzir a um desbalanço imunológico nessas pacientes.

7 CONCLUSÕES

1. Nossos resultados indicaram uma distribuição diferencial de polimorfismos nos genes *CTLA-4*, *MBL2* e *VDR* em pacientes ST com relação ao grupo controle. O entendimento de como genes associados ao sistema imune estão relacionados a ST, poderá ajudar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas, apontando para novas linhas de pesquisa visando melhorar a qualidade de vida de pacientes ST;
2. Uma associação foi estabelecida entre o polirmorfismo *CTLA-4* +49A/G e obesidade nas pacientes ST;
3. A detecção de níveis reduzidos de expressão do gene *VDR* nas pacientes ST, pode ser um dos fatores relacionados ao desbalanço imunológico. Uma vez que a vitamina D atua como imunomodulador através do VDR, níveis reduzidos desse receptor podem comprometer a função desempenhada pelas células do sistema imune, levando a uma deficiência imunológica.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, N.; GUPTA, M.; WANGNOO, S.K. Turner's syndrome. **Apollo Medicine**, v.6, p.335-339, 2011.
- ALVAREZ-NAVA, F. et al. Elevated second-trimester maternal serum β -human chorionic gonadotropin and amniotic fluid alpha-fetoprotein as indicators of adverse obstetric outcomes in fetal Turner syndrome. **J Obstet Gynaecol Res**, v.41, p.1891-1898, 2015.
- ARAUJO, A.; RAMOS, E.S. Cryptic mosaicism involving a second chromosome X in patients with Turner syndrome. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, p.368-372, 2008.
- ARAUJO, J. et al. Mannose binding lectin gene polymorphisms and associated autoimmune diseases in type 1 diabetes Brazilian patients. **Clin Immunol**, v.131, p.254-259, 2009.
- BAEKE, F. et al. Vitamin D: modulator of the immune system. **Curr Opin Pharmacol**, v.10, p.482-496, 2010.
- BELTRAME, M.H., et al. The Lectin Pathway of Complement and Rheumatic **Heart Disease Front Pediatr**, v.2, p.1-14, 2015.
- BIANCHI, I. et al. The X chromosome and immune associated genes. **J Autoimmun**, v.38, p.187-192, 2012.
- BIANCO, B. et al. SRY gene increases the risk of developing gonadoblastoma and/or nontumoral gonadal lesions in Turnersyndrome. **Int J Gynecol Pathol**, v.28, p.197-202, 2009.
- BIANCO, B. et al. PTPN22 polymorphism is related to autoimmune disease risk in patients with Turner syndrome, **Scand J Immunol**, v.72, p.256-259, 2010.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v.447, p.396-398, 2007.
- BISPO, A.V.S. et al. Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype. **Genet Mol Res**, v.12, p.4243-4250, 2013a.
- BISPO, A.V.S. et al. Y chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.A-G, 2013b.
- BOTTINI, N. et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. **Nat Genet**, v.36, p.337-338, 2004.
- BOTTINI, N; PETERSON, E.J.
Tyrosine phosphatase PTPN22: multifunctional regulator of immune signalin, development, and disease. **Annu Rev Immunol**, v.32, p.83-119, 2013.

BOUAYED ABDELMOULA, N. et al. Turner syndrome female with a small ring X chromosome lacking the XIST, an unexpectedly mild phenotype and an atypical association with alopecia universalis. **Ann Genet**, v.47, p.305-313, 2004.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocr Rev**, v.29, p.726-776, 2008.

BOUWMAN, L.H.; ROEP, B.O.; ROOS, A. Mannose-binding lectin: clinical implications for infection, transplantation, and autoimmunity. **Hum Immunol**, v.67, p.247-256, 2006.

BRONSHTEIN, M.; ZIMMER, E.Z.; BLAZER, S. A characteristic cluster of fetal sonographic markers that are predictive of fetal Turner syndrome in early pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, v.188, p.1016-1020, 2003.

BUCERZAN, S. et al. Clinical and genetic characteristics in a group of 45 patients with Turner syndrome (monocentric study). **Ther Clin Risk Manag**, v.13, p.613-622, 2017.

BURÉGIO-FROTA, P. et al. Identification of a de novo inv dup(X)(pter-->q22) by multicolor banding in a girl with Turner syndrome. **Genet Mol Res**, v.27, p.780-784, 2010.

BURN, G.L. et al. Why is PTPN-22 a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease? **FEBS Lett**, v.585, p.3689-3698, 2011.

CAPPELLA, M. et al. Hyperinsulinemic Hypoglycaemia in a Turner Syndrome with Ring (X). **Case Rep Pediatr**, v.2015, p.1-4, 2015.

CARVALHO, A.B. et al. Cardiovascular and renal anomalies in Turner syndrome. **Rev Assoc Med Bras**, v.56, p.655-659, 2010.

CHEN, M.; DAHA, M.R.; KALLENBERG, C.G. The complement system in systemic autoimmune disease. **J Autoimmun**, v.34, p.276-286, 2010.

COHEN, S. et al. Cloning and characterization of a lymphoid-specific, inducible human protein tyrosine phosphatase, Lyp. **Blood**, v.93, p.2013-2024, 1999.

CHRISTAKOS, S. et al. Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. **Physiol Rev**, v.96, p.365-408, 2016.

DARIAVACH, P. et al. Human Ig superfamily CTLA-4 gene: chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. **Eur J Immunol**, v.18, p.1901-1905, 1988.

DAVIDSON, A; DIAMOND, B. Autoimmune diseases. **The New England journal of medicine**, v.345, p.340-350, 2001.

DE LA PUERTA, M.L. et al. The autoimmunity risk variant LYP-W620 cooperates with CSK in the regulation of TCR signaling. *PLoS One*, v.8, p.1-11, 2013.

DEL REY, G. et al. Trisomy of the short stature homeobox-containing gene (SHOX) due to duplication/deletion of the X chromosome: clinical implications on the stature. *Horm Res Paediatr*, v.74, p.297-304, 2010.

DJORDJEVIĆ, V.A. et al. Cytogenetic findings in Serbian patients with Turner's syndrome stigmata. *Genet Mol Res*, v.9, p.2213-2221, 2010.

DOMMETT, R.M.; KLEIN, N.; TURNER, M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens*, v.68, p.193-209, 2006.

EISEN, D.P.; MINCHINTON, R.M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis*. v.37, p.496-505, 2003.

ELLEUCH, M. et al. Descriptive analyses of Turner syndrome: 49 cases in Tunisia. *Ann Endocrinol*, v.71, p.111-6, 2010.

EL-MANSOURY, M. et al. Hypothyroidism is common in Turner syndrome: results of the five-year follow-up. *J Clin Endocrinol Metab*, v.90, p.2131-5, 2005.

ELSHEIKH, M. et al. Turner's syndrome in adulthood. *Endocr Rev*, v.23, p.120-40, 2002.

FIORILLO, E. et al. Autoimmune associated PTPN22 R620W variation reduces phosphorylation of lymphoid phosphatase on an inhibitory tyrosine residue. *J Biol Chem*, v.285, p.26506-18, 2010.

FRERIKS, K. et al. Buccal cell fish and blood pcr-y detect high rates of x chromosomal mosaicism and y chromosome derivatives in patients with turner syndrome. *Eur J Med Genet*, v.56, p.497-501, 2013.

FRUMAN, D.A.; WALSH, C.M. Signal transduction and autoimmunity: Introduction. *Autoimmunity*, v.40, p.403-404, 2007.

GALVANI, G.; FOUSTERI, G. PTPN22 and islet specific autoimmunity: What have the mouse models taught us? *World J Diabetes*, v.8, p.330-336, 2017.

GARRED, P. et al. MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3-The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. *Mol Immunol*, v.46, p.2737-44, 2009.

GOUGH, S.C.; WALKER, L.S.; SANSOM, D.M. CTLA4 gene polymorphism and autoimmunity. *Immunol Rev*, v.204, p.102-15, 2005.

GRAVHOLT, C.H. et al. Morbidity in Turner Syndrome. *J Clin Epidemiol*, v.51, p.147-158, 1998.

GRAVHOLT, C.H. et al. International Turner Syndrome Consensus Group. Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: pro

ceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting. **Eur J Endocrinol**, v.177, p.G1-G70, 2017.

GREGERSEN, P.K.; BEHRENS, T.W. Genetics of autoimmune diseases - disorders of immune homeostasis. **Nature Reviews Genetics**, v.7, p.917-928, 2006.

GROSSI, A. et al. Endocrine autoimmunity in Turner syndrome. **Ital J Pediatr**, v.20, p.39-79, 2013.

GUILLOT, X. et al. Vitamin D and inflammation. **Joint Bone Spine**, v.77, p.552-7, 2010.

