

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

ALDIANNE MILENE DOS SANTOS BARBOSA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DO GENE *CTLA-4* NA
RESPOSTA IMUNE DE PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER**

Recife

2022

ALDIANNE MILENE DOS SANTOS BARBOSA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DO GENE *CTLA-4* NA
RESPOSTA IMUNE DE PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Profa. Dra. Neide Santos

Coorientador: Profa. Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva

Recife

2022

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

Barbosa, Aldianne Milene dos Santos

Avaliação de polimorfismo e expressão do gene *CTLA-4* na resposta imune de pacientes com Síndrome de Turner / Aldianne Milene dos Santos Barbosa. – 2022.

68 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Neide Santos.

Coorientadora: : Profa. Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva.

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

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Genética médica. 2. Doenças hereditárias. 3. Turner, Síndrome. I. Santos, Neide (orientadora). II. Silva, Jaqueline de Azevêdo (coorientadora). III. Título.

616.91

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-237

ALDIANNE MILENE DOS SANTOS BARBOSA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMO E EXPRESSÃO DO GENE *CTLA-4* NA
RESPOSTA IMUNE DE PACIENTES COM SÍNDROME DE TURNER**

Aprovado em: 30 / 08 / 2022

Banca Examinadora

Dra Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Camilla Albertina Dantas de Lima
Universidade Federal da Paraíba

Dra. Michelly Cristiny Pereira
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter me concedido força e sabedoria durante o percurso do mestrado. O agradeço por ter me abençoado com saúde física e mental diante da pandemia de COVID-19 que, por vezes, tornou os dias incertos, e por ser meu consolo e abrigo em momentos de angústia.

Aos meus pais, Audilene e João Claudio, pelo apoio incondicional e pelo cuidado, me ajudando a tornar tudo isso possível. Agradeço pelas noites de oração, pela força e incentivo para continuar buscando crescimento pessoal e profissional. Aos meus irmãos, Abel e Marianne, e às minhas primas, Sarah e Camila, pela amizade, conselhos e por todo apoio emocional durante o isolamento social e aulas online. O suporte de vocês foi essencial para cada conquista alcançada na minha vida.

À minha orientadora, Professora Neide Santos, por ser uma pessoa incrível, pelos ensinamentos, pela compressão e paciência, pelas risadas e pela oportunidade de cursar mais esta etapa acadêmica tendo a sua orientação. Assim como, à minha coorientadora, Professora Jaqueline Azevêdo, pelas contribuições. Obrigada pela confiança! Deus as abençoe.

À minha amiga, Raysa Laranjeira, pela amizade, companheirismo, risadas e por compartilhar os docinhos após o almoço. Muito obrigada por todos os ensinamentos, por estar presente em todas as etapas do meu mestrado, ainda que fisicamente distantes neste finalzinho. Você é um exemplo de pessoa e profissional que eu quero seguir! Deus te abençoe.

Agradeço às minhas amigas de laboratório, Carla e Juliana, pelo carinho e pelos bons momentos. E à todas as pessoas que fazem parte do LGCAH por estarem presentes nessa jornada.

Ao meu trio de amigos do mestrado, Thays, Guilherme e Rebeca. Pelas noites de estudo, pelo apoio emocional e psicológico, e pelas infinitas chamadas no Google Meet. Ter vocês, mesmo que de forma virtual, fez toda a diferença na minha caminhada da Pós-Graduação!

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado ao convite, e pelo tempo e dedicação para avaliar esta dissertação.

Agradeço às médicas e toda a equipe do Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas (HC-UFPE); às pacientes e responsáveis que contribuíram para

a realização deste trabalho. À CAPES e à FACEPE pela concessão da bolsa e auxílio financeiro do projeto, e ao PPGG.

Muito Obrigada!

RESUMO

A síndrome de Turner (ST) é um dos distúrbios cromossômicos humanos mais comuns, definida citogeneticamente pela perda total ou parcial de um dos cromossomos sexuais. Pacientes com ST apresentam um risco aumentado de desenvolver doenças autoimunes e inflamatórias crônicas comparadas às mulheres no geral. Genes relacionados com os processos de regulação da resposta imune têm sido recentemente estudados nesta síndrome, incluindo o *CTLA-4*, fundamental na atividade imunossupressora. Os objetivos deste estudo foram investigar se há distribuição diferencial do SNP rs3087243 (G>A) do *CTLA-4*, bem como uma expressão gênica diferencial, na amostra de pacientes com ST. A análise do polimorfismo foi realizada em 112 pacientes ST, comparando as frequências entre grupos ST com doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (n=38) e sem tais condições (n=74). Os níveis de mRNA do *CTLA-4* foram avaliados em pacientes ST (n=23) em comparação com um grupo controle saudável (n=21) e entre pacientes ST, com (n=9) e sem doenças autoimunes/inflamatórias crônicas (n=14), através da expressão gênica relativa. Os resultados indicam uma diferença na distribuição alélica em relação a doenças autoimunes na ST e um possível efeito protetor do genótipo GA em indivíduos saudáveis, porém, não foi possível determinar a associação do SNP rs3087243 do gene *CTLA-4* no contexto imune da ST. Uma expressão reduzida do gene *CTLA-4* foi observada nas pacientes ST em comparação com o grupo controle ($p < 0.001$), indicando que possivelmente o gene está relacionado a uma resposta imune alterada nesta amostra de pacientes ST.

Palavras-Chave: Doenças autoimunes/inflamatórias; expressão gênica; rs3087243; Síndrome de Turner; SNP.

ABSTRACT

Turner syndrome (TS) is one of the most common human chromosomal disorders, defined cytogenetically by the total or partial loss of one of the sex chromosomes. Patients with TS have an increased risk of developing chronic autoimmune and inflammatory diseases compared to women in general. Genes related to the regulatory processes of the immune response have been recently studied in this syndrome, including *CTLA-4*, which is fundamental in immunosuppressive activity. The present study evaluated whether there is a differential distribution of the rs3087243 SNP (G>A) from *CTLA-4*, as well as a differential gene expression, in a sample of patients with TS. Polymorphism analysis was performed in 112 TS patients, comparing the frequencies between TS groups with autoimmune and inflammatory diseases (n=38) and without such conditions (n=74). *CTLA-4* mRNA levels were evaluated in TS patients (n=23) compared with a healthy control group (n=21), and among TS patients with (n=9) and without autoimmune/inflammatory diseases (n =14), through relative gene expression. The results indicate a difference in allelic distribution in relation to autoimmune diseases in TS and a possible protective effect of the GA genotype in healthy individuals, however, it was not possible to determine the association of the rs3087243 SNP of the *CTLA-4* gene in the immune context of TS. A reduced expression of the *CTLA-4* gene was observed in ST patients compared to the control group ($p < 0.001$), indicating that the gene is possibly related to an altered immune response in this sample of ST.

Keywords: Autoimmune/inflammatory diseases; expression; rs3087243; Turner syndrome; SNP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Cariótipo 45,X com bandeamento G na Síndrome de Turner. (Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana - UFPE)	17
Figura 2 –	Alterações estruturais do cromossomo X. A) Isocromossomo do braço longo do X. B) Cromossomo em anel. C) Deleção do braço curto do cromossomo X. (Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana – UFPE)	17
Figura 3 –	Algumas características fenotípicas de pacientes com ST. A) Paciente portadora de ST evidenciando o pescoço curto e alado, cúbito valgo e baixa estatura; B) Linha posterior de implantação dos cabelos baixa; C) Quarto metatarso curto. (Fonte: BUCERZAN et al., 2017)	19
Figura 4 –	Componentes das imunidades inata e adaptativa. A imunidade inata é composta por tecidos, como o epitélio que forma uma barreira física, além de células especializadas e sistema complemento. Imunidade adaptativa responde por meio de linfócitos T e B, anticorpos e interação com componentes da imunidade inata. (Fonte: ABBAS et al., 2012)	21
Figura 5 –	Mecanismos de tolerância central. A seleção positiva (setas roxas) garante a circulação de células T com afinidade baixa ou intermediária para antígenos próprios em tecidos periféricos. Células T com alta afinidade para autoantígenos são selecionados negativamente (seta vermelha) e sofrem apoptose. (Fonte: Adaptado de DELVES e ROITT, 2000)	23
Figura 6 –	Mecanismos de tolerância central e periférica. A) No timo ocorrem eventos de tolerância central, com seleção positiva e negativa de células T. B) Células T autorreativas podem escapar da tolerância central e migrar para tecidos periféricos (Linfonodo). Mecanismos de tolerância periférica garantem a exclusão ou não responsividade de células T autorreativas. (Fonte: Adaptado de STOLP et al., 2019)	24

Figura 7 –	Pacientes ST com alterações dermatológicas autoimunes. A) Paciente com Alopecia areata; B) Paciente com vitiligo. (Fonte: GIANFALDONI et al., 2017; adaptado de MIURA e YAMAMOTO, 2016)	26
Figura 8 –	Estrutura do gene <i>CTLA-4</i> . (Fonte: Adaptado de GOUGH et al., 2005)	28
Figura 9 –	Polimorfismos do gene <i>CTLA-4</i> . Em destaque, dois dos polimorfismos mais estudados, rs231775 no éxon 1 e CT60. (Fonte: Adaptado de TU et al., 2017)	28
Figura 10 –	Isoformas da proteína CTLA-4. (Fonte: Adaptado de VALK et al., 2008)	29
Figura 11 –	Ativação e inibição de células T pelos receptores CD28 e CTLA-4, respectivamente. (Fonte: Adaptado de TEXEIRA et al., 2019)..	30
Figura 12 –	Expressão do gene <i>CTLA-4</i> em pacientes ST e controles saudáveis, respectivamente. Foi observada uma redução da expressão gênica em pacientes ST em comparação com grupo controle ($p < 0.001$)	42
Figura 13 –	Expressão do gene <i>CTLA-4</i> entre pacientes ST com doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (grupo caso) e pacientes ST sem tais condições (grupo controle). Sem diferenças estatísticas significantes	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Grupos de análise do polimorfismo rs3087243 do gene <i>CTLA-4</i> e médias de idades dos respectivos grupos	34
Tabela 2 –	Grupos de análise da expressão do gene <i>CTLA-4</i> e médias de idades dos respectivos grupos	34
Tabela 3 –	Cariótipos das 112 pacientes ST	37
Tabela 4 –	Características clínicas das 112 pacientes com síndrome de Turner	38
Tabela 5 –	Análise do polimorfismo rs3087243 do gene <i>CTLA-4</i> de pacientes ST com DAIs (Grupo caso) e pacientes ST (Contres)...	39
Tabela 6 –	Análise do polimorfismo rs3087243 do gene <i>CTLA-4</i> de pacientes ST com doenças inflamatórias crônicas (Casos) e pacientes ST (Controles)	40
Tabela 7 –	Análise do polimorfismo rs3087243 do gene <i>CTLA-4</i> de pacientes ST (Caso) e grupo controle saudável (Bufalo et al., 2020)	41
Tabela 8 –	Dados agrupados da análise do polimorfismo rs3087243 do gene <i>CTLA-4</i> de pacientes ST do grupo caso (com DAIs e/ou doenças inflamatórias) e pacientes ST (Controles)	58

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
A	Adenina
APCs	Células Apresentadoras de Antígeno
CCS	Centro de Ciências da Saúde
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cfDNA	DNA livre de células
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHAI	Haploinsuficiência de <i>CTLA-4</i> com Infiltração Autoimune
<i>CTLA-4</i>	Antígeno-4 associado a linfócitos T citotóxicos
DAIs	Doenças autoimunes
DC	Doença celíaca
del(Xp)	Deleção no braço curto do cromossomo X
del(Xq)	Deleção no braço longo do cromossomo X
DG	Doença de Graves
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
<i>FOXP3</i>	<i>Forkhead box P3</i>
G	Guanina
HC	Hospital das Clínicas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IgA	Imunoglobulina A
ICOS	Gene coestimulador induzível de células T
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
i(Xq)	Isocromossomo do braço longo do cromossomo X
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

NIPT	Triagem pré-natal não invasiva
OR	Odds Ratio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido ribonucleico
r(X)	Cromossomo X em anel
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
ST	Síndrome de Turner
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
Tregs	Células T reguladoras
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTR	Região não traduzida
%	Porcentagem
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	SÍNDROME DE TURNER	15
2.2	SISTEMA IMUNE	20
2.2.1	Tolerância e Autoimunidade	22
2.3	DOENÇAS AUTOIMUNES E INFLAMATÓRIAS	25
2.3.1	Doenças Autoimunes e Inflamatórias na ST	26
2.4	GENE <i>CTLA-4</i>	27
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	CASUÍSTICA	33
4.2	ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	34
4.3	BIOLOGIA MOLECULAR	35
4.3.1	Extração de DNA e RNA	35
4.3.2	Ensaio de Genotipagem	35
4.3.3	Ensaio de Expressão Gênica	35
4.4	ANÁLISE DOS DADOS	36
5	RESULTADOS	37
6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	50
	APÊNDICES	58
	ANEXOS	59
	CURRÍCULO VITAE (LATTES)	66

1 INTRODUÇÃO

A síndrome de Turner (ST) é uma das cromossopatias humanas mais comuns, com uma incidência de 1:2500 nascimentos de indivíduos femininos vivos. É uma aneuploidia causada por uma não disjunção cromossômica, definida citogeneticamente pela perda total ou parcial de um dos cromossomos sexuais, e expressa fenótipo característico devido a uma haploinsuficiência de genes normalmente expressos em ambos os cromossomos X.

Os achados clínicos comumente incluem a baixa estatura, na maioria das pacientes, caracteres dismórficos, como pescoço curto e/ou alado e cúbito valgo, atraso puberal, amenorreia primária, infantilismo sexual e infertilidade, bem como distúrbios endócrinos e metabólicos. Além das características citadas, pacientes com ST apresentam um risco aumentado de desenvolver doenças autoimunes e inflamatórias crônicas comparadas às mulheres em geral. O espectro inclui doenças autoimunes da tireoide, doença celíaca (DC), diabetes mellitus tipo 1 (DM1), obesidade, doença de Addison, alopecia areata, vitiligo e psoríase.

Apesar da alta prevalência de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas na ST, os mecanismos relacionados ao desenvolvimento dessas doenças ainda não foram completamente elucidados, e até o momento existem poucos estudos envolvendo genes ligados à imunidade nesses indivíduos. Genes com função de regulação da resposta imunológica, incluindo o gene da proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (*CTLA-4*) têm sido associados ao contexto imunológico de diversas doenças, na população geral e na ST. O *CTLA-4* é um potente regulador negativo da resposta imune mediada por células T, expresso principalmente em células T CD4+ e CD8+ ativadas, apresentando importante função na manutenção da tolerância periférica, prevenção de doenças autoimunes, e na manutenção e regulação da homeostase. Diante disso, polimorfismos do gene *CTLA-4*, que resultam em alteração da sua atividade imunossupressora, podem estar associados ao desenvolvimento de desordens autoimunes e inflamatórias em pacientes ST.

Este é o primeiro estudo a investigar o polimorfismo rs3087243 (G>A) do gene *CTLA-4* em pacientes com Síndrome de Turner, bem como o primeiro a avaliar diferenças de expressão deste gene em pacientes ST em comparação com indivíduos saudáveis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SÍNDROME DE TURNER

A síndrome de Turner (ST) é um dos distúrbios cromossômicos humanos mais comuns, caracterizado citogeneticamente pela perda total ou parcial de um dos cromossomos sexuais, com uma incidência de 1:2500 nascimentos de indivíduos femininos vivos. É uma aneuploidia causada por uma não disjunção cromossômica, e a única monossomia compatível com a vida em seres humanos (MARQUI, 2015; CUI et al., 2018; KRUSZKA et al., 2019).