HAAK, M.C. et al. Cardiac malformations in first trimester fetuses with increased nuchaltranslucency: ultrasound diagnosis and postmortem morphology. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v.20, p.14-21, 2002.

HJERRILD, B.E.; MORTENSEN, K.H.; GRAVHOLT, C.H. Turner syndrome and clinical treatment. **British Medical Bulletin**, v.86, p.77-93, 2008.

HOGQUIST, K.A.; BALDWIN, T.A.; JAMESON, S.C. Central tolerance: learning self-control in the thymus. **Nat Rev Immunol**, v.5, p.772-82, 2005.

HOLICK, M.F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. **Nutrition Reviews**, v.66, p.S182-S194, 2008.

HOLICK, M.F. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention. **Rev Endocr Metab Disord**, v.18, p.153-165, 2017.

HOOK, E.B.; WARBURTON, D. Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss. **Hum Genet**, v.133, p.417-24, 2014.

IM, C.H. et al. Mannose-binding lectin 2 gene haplotype in Korean patients with ankylosing spondylitis. **Rheumatol Int**, v.32, p.2251-5, 2012.

JANEWAY, C.A. JR.; MEDZHITOV, R. INNATE IMMUNE RECOGNITION. **Annu Rev Immunol**, v.20, p.197-216, 2002.

JØRGENSEN, K.T., et al. Autoimmune Diseases in Women With Turner's Syndrome. **ARTHRITIS & Rheumatism**, v.62, p. 658-666, 2010.

JUNG, M.P. et al. Diagnóstico da Síndrome de Turner: a experiência do Instituto Estadual de Diabetes e Endocrinologia - Rio de Janeiro, de 1970 a 2008. **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant**, v.10, p.117-124, 2010.

KANG, H.J. et al. Mannose-binding lectin without the aid of its associated serine proteases alters lipopolysaccharide-mediated cytokine/chemokine secretion from human endothelial cells. **Immunology**, v.122, p.335-342, 2007.

KAMEN, D.L.; TANGPRICHA, V. Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. **J Mol Med (Berl)**, v. 88, p.441-50, 2010.

KAWAI, T.; AKIRA, S. TLR signaling. **Cell Death Differ**, v.13, p.816-25, 2006.

KIM, J.S. et al. Association of Single-Nucleotide Polymorphisms of the MBL2 with Atopic Dermatitis in Korean Patients. **Ann Dermatol**, v.29, p.571-577, 2017.

KWON, A. et al. Risk of Gonadoblastoma Development in Patients with Turner Syndrome with Cryptic Y Chromosome Material. **Horm Cancer**, v.8, p.166-173, 2017.

KYEWSKI, B.; KLEIN, L. A Central Role for Central Tolerance. **Annu. Rev. Immunol**, v.24, p.571–606, 2006.

LARIZZA, D.; CALCATERRA, V.; MARTINETTI, M. Autoimmune stigmata in Turner syndrome: When lacks an X chromosome. **Journal of Autoimmunity**, v.33, p.25–30, 2009.

LEPAGE, J.F. et al. Genomic Imprinting Effects on Cognitive and Social Abilities in Prepubertal Girls with Turner Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.97, p.460-4, 2012.

LIEHR, T. et al. Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) in patients with a 45,X/46,X,+mar karyotype - 17 new cases and a review of the literature. **Sex Dev**, v.1; p.353-362, 2007.

LIPSCOMBE, R.J. et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. **Hum Mol Genet**, v.1, p.709-15, 1992.

LING, V. et al. Complete sequence determination of the mouse and human CTLA4 gene loci: cross-species DNA sequence similarity beyond exon borders. **Genomics**, v.60, p.341-55, 1999.

LINTNER, K.E. et al. Early Components of the Complement Classical Activation Pathway in Human Systemic Autoimmune Diseases. **Front Immunol**, v.7, p.1-22, 2016.

LISTON, A. et al. Genetic lesions in T-cell tolerance and thresholds for autoimmunity. **Immunological Reviews**, v.204, p.87–101, 2005.

LIU, A.X. et al. Increased risk of gonadal malignancy and prophylactic gonadectomy: a study of 102 phenotypic female patients with Y chromosome or Y-derived sequences. **Hum Reprod**, v.29, p.1413-9, 2014.

LLEO, A. et al. Definition of human autoimmunity--autoantibodies versus autoimmune disease. **Autoimmun Rev**, v.9, p.A259-66, 2010.

LLEO, A. et al. Autoimmunity and Turner's syndrome. **Autoimmunity Reviews** v.11, p.A538–A543, 2012.

MADSEN, H.O. et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding protein. **Immunogenetics**, v.40, p.37-44, 1994.

MADSEN, H.O. et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. **J Immunol**, v.155, p.3013-20, 1995.

MARQUI, A.B.T.; DA SILVA-GRECCO, R.L.; BALARIN, M.A.S. Prevalence of Y-chromosome sequences and gonadoblastoma in Turner syndrome. **Rev Paul Pediatr**, v.34, p.114–121, 2016.

MIGUEL-NETO, J. et al. New approach to phenotypic variability and karyotype-phenotype correlation in Turner syndrome. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v.29, p.475-9, 2016.

MORTENSEN, K.H. et al. Increased prevalence of autoimmunity in Turner syndrome –influence of age. **Clinical and Experimental Immunology**, v.156, p.205–210, 2009.

NAITO, H. et al. Characterization of human serum mannan-binding protein promoter. **J Biochem**, v.126, p.1004-1012, 1999.

NCBI. Disponível em:
<http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Explore?r=1:113834446-113835446;toggle_HGVS_names=open;v=rs2476601;vdb=variation;vf=1826947>.
Acesso em: 23 dez. 2017.

OAKS, M.K. et al. A native soluble form of CTLA-4. **Cell Immunol**, v.201, p.144-53, 2000.

OGDEN, C.A. et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. **J Exp Med**, v.194, p.781-95, 2001.

OLIVEIRA, R.M. et al. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. **Sao Paulo Med J**, v.127, p.373-8, 2009.

PAPP, C. et al. Prenatal diagnosis of Turner syndrome: report on 69 cases. **J Ultrasound Med**, v.25, p.711-7, 2006.

PASARE, C; MEDZHITOV, R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. **Microbes and Infection**, v.6, p.1382–1387, 2004.

PERALTA LÓPEZ, M. et al. Vitamin D receptor genotypes are associated with bone mass in patients with Turner syndrome. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v.24, p.307-12, 2011.

PERALTA LÓPEZ, M. et al. Association of vitamin D receptor gene Cdx2 polymorphism with bone markers in Turner syndrome patients. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v.25, p.669-71, 2012.

PORTNOÏ, M.F. et al. Familial Turner syndrome with an X;Y translocation mosaicism: implications for genetic counseling. **Eur J Med Genet**, v.55, p.635-40, 2012.

PRESANIS, J.S.; KOJIMA, M.; SIM, R.B. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). **Biochem Soc Trans**, v.31: p.748-52, 2003.

RADTKE, A.C. et al. Complexity in the diagnosis and management of 45,X Turner Syndrome mosaicism. **Urology**, v.84, p.919-21, 2014.

RANKE, M.B.; SAENGER, P. Turner's syndrome. **Lancet**, v.358, p.309-314, 2001.

RAO, E. et al. Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome. **Nat genet**, v.16, p.54-63, 1997.

SASTRY, K. et al. The human mannose-binding protein gene. Exon structure reveals its evolutionary relationship to a human pulmonary surfactant gene and localization to chromosome 10. **J Exp Med**, v.170, p.1175-89, 1989.

SAYEGH, M.H. Finally, CTLA4Ig graduates to the clinic. **J Clin Invest**, v.103, p.1223–1225, 1999.

SCHMIEGELOW, K. et al. Increased frequency of mannose-binding lectin insufficiency among children with acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v.100, p.3757–3760, 2002.

SEYFARTH, J; GARRED, P.; MADSEN, H.O. Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (mbi2) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. **Mol Immunol**, v.43, p.962-71, 2006.

SEO, G.H. et al. Turner syndrome presented with tall stature due to overdosage of the SHOX gene. **Ann Pediatr Endocrinol Metab**, v.20, p.110-3, 2015.

SILVA-GRECCO, R.L. et al. Identification of Y-Chromosome Sequences in Turner Syndrome. **Indian J Pediatr**, 83: 405-9, 2015.

SILVA, M.E.R.; MORY, D.; DAVINI, E. Marcadores genéticos e auto-imunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.52, p.166-180, 2008.

STANFORD, S.M.; BOTTINI, N. PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. **NAT REV RHEUMATOL**, v.10, p.602-11, 2014.

SINHA, A.A.; LOPEZ, M.T.; MCDEVITT, H.O. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. **Science**, v.248, p.1380-8, 1990.

STANFORD, S.M.; MUSTELIN, T.M.; BOTTINI, N. Lymphoid tyrosine phosphatase and autoimmunity: human genetics rediscovers tyrosine phosphatases. **Semin Immunopathol**, v.32, p.127–136, 2010.

STANFORD, S.M.; RAPINI, N.; BOTTINI, N. Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity. **Immunology**, v.137, p.1-19, 2012.

STAVROPOULOU, C. et al. Severe phenotype resulting from an active ring X chromosome in a female with a complex karyotype: characterization and replication study. **J Med Genet**, v.35, p.932-938, 1998.

STEFFENSEN, R. et al. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. **J Immunol Methods**, v.241, p.33-42, 2000.

STENBERG, A.E. et al. Immunological parameters in girls with Turner syndrome. **J Negat Results Biomed**, v.25, p.1-6, 2004

STOCHHOLM, K. et al. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, p.3897-3902, 2006.

SUMIYA, M. et al. Molecular basis of opsonic defect in immunodeficient children. **Lancet**, v.337, p.1569-70, 1991.

SURERUS, E.; HUGGON, I.C.; ALLAN, L.D. Turner's syndrome in fetal life. **Ultrasound Obstet Gynecol**, v.22, p.264-7, 2003.

SYBERT, V.P.; MCCAULEY, E. Turner's Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v.351, p.1227-1238, 2004.

TAYLOR, M.E. et al. Structure and evolutionary origin of the gene encoding a human serum mannose-binding protein. **Biochem J**, 262, p.763-71, 1989.

THIEL, S. et al. The concentration of the C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during an acute phase response. **Clin Exp Immunol**, v.90, p.31–35, 1992.

TOBÓN, G.J. et al. Are autoimmune diseases predictable? **Autoimmunity Reviews**, v.11, p.259–266, 2012.

TOMKINS, D.J. et al. Lack of expression of XIST from a small ring X chromosome containing the XIST locus in a girl with shortstature, facial dysmorphism and developmental delay. **Eur J Hum Genet**, v.10, p.44-51, 2002.

TING, W.H. et al. Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study. **PLoS One**, v.11, p.1-13, 2016.

TURNER, M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today**, v.17, p.532-40, 1996.

TURNER, M.W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Mol Immunol**, v.40, p.423-9, 2003.

UITTERLINDEN, A.G. et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. **Gene**, v.338, p.143-56, 2004.

URBACH, A.; BENVENITSY, B. Studying Early Lethality of 45,XO (Turner's Syndrome) Embryos Using Human Embryonic Stem Cells. **PLoS One**, v.4, p.1-9, 2009.

VALK, E.; RUDD, C.E.; SCHNEIDER, H. CTLA-4 trafficking and surface expression. **Trends Immunol**, v.29, p.272-279, 2008.

VANG, T. et al. Autoimmune-associated lymphoid tyrosine phosphatase is a gain-of-function variant. **Nat Genet**, v.37, p.1317-9, 2005.

VILLA, N. et al. A complete duplication of X chromosome resulting in a trisomic isochromosome originated by centromere repositioning. **Mol Cytogenet**, v.10, p.1-7, 2017.

VILLANUEVA-ORTEGA, E. et al. Analysis of PTPN22, ZFAT and MYO9B polymorphisms in Turner Syndrome and risk of autoimmune disease. **Int J Immunogenet**, v.44, p.153-157, 2017.

WANG, L.; WANG, F.S.; GERSHWIN, M.E. Human autoimmune diseases: a comprehensive update. **J Intern Med**, v.278, p.369-95, 2015.

WANG, S. et al. Identification of a variant form of tyrosine phosphatase LYP. **BMC Mol Biol**, v.11, p.1-7, 2010.

WANG, X.B. et al. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA-4 on human peripheral T cells. **Scand J Immunol**, v.54, p.453-8, 2001.

WU, J. et al. Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. **J Biol Chem**, v.281, p.11002-10, 2006.

XIAOHENG, C. et al. General and Specific Genetic Polymorphism of Cytokines-Related Gene in AITD. **Mediators Inflamm**, v. 2017, p.1-8, 2017.

YEŞİLKAYA, E. et al. Turner Syndrome and Associated Problems in Turkish Children: A Multicenter Study. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**, v.7, p.27-36, 2015.

YÜCE, O. et al. Gonadoblastoma with Dysgerminoma in a Phenotypically Turner-Like Girl with 45,X/46,XY Karyotype. **J Clin Res Pediatr Endocrinol**, v.7, p.336-339, 2015.

ZHEBRUN, D. et al. Association of PTPN22 1858T/T genotype with type 1 diabetes, Graves' disease but not with rheumatoid arthritis in Russian population. **Aging (Albany NY)**, v.3, p.368-73, 2011.

ZIKHERMAN, J. et al. *PTPN22* deficiency cooperates with the CD45 E613R allele to break tolerance on a non-autoimmune background. **J Immunol**, v.182, p.093-106, 2009.

**ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES
HUMANOS DO INSTITUTO DE MEDICINA INTEGRAL PROF FERNANDO
FIGUEIRA (IMIP)**

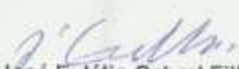
**Instituto Materno Infantil
Prof. Fernando Figueira**
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

Declaro que o Projeto de pesquisa nº. 802 intitulado **"Investigação cromossômica e molecular em pacientes com Síndrome de Turner"**, apresentado pela Pesquisadora Gabriela Ferraz Leal foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira – IMIP, em Reunião Ordinária 03 de agosto de 2006. .

Recife, 04 de agosto de 2006.


Dr. José Eulálio Cabral Filho
 Coordenador do Comitê de Ética
 e Pesquisa em Seres Humanos do
 Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira

JORNAL PÚBLICA-IMPRESSA - CNJ: 14.073/01-0001/04
 JORNAL PÚBLICA-IMPRESSA - CNJ: 14.073/01-0001/04
 JORNAL PÚBLICA-IMPRESSA - CNJ: 14.073/01-0001/04
 JORNAL PÚBLICA-IMPRESSA - CNJ: 14.073/01-0001/04
 JORNAL PÚBLICA-IMPRESSA - CNJ: 14.073/01-0001/04

Rua dos Coelhos, 200 São Vito
 Recife - PE - Brasil CEP 50.070-500
 FONE: (81) 2122.4100
 FAX: (81) 2122.4722 - Cx. Postal 355
 e-mail: imip@imip.org.br
 home page: www.imip.org.br

**ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
PACIENTES MENORES DE 21 ANOS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES
MENORES DE 21 ANOS**

Convido o Sr(a). _____ a participar da pesquisa sob o título “Investigação cromossômica e molecular em pacientes com Síndrome de Turner”. Declaro que fui devidamente esclarecido (a) pela Dra. Neide Santos e que:

1. Concordo em participar da pesquisa sem receber qualquer pressão dos pesquisadores ou médicos que estão me atendendo;
2. Foi-me assegurado que continuarei a ser atendido no IMIP independentemente de continuar participando ou não da pesquisa;
3. Concordo em prestar informações pessoais à equipe responsável pela pesquisa, contudo estas informações deverão ser confidenciais;
4. Autorizo a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandeamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular. Declaro ainda que fui informado sobre o objetivo destes exames e que terei livre acesso aos seus resultados;
5. Posso desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo depois de ter assinado este termo, sem que isto comprometa o meu atendimento no IMIP;
6. Ao participar desta pesquisa, o indivíduo se expõe ao risco de desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue. O hematoma deve desaparecer dentro de poucos dias.
7. Quanto ao benefício, alguns pacientes podem ser beneficiados pelo conhecimento adquirido neste estudo.

Recife,

Assinatura do responsável pela paciente

Assinatura do pesquisador

Testemunha

Testemunha

**ANEXO C– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
PACIENTES MAIORES DE 21 ANOS**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES
MAIORES DE 21 ANOS**

Convido o Sr(a). _____ a participar da pesquisa sob o título “Investigação cromossômica e molecular em pacientes com Síndrome de Turner”. Declaro que fui devidamente esclarecido (a) pela Dra. Neide Santos e que:

1. Concordo em participar da pesquisa sem receber qualquer pressão dos pesquisadores ou médicos que estão me atendendo;
2. Foi-me assegurado que continuarei a ser atendido no IMIP independentemente de continuar participando ou não da pesquisa;
3. Concordo em prestar informações pessoais à equipe responsável pela pesquisa, contudo estas informações deverão ser confidenciais;
4. Autorizo a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandeamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular. Declaro ainda que fui informado sobre o objetivo destes exames e que terei livre acesso aos seus resultados;
5. Posso desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo depois de ter assinado este termo, sem que isto comprometa o meu atendimento no IMIP;
6. Ao participar desta pesquisa, o indivíduo se expõe ao risco de desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue. O hematoma deve desaparecer dentro de poucos dias.
7. Quanto ao benefício, alguns pacientes podem ser beneficiados pelo conhecimento adquiridos neste estudo.