No Brasil, o diagnóstico de ST é geralmente feito tardiamente devido a sua considerável variabilidade clínica. Contudo, o diagnóstico precoce fornece melhores oportunidades de reconhecimento e intervenção para possíveis comorbidades, enquanto o diagnóstico tardio pode impactar significativamente em questões relacionadas à saúde e qualidade de vida para essas pacientes (BUCERZAN et al., 2017; REDEL e BACKELJAUW, 2018).

O diagnóstico de ST pode ser realizado após o nascimento, inicialmente por meio do reconhecimento das características clínicas, sendo também possível realizar um diagnóstico preliminar durante o pré-natal, através da análise de cariótipo por amostragem de vilosidade coriônica ou amniocentese. De todo modo, fetos 45,X geralmente apresentam alterações ultrassonográficas, incluindo aumento na medição da translucência nuchal no primeiro trimestre, higroma cístico (acúmulo de líquido linfático anormal), hidropisia (acúmulo de fluido intersticial anormal), atraso de crescimento, anormalidades cardiovasculares e renais, entre outras características pré-natais, que podem gerar a suspeita clínica de ST (GRAVHOLT et al., 2017; REDEL e BACKELJAUW, 2018; BIANCHI, 2019).

Outros tipos de testes de triagem também são oferecidos durante o período gestacional, mesmo na ausência de fatores de riscos, como as triagens séricas do soro materno, que avalia os níveis de hormônios como o estriol e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e a triagem pré-natal não invasiva (NIPT), que apresenta a capacidade de detectar aneuploidias ao utilizar o DNA livre de células (cfDNA) ou DNA fetal livre presente no soro materno (REDEL e BACKELJAUW, 2018; CHOE et al., 2021).

O NIPT oferece diagnóstico preliminar da ST e de outras alterações cromossômicas, diferenciando o DNA materno do DNA fetal sem oferecer riscos durante o procedimento, pois é realizado a partir do sangue periférico materno.

Apresenta resultados superiores quando comparado com as triagens séricas, com uma capacidade de detecção de 98% de trissomias fetais e uma taxa de falso-positivo de apenas 0.13%, porém a porcentagem para detecção de monossomias é um pouco menor, variando de 90-93%, com uma taxa de falso-positivo menor que 1%. Desta forma, esta abordagem tem sido implementada como teste de rotina pré-natal em diversos países (ZHANG et al., 2017; ESWARACHARI et al., 2018; BORTH et al., 2021; CHOE et al., 2021).

O diagnóstico de ST durante a infância e a adolescência comumente envolve a presença de estigmas típicos da síndrome. Enquanto na infância é possível observar a presença de linfedema e redundância de pele na nuca, na adolescência, além das características citadas, a baixa estatura, o hipogonadismo, a amenorreia primária e atraso puberal são responsáveis pela suspeita clínica de ST. Em pacientes com uma idade mais avançada, comum em mulheres de meia-idade, a investigação pode se iniciar após a amenorreia secundária, infertilidade ou abortos recorrentes (CAMERON-PIMBLETT et al., 2017; LI et al., 2017; CARVALHO et al., 2018).

A idade de diagnóstico pode ser bastante variável, mas em todos os casos em que há achados de características clínicas relacionadas à ST o cariótipo por bandeamento G deve ser realizado, pois sem este o diagnóstico não pode ser definido corretamente (CAMERON-PIMBLETT et al., 2017; CUI et al., 2018). Há casos em que a análise citogenética por bandeamento G não tem tanta sensibilidade para detectar cromossomos com estrutura anormal se eles forem muito pequenos ou raros, então é possível utilizar métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), mas o padrão ouro para a determinação do diagnóstico é a análise do cariótipo por bandeamento G (CUI et al., 2018; BIANCHI, 2019; GRAVHOLT et al., 2019).

A constituição cromossômica mais frequente na ST, observada em 40 à 60% das pacientes, é a monossomia do cromossomo X, representado pelo cariótipo 45,X (Figura 1), mas a síndrome ainda pode apresentar outros cariótipos, incluindo alterações estruturais do cromossomo X (Figura 2) em aproximadamente 30% dos casos, como isocromossomos [i(Xq)], cromossomos em anel [r(X)], deleções de braço longo ou curto [del(Xp); del(Xq)] e cariótipos mais complexos, que podem surgir em linhagens homogêneas ou em mosaicismo, ou seja, na presença de duas ou mais linhagens celulares com constituições cromossômicas distintas. Além disso, 10-12% das mulheres com ST apresentam uma segunda linhagem cromossômica contendo

material do cromossomo Y normal ou alterado, sendo estimado que dessas mulheres, cerca de 3% apresentam cariótipo 45,X/46,XY (BISPO et al., 2013; GRANGER et al., 2016; MACHIELA et al., 2016; GRAVHOLT et al., 2019).

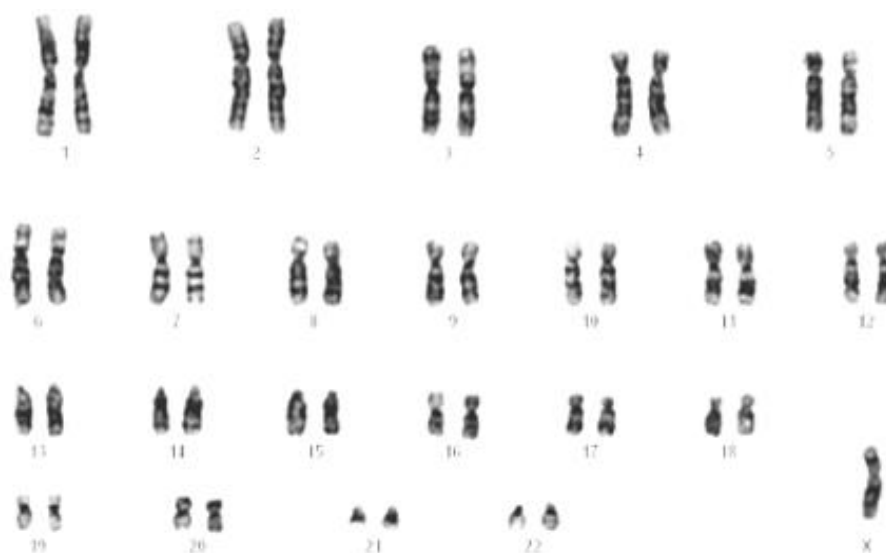


Figura 1 – Cariótipo 45,X com bandeamento G na Síndrome de Turner (Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana - UFPE).

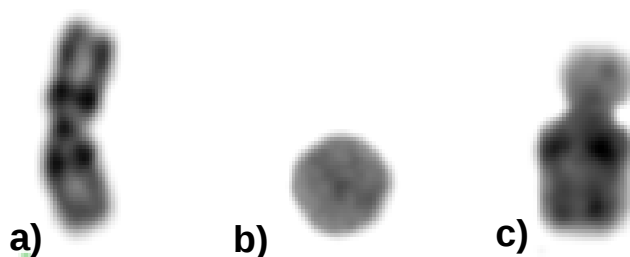


Figura 2 – Alterações estruturais do cromossomo X. a) Isocromossomo do braço longo do X. b) Cromossomo em anel. c) Deleção do braço curto do cromossomo X. (Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana - UFPE).

A ST é responsável por 1/5 dos casos de abortos espontâneos precoces, onde cerca de 99% dos embriões com o cariótipo 45,X são abortados espontaneamente durante o primeiro trimestre de gestação, com apenas 1% das gestações sendo bem-sucedida (ARAÚJO et al., 2010; VIUFF et al., 2019). É suposto que para o sucesso

da gestação de um indivíduo 45,X é necessário o mosaicismismo em alguma fase da vida embrionária ou que este esteja presente em algum órgão ou tecido do nativo (HOOK e WARBURTON, 2014).

Pacientes com ST que apresentam mosaicismismo cromossômico envolvendo sequências gênicas do cromossomo Y possuem um risco aumentado de aproximadamente 30% de desenvolver neoplasias gonadais, como o gonadoblastoma, e consequentemente, a gonadectomia profilática é recomendada (BUCERZAN et al., 2017; KWON et al., 2017; LENG et al., 2020). Alguns estudos apoiam a ideia da realização da triagem do cromossomo Y em todas as pacientes com ST, incluindo a investigação em diferentes tipos de tecido e a utilização de diferentes técnicas de diagnóstico, como as técnicas moleculares de PCR e FISH, que podem ser importantes para determinar a presença de diferentes linhagens celulares, principalmente em casos de mosaicismismo envolvendo o cromossomo Y. Contudo, ainda não há um consenso, e na maioria dos casos a investigação é realizada apenas na presença de características masculinas, como a virilização (BUCERZAN et al., 2017; JIVRAJ e STILLWELL, 2020).

As características fenotípicas da ST são expressas de modo particular devido a uma haploinsuficiência de genes normalmente expressos em ambos os cromossomos X, onde estes genes estão relacionados ao desenvolvimento e manutenção das funções ovarianas em pacientes com fenótipo feminino (STOCHHOLM et al., 2006; BISPO et al., 2013). Porém, o fenótipo característico da ST pode ocorrer não apenas devido ao desequilíbrio genômico decorrente da perda de partes do cromossomo X, mas também pode estar relacionado à influência da haploinsuficiência dos genes do X no genoma através de diferentes vias, como a inativação ou impressão de genes do cromossomo X, ou até mesmo por fatores epigenéticos, mecanismos estes que podem afetar genes associados dentro de uma determinada rede de genes e alterar a regulação da expressão gênica em todo o genoma (ÁLVAREZ-NAVA e LANES, 2018; VIUFF et al., 2019).

Devido à alta variedade cariotípica presente na ST, as características fenotípicas podem variar bastante e incluem baixa estatura na maioria das pacientes, disgenesia gonadal, atraso puberal, insuficiência ovariana, infantilismo sexual, infertilidade, distúrbios endócrinos e metabólicos, aumento do risco de doenças autoimunes, bem como outras condições médicas, como doenças cardiovasculares, e um perfil neurocognitivo específico (GRANGER et al., 2016; GRAVHOLT et al.,

2019; KRUSZKA et al., 2019). Algumas características dismórficas também podem ser observadas (Figura 3), como pescoço curto e/ ou alado, linha posterior de implantação dos cabelos baixa, linfedema de mãos e pés, tórax alargado com aumento da distância entre os mamilos, cúbito valgo, orelhas proeminentes, e diversas anormalidades, como malformações renais, cardiovasculares, auditivas e doenças autoimunes da tireoide (COLLET-SOLBERG et al., 2011; GRAVHOLT et al., 2017).

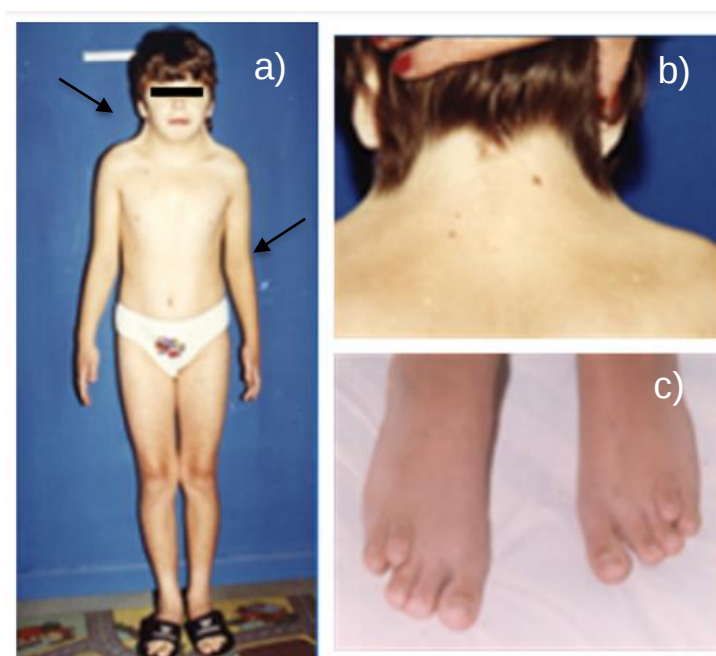


Figura 3 – Algumas características fenotípicas de pacientes com ST. a) Paciente portadora de ST evidenciando o pescoço curto e alado, cúbito valgo e baixa estatura. b) Linha posterior de implantação dos cabelos baixa. c) Quarto metatarso curto. (Fonte: BUCERZAN et al., 2017).

Dentre as características fenotípicas da ST, algumas são mais comuns do que outras e as pacientes com cariótipo 45,X, em 100% das células analisadas, tendem a ter manifestações mais graves da síndrome do que aquelas que possuem outras configurações cromossômicas. O fenótipo pode afetar vários sistemas fisiológicos e são responsáveis pela redução da expectativa de vida de 13 a 15 anos dessas pacientes em comparação com a população geral (BISPO et al., 2013; GRANGER et al., 2016, GRAVHOLT et al., 2019).

Além disso, mulheres portadoras da ST que apresentam cariótipos que incluem o i(Xq) apresentam risco aumentado de desenvolver doenças autoimunes, como o

hipotireoidismo, e pacientes com mosaicismo 45,X/46,XY se mostram menos propensas. De todo modo, pacientes com ST apresentam um risco aumentado de desenvolver doenças autoimunes e inflamatórias crônicas comparadas às mulheres no geral, sendo uma das condições clínicas recentemente apontadas como uma das mais frequentes da síndrome. No entanto, os mecanismos envolvidos no desbalanço imunológico em pacientes ST ainda não foram totalmente elucidados (CAMERON-PIMBLETT et al., 2017; SANTOS et al., 2018; SANTOS et al., 2019; ERDAL e BALKAN, 2019; KHATER, 2019).

2.2 SISTEMA IMUNE

O sistema imunológico, também denominado de sistema imune, corresponde a um conjunto de células, tecidos e moléculas que conferem defesa e resistência contra agentes patogênicos e tecidos lesionados (STOREY e JORDAN, 2008; ABBAS et al., 2015). É responsável por reconhecer uma variedade de moléculas potencialmente prejudiciais ao organismo, gerar respostas específicas para cada uma delas e destruí-las, diferenciando o que é próprio do não próprio no indivíduo, como hormônios, receptores celulares, metabólitos, organelas, interleucinas, entre outros; e moléculas não próprias, como vírus, bactérias e toxinas. Em condições normais, também é capaz de reconhecer moléculas próprias, que foram modificadas ou lesionadas, e eliminá-las (CORONEL-RESTREPO et al., 2017; KHAN e GHAZANFAR, 2018).

A imunidade é dividida em resposta imune inata, sendo um mecanismo de resposta rápida, e resposta imune adaptativa, onde o sistema imune tem a capacidade de montar uma resposta específica ao antígeno, ou seja, à molécula não própria, que é memorizada e utilizada novamente ao entrar em contato com o mesmo antígeno (MCCOMB et al., 2019; SHANKAR, 2020).

O sistema imune inato reage rapidamente, mas não especificamente aos agentes patogênicos, levando de minutos a horas para ser totalmente ativado diante de uma resposta inflamatória. É representado por barreiras físicas, químicas e biológicas, envolvendo células e tecidos como a pele e células epiteliais dos tratos gastrointestinais, geniturinário e respiratório, e células do sistema imune, que incluem, macrófagos, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas e células *Natural Killers*, e sistema complemento (Figura 4), não dependendo de contato prévio com agentes imunogênicos (CRUVINEL et al., 2010; KAUR e SECORD, 2019; NETEA et

al., 2019).