Recife,

Assinatura do responsável pela paciente

Assinatura do pesquisador

Testemunha

Testemunha

**ANEXO D - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO
SERES HUMANOS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PERNAMBUCO (CEP/CCS/UFPE)**



Ofício nº 032/2017 - CEP/UFPE

Recife, 18 de agosto de 2017.

A

Pesquisadora Adriana Valéria Sales Bispo

Departamento de Genética - CCB/UFPE

Registro do SISNEP FR - 476794

CAAE -0485.0.172.000-11

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 493/11

Título: Polimorfismos genéticos como fatores de risco a doenças autoimunes e a não-disjunção cromossômica na síndrome de Turner

Senhor (a) Pesquisador (a):

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/UFPE) recebeu em 17/08/2017 o relatório final do protocolo em epígrafe e considera que o mesmo foi devidamente aprovado por este Comitê.

Atenciosamente


Prof. Luciano Tavares Montenegro

Coordenador do CEP/UFPE


Prof. Luciano Tavares Montenegro
Coordenador do CEP/CCS/UFPE
CAAE Nº 1130870

**ANEXO E - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
MENORES DE 12 a 18 ANOS - Resolução 466/12)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**10.1 TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE
12 a 18 ANOS - Resolução 466/12)**

OBS: Este Termo de Assentimento para o menor de 12 a 18 anos não elimina a necessidade da elaboração de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor.

Convidamos você, após autorização dos seus pais [ou dos responsáveis legais] para participar como voluntário (a) da pesquisa sob o título: “Polimorfismos genéticos como fatores de risco a doenças autoimunes e a não-disjunção cromossômica na síndrome de Turner”. Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Adriana Valéria Sales Bispo, que encontra-se no endereço:_____. Telefones para contato:_____, e-mail:_____. Também participam desta pesquisa a pesquisadora: Luana Oliveira dos Santos Telefone para contato: _____e está sob a orientação de: Neide Santos Telefone:_____, e-mail:_____.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados e concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue para que seus pais ou responsável possam guarda-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida e estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você

deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Essa pesquisa tem como objetivos: definir o cariótipo de cada voluntário participante; investigar a associação de polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo do folato como fatores de risco na não-disjunção cromossômica, bem como a associação de polimorfismos dos genes *PTPN-22*, *DEFB1* e *MBL2* e a susceptibilidade a doenças autoimunes na síndrome de Turner. Para a coleta de dados da pesquisa será realizada a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandeamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular para pesquisa de polimorfismos nos genes (variações no gene, que podem ou não interferir na expressão fenotípica) *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase), *TS* (timidilato sintase), *MS* (metionina sintase), *MTRR* (metionina sintase redutase), *RFC* (carreador de folato reduzido), *PTPN22* (proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22), *CTLA-4* (Antígeno-4 associado ao linfócito-T citotóxico), *DEFB1* (β -defensina 1) e *MBL2* (lectina ligadora de manose). Os dados clínicos de cada paciente serão obtidos a partir dos prontuários, os quais serão previamente solicitados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística - SAME.
- Em relação ao período de participação de cada voluntário na pesquisa, será necessário o comparecimento ao hospital para que haja a coleta do sangue periférico, onde serão colhidos cerca de 10 ml de sangue, por punção venosa. Caso não sejam obtidos bons resultados, o voluntário poderá ser chamado novamente para uma coleta de sangue.
- O risco direto para o voluntário ao participar desta pesquisa é desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue, o que pode causar

um certo grau de desconforto. Como formas de amenizar este risco, podemos citar: não massagear o local onde a agulha perfurou; logo após a coleta do sangue periférico, uma compressão deve ser feita no local perfurado, pressionando por três minutos e o braço não deve ser flexionado. Caso haja o surgimento do hematoma, o mesmo deve desaparecer dentro de poucos dias. O uso de cremes, receitados por um médico, facilitam o desaparecimento dessa mancha.

- Os benefícios diretos para os voluntários incluem: ter um diagnóstico genético definido após as análises citogenéticas e um acompanhamento médico que deve ser realizado no hospital onde cada paciente teve o seu sangue periférico coletado para análise genética. Quanto aos benefícios indiretos, os pacientes podem ser beneficiados pelos conhecimentos adquiridos neste estudo.

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 (dados clínicos obtidos dos prontuários de cada paciente e sangue periférico coletado de cada paciente), ficarão armazenados em (pastas de arquivo, computador pessoal e geladeira), sob a responsabilidade da orientadora Dra. Neide Santos, no endereço 1º andar da antiga Faculdade de Medicina, situado na Av. Professor Moraes Rego, S/N - Cidade Universitária, Recife, PE, pelo período de mínimo 5 anos.

Nem você e nem seus pais [ou responsáveis legais] pagarão nada para você participar desta pesquisa, também não receberão nenhum pagamento para a sua participação, pois é voluntária. Se houver necessidade, as despesas (deslocamento e alimentação) para a sua participação e de seus pais serão assumidas ou ressarcidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Este documento passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE que está 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).

Assinatura do pesquisador (a)

**ASSENTIMENTO DO(DA) MENOR DE IDADE EM PARTICIPAR COMO
VOLUNTÁRIO(A)**

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Polimorfismos genéticos como fatores de risco a doenças autoimunes e a não-disjunção cromossômica na síndrome de Turner”, como voluntário (a). Fui informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, o que vai ser feito, assim como os possíveis riscos e benefícios que podem acontecer com a minha participação. Foi-me garantido que posso desistir de participar a qualquer momento, sem que eu ou meus pais precise pagar nada.

Local e data _____

Assinatura do (da) menor: _____

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO F - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

10.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa “Polimorfismos genéticos como fatores de risco a doenças autoimunes e a não-disjunção cromossômica na síndrome de Turner”.

Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Adriana Valéria Sales Bispo, que encontra-se no endereço:_____. Telefones para contato: _____, e-mail:_____. Também participam também desta pesquisa a pesquisadora: Luana Oliveira dos Santos. Telefone para contato: _____ e está sob a orientação de: Neide Santos Telefone:_____, e-mail:_____.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde que o (a) menor faça parte do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde não haverá penalização nem para o (a) Sr.(a) nem para o/a voluntário/a que está sob sua responsabilidade, bem como será possível ao/a Sr. (a) retirar o consentimento a qualquer momento, também sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Essa pesquisa tem como objetivos: definir o cariótipo de cada voluntário participante; investigar a associação de polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo do folato como fatores de risco na não-disjunção

cromossômica, bem como a associação de polimorfismos dos genes *PTPN-22*, *DEFB1* e *MBL2* e a susceptibilidade a doenças autoimunes na síndrome de Turner. Para a coleta de dados da pesquisa será realizada a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandeamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular para pesquisa de polimorfismos nos genes (variações no gene, que podem ou não interferir na expressão fenotípica) *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase), *TS* (timidilato sintase), *MS* (metionina sintase), *MTRR* (metionina sintase redutase), *RFC* (carreador de folato reduzido), *PTPN22* (proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22), *CTLA-4* (*Antígeno-4 associado ao linfócito-T citotóxico*), *DEFB1* (β -defensina 1) e *MBL2* (lectina ligadora de manose). Os dados clínicos de cada paciente serão obtidos a partir dos prontuários, os quais serão previamente solicitados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística - SAME.

- Em relação ao período de participação de cada voluntário na pesquisa, será necessário o comparecimento ao hospital para que haja a coleta do sangue periférico, onde serão colhidos cerca de 10 ml de sangue, por punção venosa. Caso não sejam obtidos bons resultados, o voluntário poderá ser chamado para uma recoleta de sangue.
- O risco direto para o voluntário ao participar desta pesquisa é desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue, o que pode causar um certo grau de desconforto. Como formas de amenizar este risco, podemos citar: não massagear o local onde a agulha perfurou; logo após a coleta do sangue periférico, uma compressão deve ser feita no local perfurado, pressionando por três minutos e o braço não deve ser flexionado. Caso haja o surgimento do hematoma, o mesmo deve desaparecer dentro de poucos dias. O uso de cremes, receitados por um médico, facilitam o desaparecimento dessa mancha.

- Os benefícios diretos para os voluntários incluem: ter um diagnóstico genético definido após as análises citogenéticas e um acompanhamento médico que deve ser realizado no hospital onde cada paciente teve o seu sangue periférico coletado para análise genética. Quanto aos benefícios indiretos, os pacientes podem ser beneficiados pelos conhecimentos adquiridos neste estudo.

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 participação do/a voluntário (a). Os dados coletados nesta pesquisa (dados clínicos obtidos dos prontuários de cada paciente e sangue periférico coletado de cada paciente), ficarão armazenados em (pastas de arquivo, computador pessoal e geladeira), sob a responsabilidade da orientadora Dra. Neide Santos, no endereço 1º andar da antiga Faculdade de Medicina, situado na Av. Professor Moraes Rego, S/N - Cidade Universitária, Recife, PE, pelo período de mínimo 5 anos.