Em contrapartida, o sistema imune adaptativo é ativado de forma lenta, sendo necessários dias ou semanas para exercer sua atividade. Está envolvido em uma resposta imune mais específica, sendo importante nas fases finais da infecção e no desenvolvimento de uma memória imunológica, devido à capacidade de, após contatos iniciais com um determinado antígeno, fornecer células com capacidade de resposta rápida em infecções posteriores (BONILLA e OETTGEN, 2010; NETEA et al., 2019). A imunidade adaptativa é classificada em imunidade mediada por células e humoral. A imunidade mediada por células ocorre por meio de linfócitos T e os principais subgrupos incluem células citotóxicas ($CD8^+$), células auxiliares com grupamento de diferenciação 4 ($CD4^+$) e células T reguladoras (Tregs), enquanto a imunidade humoral funciona por meio de linfócitos B, que produzem várias classes de anticorpos (Figura 4) (SHANKAR, 2020).

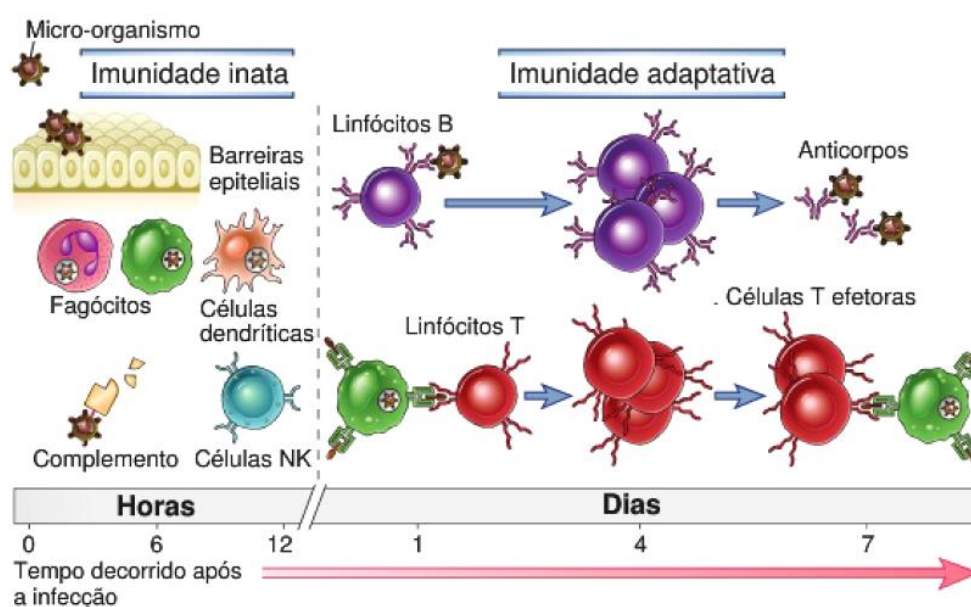


Figura 4 – Componentes das imunidades inata e adaptativa. A imunidade inata é composta por tecidos, como o epitélio que forma uma barreira física, além de células especializadas e sistema complemento. Imunidade adaptativa responde por meio de linfócitos T e B, anticorpos e interação com componentes da imunidade inata. (Fonte: ABBAS et al., 2012).

A especificidade do sistema imune adaptativo se deve ao grande repertório de receptores celulares expressos em linfócitos T e B, que são gerados a partir de recombinação somática e são específicos para antígenos únicos. No entanto, os

processos que envolvem as respostas imunes inatas e adaptativas não ocorrem de formas isoladas, eles interagem entre si para gerar uma resposta eficiente, onde a ativação de células do sistema imune adaptativo depende da indução de células pertencentes ao sistema imune inato, particularmente das células apresentadoras de antígeno (APCs), como as células dendríticas, que apresentam antígenos associados a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) para os linfócitos T (CRUVINEL et al., 2010; NETEA et al., 2019; SHANKAR , 2020).

Devido a quantidade de receptores celulares para detecção de antígenos, o sistema imune inevitavelmente gera receptores que reconhecem moléculas próprias como estranhas ao organismo, e para contornar esse problema, desenvolveu mecanismos para evitar a autodestruição, mecanismos de autotolerância ou tolerância imunológica. Existe um equilíbrio tênue entre a identificação de moléculas próprias e elementos com potencial de causar danos. Com isso, a homeostase do sistema imunológico é fundamental para que este funcione adequadamente, pois falhas no processo de manutenção e regulação da tolerância podem provocar o desenvolvimento de autoimunidade e doenças autoimunes (KHAN e GHAZANFAR, 2018; RYBA-STANISŁAWOWSKA et al., 2019).

2.2.1 Tolerância e Autoimunidade

A tolerância pode ser definida como um estado em que o sistema imunológico é capaz de tolerar determinados antígenos, como os autoantígenos, que são reconhecidos por células imunológicas, sem promover um ataque aos tecidos que os exibem. Envolve dois mecanismos principais, a tolerância central e a tolerância periférica (BANO et al., 2019).

A tolerância central se refere ao silenciamento ou eliminação de linfócitos imaturos que reagem contra autoantígenos, os antígenos próprios, em um rigoroso processo de seleção. No desenvolvimento das células T, elas migram da medula óssea para o timo para completar sua maturação, onde são apresentadas a peptídeos ligados às moléculas do MHC nas células epiteliais corticais do timo, sendo selecionados positivamente no córtex tímico os linfócitos que apresentam uma afinidade baixa ou intermediária para autoantígenos. Posteriormente, os linfócitos T migram para a medula tímica e interagem com o complexo MHC e peptídeo próprio presente em APCs, e os que apresentam baixa afinidade para autoantígenos são selecionados para maturação e ocupação em tecidos periféricos, formando o conjunto

de linfócitos efetores e reguladores do organismo. Contudo, os linfócitos T com alta afinidade são selecionados negativamente na medula do timo e excluídos (Figura 5) (KHAN e GHAZANFAR, 2018; STOLP et al., 2019).

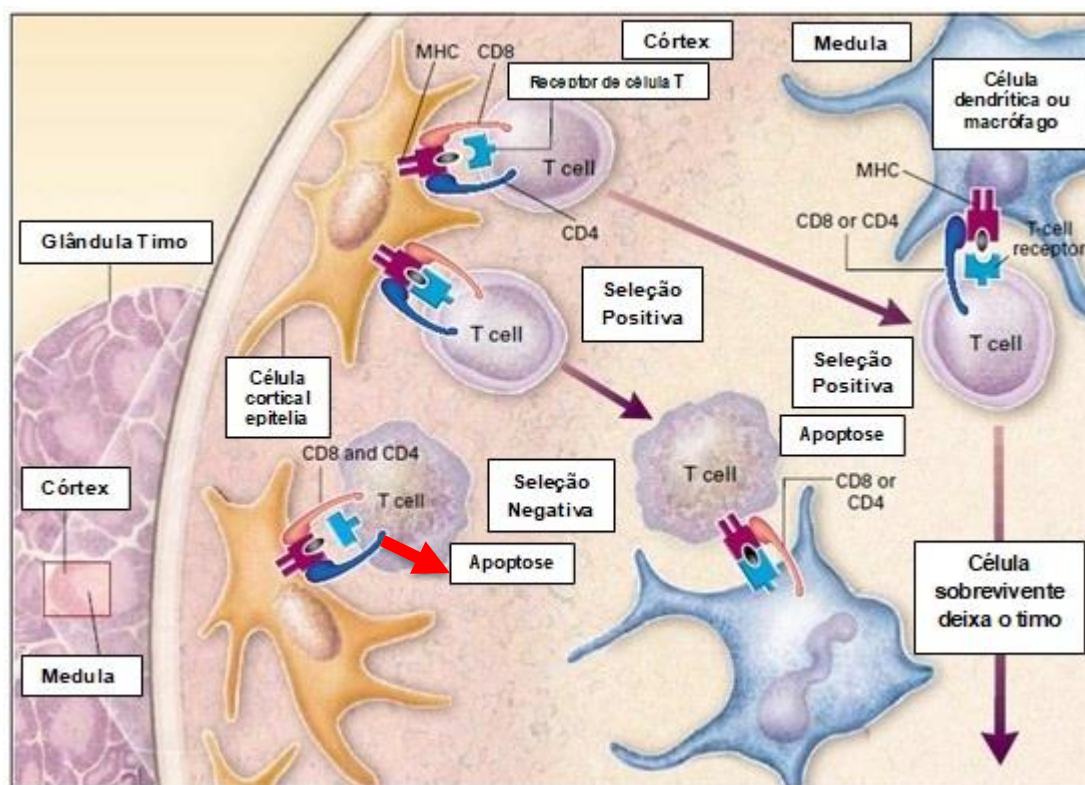


Figura 5 – Mecanismos de tolerância central. A seleção positiva (setas roxas) garante a circulação de células T com afinidade baixa ou intermediária para antígenos próprios em tecidos periféricos. Células T com alta afinidade para autoantígenos são selecionadas negativamente (seta vermelha) e sofrem apoptose. (Fonte: Adaptado de DELVES e ROITT, 2000).

Apesar da rigidez dos mecanismos da tolerância central, há linfócitos T autorreativos que escapam dos processos de seleção no timo e migram para os órgãos periféricos, tornando necessário o uso de mecanismos adicionais para verificação da reposta imune. A presença de células T com alta afinidade por moléculas próprias é regulada por meio da tolerância periférica (Figura 6), que envolve vários mecanismos diferentes, como anergia, ignorância clonal, apoptose e ação das células T reguladoras (Tregs) (STOLP et al., 2019; KUCUKSEZER et al., 2020).

A maioria das células T selecionadas pelos mecanismos de tolerância imunológica se diferenciam em células efetoras CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, um subconjunto de células T reguladoras, as células Tregs, apresentam um papel

indispensável no estabelecimento e manutenção da tolerância periférica, prevenindo o desenvolvimento de autoimunidade. As células Tregs são células T especializadas com o fenótipo $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$, ou seja, expressam antígenos de superfície CD4 e CD25, além do fator de transcrição da família *forkhead box P3* (FOXP3). A função das Tregs é suprimir a ativação, proliferação e funções efetoras de outras células do sistema imune, ao produzir citocinas, como a interleucina 10 (IL-10), fator de crescimento transformador β (TGF- β), e pela expressão de moléculas de superfície com função supressora como o antígeno-4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) (GAWLIK et al., 2018; KUCUKSEZER et al., 2020).

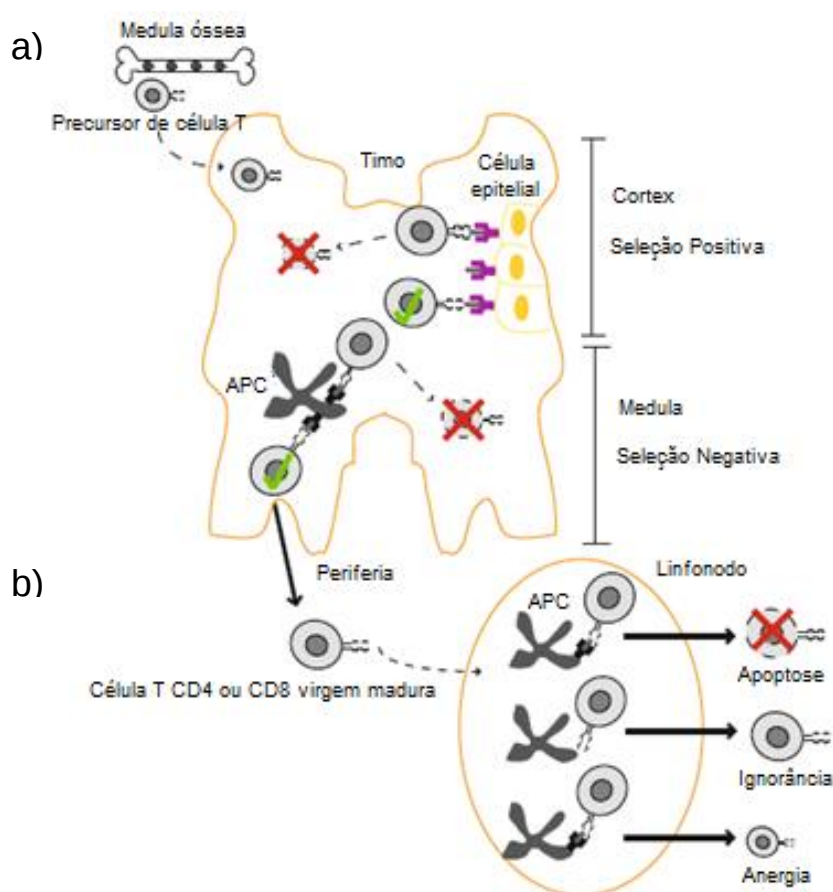


Figura 6 – Mecanismos de tolerância central e periférica. a) No timo ocorrem eventos de tolerância central, com seleção positiva e negativa de células T. b) Células T autorreativas podem escapar da tolerância central e migrar para tecidos periféricos (Linfonodo). Mecanismos de tolerância periférica garantem a exclusão ou não responsividade de células T autorreativas. (Fonte: Adaptado de STOLP et al., 2019).

Falhas em um dos pontos de verificação da resposta imune ou quebra da

tolerância imunológica pode causar a expansão descontrolada de células T autorreativas, levando à inflamação, autoimunidade, desenvolvimento de doenças autoimunes e consequente dano tecidual (WANG et al., 2015). Um grau de autoimunidade, ou seja, de reatividade de células do sistema imune contra antígenos próprios, é encontrado em todos os indivíduos. No entanto, possíveis falhas do sistema imune geralmente não são suficientes para causar doenças autoimunes. Embora a etiologia e patogênese da maioria dessas doenças permaneça sem explicações precisas, o seu surgimento pode estar envolvido com fatores genéticos, ambientais e hormonais, e a doença ocorre apenas quando os mecanismos de prevenção a lesões do tecido não forem mais suficientes, por exemplo, quando a resposta regulatória não funciona adequadamente ou quando a resposta prejudicial é potencializada (CHEN et al., 2015; BANO et al., 2019).

2.3 DOENÇAS AUTOIMUNES E INFLAMATÓRIAS

As doenças autoimunes (DAIs) são consideradas doenças raras que podem se desenvolver em qualquer idade, porém são relativamente frequentes, sendo estimado que até 10% da população em geral seja afetada por uma ou mais doença autoimune ou inflamatória crônica. Na população em geral ocorre mais comumente em mulheres do que nos homens e apresentam um impacto significativo na prestação de serviços de saúde, pois estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo, devido à sua natureza crônica e frequentemente grave (BAKALOV et al., 2012; BIANCHI et al., 2012).

As DAIs são caracterizadas pela desregulação do sistema imune que resulta na quebra da tolerância ao autoantígeno. Podem ocorrer, além de gatilhos ambientais e hormonais, devido a alterações e polimorfismos genéticos que podem desencadear perda da autotolerância. Estudos indicam que genes ligados ao cromossomo X podem exercer um importante papel no desenvolvimento de DAIs e, consequentemente, dosagens alteradas de genes do cromossomo X, que estão relacionadas a insuficiência ovariana e ST, duas condições frequentemente associadas com DAIs, podem influenciar na manutenção ou perda da tolerância. Porém outros mecanismos do sistema imune podem estar envolvidos no surgimento de doenças autoimunes (BIANCHI et al., 2012; CHEN et al., 2015; EGGENHUIZEN et al., 2020).