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

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

Assinatura do pesquisador (a)

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DO/A VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável por _____, autorizo a sua participação no estudo "Polimorfismos genéticos como fatores de risco a doenças autoimunes e a não-disjunção cromossômica na síndrome de Turner", como voluntário(a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de seu acompanhamento/assistência/tratamento) para mim ou para o (a) menor em questão.

Local e data _____



Assinatura do (da) responsável: _____

Impressão digital
(opcional)

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

**ANEXO G - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA
MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**10.3 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES
DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Polimorfismos genéticos como fatores de risco a doenças autoimunes e a não-disjunção cromossômica na síndrome de Turner”. Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Adriana Valéria Sales Bispo, que encontra-se no endereço:_____. Telefones para contato:_____, e-mail: _____.

Também participam também desta pesquisa a pesquisadora: Luana Oliveira dos Santos. Telefones para contato: _____ e está sob a orientação de: Neide Santos Telefone: _____, e-mail: _____.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Essa pesquisa tem como objetivos: definir o cariótipo de cada voluntário participante; investigar a associação de polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo do folato como fatores de risco na não-disjunção cromossômica, bem como a associação de polimorfismos dos genes *PTPN-*

22, *DEFB1* e *MBL2* e a susceptibilidade a doenças autoimunes na síndrome de Turner. Para a coleta de dados da pesquisa será realizada a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandeamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular para pesquisa de polimorfismos nos genes (variações no gene, que podem ou não interferir na expressão fenotípica) *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase), *TS* (timidilato sintase), *MS* (metionina sintase), *MTRR* (metionina sintase redutase), *RFC* (carreador de folato reduzido), *PTPN22* (proteína tirosina fosfatase não receptora tipo 22), *CTLA-4* (*Antígeno-4 associado ao linfócito-T citotóxico*), *DEFB1* (β -defensina 1) e *MBL2* (lectina ligadora de manose). Os dados clínicos de cada paciente serão obtidos a partir dos prontuários, os quais serão previamente solicitados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística - SAME.

- Em relação ao período de participação de cada voluntário na pesquisa, será necessário o comparecimento ao hospital para que haja a coleta do sangue periférico, onde serão colhidos cerca de 10 ml de sangue, por punção venosa. Caso não sejam obtidos bons resultados, o voluntário poderá ser chamado para uma recoleta de sangue.
- O risco direto para o voluntário ao participar desta pesquisa é desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue, o que pode causar um certo grau de desconforto. Como formas de amenizar este risco, podemos citar: não massagear o local onde a agulha perfurou; logo após a coleta do sangue periférico, uma compressão deve ser feita no local perfurado, pressionando por três minutos e o braço não deve ser flexionado. Caso haja o surgimento do hematoma, o mesmo deve desaparecer dentro de poucos dias. O uso de cremes, receitados por um médico, facilitam o desaparecimento dessa mancha.
- Os benefícios diretos para os voluntários incluem: ter um diagnóstico genético definido após as análises citogenéticas e um acompanhamento

médico que deve ser realizado no hospital onde cada paciente teve o seu sangue periférico coletado para análise genética. Quanto aos benefícios indiretos, os pacientes podem ser beneficiados pelos conhecimentos adquiridos neste estudo.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (dados clínicos obtidos dos prontuários de cada paciente e sangue periférico coletado de cada paciente), ficarão armazenados em (pastas de arquivo, computador pessoal e geladeira), sob a responsabilidade da orientadora Dra. Neide Santos, no endereço 1º andar da antiga Faculdade de Medicina, situado na Av. Professor Moraes Rego, S/N - Cidade Universitária, Recife, PE, pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

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).**

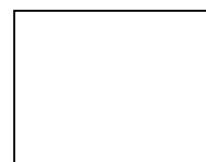
Assinatura do pesquisador (a)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo "Polimorfismos genéticos como fatores de risco a doenças autoimunes e a não-disjunção cromossômica na síndrome de Turner", como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

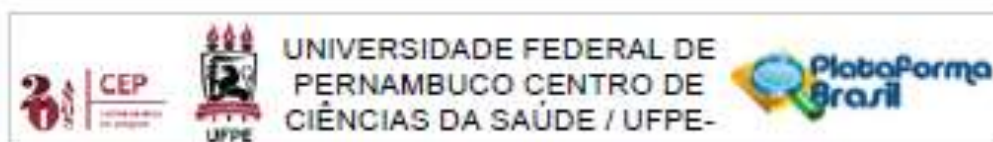


Impressão digital
(opcional)

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO H - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (CEP/CCS/UFPE)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de polimorfismos e expressão do gene VDR (Vitamin D Receptor) e sua relação com diferentes condições clínicas na Síndrome de Turner

Pesquisador: Luana Oliveira dos Santos

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 71308817.8.0000.5206

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE AMPARO A CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FAPES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.311.592

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado da estudante LUANA OLIVEIRA DOS SANTOS sob a orientação da Professora NEIDE SANTOS, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco. O projeto será desenvolvido no Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana do Departamento de Genética, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE) e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). A proposta consiste basicamente na análise da hipótese: polimorfismos que alteram a proteína codificada pelo gene VDR (Vitamin D Receptor) podem ser importantes fatores genéticos de predisposição ao risco de diferentes condições clínicas em pacientes portadoras da Síndrome de Turner. Para este fim realizar-se-á um estudo do tipo transversal de caráter analítico, com o objetivo de promover a caracterização citogenética e molecular em pacientes com indicação clínica da síndrome de Turner (ST) atendidas no Serviço de Genética Médica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e no Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE). Serão utilizados dados de prontuários médicos e também a coleta de duas amostras de 10 ml de sangue de 100 pacientes para obtenção de DNA e RNA de células linfocitárias e realização de testes genéticos. As análises estatísticas para estimar as frequências alélicas e distribuição dos

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (011)2125-0556 E-mail: cepccs@ufpe.br



CEP
comitê de ética em pesquisa



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 2.311.582

Recomendações:

Nenhuma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

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

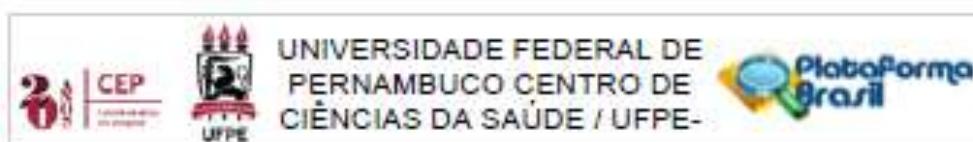
Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_956670.pdf	28/09/2017 15:40:04		Aceito
Outros	carta_resposta_pendencias_Luana_Oliveira.docx	28/09/2017 15:36:58	Luana Oliveira dos Santos	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-0536 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Processo: 2.211.592

Não

RECIFE, 03 de Outubro de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (01)2126-0530 E-mail: cepcos@ufpe.br

Página 15 de 18

**ANEXO I - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA
MENORES DE 12 a 18 ANOS - Resolução 466/12)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 12
a 18 ANOS - Resolução 466/12)**

OBS: Este Termo de Assentimento para o menor de 12 a 18 anos não elimina a necessidade da elaboração de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que deve ser assinado pelo responsável ou representante legal do menor.

Convidamos você _____, após autorização dos seus pais [ou dos responsáveis legais] para participar como voluntário (a) da pesquisa sob o título: “Análise de polimorfismos e expressão do gene *VDR (Vitamin D Receptor)* e sua relação com diferentes condições clínicas na Síndrome de Turner”. Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Luana Oliveira dos Santos, que encontra-se no endereço: _____.

Telefones para contato: _____, e-mail: _____.

Também participam desta pesquisa as pesquisadoras: Raysa Samanta Moraes Laranjeira, Telefone para contato: _____; Barbara Guiomar Sales Gomes da Silva, Telefone para contato: _____; Jacqueline Rosangela de Araujo; Jaqueline de Azevêdo Silva, Telefone para contato: _____ e está sob a orientação de: Neide Santos, Telefones: _____, e-mail: _____.