2.3.1 Doenças Autoimunes e Inflamatórias na ST

Pacientes com ST apresentam um risco aumentado, aproximadamente duas vezes maior, de desenvolver doenças autoimunes e inflamatórias crônicas comparadas às mulheres no geral, e até quatro vezes maior, quando comparadas aos homens (GAWLIK et al, 2018). Essa prevalência aumenta com a idade e mais de uma doença autoimune pode ocorrer ao mesmo tempo na mesma paciente (MOHAMED et al., 2018; WEGIEL et al., 2019).

A alteração autoimune mais comum na ST, que afeta cerca de 50% das pacientes, é tireoidite de Hashimoto. No entanto, o espectro ainda inclui outras doenças, como o hipotireoidismo, doença celíaca (DC), diabetes mellitus tipo 1 (DM1), alopecia areata (Figura 7), doenças inflamatórias do intestino, como doença de Crohn e colite ulcerosa, artrite reumatóide juvenil, doença de Addison e alguns distúrbios cutâneos, como o vitiligo (Figura 7) e psoríase (VILLANUEVA-ORTEGA et al., 2017; KHATER, 2019; CASTO et al., 2021). Pacientes com ST ainda apresentam desordens imunológicas, com níveis mais baixos de imunoglobulinas, IgG, IgM e IgA, comparadas com indivíduos sem alterações genéticas, bem como baixa quantidade de linfócitos T e B e responsividade mitogênica reduzida (SHANKAR et al., 2020).

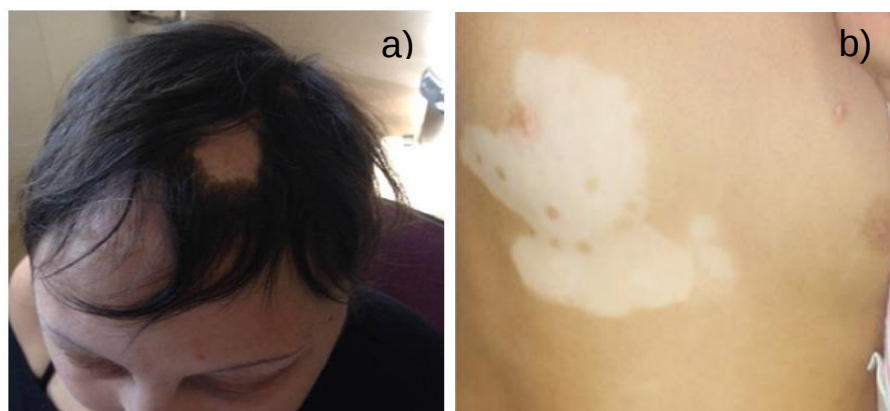


Figura 7 – Pacientes ST com alterações dermatológicas autoimunes. a) Paciente com Alopecia areata. b) Paciente com vitiligo. (Fonte: GIANFALDONI et al., 2017; adaptado de MIURA e YAMAMOTO, 2016).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a maior susceptibilidade de mulheres com ST no desenvolvimento de doenças autoimunes, dentre os quais, podem ser incluídos a haploinsuficiência de genes do cromossomo X, origem materna do cromossomo X, produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, redução de

citocinas anti-inflamatórias e hipogonadismo (GAWLIK et al., 2018; WEGIEL et al., 2019). O estrogênio também é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de DAIs, pois mulheres com ST naturalmente têm menor exposição ao estrogênio e podem fazer uso de terapia hormonal, embora o impacto do tratamento ainda esteja em estudo (WEGIEL et al., 2019; CASTO et al., 2021).

O cromossomo X abriga o maior número de genes relacionados ao sistema imunológico no genoma humano, incluindo um locus do MHC no braço longo. Dessa forma, a perda de um locus que engloba genes específicos poderia levar à desregulação da resposta imune e da tolerância, aumentando o risco de desenvolvimento de DAIs em pacientes ST. Além disso, foi observada uma relação entre a presença de três cópias de material genético do braço longo do cromossomo X, em pacientes ST e cariótipo 46,X,i(Xq), com uma maior propensão ao desenvolvimento de doenças da tireoide nessas pacientes (KHATER, 2019; STOKLASOVA et al., 2019).

Alterações no cromossomo X provavelmente estão relacionadas a maior prevalência de autoanticorpos observada em mulheres ST. A haploinsuficiência de genes do cromossomo X pode ser responsável pela falta de exposição de células T a antígenos próprios no timo e escape de células T autorreativas para a periferia, podendo levar a autoimunidade (GROSSI et al., 2013; HAMZA et al., 2013; SHANKAR et al., 2020).

Genes relacionados com os processos de regulação da resposta imune, tolerância central e periférica, apresentação de antígenos e ativação de linfócitos têm sido recentemente estudados na ST, incluindo o gene *FOXP3* e o gene do antígeno-4 associado a linfócitos T citotóxicos (*CTLA-4*), que são cruciais na atividade imunossupressora. Polimorfismos que resultam em alterações das atividades desses genes podem estar associados ao desenvolvimento de DAIs em pacientes ST (SANTOS et al., 2018; CASTO et al., 2021).

2.4 GENE *CTLA-4*

O gene *CTLA-4* está localizado no cromossomo 2 (2q33) em humano, próximo aos genes de outras moléculas reguladoras, *CD28* e *ICOS* (Coestimulador induzível de células T) (Figura 8). Esse gene apresenta comprimento total de 6,1 kb de DNA, com quatro éxons e três íntrons, onde o éxon 1 codifica o peptídeo sinal, o éxon 2 codifica o domínio extracelular de ligação ao ligante, o éxon 3 codifica o domínio

transmembranar e o éxon 4 codifica a cauda citoplasmática da proteína, o domínio intracelular (TU et al., 2017; MITSUIKI et al., 2018; GARCIA-PEREZ et al., 2019).

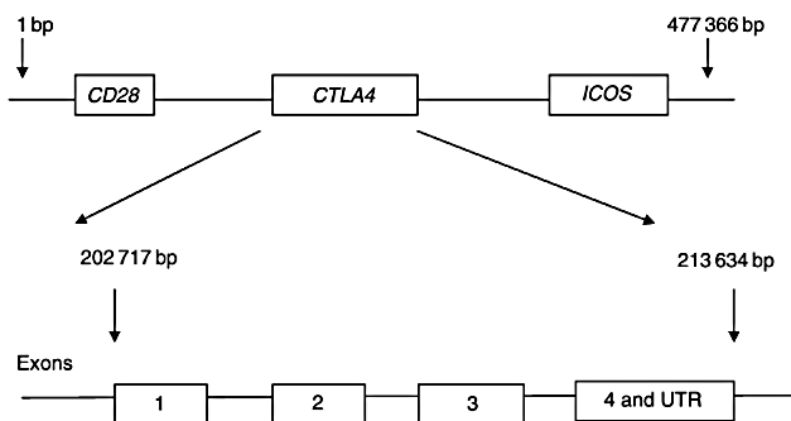


Figura 8 – Estrutura do gene *CTLA-4*. (Fonte: Adaptado de GOUGH et al., 2005).

A região onde se encontra o gene *CTLA-4* é altamente polimórfica, com polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) exônicos, intrônicos e de promotores (TU et al., 2017). Entre os polimorfismos mais investigados estão os SNPs +49 A/G no éxon 1 (rs231775), com uma substituição da base adenina (A) por uma guanina (G), e o rs3087243, também conhecido como CT60, que corresponde a um polimorfismo G>A na posição +6230 na região 3' não traduzida (UTR) ou região 3'-UTR (Figura 9) (KAARTINEN et al., 2007; VALK et al., 2008; TING et al., 2016).



Figura 9 – Polimorfismos do gene *CTLA-4*. Em destaque, dois dos polimorfismos mais estudados, rs231775 no éxon 1 e rs 3087243 (CT60). (Fonte: Adaptado de TU et al., 2017)

A substituição de bases nitrogenadas do SNP rs231775 (+49 A/G) está associada a uma atividade supressora reduzida e aumento da proliferação de células T. A alteração de função ocorre devido a uma mudança do aminoácido treonina para

alanina no códon 17 da proteína CTLA-4, o que afeta sua modificação pós-traducional (FERNÁNDEZ-MESTRE et al., 2009; FATHIMA et al., 2019; SANTOS et al., 2018). Enquanto isso, o SNP rs3087243 (CT60), outro polimorfismo funcional do gene *CTLA-4*, está localizado próximo ao sítio de terminação poli(A), na região 3'-UTR. Estudos sugerem que este SNP é importante para a manutenção de um *splicing* eficiente e pode desempenhar um papel na estabilidade do mRNA do *CTLA-4*, onde alterações nessa sequência gênica possivelmente podem levar a uma resposta imune desequilibrada e desencadear um distúrbio autoimune ou doenças inflamatórias (UEDA et al., 2003; TU et al., 2017).

Devido a importância do *CTLA-4* na manutenção da homeostase, polimorfismos do gene estão sendo relacionados a desordens autoimunes, como a doença de Graves, tireoidismo de Hashimoto, doença de Addison, diabetes tipo 1, e doença celíaca, em vários estudos de associação genética realizados em diferentes grupos raciais (VALK et al., 2008; TING et al., 2016; BUFALO et al., 2020).

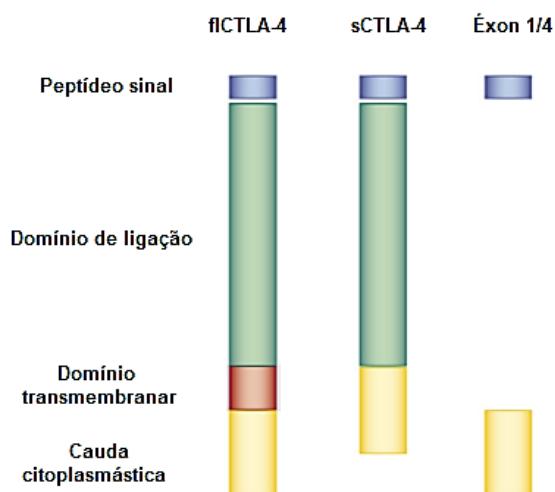


Figura 10 – Isoformas da proteína CTLA-4. (Fonte: Adaptado de VALK et al., 2008).

A proteína CTLA-4 é membro da superfamília das imunoglobulinas. Em humanos, além da proteína de comprimento total (flCTLA-4) com 672 pb, outras duas variantes podem ser geradas por *splicing* alternativo (Figura 10), uma isoforma solúvel (sCTLA-4) de 562 pb, que não apresenta o éxon 3 e uma isoforma de 214 pb, contendo apenas os éxons 1 e 4 (UEDA et al., 2003; REPNIK e POTOCHNIK, 2010). Assim como a flCTLA-4, a forma solúvel apresenta função inibitória, mas por não apresentar o domínio transmembranar, é secretada e detectável no soro humano em baixos níveis,

sendo encontrados níveis séricos mais elevados em pacientes com doenças autoimunes. Para a forma alternativa 1/4 de CTLA-4 é sugerido que apresente função estimuladora, promovendo a ativação de células T (SIMONE et al., 2009; JOLLER et al., 2012).

O CTLA-4 é um potente regulador negativo da resposta imune mediada por células T. É expresso constitutivamente em células T reguladoras (Tregs), mas em células T CD4⁺ e CD8⁺ é expresso apenas após a ativação. As células T apresentam a necessidade de dois sinais para sua ativação, o primeiro envolve o reconhecimento do complexo antígeno-MHC de uma célula apresentadora de antígeno (APC) pelo TCR da célula T, mas este contato é insuficiente para sua ativação completa; o segundo é um sinal co-estimulatório, fornecido pela interação de ligantes de superfície em APCs, chamados CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2), que interagem com o receptor co-estimulatório CD28 nas células T. A ação de CD28 estimula a produção de citocinas, como a IL-2, resultando na ativação e proliferação de células T (Figura 11) (SIMONE et al., 2009; MITSUIKI et al., 2018; SALINAS-SANTANDER et al., 2020).

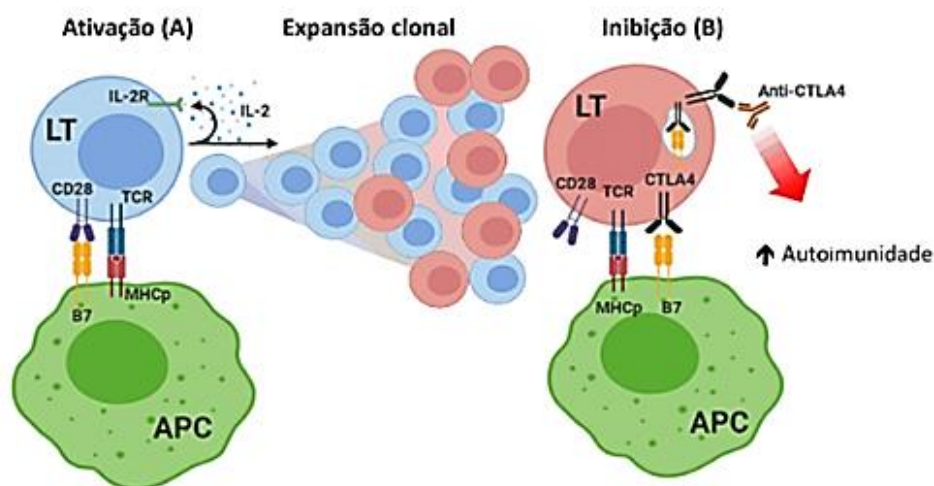


Figura 11 – Ativação e inibição de células T pelos receptores CD28 e CTLA-4, respectivamente. (Fonte: Adaptado de TEXEIRA et al., 2019)

O CTLA-4 é um receptor homólogo ao CD28, que se liga aos mesmos ligantes CD80 e CD86, porém, com uma maior afinidade. A maior parte das moléculas de CTLA-4 se encontra contida em compartimentos intracelulares em células Tregs, e migram para a superfície celular após o sinal co-estimulatório do CD28, e em células T convencionais, é expresso após a ativação. Uma vez que o CTLA-4 se liga aos

ligantes presentes na superfície celular de APCs, ele pode causar a remoção ou ingestão do complexo, e inibe a ativação e proliferação de células T por diversos mecanismos com função supressora, incluindo a competição com o CD28 e redução do sinal co-estimulatório. É capaz de atenuar a resposta imune e estimular a função supressora das Tregs, regulação negativa que é importante na manutenção da tolerância periférica e na prevenção de doenças autoimunes (PATERSON et al., 2015; VERMA et al., 2017; KHAN e GHAZANFAR, 2018; MITSUIKI et al., 2018; GARCIA-PEREZ et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a distribuição do polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4*, bem como avaliar seu perfil de expressão, em pacientes com Síndrome de Turner e grupo controle.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar se existe distribuição diferencial entre as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4* em pacientes ST com e sem doenças autoimunes e inflamatórias crônicas.
2. Verificar se existe distribuição diferencial entre as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4* em pacientes ST em comparação com um grupo controle saudável.
3. Avaliar se existe uma expressão diferencial do gene *CTLA-4* em pacientes ST em comparação com o grupo controle.
4. Investigar se existe uma expressão diferencial do gene *CTLA-4* entre pacientes ST com doenças autoimunes/inflamatórias crônicas e pacientes ST sem tais condições.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O estudo é do tipo transversal analítico, com comparação de grupos caso e controle. As pacientes com a síndrome de Turner foram provenientes do Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFPE (HC) e Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Cerca de 5ml de sangue periférico foi coletado de cada paciente em tubos contendo heparina como anticoagulante e em tubos de EDTA, e os achados clínicos das pacientes incluídas no estudo foram obtidos por revisão dos prontuários médicos.

Para a análise de polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4*, o grupo amostral foi composto por 112 pacientes ST, com média de idade de 12 anos, variando de 1 mês de vida a 35 anos (0.1 - 35) (Mediana = 12 anos e Desvio Padrão = 8.47) e residentes do Estado de Pernambuco. As análises do polimorfismo entre pacientes ST foram realizadas duas etapas: Inicialmente, amostra das 112 pacientes foi dividida em dois grupos: (1) Casos - Indivíduos com ST que apresentaram doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas (n=38), e (2) Controle - Indivíduos com ST sem doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas (n=74).

A segunda etapa da análise do polimorfismo foi realizada separando grupos de pacientes ST. A primeira análise para a avaliação das distribuições das frequências consistiu em 24 pacientes ST com doenças autoimunes (DAIs) e 88 pacientes ST controles, sem histórico de tais condições. A segunda análise foi realizada em 22 pacientes ST com doenças inflamatórias crônicas (DICs) e 90 pacientes ST controles. As médias de idades de cada grupo se encontram na tabela 1.

Posteriormente, a análise do SNP rs3087243 do gene *CTLA-4* também foi realizada comparando pacientes ST (n=112) e um grupo controle saudável (n=246). Na ausência de um número significativo de voluntários para compor o grupo controle, a análise do SNP foi realizada utilizando dados do grupo controle do estudo de Bufalo et al. (2020). Para incluir no presente estudo, apenas as mulheres do grupo controle foram selecionadas.

Tabela 1 – Grupos de análise do polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4* e médias de idades dos respectivos grupos.

Análise do Polimorfismo	
Grupo Caso	Grupo Controle
1. 24 Pacientes ST com DAIs 12.77 anos (DP±6.4)	88 Pacientes ST sem DAIs 11.9 anos (DP±9)
2. 22 Pacientes ST com DICs 13.45 anos (DP±6.34)	90 Pacientes ST sem DICs 11.7 anos (DP±8.9)
3. 112 Pacientes ST 12 anos (DP±8.47)	246 Indivíduos saudáveis 36.86 anos (DP±12.95)

DP = Desvio Padrão

A avaliação da expressão do gene *CTLA-4* foi realizada a partir de duas análises: (1) Análise da expressão gênica de pacientes ST, grupo caso composto de 23 indivíduos com Síndrome de Turner e grupo controle composto de 21 indivíduos saudáveis, voluntárias do sexo feminino, e (2) Análise da expressão do *CTLA-4* entre nove pacientes ST com doenças autoimunes (DAIs) e inflamatórias crônicas (DICs), e 14 pacientes ST sem tais condições clínicas, cujas médias de idade podem ser observadas na tabela 2.

Tabela 2 – Grupos de análise da expressão do gene *CTLA-4* e médias de idades dos respectivos grupos.

Análise do Polimorfismo	
Grupo Caso	Grupo Controle
1. 23 Pacientes ST 19.96 anos (DP±8.37)	21 Indivíduos saudáveis 30.38 anos (DP±9.86)
2. 9 Pacientes ST com DAIs e DICs 21.67 anos (DP±8.26)	14 Pacientes ST sem DAIs e DICs 18.86 anos (DP±8.56)

DP = Desvio Padrão

4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente estudo foi realizado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde – CCS/UFPE, Nº do CAAE 0485.0.172.000-11 (ANEXO A). Os pacientes incluídos foram orientados sobre a proposta do estudo e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO B).

4.3 BIOLOGIA MOLECULAR

4.3.1 Extração de DNA e RNA

A extração de DNA das pacientes com ST foi realizada a partir de leucócitos totais das amostras de sangue periférico, através do Kit de extração e purificação de DNA Illustra blood genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi extraído de leucócitos totais das amostras de sangue periférico a partir do reagente Trizol (Invitrogen, EUA).

4.3.2 Ensaios de genotipagem

Os ensaios de genotipagem foram realizados em 112 pacientes com ST, utilizando o sistema Taqman® (Applied Biosystems, Foster City, CA) com sondas fluorogênicas específicas para o polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4*. As reações de genotipagem foram realizadas por PCR em tempo real, utilizando o equipamento Rotor Gene 6000 (Cobertt Research, Austrália).

4.3.3 Ensaios de Expressão Gênica

Para avaliar os níveis de mRNA do *CTLA-4* em pacientes com ST (n=23) e no grupo controle saudável (n=21), o RNA total foi isolado e posteriormente quantificado no equipamento NanoDrop™, a partir da espectrofotometria, para avaliar a concentração total e pureza do RNA.

A síntese de cDNA, com a concentração de RNA total padronizada em 500ng, foi realizada com o kit comercial ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Os ensaios de expressão foram realizados utilizando sondas Taqman® para o gene alvo, *CTLA-4*, e o sistema *SYBR Green* para o gene de referência, *HPRT1*, no equipamento ABI7500 (Applied biosystems), finalizando com a aplicação do método de análise $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para a quantificação relativa da expressão gênica. O gene de referência utilizado foi escolhido após testes com

seis genes candidatos, onde o gene *HPRT1* se mostrou mais estável, segundo a plataforma geNorm.

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

A análise estatística foi realizada utilizando o SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web) e o programa R (<https://www.r-project.org/>). As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta por meio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o teste do qui-quadrado (X^2) e posteriormente, o teste exato de Fisher.

A influência do polimorfismo sobre o risco para o desenvolvimento de doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas na ST foi estimada pelo teste de Odds Ratio (OR), utilizando intervalo de confiança de 95% para os parâmetros e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A análise do poder amostral, através do *post-hoc*, foi realizada por meio do programa G* Power (versão 3.1.9.7, disponível em <http://www.gpower.hhu.de/>), com uma probabilidade de erro de 0.05.

Na análise da expressão gênica, para avaliar se as amostras apresentavam distribuição normal foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Por fim, a análise estatística para as amostras não normalizadas foi realizada utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, e para o grupo amostral com distribuição normal foi utilizado o teste paramétrico T Student, ambos com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), a partir do programa R e os gráficos foram gerados a partir do programa GraphPad.

5 RESULTADOS

5.1 CARIÓTIPOS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM ST

A tabela 3 mostra o cariótipo das 112 pacientes com a síndrome de Turner, com média de idade de 12 anos (0.1 - 35 anos).

Tabela 3 – Cariótipos das 112 pacientes ST.

Cariótipos	N (%)
45,X	56 (50)
45,X/46,X,i(Xq)	18 (16.07)
46,X,i(Xq)	7 (6.25)
45,X/46,X,(r)	6 (5.36)
45,X/46,X,+mar	5 (4.46)
45,X/46,XY	4 (3.57)
45,X/46,XX	2 (1.79)
45,X/46,X,del(Xq)	2 (1.79)
Outros cariótipos	12 (10.71)
Total	112 (100)

O cariótipo com a monossomia do cromossomo X (45,X) foi o mais frequente, sendo observado em 50% da amostra, seguido do cariótipo mosaico com i(Xq), compreendendo 16.07% dos casos. Outras configurações cromossômicas também foram observadas, compreendendo 33.93% dos casos, incluindo cariótipos com cromossomo X em anel [r(X)], cromossomo marcador (+mar), cariótipos com deleções no cromossomo X [del(Xp) e del(Xq)] e cariótipos com mosaicismo para o cromossomo Y.

As pacientes apresentaram características clínicas típicas da ST, sendo os achados mais proeminentes: a baixa estatura em 86 pacientes (76,79%), infantilismo sexual em 83 (74,11%), pescoço curto e alado em 44 (39.29%), amenorreia primária em 43 (38.39%) e baixa implantação dos cabelos em 32 (28.57%). Todos os achados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4 – Características clínicas das 112 pacientes com síndrome de Turner.

Características clínicas	N (%)
Baixa estatura	86 (76,79)
Anormalidades esqueléticas	50 ^a (44,64)
Osteopenia/osteoporose	11 (9,82)
Infantilismo sexual	83 ^b (74,11)
Amenorreia primária	43 (38,39)
Sobrepeso/obesidade	14 (12,5)
Dislipidemia	6 (5,36)
Doença autoimune da tireoide	23 (20,54)
Alopecia	2 (1,78)
Doença inflamatória crônica (com sobrepeso/obesidade)	22 (19,64)
Doença neurológica	20 (17,86)
Doença cardiovascular	22 (19,64)
Malformação renal	10 (8,93)
Doenças de pele	18 (16,07)
Edema	27 (24,11)
Hipertelorismo mamário	29 (25,89)
Deficiência auditiva	10 (8,93)
Baixa implantação de orelhas	18 (16,07)
Hipotonia muscular	3 (2,68)
Palato arqueado	17 (15,18)
Alteração anatômica dos olhos	13 (11,61)
Pescoço curto e alado	44 (39,29)
Baixa implantação do cabelo	32 (28,57)
Redundância de pele no pescoço	19 (16,96)

^a As principais condições clínicas são cubitus valgus, depressão de xifóides, metacarpos curtos e Genu valgus; ^b Ausência de desenvolvimento mamário, ausência de pêlos axilares e pubianos, útero hipoplásico e ausência de ovários.

Das 112 pacientes ST, 24 (21.43%) apresentaram doenças autoimunes, incluindo tireoidite de Hashimoto, hipotireoidismo e alopecia, e 22 (19.64%) apresentaram algum tipo de doença inflamatória crônica (Tabela 4), incluindo sobrepeso e obesidade. Considerando a sobreposição de mais de um tipo de doença

em uma mesma paciente, no total, 38 pacientes apresentaram algum tipo de doença autoimune e/ou inflamatória crônica, compreendendo 34% da amostra. Das 38 pacientes com doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas, que formaram o grupo caso, 16 (42.1%) apresentaram apenas doenças autoimunes, 14 (36.84%) apresentaram apenas doenças inflamatórias e 8 (21.05%) apresentaram ambas as condições clínicas.

5.2 ANÁLISE DO POLIMORFISMO RS3087243 DO GENE *CTLA-4*

A análise de polimorfismo rs3087243 (G>A) do gene *CTLA-4* foi realizada em 112 pacientes ST, avaliando o SNP dentro do grupo de pacientes ST com (grupo caso) e sem doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (grupo controle). Em etapas iniciais, as 38 pacientes ST que apresentaram o desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas foram incluídas no grupo caso e as 74 pacientes ST restantes, que não apresentaram tais doenças, foram incluídas no grupo controle. Contudo, o poder estatístico encontrado foi de apenas 19.48%, parâmetro longe do ideal (a partir de 80%) para considerar o estudo eficiente (APÊNDICE A).

Posteriormente, a análise do polimorfismo foi realizada, comparando grupos caso e controle para avaliação do desenvolvimento de doenças autoimunes (Tabela 5) e outro estudo para avaliação do desenvolvimento de doenças inflamatórias (Tabela 6). As distribuições alélicas e genótípicas não se encontram em conformidade com o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Tabela 5 – Análise do polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4* de pacientes ST com DAIs (Grupo caso) e pacientes ST (Controles).

Polimorfismo	Casos N (%) (24)	Controles N (%) (88)	Odds ratio (95% IC)	<i>p-value</i>
rs3087243				
Alelos				
G	26 (0.54)	66 (0.38)	0.51 (0.25-1.02)	0.047
A	22 (0.46)	110 (0.62)		
Genótipos				
GG	12 (50)	28 (31.8)	0.473 (0.04-2.75)	0.475
GA	2 (8.3)	10 (11.4)		
AA	10 (41.7)	50 (56.8)	0.47 (0.16-1.36)	0.142

Resultados expressos em: valor absoluto (valor relativo)

Após a análise do polimorfismo entre os grupos caso (pacientes ST com doenças autoimunes) e controle (pacientes ST sem DAIs), foi observado no grupo caso o genótipo GG (selvagem) em 50% das pacientes (Tabela 5), 8.3% do genótipo GA (heterozigoto para o polimorfismo) e 41.7% apresentaram o genótipo AA (variante). No grupo controle, foi encontrado 31.8% do genótipo GG, 11.4% GA e 56.8% AA. Um *p value* de 0.047 foi observado na frequência alélica, sugerindo uma distribuição diferencial nessas pacientes, contudo, não foram observadas distribuições genotípicas com diferenças estatísticas significativas entre os grupos caso e controle. O poder estatístico foi de 97%, com 5% de confiança, na comparação dos genótipos dos grupos caso e controle.

Tabela 6 – Análise do polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4* de pacientes ST com doenças inflamatórias crônicas (Casos) e pacientes ST (Controles).

Polimorfismo	Casos N (%) (22)	Controles N (%) (90)	Odds ratio (95% IC)	<i>p-value</i>
rs3087243				
Alelos				
G	16 (0.36)	76 (0.42)		
A	28 (0.64)	104 (0.58)	1.28 (0.61-2.72)	0.5
Genótipos				
GG	6 (27.3)	34 (37.8)		
GA	4 (18.2)	8 (8.9)	2.77 (0.46-15.31)	0.21
AA	12 (54.5)	48 (53.3)	1.41 (0.44-5.06)	0.6

Resultados expressos em: valor absoluto (valor relativo)

A tabela 6 se refere a análise do SPN rs3087243 em pacientes ST com e sem doenças inflamatórias crônicas. No grupo caso, com pacientes ST com doenças inflamatórias crônicas, foi observado o genótipo GG (selvagem) em 27.3% delas, 18.2% apresentaram o genótipo GA (heterozigoto para o polimorfismo) e 54.5% o genótipo AA (variante). No grupo controle, contendo pacientes ST sem doenças inflamatórias crônicas, foram encontradas 37.8% das pacientes com o genótipo GG, 8.9% GA e 53.3% AA. Para esta análise, não foram observadas distribuições alélicas e genotípicas com diferenças estatísticas significativas. O poder estatístico foi de 93%, com 5% de confiança, na comparação dos genótipos dos grupos caso e controle.

A análise do polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4* também foi realizada comparando as 112 pacientes ST (média de 12 anos) e um grupo controle saudável, ou seja, que não apresentam estigmas associados à ST e nem doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas, referente à tabela 7. O grupo controle, composto por 246 mulheres incluídas no estudo de Bufalo e colaboradores de 2020, compreende voluntárias com idade média de 36.86 anos.

Na tabela 7 é possível observar que as pacientes ST apresentam o genótipo GG (selvagem) em 35.7% da amostra, 10.7% apresentaram o genótipo GA (heterozigoto para o polimorfismo) e 53.6% o genótipo AA (variante). No grupo controle (Bufalo et al., 2020) foi observado 21.5% do genótipo GG, 50.8% GA e 27.6% AA. Nesta análise, não foi observada diferença estatística na distribuição alélica, mas um *p value* menor que 0.001 ($p < 0.001$) foi encontrado na distribuição genotípica, indicando um fator protetor do genótipo GA no grupo controle em comparação com pacientes ST. O poder estatístico foi de 100%, com 5% de confiança, contudo, as distribuições do SNP no grupo de pacientes ST não estão em conformidade com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, assim como nas análises anteriores, enquanto o grupo controle se encontra em EHW.

Tabela 7 – Análise do polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4* de pacientes ST (Caso) e grupo controle saudável (Bufalo et al., 2020).