Caso este Termo de assentimento contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados e concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue para que

seus pais ou responsável possam guarda-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida e estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Essa pesquisa tem como objetivos: definir o cariótipo (conjunto de cromossomos, ou seja, o material genético do indivíduo) de cada voluntário participante; investigar a associação de polimorfismos e expressão do gene *VDR* e a susceptibilidade a diferentes condições clínicas na síndrome de Turner (ou seja, se há alguma alteração no material genético de cada paciente com síndrome de Turner). Para a coleta de dados da pesquisa será realizada a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandejamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular para pesquisa de polimorfismos e expressão do gene *VDR* (*Vitamin D Receptor*) (ou seja, variações no gene, que podem ou não interferir nas características do indivíduo) Os dados clínicos de cada paciente serão obtidos a partir dos prontuários, os quais serão previamente solicitados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística - SAME.
- Em relação ao período de participação de cada voluntário na pesquisa, será necessário o comparecimento ao hospital para que haja a coleta do sangue periférico (ou seja, sangue que circula pelo corpo), onde serão colhidos cerca de 10 ml de sangue da veia do braço. Caso não sejam obtidos bons resultados, o voluntário poderá ser chamado novamente para uma coleta de sangue.

- O risco direto para o voluntário ao participar desta pesquisa é desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue, o que pode causar um certo grau de desconforto. Como formas de amenizar este risco, podemos citar: não massagear o local onde a agulha perfurou; logo após a coleta do sangue periférico, uma compressão deve ser feita no local perfurado, pressionando por três minutos e o braço não deve ser flexionado. Caso haja o surgimento do hematoma, o mesmo deve desaparecer dentro de poucos dias. O uso de cremes, receitados por um médico, facilitam o desaparecimento dessa mancha.
- Os benefícios diretos para os voluntários incluem: ter um diagnóstico genético definido após as análises citogenéticas (ou seja, estudo do material genético do indivíduo) e um acompanhamento médico que deve ser realizado no hospital onde cada paciente teve o seu sangue periférico coletado para análise genética. Quanto aos benefícios indiretos, os pacientes podem ser beneficiados pelos conhecimentos adquiridos neste estudo.

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 (dados clínicos obtidos dos prontuários de cada paciente e sangue periférico coletado de cada paciente), ficarão armazenados em (pastas de arquivo, computador pessoal e freezer), sob a responsabilidade da orientadora Dra. Neide Santos, no endereço: Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50740-600, pelo período de mínimo 5 anos.

Nem você e nem seus pais [ou responsáveis legais] pagarão nada para você participar desta pesquisa, também não receberão nenhum pagamento para a sua participação, pois é voluntária. Se houver necessidade, as despesas (deslocamento e alimentação) para a sua participação e de seus pais serão assumidas ou ressarcidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Este documento passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE que está 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).**

Assinatura do pesquisador (a)

**ASSENTIMENTO DO(DA) MENOR DE IDADE EM PARTICIPAR COMO
VOLUNTÁRIO(A)**

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Análise de polimorfismos e expressão do gene *VDR (Vitamin D Receptor)* e sua relação com diferentes condições clínicas na Síndrome de Turner”, como voluntário (a). Fui informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, o que vai ser feito, assim como os possíveis riscos e benefícios que podem acontecer com a minha participação. Foi-me garantido que posso desistir de participar a qualquer momento, sem que eu ou meus pais precise pagar nada.

Local e data _____

Assinatura do (da) menor: _____

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

**ANEXO J - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA
RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA RESPONSÁVEL
LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)**

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) _____ {ou menor que está sob sua responsabilidade} para participar, como voluntário (a), da pesquisa “Análise de polimorfismos e expressão do gene *VDR (Vitamin D Receptor)* e sua relação com diferentes condições clínicas na Síndrome de Turner”. Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Luana Oliveira dos Santos, que encontra-se no endereço: _____. Telefones para contato: _____, e-mail: _____. Também participam desta pesquisa as pesquisadoras: Raysa Samanta Moraes Laranjeira, Telefone para contato: _____; Barbara Guiomar Sales Gomes da Silva, Telefone para contato: _____; Jacqueline Rosangela de Araujo; Jaqueline de Azevêdo Silva, Telefone para contato: _____ e está sob a orientação de: Neide Santos, Telefones: _____, e-mail: _____.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde que o (a) menor faça parte do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde não haverá penalização nem para o (a) Sr.(a) nem para o/a voluntário/a que está sob sua responsabilidade, bem como será possível ao/a Sr. (a) retirar o consentimento a qualquer momento, também sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Essa pesquisa tem como objetivos: definir o cariótipo (conjunto de cromossomos, ou seja, o material genético do indivíduo) de cada voluntário participante; investigar a associação de polimorfismos e expressão do gene *VDR* e a susceptibilidade a diferentes condições clínicas na síndrome de Turner (ou seja, se há alguma alteração no material genético de cada paciente com síndrome de Turner). Para a coleta de dados da pesquisa será realizada a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandeamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular para pesquisa de polimorfismos e expressão do gene *VDR* (*Vitamin D Receptor*) (ou seja, variações no gene, que podem ou não interferir nas características do indivíduo) Os dados clínicos de cada paciente serão obtidos a partir dos prontuários, os quais serão previamente solicitados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística - SAME.
- Em relação ao período de participação de cada voluntário na pesquisa, será necessário o comparecimento ao hospital para que haja a coleta do sangue periférico (ou seja, sangue que circula pelo corpo), onde serão colhidos cerca de 10 ml de sangue da veia do braço. Caso não sejam obtidos bons resultados, o voluntário poderá ser chamado novamente para uma recoleta de sangue.
- O risco direto para o voluntário ao participar desta pesquisa é desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue, o que pode causar um certo grau de desconforto. Como formas de amenizar este risco, podemos citar: não massagear o local onde a agulha perfurou; logo após a coleta do sangue periférico, uma compressão deve ser feita no local perfurado, pressionando por três minutos e o braço não deve ser flexionado. Caso haja o surgimento do hematoma, o mesmo deve desaparecer dentro de poucos dias. O uso de cremes, receitados por um médico, facilitam o desaparecimento dessa mancha.

- Os benefícios diretos para os voluntários incluem: ter um diagnóstico genético definido após as análises citogenéticas (ou seja, estudo do material genético do indivíduo) e um acompanhamento médico que deve ser realizado no hospital onde cada paciente teve o seu sangue periférico coletado para análise genética. Quanto aos benefícios indiretos, os pacientes podem ser beneficiados pelos conhecimentos adquiridos neste estudo.

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 participação do/a voluntário (a). Os dados coletados nesta pesquisa (dados clínicos obtidos dos prontuários de cada paciente e sangue periférico coletado de cada paciente), ficarão armazenados em (pastas de arquivo, computador pessoal e freezer), sob a responsabilidade da orientadora Dra. Neide Santos, no endereço: Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50740-600, pelo período de mínimo 5 anos.

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

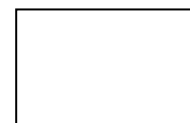
Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – Prédio do CCS - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 –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

Assinatura do pesquisador (a)

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DO/A VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável por _____, autorizo a sua participação no estudo "Análise de polimorfismos e expressão do gene *VDR* (*Vitamin D Receptor*) e sua relação com diferentes condições clínicas na Síndrome de Turner", como voluntário(a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de seu acompanhamento/assistência/tratamento) para mim ou para o (a) menor em questão.

Local e data _____



Assinatura do (da) responsável: _____

Impressão digital
(opcional)

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

**ANEXO K - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA
MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18
ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Análise de polimorfismos e expressão do gene *VDR* (*Vitamin D Receptor*) e sua relação com diferentes condições clínicas na Síndrome de Turner”. Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Luana Oliveira dos Santos, que encontra-se no endereço: _____. Telefones para contato: _____, e-mail: _____. Também participam desta pesquisa as pesquisadoras: Raysa Samanta Moraes Laranjeira, Telefone para contato: _____; Barbara Guiomar Sales Gomes da Silva, Telefone para contato: _____; Jacqueline Rosangela de Araujo; Jaqueline de Azevêdo Silva, Telefone para contato: _____ e está sob a orientação de: Neide Santos, Telefones: _____, e-mail: _____.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensível, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Essa pesquisa tem como objetivos: definir o cariótipo (conjunto de cromossomos, ou seja, o material genético do indivíduo) de cada voluntário participante; investigar a associação de polimorfismos e expressão do gene *VDR* e a susceptibilidade a diferentes condições clínicas na síndrome de Turner (ou seja, se há alguma alteração no material genético de cada paciente com síndrome de Turner). Para a coleta de dados da pesquisa será realizada a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandeamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular para pesquisa de polimorfismos e expressão do gene *VDR* (*Vitamin D Receptor*) (ou seja, variações no gene, que podem ou não interferir nas características do indivíduo) Os dados clínicos de cada paciente serão obtidos a partir dos prontuários, os quais serão previamente solicitados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística - SAME.
- Em relação ao período de participação de cada voluntário na pesquisa, será necessário o comparecimento ao hospital para que haja a coleta do sangue periférico (ou seja, sangue que circula pelo corpo), onde serão colhidos cerca de 10 ml de sangue da veia do braço. Caso não sejam obtidos bons resultados, o voluntário poderá ser chamado novamente para uma recoleta de sangue.
- O risco direto para o voluntário ao participar desta pesquisa é desenvolver hematoma (mancha roxa) no local da retirada de sangue, o que pode causar um certo grau de desconforto. Como formas de amenizar este risco, podemos citar: não massagear o local onde a agulha perfurou; logo após a coleta do sangue periférico, uma compressão deve ser feita no local perfurado, pressionando por três minutos e o braço não deve ser flexionado. Caso haja o surgimento do hematoma, o mesmo deve desaparecer dentro de poucos dias. O uso de cremes, receitados por um médico, facilitam o desaparecimento dessa mancha.