Polimorfismo	Casos N (%) (112)	Controles N (%) (246)	Odds ratio (95% IC)	<i>p-value</i>
rs3087243				
Alelos				
G	92 (0.41)	231 (0.47)		
A	132 (0.59)	261 (0.53)	1.27 (0.91-1.77)	0.15
Genótipos				
GG	40 (35.7)	53 (21.5)		
GA	12 (10.7)	125 (50.8)	0.13 (0.06-0.27)	<0.0001
AA	60 (53.6)	68 (27.6)	1.17 (0.66-2.07)	0.6

Resultados expressos em: valor absoluto (valor relativo)

5.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *CTLA-4*

Os níveis de mRNA do *CTLA-4* das 23 pacientes ST e das 21 mulheres do grupo controle foram analisados a partir de teste de expressão gênica relativa. Na primeira análise de expressão gênica, realizada entre pacientes ST em comparação com controles saudáveis, foi observada uma diferença estatística significativa ($p=5.632e-07$), indicando que o gene *CTLA-4* se apresenta 3,25 vezes menos expresso em mulheres com ST quando comparadas ao grupo controle, dado que pode ser visualizado na figura 12.

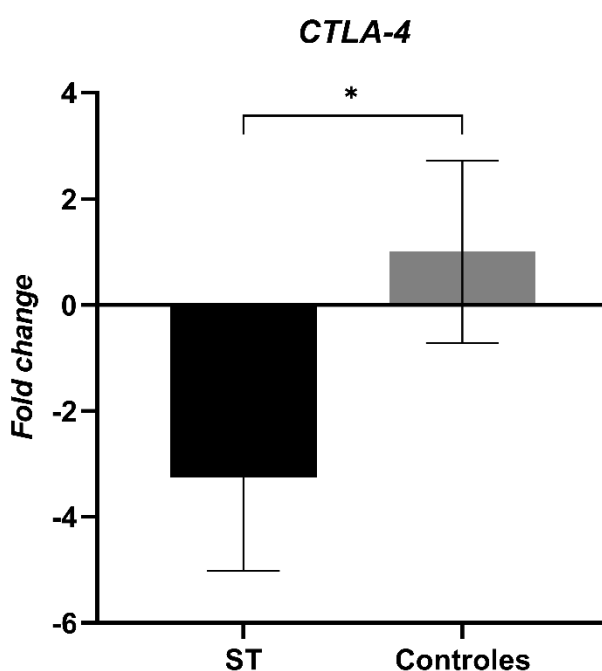


Figura 12 – Expressão do gene *CTLA-4* em pacientes ST e controles saudáveis, respectivamente. Foi observada uma redução da expressão gênica em pacientes ST em comparação com grupo controle ($p<0.001$).

Na análise dos níveis de mRNA do gene *CTLA-4* entre grupos de pacientes ST, foram incluídas no grupo caso nove pacientes com doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas, e no grupo controle 14 pacientes ST sem histórico de tais condições, porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão gênica (Figura 13).

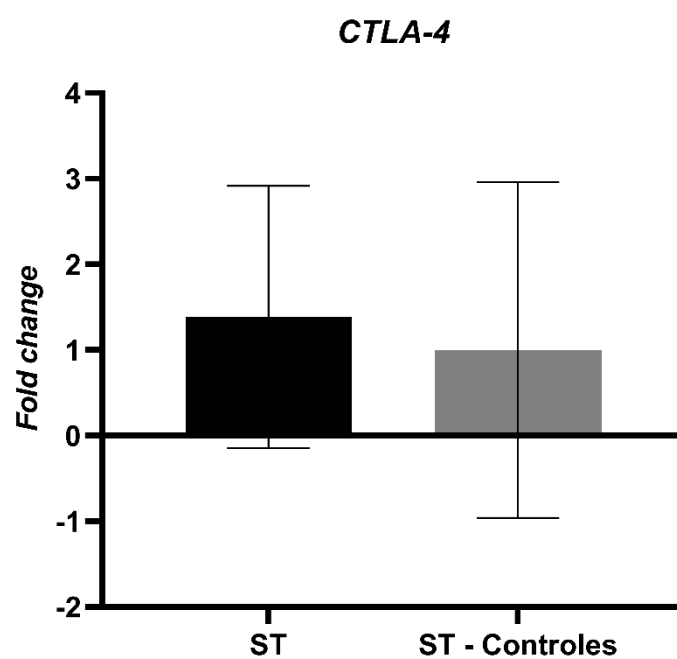


Figura 13 – Expressão do gene *CTLA-4* entre pacientes ST com doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (grupo caso) e pacientes ST sem tais condições (grupo controle). Sem diferenças estatísticas significantes.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, o cariótipo 45,X foi observado em maior frequência, presente em 50% das pacientes com ST, seguido pelos cariótipos com i(Xq) em mosaicismo [45,X/46,X,i(Xq)] e em linhagem homogênea [46,X,i(Xq)], 16.07% e 6.25%, respectivamente. O resultado se assemelha aos achados da literatura, que afirmam a presença da monossomia do cromossomo X em cerca de 40-60% das mulheres ST e cerca de 20% das pacientes apresentando isocromossomo do X (BISPO et al., 2013; MARQUI, 2015; GRAVHOLT et al., 2019).

As características clínicas de pacientes 45,X tendem a ser mais expressivas do que ocorre em pacientes com mosaicismo ou alterações estruturais do cromossomo X. Enquanto isso, é sugerido que a presença do cariótipo i(Xq), apresenta um risco aumentado para o desenvolvimento de distúrbios autoimunes e inflamatórios, principalmente da tireoide. Além disso, foi observado que pacientes i(Xq) apresentam uma maior proporção de anticorpos antitireoidianos positivos em comparação com outros cariótipos (SANTOS et al., 2019; SHANKAR et al., 2020). Contudo, a associação de um cariótipo específico e o desenvolvimento de condições clínicas que envolvem o contexto imunológico das pacientes ST ainda é controversa (CASTO et al., 2021).

Das 112 pacientes ST analisadas neste estudo, 38 apresentaram algum tipo de doença autoimune e / ou inflamatórias crônicas, compreendendo 34% da amostra. Estudos anteriores relatam uma incidência de 20 a 50% de desenvolvimento de tais condições clínicas na ST, corroborando com os nossos achados (GROSSI et al., 2013; GAWLIK et al., 2018).

Dentre os genes relacionados à regulação da resposta imune, polimorfismos do gene *CTLA-4* estão sendo relacionados ao desenvolvimento de diferentes doenças de caráter autoimune e inflamatório, como o SNP CT60 (rs3087243 G>A), que foi considerado candidato ao desenvolvimento de doenças como artrite reumatoide, doença de Graves, diabetes mellitus tipo 1 e doenças de pele, como vitiligo e alopecia (REPNIK et al., 2010; TING et al., 2016; SHEHJAR et al., 2019, SALINAS-SANTANDER et al., 2020).

Este SNP tem sido associado com a produção da proteína sCTLA-4, onde o alelo G (suscetível) envolve uma expressão menor da proteína solúvel do que o alelo A (protetor) (REPNIK et al., 2010). A função biológica do sCTLA-4 ainda não é conhecida, então é possível supor que para uma resposta inibitória satisfatória existe

um fino equilíbrio do nível de CTLA-4 solúvel disponível, onde baixos níveis podem não ser suficientes para contribuir com a supressão da ativação de células T e altos níveis podem competir com o CTLA-4 receptor de superfície celular e bloquear sinais inibitórios (KAARTINEN et al., 2007; RYDÉN et al., 2012).

Até o momento, existe apenas um estudo envolvendo um dos SNPs *CTLA-4* (rs231775) em mulheres com ST, realizado por Santos et al. (2018), contudo, ainda não foram publicados trabalhos relacionando o SNP rs3087243 (G>A) do gene *CTLA-4* (CT60) e condições clínicas da ST.

Neste estudo, a análise o polimorfismo rs3087243 do *CTLA-4* em pacientes ST mostrou uma distribuição alélica diferencial na comparação entre os grupos caso (com DAIs) e controle (pacientes sem DAIs) ($p=0.047$), onde o alelo G foi observado em maior frequência no grupo caso (56%), de pacientes que desenvolveram algum tipo de doença autoimune. O genótipo GG foi o mais frequente em pacientes ST com DAIs, porém, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os genótipos e as condições clínicas das pacientes. Também não foram observadas associações estatísticas nas frequências alélicas e genotípicas no grupo de pacientes ST com e sem doenças inflamatórias crônicas, pois o *p-value* foi maior que 0.05.

Em indivíduos saudáveis, a análise do SNP rs3087243 mostrou uma distribuição diferencial do genótipo GA quando comparados com pacientes ST, independente da presença ou ausência de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, sugerindo um fator protetor do genótipo heterozigoto no grupo controle. Além disso, a população de estudo não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p<0.05$), possivelmente devido a alterações na frequência dos alelos do SNP rs3087243 do gene *CTLA-4* na amostra de pacientes ST, onde este não deve apresentar estabilidade bem definida na síndrome.

O estudo realizado por Santos et al. (2018) foi o primeiro e único estudo, até o momento, envolvendo um polimorfismo do gene *CTLA-4* em pacientes ST. Eles avaliaram o SNP +49 A/G no éxon 1 (rs231775) em 86 pacientes incluídas no presente estudo, e verificaram diferenças genotípicas significantes para o genótipo AG (heterozigoto) nas pacientes ST quando comparadas com um controle saudável ($p=0.043$). Também foi possível associar o genótipo GG (homozigoto variante para o polimorfismo) à obesidade em pacientes ST, com um *p-value* de 0.02. Neste estudo, não foi possível estabelecer relação entre o SNP rs231775 e outras desordens autoimunes ou inflamatórias observadas na amostra, assim como também não foi

possível observar diferenças estatísticas quanto à distribuição alélica para o polimorfismo em estudo na ST.

Considerando os achados de Santos et al. (2018) para o SNP +49 A/G na mesma amostra de pacientes ST utilizada neste trabalho, destacamos que os SNPs avaliados se encontram em diferentes locais do gene *CTLA-4* e, portanto, resultam em diferentes alterações funcionais. O polimorfismo rs231775 avaliado por Santos et al. (2018), localizado no éxon 1, influencia a modificação pós-traducional do CTLA-4 e pode restringir o seu efeito inibitório na resposta imune, enquanto o rs3087243 ou CT60, localizado na região 3'-UTR possui vários sítios de ligação para microRNA, e uma modificação nessa região poderia alterar a estabilidade do mRNA (FANG et al., 2015; TU et al., 2017; FATHIMA et al., 2019).

Resultados diferentes para os SNP +49 A/G e CT60 foram relatados por Ting et al. (2016) na mesma amostra de pacientes com Doença de Graves (DG) e tireoidite de Hashimoto (TH). Apenas o genótipo GG do CT60 foi associado ao risco de desenvolvimento de tireoidite de Hashimoto em pacientes pediátricos. Eles informaram que associações de +49 A/G e CT60 com DG podem ser detectadas em várias populações étnicas, mas para TH apenas associações em asiáticos foi relatada. Consistente com estes achados, Bicek et al. (2009), relatam uma correlação entre o alelo G de ambos os polimorfismos, +49 A/G e CT60, em pacientes com DG, mas essa correlação não é observada para TH.

Uma associação dos SNPs +49 A/G e rs3087243 com a doença de Graves (DG) em indivíduos cariotipicamente normais foi descrita por Tu et al. (2017). Semelhante aos nossos resultados, eles detectaram uma maior frequência do alelo G de ambos os SNPs em pacientes com DG em comparação com o grupo controle, com $p=0.005$ para o rs3087243 e $p=0.000$ para +49 A/G, e sugeriram que este alelo pode conferir um maior risco em desenvolver a desordem autoimune. Também foi possível inferir, que para o rs3087243, indivíduos com o genótipo GG podem apresentar maior risco em desenvolver desordens autoimunes do que indivíduos com genótipo AA, devido ao fator protetor do alelo A na propensão ao desenvolvimento de DG.

Em estudo semelhante, Shehjar et al. (2019) associaram diferentes SNPs do *CTLA-4*, incluindo o SNP rs3087243, com maior susceptibilidade a DG, onde as frequências do genótipo GG e do alelo G apresentaram diferenças estatísticas significantes ($p<0.001$) na comparação caso-controle. Além da maior frequência do genótipo GG em pacientes com DG, Fang et al. (2015) relataram que a frequência do

genótipo heterozigoto (GA) do CT60 foi menor no grupo caso, pacientes com DG, em relação aos controles saudáveis, o que é consistente com os nossos achados.

Desta forma, a associação entre os polimorfismos em *CTLA-4* na suscetibilidade a doenças de caráter imunológico ainda parece controversa (MITSUIKI et al., 2018). E as diferenças entre estudos podem ser observadas devido a variação nas frequências alélicas e genótípicas que ocorrem em diferentes polimorfismos, bem como em diferentes grupos étnicos (SANTOS et al., 2018).

A partir deste trabalho foi possível observar uma distribuição alélica diferencial em pacientes ST com DAIs, porém os resultados das análises do polimorfismo não foram suficientes para determinar a associação do SNP com o desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas em pacientes ST, e devemos considerar o fato de que as pacientes ST podem não ter desenvolvido desordens imunológicas até o presente momento, podendo apresentá-las em qualquer fase da vida.

Quanto aos ensaios de expressão gênica, este também é o primeiro estudo a investigar os níveis de mRNA do *CTLA-4* em pacientes ST, portanto, ainda não há relatos na literatura sobre a frequência desta molécula reguladora na síndrome. Em nosso estudo, o perfil de expressão do gene *CTLA-4* de pacientes ST (n=23) foi comparado ao de indivíduos saudáveis (n=21), onde foi observada uma redução de 3,25 vezes da expressão gênica em mulheres com ST, quando comparadas ao grupo controle ($p=5.632e-07$). Enquanto isso, não foram observadas diferenças estatísticas significativas quanto à análise da expressão comparando pacientes ST com doenças autoimunes e inflamatórias crônicas (n=9) e pacientes ST sem tais condições (n=14), indicando que a frequência reduzida do mRNA do *CTLA-4* é uma característica relacionada à pacientes ST de um modo geral, independente das condições clínicas.

A expressão do *CTLA-4* tem sido recentemente avaliada em pacientes com doenças autoimunes. Patel et al. (2016) relataram uma redução na expressão do *CTLA-4* em pacientes com hipotireoidismo autoimune em comparação com indivíduos saudáveis ($p<0.001$). Os autores sugerem que o gene *CTLA-4* é um *locus* de susceptibilidade para o hipotireoidismo autoimune, e que a sua regulação negativa apresenta importante papel na patogênese desta doença.

No diabetes mellitus tipo 1 (DM1) baixas concentrações de mRNA do *CTLA-4* foram relatados por Rydén et al. (2012) em pacientes diabéticos comparados à indivíduos com risco de desenvolver DM1 e grupo controle saudável. Nesta coorte, também foi descoberto que os indivíduos com alto risco para DM1 apresentavam

maior expressão do *CTLA-4* do que os controles saudáveis, porém com baixos níveis de proteína solúvel após estímulo com mitógeno. O aumento de expressão combinada com baixa capacidade responsiva das células T pode ser o motivo da suscetibilidade desses indivíduos à DM1.

Em contraste com a redução observada até o momento, Zahiri et al. (2022) relataram que no lúpus eritematoso sistêmico (LES) a expressão do *CTLA-4* teve um aumento significativo, aproximadamente 1300 vezes maior em pacientes com LES quando comparados com indivíduos saudáveis. Eles, porém, argumentam que Jury et al. (2010) demonstraram uma capacidade reduzida na regulação da sinalização e proliferação de células T, apesar do aumento da expressão do *CTLA-4* em pacientes com LES.