- Os benefícios diretos para os voluntários incluem: ter um diagnóstico genético definido após as análises citogenéticas (ou seja, estudo do material genético do indivíduo) e um acompanhamento médico que deve ser realizado no hospital onde cada paciente teve o seu sangue periférico coletado para análise genética. Quanto aos benefícios indiretos, os pacientes podem ser beneficiados pelos conhecimentos adquiridos neste estudo.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (dados clínicos obtidos dos prontuários de cada paciente e sangue periférico coletado de cada paciente), ficarão armazenados em (pastas de arquivo, computador pessoal e freezer), sob a responsabilidade da orientadora Dra. Neide Santos, no endereço: Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco. Av. da Engenharia, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50740-600, pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

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).**

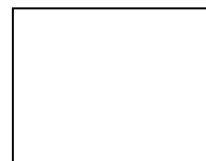
Assinatura do pesquisador (a)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Análise de polimorfismos e expressão do gene *VDR (Vitamin D Receptor)* e sua relação com diferentes condições clínicas na Síndrome de Turner”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____



Impressão digital
(opcional)

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO L - NORMAS DO PERIÓDICO: GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

Scope and policy

Editors

Carlos F. M. Menck

Marcio C. Silva-Filho

E-mail: *editor@gmb.org.br*

Assistant Editor

Klaus Hartfelder

E-mail: *editor@gmb.org.br*

Editorial Office

Cristina de Moraes

E-mail: *editor@gmb.org.br*

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The journal considers contributions that present the results of original research in genetics, molecular biology, evolution and related scientific disciplines. Manuscripts presenting methods and applications only, without an analysis of genetic data, will not be considered.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been published or are not under consideration for publication elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, as evaluated by the Editor, are reviewed by an

Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

The official abbreviation for Genetics and Molecular Biology is **Genet. Mol. Biol.**

Open-Access policy

Genetics and Molecular Biology articles are made available in full content at SciELO (Scientific Library Online) hosted at <http://www.scielo.br/gmb>. Back issues dating until 1998 are available through this site.

GMB articles published since 2009 are also indexed at PubMed Central and available in full text version at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1440/>.

Back issues of earlier titles (Brazilian Journal of Genetics and Revista Brasileira de Genética) are hosted at GMB's own site: <http://www.gmb.org.br>

Membership to the Brazilian Society of Genetics entitles subscription to Genetics and Molecular Biology.

For nonmembers and institutions, the annual subscriptions rates (four issues/year) are informed at the journal's website <http://www.gmb.org.br>.

Submission of papers

- 1. Manuscripts have to be submitted through our online submission platform:**

<https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

A cover letter addressed to the Editor-in-Chief is required

2. For submission the following instructions must be observed:

- a)** The manuscript must be submitted by the Corresponding Author, identified as such in the title page of the manuscript. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process.
- b)** Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file.
- c)** Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed. For statements on ethical issues in research see below (3.1.m).
- d)** The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.
- e)** In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and opposed reviewer(s).
- f)** Files must be uploaded separately and identified according to file types, respecting the following sequence: main text document (title page as page 1), tables, figures and, if applicable, supplementary material. The main text file must include the title page, Abstract, References and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary

material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.i).

g) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the title page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The Title Page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations must be indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be

referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names separated by "and"; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Do not start a sentence with an Arabic numeral. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; we also recommend to present names of orders or families in the Title and/or when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only *P*-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed

solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) **Conflict of Interest:** Any possible conflict of interest must be disclosed here. If there is none, please state: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

f) **The References Section:** Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>) or Thomson Reuters Web of Science.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 p.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. *PLoS One* 4:e7713.

g) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009)

LEM

Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2009)

h) **Tables:** Formats for tables are Word or RTF in Windows platform.

They must be prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator) and must be numbered consecutively in Arabic numerals). A concise title should be provided above the table. Each column should have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

i) **Figures: Formats for figures are TIFF or JPEG. They** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require resolution yielding 300 dpi for grayscale and color figures. These resolutions refer to the output size of the file, that being the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted and will be reproduced free of charge in the electronic and printed versions. Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file.

j) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

k) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

l) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and

materials used for reported studies.

m) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, a statement must be provided that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

n) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the print version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

Supplementary material - the following online material is available for this article:

- *Table S1 – < short title >*
- *Figure S1 – < short title >*

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited, include an Abstract no longer than five percent of the paper's length, but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion in a single section and without headers. Up to four items (tables and/or figures) may be submitted. The title page and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.n

3.3 Genome Insight

Genome Insight is for focused papers, usually of approximately 1500 words (up to four tables or figures), that publish new genome data as they become submitted to GenBank. This section is the premier forum to deliver that information directly to the genome community in a rapid and efficient publication of the genome. Data must be related to a complete (or nearly complete) and fully annotated genome for prokaryote or viruses, but a draft may be accepted for an eukaryote genome. While the focus of Genome Insight is necessarily involved in novel sequences, the manuscript must contain specifically novel biological, evolutive, biotechnological and/or metabolic insights revealed by data. The work may provide comparative analyses of previously published genomes that contain a substantial and novel insight of broadest biological and genetic significance.

Submitted manuscript must contain an abstract, which should be a brief report on the organism as well as its relevance and the main insight revealed by the genome. The text (approximately 1500 words- excluding abstract, references and acknowledgements) should not contain subdivisions, but must contain the rationale for the selection of such organism as well as organism information (including taxonomy, natural habitat, phylogenetic position, eventual pathogenicity, symbiotic, biotechnological use, etc), methodology (genome sequencing and assembly; reference number at GenBank), genome relevance (which should indicate the main insights revealed by the data analysis and main conclusions. Acknowledgements and References (up to 20 references) headings should be included. Figure Legends should be provided at the end of the manuscript.

Metagenome, transcriptome as well as epigenome data may also be considered for publication, but prior submission of the abstract to the Editor is necessary.

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see item 3.1.n. in our Instructions to Authors.

3.4 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.5 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area.

3.6 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.7 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding author, who will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by e-mail to the Editorial Office.

5. Availability of articles and deposition in databases

Article copies are provided as PDF-files. Authors may deposit these in their

personal or institutional homepage, as well as in public databases.

6. Publication charge

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

ANEXO M - NORMAS DO PERIÓDICO: THE JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY

SCOPE

The Journal of Clinical Immunology publishes high impact papers in the area of human immunology that explore the diagnosis, pathogenesis, prognosis, or treatment of human diseases. The Journal is particularly focused on primary immunodeficiencies and related diseases that include inborn errors of immunity, in the broad sense of the term, their underlying genotypes and their diverse phenotypes, including infection, malignancy, allergy, auto-inflammation, and autoimmunity. A wide range of studies in this area, ranging from genetic discovery, clinical description, immunologic assessment, diagnostic approach, prognosis evaluation, and treatment intervention defines the scope of the Journal. The Journal of Clinical Immunology publishes papers that include research using human subjects or human materials, as well as studies of relevant animal models that directly apply to human immunological disease(s). The Journal is particularly interested in the area of primary immunodeficiency and related diseases. Case reports are considered if they are truly original and are accompanied by a succinct review of the relevant medical literature and how the novel case study advances the field. Topical reviews are by invitation only.

ARTICLE TYPES

The Journal of Clinical Immunology publishes the following types of articles:

1. Letters to the Editor
2. Original Articles
3. CME Review Articles
4. "How I Manage" Articles
5. Editorial

Detailed instructions for each of these formats are provided below.

For each of these categories, papers that are being submitted to the Journal of Clinical Immunology must represent novel observations that have not have been published previously, nor be under consideration for publication elsewhere.

1. Letters to the Editor

The journal publishes Letters to the Editor, provided that they fit into one of the following categories: 1) Stand-alone original communications that bring out a focused but novel and important message on basic or clinical aspects of primary immune deficiencies and related diseases, including new findings related to diagnosis, pathogenesis, prognosis, or treatment; 2) Letters that relate to articles published in the Journal of Clinical Immunology but also contain significant new primary data and/or the inclusion of a figure and references to make important points, and 3) Clinical case reports where the patient's description is novel and important, and adds new insights into disease pathogenesis, diagnosis, prognosis, or therapy.

Constructive comments on articles published in the Journal of Clinical Immunology received as a Letter to the Editor may be accompanied by a response from the author of the original article being commented on, which will be solicited by the Editors. Consideration for publication will be based on priority and interest to the readership as determined by an Editorial evaluation.