A importância do *CTLA-4* como inibidor da resposta imune pode ser observada em camundongos *knockout*, onde a ausência do gene é relacionada ao desenvolvimento de autoimunidade, infiltração linfocítica em vários órgãos e destruição de tecidos, que geralmente resulta em morte (HASEDA et al., 2011; LO e ABDEL-MOTAL, 2017). Em humanos, uma condição semelhante ocorre em pacientes com mutações deletérias no gene *CTLA-4*, onde apresentam uma desordem imune hereditária dominante caracterizada por infiltração linfocítica em órgãos não linfóides, chamada de Haploinsuficiência de *CTLA-4* com Infiltração Autoimune (CHAI) (LO e ABDEL-MOTAL, 2017). Considerado um ponto de verificação imunológico (*checkpoint*), o *CTLA-4* tem sido alvo terapêutico na autoimunidade e em alguns tipos de câncer. Em doenças autoimunes como a artrite reumatoide, uma proteína de fusão *CTLA-4-Ig* (Abatacept, Orencia) promove a supressão da ativação de células T, por outro lado, no tratamento de câncer, o objetivo é inibir a função do *CTLA-4* por meio de um anticorpo monoclonal IgG1 (ipilimumab, Yervoy) e aumentar a ativação das células T, levando à regressão do tumor. No entanto, a terapia com *CTLA-4* em pacientes com câncer pode resultar autoimunidade, devido à falta de um sinal inibitório eficiente na resposta imune (GARCIA-PEREZ et al., 2019).

Sendo assim, é possível inferir que a expressão reduzida do *CTLA-4* pode estar relacionada à alteração da resposta imune nesta amostra de pacientes ST, mas não podemos afirmar que é o único responsável pelos achados clínicos observados, pois outros fatores reguladores da imunidade podem estar contribuindo na patogênese de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas na síndrome.

7 CONCLUSÕES

1. A análise do polimorfismo rs3087243 (G>A) do gene *CTLA-4* permitiu a identificação de uma distribuição diferencial na frequência alélica de pacientes ST com doenças autoimunes, onde o alelo G foi observado em maior proporção. Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas nas frequências genotípicas deste polimorfismo na ST.
2. Uma distribuição diferencial do genótipo GA foi observada em indivíduos saudáveis, indicando um fator protetor deste genótipo no grupo controle em comparação com pacientes ST.
3. A expressão do gene *CTLA-4* se encontra reduzida em pacientes ST quando comparadas com um grupo controle, sugerindo uma atividade imunossupressora ineficiente nessas pacientes.
4. Não foi observada diferença estatística na expressão gênica do *CTLA-4* nos subgrupos de pacientes ST com e sem doenças autoimunes/inflamatórias crônicas, sendo sugestivo que é uma característica das pacientes ST de um modo geral.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTAMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**, 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ABBAS, A.K.; LICHTAMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**, 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ÁLVAREZ-NAVA, F.; LANES, R. **Epigenetics in Turner syndrome**. *Clinical Epigenetics* 10:45, 2018. doi: 10.1186/s13148-018-0477-0
- ARAÚJO, C.; GALERA, B.B.; GALERA, M.F.; MEDEROS, S.F. **Características clínicas e citogenéticas da síndrome de Turner na região Centro-Oeste do Brasil**. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet* 32(8):381-385, 2010. doi: 10.1590/s0100-72032010000800004
- BAKALOV, V.K.; GUTIN, L.; CHENG, C.M.; ZHOU, J.; SHETH, P.; SHAH, K.; AREPALI, S.; VANDERHOOF, V.; NELSON, L.M.; BONDY, C.A. **Autoimmune e disorders in women with Turner syndrome and women with karyotypically normal primary ovarian insufficiency**. *J Autoimmun.* 38(4): 315–321, 2012. doi:10.1016/j.jaut.2012.01.015.
- BANO, A.; PERA, A.; ALMOUKAYED, A.; CLARKE, T.H.S.; KIRMANI, S.; DAVIES, K.A.; KERN, F. **CD28^{null} CD4 T-cell expansions in autoimmune disease suggest a link with cytomegalovirus infection [version 1; peer review:2 approved]**. *F1000Research* 8(F1000 Faculty Rev):327, 2019. doi: 10.12688/f1000research.17119.1
- BIANCHI, I.; LLEO, A.; GERSHWIN, M.E.; INVERNIZZI, P. **The X chromosome and immune associated genes**. *Journal of Autoimmunity* 38:J187-J192, 2012. doi:10.1016/j.jaut.2011.11.012
- BIANCHI, D.W. **Turner syndrome: New insights from prenatal genomics and transcriptomics**. *Am J Med Genet, Part C* 181C:29– 33, 2019. doi: 10.1002/ajmg.c.31675
- BIANCO, B.; LIPAY, M.V.N.; MELARANGO, M.I.; GUEDES, A.D.; VERRESCHI, I.T.N. **Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: Importance in the prevention of gonadoblastoma**. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM* 19:1113-1118, 2006. doi: 10.1515/JPEM.2006.19.9.1113
- BICEK, A.; ZALETEL, K.; GABERSCEK, S.; PIRNAT, E.; KRHIN, B.; STOPAR, T.G.; HOJKEK, S. **49A/G and CT60 polymorphisms of the cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 gene associated with autoimmune thyroid disease**. *Hum Immunol* 70(10):820-4, 2009. doi: 10.1016/j.humimm.2009.06.016. Epub 2009 Jun 25.
- BISPO, A.V.S.; SANTOS, L.O.; BURÉGIO-FROTA, P.; GALDINO, M.B.; DUARTE, A.R.; LEAL, G.F.; ARAÚJO, J.; GOMES, B.; SOARES-VENTURA, E.M.; MUNIZ, M.T.C.; SANTOS, N. **Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype**. *Genetics and Molecular Research* 12(4):4243-

4250, 2013. doi: 10.4238/2013.March.13.13

BONILLA, F.A.; OETTGEN, H.C. **Adaptative immunity**. Journal of Allergy and Clinical Immunology 125(2):S33-S40, 2010. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.017

BORTH, H.; TEUBERT, A.; GLAUBITZ, R.; KNIPPENBERG, S.; KUTUR, N.; WINKLER, T. **Analysis of cell-free DNA in a consecutive series of 13,607 routine cases for the detection of fetal chromosomal aneuploidies in a single center in Germany**. Arch Gynecol Obstet 303:1407–1414, 2021. doi: 10.1007/s00404-020-05856-0

BUCERZAN, S.; MICLEA, D.; POPP, R. et al. **Clinical and genetic characteristics in a group of 45 patients with Turner syndrome (monocentric study)**. Ther Clin Risk Manag 13:613–622, 2017. doi: 10.2147/TCRM.S126301

CAMERON-PIMBLETT, A.; LA ROSA, C.; KING, T.F.J.; DAVIES, M.C.; CONWAY, G.S. **The Turner syndrome life course project: Karyotype-phenotype analyses across the lifespan**. Clin Endocrinol (Oxf) 87:532– 538, 2017. doi: 10.1111/cen.13394

CARVALHO, A.B.; LEMOS-MARINI, S.H.V.; GUERRA-JUNIOR, G.; MACIEL-GUERRA, A.T. **Clinical and cytogenetic features of 516 patients with suspected Turner syndrome – a single-center experience**. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism 31(2):167-173, 2018. doi: 10.1515/jpem-2017-0273

CASTO, C. et al. **Hashimoto's Thyroiditis and Graves' Disease in Genetic Syndromes in Pediatric Age**. Genes 12(2):222, 2021. doi: 10.3390/genes12020222

CHEN, J.Q.; SZODORAY, P.; ZEHER, M. **Toll-Like Receptor Pathways in Autoimmune Diseases**. Clinic Rev Allerg Immunol 50, 1–17, 2015. doi: 10.1007/s12016-015-8473-z

CHOE, A.S. et al. **Clinical Practice Guidelines for Prenatal Aneuploidy Screening and Diagnostic Testing from Korean Society of Maternal-Fetal Medicine: (1) Prenatal Aneuploidy Screening**. J Korean Med Sci 36(4):e27, 2021. doi: 10.3346/jkms.2021.36.e27

COLLETT-SOLBERG, P.; GALLICCHIO, C.T.; COELHO, S.C.S.; SIQUEIRA, R.A.; ALVES, S.T.F.; GUIMARÃES, M.M. **Endocrine diseases, perspectives and care in Turner syndrome**. Arq Bras Endocrinol Metab 55:550-558, 2011. doi: 10.1590/S0004-27302011000800008

CORONEL-RESTREPO, N.; POSSO-OSORIO, I.; NARANJO-ESCOBAR, J.; TÓBON, G.J. **Autoimmune diseases and their relation with immunological, neurological and endocrinological axes**. Autoimmunity Reviews 16(7):684-692, 2017. doi: 10.1016/j.autrev.2017.05.002.

CRUVINEL, W.M.; JÚNIOR, D.M.; ARAÚJO, J.A.P. et al. **Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória**. Rev Bras Reumatol 50(4):434-461, 2010. doi: 10.1590/S0482-50042010000400008

- CUI, X.; CUI, Y.; SHI, L.; LUAN, J.; ZHOU, X.; HAN, J. **A basic understanding of Turner syndrome: Incidence, complications, diagnosis, and treatment.** *Intractable Rare Dis Res* 7(4):223-228, 2018. doi: 10.5582/irdr.2017.01056.
- DELVES, P.J.; ROITT, I.M. **The Immune System: First of two parts.** *N Engl J Med* 343(1):37-49, 2000. doi: 10.1056/NEJM200007063430107
- EGGENHUIZEN, P.J.; NG, B.H.; OOI, J.D. **Treg Enhancing Therapies to Tret Autoimmune Diseases.** *Int. J. Mol. Sci.* 21(19):7015, 2020. doi: 10.3390/ijms21197015
- ERDAL, G.G.; BALKAN, M. **Turner Syndrome with Isochromosome Xq.** *Journal of pediatric genetics* 9(4):243-245, 2019. doi:10.1055/s-0039-3399496
- ESWARACHARI, V.; KADAM, P.; MOVVA, S. et al. **Noninvasive prenatal testing (NIPT) detects variant of Turner syndrome not detectable by fluorescent *in situ* hybridization.** *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 32(24):4177-4180, 2018. doi: 10.1080/14767058.2018.1481383
- FANG, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, J.; CAI, Z.; ZENG, H.; CHEN, M.; HUANG, J. **Association of the CTLA4 gene CT60/rs3087243 single-nucleotide polymorphisms with Graves' disease.** *Biomed Rep* 3(5):691-696, 2015. doi: 10.3892/br.2015.493
- FATHIMA, N.; NARNE, P.; ISHAQ, M. **Association and gene–gene interaction analyses for polymorphic variants in CTLA-4 and FOXP3 genes: role in susceptibility to autoimmune thyroid disease.** *Endocrine* 64:591–604, 2019. doi: 10.1007/s12020-019-01859-3
- FERNÁNDEZ-MESTRE, M.; SÁNCHEZ, K.; BALBÁS, O. et al. **Influence of CTLA-4 gene polymorphism in autoimmune and infectious diseases.** *Hum Immunol* 70(7):532-535, 2009. doi: 10.1016/j.humimm.2009.03.016
- GARCIA-PEREZ, J.E.; BAXTER, R.M.; KONG, D.S. et al. **CTLA4 Message Reflects Pathway Disruption in Monogenic Disorders and Under Therapeutic Blockade.** *Front. Immunol.* 10:998, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00998
- GAWLIK, A.M.; BERDEJ-SZCZOT, E.; BLAT, D. et al. **Immunological Profile and Predisposition to Autoimmunity in Girls With Turner Syndrome.** *Frontiers in Endocrinology* 9:307, 2018. doi: 10.3389/fendo.2018.00307
- GIANFALDONI, S.; TCHERNEV, G.; WOLLINA, U.; ANDLOTTI, T. **A Case of Alopecia Areata in a Patient with Turner Syndrome.** *Open Access Maced J Med Sci* 5(4):493-496, 2017. doi: 10.3889/oamjms.2017.127
- GOUGH, S.C.L.; WALKER, L.S.K.; SAMSON, D.M. **CTLA4 gene polymorphism and Autoimmunity.** *Immunological Reviews* 204: 102–115, 2005. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00249.x.

GRANGER, A.; ZURADA, A.; ZURADA-ZIELINSKA, A.; GIELECKI, J.; LOUÇAS, M. **Anatomy of turner syndrome.** Clinical anatomy 29(5):638-642, 2016. doi:10.1002/ca.22727

GRAVHOLT, C.H.; ANDERSEN, N.H.; CONWAY, G.S.; DEKKERS, O.M. et al. **Clinical practice guidelines for the care of girls and women with Turner syndrome: proceedings from the 2016 Cincinnati International Turner Syndrome Meeting.** European Journal of Endocrinology 177(3):G1-G70, 2017. doi: 10.1530/EJE-17-0430

GRAVHOLT, C.H.; VIUFF, M.H.; BRUN, S.; STOCHHOLM, K.; ANDERSEN, N.H. **Turner syndrome: mechanisms and management.** Nat Rev Endocrinol 15:601–614, 2019. doi: 10.1038/s41574-019-0224-4

GROSSI, A.; CRINÒ, A.; LUCIANO, R.; LOMBARDO, A.; CAPPA, M.; FIERABRACCI, A. **Endocrine autoimmunity in Turner syndrome.** Ital J Pediatr 39:79, 2013. doi: 10.1186/1824-7288-39-79

HAMZA, R.T.; RAO, N.A.; ABDALLAH, K.O. **Prevalence of multiple forms of autoimmunity in Egyptian patients with Turner syndrome: relation to karyotype.** J Pediatr Endocr Met 26(5-6):545–550, 2013. doi: 10.1515/jpem-2012-0265

HASEDA, F.; IMAGAWA, A.; MURASE-MISHIBA, Y. et al. **Low CTLA-4 expression in CD4+ helper T-cells in patients with fulminant type 1 diabetes.** Immunology Letters 139(1–2):80-86, 2011. doi: 10.1016/j.imlet.2011.05.003

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.** Human Genetics 133(4):417–424, 2014. doi: 10.1007/s00439-014-1420-x

JIVRAJ, S.; STILLWELL, S. **Turner syndrome through the lens of a gynaecologist.** Post Reproductive Health 27(2):98-108, 2020. doi:10.1177/2053369120958593

JOLLER, N.; PETERS, A.; ANDERSON, A.C.; KUCHROO, V.K. **Immune checkpoints in central nervous system autoimmunity.** Immunol Ver 248(1):122-39, 2012. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01136.x.

KAARTINEN, T.; LAPPALAINEN, J.; HAIMILA, K.; AUTERO, M.; PARTANEN, J. **Genetic variation in ICOS regulates mRNA levels of ICOS and splicing isoforms of CTLA4.** Molecular Immunology 44:1644–1651, 2007. doi: 10.1016/j.molimm.2006.08.010

KAUR, B.P.; SECORD, E. **Innate Immunity.** Pediatric Clinics of North America 66(5):905-911, 2019. doi: 10.1016/j.pcl.2019.06.011

KHAN, U.; GHAZANFAR, H. **Chapter Three - T Lymphocytes and Autoimmunity.** International Review of Cell and Molecular Biology 341:125-168, 2018. doi:

10.1016/bs.ircmb.2018.05.008

KHATER, D. **Autoimmune diseases in Turner syndrome: an overview.** Acta biomedica: Atenei Parmensis 90(3):341-344, 2019. doi: 10.23750/abm.v90i3.8737

KRUSZKA, P.; ADDISSIE, Y.A.; TEKENDO-NGONGANG, C. et al. **Turner syndrome in diverse populations.** American journal of medical genetics. Part A 182(2):303-313, 2020. doi:10.1002/ajmg.a.61461

KUCUKSEZER, U.; OZDEMIR, C.; AKDIS, M.; AKDIS, C. **Influence of Innate Immunity on Immune Tolerance.** Acta medica acadêmica 49(2):164-180, 2020. doi: 10.5644/ama2006-124.295.

KWON, A.; HYUN, S.E.; JUNG, M.K. et al. **Risk of Gonadoblastoma Development in Patients with Turner Syndrome with Cryptic Y Chromosome Material.** Horm Canc 8:166–173, 2017. doi: 10.1007/s12672-017-0291-8

LENG, X-F.; LEI, K.; LI, Y. et al. **Gonadal dysgenesis in Turner syndrome with Y-chromosome mosaicism: Two case reports.** World journal of clinical cases 8(22):5737-5743, 2020. doi: 10.12998/wjcc.v8.i22.5737

LI, N.; ZHAO, L.; LI, J. et al. **Turner syndrome caused by rare complex structural abnormalities involving chromosome X.** Experimental and Therapeutic Medicine 14:2265-2270, 2017. doi: 10.3892/etm.2017.4756

LO, B.; ABDEL-MOTAL, U.M. **Lessons from CTLA-4 deficiency and checkpoint inhibition.** Current Opinion in Immunology 49:14-19, 2017. doi: 10.1016/j.coi.2017.07.014.

MACHIELA, M.J. et al. **Female chromosome X mosaicism is age-related and preferentially affects the inactivated X chromosome.** Nature communications 7(11843), 2016. doi: 10.1038/ncomms11843

MARQUI, A.B.T. **Síndrome de Turner e polimorfismo genético: uma revisão sistemática.** Rev. paul. Pediatr 33(3):363-370, 2015. doi: 10.1016/j.rpped.2014.11.014

MCCOMB, S.; THIRIOT, A.; AKACHE, B.; KRISHNAN, L.; STARK, F. **Introduction to the Immune System. Immunoproteomics.** Methods in Molecular Biology 2024:1-24, 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-9597-4_1

MITSUIKI, N.; SCHWAB, C.; GRIMBACHER, B. **What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system?** Immunol Rev 287: 33– 49, 2018. doi:/10.1111/imr.12721

MIURA, T. YAMAMOTO, T. **Alopecia, halo nevi and vitiligo in a pediatric case of Turner's syndrome.** J Dermatol 44(2):217-219, 2016. doi: 10.1111/1346-8138.13459

MOHAMED, S.O.O.; ELKHIDIR, I.H.E.; ABUZIED, A.I.H. et al. **Prevalence of**

autoimmune thyroid diseases among the Turner Syndrome patients: meta-analysis of cross sectional studies. BMC Res Notes 11:842, 2018. doi: 10.1186/s13104-018-3950-0

NETEA, M.G.; SCHLITZER, A.; PLACEK, K.; JOOSTEN, L.A.B.; SCHULTZE, J.L. **Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens.** Cell Host & Microbe 25(1):13-26, 2019. doi: 10.1016/j.chom.2018.12.006

OLIVEIRA, R.M.R.; VERRESCHI, I.T.N.; LIPAY, M.V.N.; EÇA, L.P.; GUEDES, A.D.; BIANCO, B. **Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature.** Sao Paulo Med. J. 127(6):373-378, 2009. doi: 10.1590/s1516-31802009000600010

PATEL, H.; MANSURI, M.S.; SINGH, M. et al. **Association of Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4 (CTLA4) and Thyroglobulin (TG) Genetic Variants with Autoimmune Hypothyroidism.** PLoS ONE 11(3): e0149441, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0149441

PATERSON, A.M.; LOVITCH, S.B.; SAGE, P.T. et al. **Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity.** J Exp Med. 212(10):1603-21, 2015. doi: 10.1084/jem.20141030

REDEL, J.M.; BACKELJAUW, P.F. **Turner Syndrome: Diagnostic and Management Considerations for Perinatal Clinicians.** Clinics in Perinatology 45(1):119-128, 2018. doi: 10.1016/j.clp.2017.11.003

REPNIK, K.; POTOČNIK, U. **CTLA4 CT60 single-nucleotide polymorphism is associated with Slovenian inflammatory bowel disease patients and regulates expression of CTLA4 isoforms.** DNA Cell Biol 29(10):603-10, 2010. doi: 10.1089/dna.2010.1021

RYBA-STANISŁAWOWSKA, M.; SAKOWSKA, J.; ZIELIŃSKI, M.; ŁAWRYNOWICZ, U.; TRZONKOWSKI, P. **Regulatory T cells: the future of autoimmune disease treatment.** Expert Review of Clinical Immunology 15(7):777-789, 2019. doi: 10.1080/1744666X.2019.1620602

RYDÉN, A.; BOLMESON, C.; JONSON, C.O.; CILIO, C.M.; FARESJÖ, M. **Low expression and secretion of circulating soluble CTLA-4 in peripheral blood mononuclear cells and sera from type 1 diabetic children.** Diabetes Metab Res Rev 28(1):84-96, 2012. doi: 10.1002/dmrr.1286

SALINAS-SANTANDER, M.A.; CANTU-SALINAS, C.S.; OCAMPO-CANDIANI, J. et al. **CTLA4 + 49AG (rs231775) and CT60 (rs3087243) gene variants are not associated with alopecia areata in a Mexican population from Monterrey Mexico.** An Bras Dermatol 95(3):283-288, 2020. doi:10.1016/j.abd.2020.03.001

SANTOS, L.O.; BISPO, A.V.S.; BARROS, J.V. et al. **CTLA-4 gene polymorphisms are associated with obesity in Turner Syndrome.** Genet. Mol. Biol. 41(4):727-734, 2018. doi: 10.1590/1678-4685-gmb-2017-0312

SANTOS, L.O.; LARANJEIRA, R.; BORBOREMA, M.E.B.A. et al. **Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and expression profile influence upon the immunological imbalance in Turner syndrome.** J Endocrinol Invest 43(4):505-513, 2019. doi: 10.1007/s40618-019-01135-1

SIMONE, D.; SAVERINO, R.; BAGNASCO, M.; PESCE, G. **The Soluble CTLA-4 Receptor and its Emerging Role in Autoimmune Diseases.** Auto Immun Highlights. 2010 Nov; 1(2): 73–81, 2010. doi: 10.1007/s13317-010-0011-7

SHANKAR , R.K. **Immunological Profile and Autoimmunity in Turner Syndrome.** Horm Res Paediatr 93:415-422, 2020. doi: 10.1159/000512904

SHEHJAR, F.; DIL-AFROZE; MISGAR, R.A.; MALIK, A.S.; LAWAY, B.A. **A significant association of the CTLA4 gene variants with the risk of autoimmune Graves' disease in ethnic Kashmiri population.** Cellular Immunology 347, 2020. doi: 10.1016/j.cellimm.2019.103995

STOCHHOLM, K.; JUUL, S.; JUEL, K.; NAERSA, R.W.; GRAVHOLT, C.H. **Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 91(10):3897–3902, 2006. doi: 10.1210/jc.2006-0558

STOKLASOVA, J.; ZAPLETALOVA, J.; FRYSAK, Z. et al. **An isolated Xp deletion is linked to autoimmune diseases in Turner syndrome.** J Pediatr Endocrinol Metab 32(5):479–488, 2019. doi: 10.1515/jpem-2019-0067

STOLP, J.; ZAITSU, M.; WOOD, K.J. **Immune Tolerance and Rejection in Organ Transplantation.** Immunological Tolerance: Methods in Molecular Biology 1899:159-180, 2019. doi: 10.1007/978-1-4939-8938-6_12

STOREY, M.; JORDAN, S. **An overview of the immune system.** Nursing standard 23(15-17):47-56, 2008. doi: 10.7748/ns2008.12.23.15.47.c6738

TEXEIRA, H.C.; DIAS, L.S.; MENÃO, T.L.; OLIVEIRA, E.E. **Immune checkpoint proteins as new target for cancer immunotherapy: literature review.** HU rev. 45(3):325-333, 2019. doi: 10.34019/1982-8047.2019.v45.28820

TING, W-H.; CHIEN, M-N.; LO, F-S. et al. **Association of Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4 (CTLA4) Gene Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Disease in Children and Adults: Case-Control Study.** PLoS ONE 11(4): e0154394, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0154394

TU, Y.; FAN, G.; DAI, Y.; ZENG, T.; XIAO, F.; CHEN, L.; KONG, W. **Association between rs3087243 and rs231775 polymorphism within the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene and Graves' disease: a case/control study combined with meta-analyses.** Oncotarget 8: 110614-110624, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.22702

UEDA, H.; HOWSON, J.M.; ESPOSITO, L. et al. **Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease.** Nature

423(6939):506-11, 2003. doi: 10.1038/nature01621

VALK, E.; RUDD, C.E.; SCHNEIDER, H. **CTLA-4 trafficking and surface expression.** Trends Immunol 29(6):272-279, 2008. doi: 10.1016/j.it.2008.02.011

VERMA, N.; BURNS, S.O.; WALKER, L.S.K.; SANSOM, D.M. **Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations.** Clin Exp Immunol 190(1):1-7, 2017. doi: 10.1111/cei.12997

VILLANUEVA-ORTEGA, E.; AHEDO, B.; FONSECA-SÁNCHEZ, M.A. et al. **Analysis of PTPN22, ZFAT and MYO9B polymorphisms in Turner Syndrome and risk of autoimmune disease.** Int J Immunogenet 44(4):153–157, 2017. doi: 10.1111/iji.12323

VIUFF, M.; SKAKKEBÆK, A.; NIELSEN, M.M.; CHANG, S.; GRAVHOLT, C.H. **Epigenetics and genomics in Turner syndrome.** American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics 181(1):68–75, 2019. doi: 10.1002/ajmg.c.31683

WANG, L.; WANG, F-S.; GERSHWIN, M.E. **Human autoimmune diseases: a comprehensive update. (Review).** J Intern Med 278: 369– 395, 2015. doi: 10.1111/joim.12395

WEGIEL, M.; ANTOSZ, A.; GIEBUROWSKA, J. et al. **Autoimmunity predisposition in girls with Turner syndrome.** Front Endocrinol (Lausanne) 10:511, 2019. doi: 10.3389/fendo.2019.00511

ZAHIRI, L.; MALEKMAKAN, L.; MASJEDI, F.; HABIBAGAH, Z.; HABIBAGAH, M. **Association Between IL-17A, FOXP3, and CTLA4 Genes Expression and Severity of Lupus Nephritis.** Iran J Kidney Dis 1(1):13-23, 2022. doi: 10.52547/ijkd.6537

ZHANG, B.; LU, B-Y.; YU, B. et al. **Noninvasive prenatal screening for fetal common sex chromosome aneuploidies from maternal blood.** Journal of International Medical Research 45(2):621-630, 2017. doi: 10.1177/0300060517695008

APÊNDICES

APÊNDICE A – TABELA COM ANÁLISE DO POLIMORFISMO rs3087243 DO GENE *CTLA-4* EM PACIENTES ST.

Tabela 8 – Dados agrupados da análise do polimorfismo rs3087243 do gene *CTLA-4* de pacientes ST do grupo caso (com DAIs e/ou doenças inflamatórias) e pacientes ST (controle).

Polimorfismo	Casos N (%) (38)	Controles N (%) (74)	Odds ratio (95% IC)	<i>p-value</i>
rs3087243				
Alelos				
G	34 (0.45)	58 (0.39)	0.8 (0.44-1.45)	0.474
A	42 (0.55)	90 (0.61)		
Genótipos				
GG	15 (39.5)	25 (33.8)	0.84 (0.16-3.81)	1
GA	4 (10.5)	8 (10.8)		
AA	19 (50)	41 (55.4)		

Resultados expressos em: valor absoluto (valor relativo)

ANEXOS

ANEXO A - 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
CIAPE Nº 1130879

ANEXO B - 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 guardá-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* (metilenetetrahydrofolato 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 C - 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 rubriche 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 extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento com transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, 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 D - 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* (metilenotetrahydrofolato 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:

CURRÍCULO VITAE (LATTES)

Aldianne Milene dos Santos Barbosa
Curriculum Vitae

Agosto, 2022

Aldianne Milene dos Santos Barbosa
Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Aldianne Milene dos Santos Barbosa

Dados pessoais

Filiação João Cláudio Barbosa e Audilene Maria dos Santos Barbosa

Nascimento 28/10/1995 - Recife/PE - Brasil

Carteira de Identidade 7909872 SDS - PE - 31/03/2016

CPF 105.073.084-41

Endereço residencial Rua Doutor João Suassuna, 388
Cavaleiro - Jaboatão dos Guararapes
54210450, PE - Brasil
Telefone: 081 34556892
Celular 081 984600555

Endereço eletrônico

E-mail para contato : aldiannemilene@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2020 Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Avaliação de polimorfismo e expressão do gene CTLA-4 na
resposta imune de pacientes com Síndrome de Turner
Orientador: Neide Santos
Co-orientador: Jaqueline de Azevedo Silva
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior

Formação complementar

2021 - 2021 Curso de curta duração em Genética Aplicada ao Diagnóstico. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2020 - 2020 Curso de curta duração em Soluções biotecnológicas aplicadas às ações de enfrentamento à COVID-19. (Carga horária: 45h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2020 - 2020 Curso de curta duração em MINICURSO ONLINE DE BIOLOGIA MOLECULAR NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS INFECCIOSAS. (Carga horária: 4h). Centro de Capacitação em Saúde de Pernambuco, CCS, Brasil

2020 - 2020 Curso de curta duração em Princípios Básicos de Reprodução Humana Assistida. (Carga horária: 5h). Universidade Federal de

Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

- 2020 - 2020** Curso de curta duração em MINICURSO ONLINE DE ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DE EXAMES EM URINÁLISE. (Carga horária: 8h). Centro de Capacitação em Saúde de Pernambuco, CCS, Brasil
- 2020 - 2020** Curso de curta duração em I Curso de Desenvolvimento Textual Científico. (Carga horária: 15h). Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, Brasil

Áreas de atuação

1. Genética
2. Genética Humana e Médica
3. Citogenética Humana

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Produção

Apresentação de trabalho e palestra

1. **BARBOSA, A. M. S.; LARANJEIRA, R.; SILVA, J. A.; SANTOS, N. Avaliação de polimorfismo e expressão do gene CTLA-4 na resposta imune de pacientes com Síndrome de Turner, 2021.** (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
2. **BARBOSA, A. M. S.; LARANJEIRA, R.; ARCOVERDE, J.; DUARTE, A.; ARAUJO, J.; SILVA, J. A.; SANTOS, N. Avaliação de polimorfismo e expressão do gene CTLA-4 na resposta imune de pacientes com Síndrome de Turner, 2020.** (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Eventos

Participação em eventos

1. **XI Jornada da Pós-Graduação em Genética, 2021.** (Simpósio)
2. **I Simpósio Nacional Acadêmico das Ligas de Hematologia - INTERHEMO, 2020.** (Simpósio)
3. **IV Webinar Ciência USP - Covid-19: Inteligência Artificial na Medicina, 2020.** (Outra)
4. **X Jornada da Pós-Graduação em Genética, 2020.** (Simpósio)