Letters to the Editor should begin with the salutation: "To the Editor". They should have a clear and concise title (no more than 75 characters), include up to 5 authors, no abstract, and no more than 5 references. The total length of the Letter should not exceed a total of 2 printed pages, corresponding to approximately 1,200 words and 1 figure or Table. However, additional Figures or tables could be posted as on line Supplemental Data. Letters to the Editor are indexed by PubMed.

2. Original Articles

The journal publishes Regular Articles, which include: 1) original in-depth studies that bring out a novel and important message on basic or clinical aspects of primary immune deficiencies and related diseases, including new findings related to diagnosis, pathogenesis, prognosis, or treatment; 2) In rare circumstances, case reports where a patient's description is not only novel and important, but also supported by in-depth genetic, immunological, and clinical data, thereby adding new insights into disease pathogenesis, diagnosis, prognosis, and therapy.

Regular Articles should be ordered in sections as follows:

- Abstract
- Introduction
- Methods (must include sufficient information to allow readers to understand the article content)
- Results
- Discussion
- Acknowledgements
- Authorship Contributions
- Disclosure of Conflicts of Interest
- References
- Tables
- Figure Legends
- Figures

The maximum length for a Regular Article is 4,000 words of text - not including the abstract, tables, figure legends, and references. Abstracts must not exceed 250 words and should be constructed as a single narrative paragraph with no subheadings or references. Submissions are limited to a total of 7 figures, and digital images are required. We recommend a limit of 100 references.

Any involvement of medical writers/researchers, particularly those employed or supported by the pharmaceutical industry, in the writing of an article must be clearly defined and disclosed in the Authorship and/or the Acknowledgements section(s) as appropriate. This type of involvement must also be disclosed to the Editor-in-Chief in the Cover Letter. For more information, see the “Disclosure of Potential Conflicts of Interest” tab farther below in Instructions for Authors.

Supplemental data - to be published online only - may include additional information regarding methodology, supplemental figures or tables, or primary data sets that add to the topic of the article but cannot be included within the body of the article. They may include files that are not printable, such as long gene sequences. They must be submitted with the original manuscript submission so they can be peer-reviewed. At all times, all supplemental data should be uploaded as a single PDF, adhering to the following order:

1. Appendices (e.g., list of participants in a multi-center study)

2. Methods

3. Tables (with legends)

4. Figures (with legends).

Tables and figures must be labeled with an S, as in “Table S1” and “Figure S1.”

3. CME Review Articles:

The journal publishes Review Articles that are accompanied by questions, which our readers can answer and submit for Continued Medical Education (CME) credit. The Review Articles are typically focused on a single genetic etiology of primary immunodeficiencies and related diseases. In rare instances, two closely related genetic etiologies can be reviewed together (e.g. defects of two chains of the same receptor, if the clinical phenotypes are phenocopies).

The instructions for CME Review Articles are the same as those for Original Articles. An example of a previously published invited review is: Rice GI et al J Clin Invest (2015) 35:235-243. However, please be sure to include 5 multiple choice questions, each of which should be accompanied by 1 correct answer and 4 distractors, which our readers must answer and then submit for CME credit. The completion and submission of answers to these 5 questions will provide 1 CME credit per review article. A score of 80% (4 out of 5 correct answers) is required to receive CME credit.

4. “How I Manage” Articles

The Journal publishes “How I Manage” Articles, which are written by expert clinicians offering up-to-date information and guidance regarding diagnosis and management of primary immune deficiency diseases and related diseases, and the complications of therapeutic interventions based on longstanding clinical experience. Each “How I Manage” article focuses on a single disease and/or treatment modality for which new information has recently emerged. Because many primary immune deficiency diseases and related diseases are rare, their clinical management cannot always be based on large clinical trials. This increases the value of having articles authored by leading experts with in-depth experience. The “How I Manage” articles need to allow the clinical reader to gain greater insight into the molecular and cellular pathogenesis and how it may affect the clinical decision making process through the synthesis of an expert clinician-scientist.

The “How I Manage” articles may contain illustrative clinical cases, which should enhance their practical usefulness among the readers. For instance, a “How I Manage” article could comprise an introduction, a brief description of up to six cases, each highlighting distinct clinically relevant issues and/or management dilemmas which are linked to the discussion, and a conclusion. Alternatively, one or two cases can be presented that set the stage and are referred to throughout the discussion. Other narratives, not necessarily including clinical cases, may also be appropriate.

The instructions for “How I Manage” articles are the same as those for Original Articles, with the exception of the organization of the Article into specific sections, which is deferred to the authors. Use of Figures and Tables that comprehensively summarize the pathophysiology and treatment modalities, with algorithms when appropriate, is encouraged. The “How I Manage” articles are by invitation only. The editors however welcome suggestions from readers and potential authors. Involvement of medical writers, editors, or researchers supported by the pharmaceutical industry is not acceptable for “How I Manage” articles published in the Journal of Clinical Immunology.

5. Editorial

- 1-2 authors
- Reference the paper being editorialized
- Clear and concise title (maximum 75 characters)
- Maximum 10 references
- maximum 1,500 words. One Figure or Table may be included if needed, and is not part of the narrative limitations.
- 1-2 sentence summary of significance of the paper being editorialized to readership

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out.

The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Cover Letter

An accompanying submission letter must state that all coauthors have reviewed the manuscript and have contributed in a substantive and intellectual manner to the work described.

Authors may suggest preferred and non-preferred reviewers with contact information.

Title Page

Title Page

The title page should include:

- *The name(s) of the author(s) must be formatted as ‘full first name, middle initial, full last name’ or John W. Doe
- *A concise and informative title
- *The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- *The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

- *Purpose (stating the main purposes and research question)
- *Methods
- *Results
- *Conclusions

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Additional information

Manuscripts should be ordered as:

- title page
- abstract
- key words
- introduction
- methods
- results
- discussion
- conclusions
- appendix
- acknowledgments
- references
- tables
- and figure–caption list

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Scientific style

Generic names of drugs and pesticides are preferred; if trade names are used, the generic name should be given at first mention.

ACMG style

The Journal of Clinical Immunology requires that all manuscripts comply with the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) Recommendations for Reporting of Incidental Findings in Clinical Exome and Genome Sequencing. These published recommendations about reporting incidental findings in the exons of certain genes are available here (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23788249) and the original PDF file (https://www.acmg.net/docs/ACMG_Releases_Highly-Anticipated_Recommendations_on_Incidental_Findings_in_Clinical_Exome_and_Genome_Sequencing.pdf) are available as well as clarifications (www.acmg.net/docs/IF_Release.pdf) and updates (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356965).

References

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets.

Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article
Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234–5.
- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s001090000086
- Book
Blenkinsopp A, Paxton P. Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.
- Book chapter
Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology.* London: Academic; 1980. pp. 251–306.
- Online document
Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects.* Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title> of subordinate document. Accessed 15 Jan 1999.

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [ISSN.org LTWA](https://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- [EndNote style \(zip, 3 kB\)](#)

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Authors must disclose all relationships or interests that could have direct or potential influence or impart bias on the work. Although an author may not feel there is any conflict, disclosure of relationships and interests provides a more complete and transparent process, leading to an accurate and objective assessment of the work. Awareness of a real or perceived conflicts of interest is a perspective to which the readers are entitled. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate. Examples of potential conflicts of interests **that are directly or indirectly related to the research** may include but are not limited to the following:

- Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number)
- Honoraria for speaking at symposia
- Financial support for attending symposia
- Financial support for educational programs
- Employment or consultation
- Support from a project sponsor

- Position on advisory board or board of directors or other type of management relationships
- Multiple affiliations
- Financial relationships, for example equity ownership or investment interest
- Intellectual property rights (e.g. patents, copyrights and royalties from such rights)
- Holdings of spouse and/or children that may have financial interest in the work

In addition, interests that go beyond financial interests and compensation (non-financial interests) that may be important to readers should be disclosed. These may include but are not limited to personal relationships or competing interests directly or indirectly tied to this research, or professional interests or personal beliefs that may influence your research.

The corresponding author collects the conflict of interest disclosure forms from all authors. In author collaborations where formal agreements for representation allow it, it is sufficient for the corresponding author to sign the disclosure form on behalf of all authors. Examples of forms can be found here:

The corresponding author will include a summary statement in the text of the manuscript in a separate section before the reference list, that reflects what is recorded in the potential conflict of interest disclosure form(s).

Please make sure to submit all Conflict of Interest disclosure forms together with the manuscript.

See below examples of disclosures:

Funding: This study was funded by X (grant number X).

Conflict of Interest: Author A has received research grants from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company X and owns stock in Company Y. Author C is a member of committee Z.

If no conflict exists, the authors should state:

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.