

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

CARLA FERNANDES DOS SANTOS

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

RECIFE
2023

CARLA FERNANDES DOS SANTOS

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

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

Orientador: Profa. Dra. Neide Santos

Coorientador: Profa. Dra. Jaqueline de Azevêdo Silva

RECIFE

2023

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

Santos, Carla Fernandes dos.

Perfil de expressão do genes CTLA-4 VDR E PTPN22 em indivíduos com síndrome de down . / Carla Fernandes dos Santos. – 2023.

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

Orientadora: Neide Santos.

Coorientadora: Jaqueline de Azevêdo Silva.

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

Inclui referências e anexos.

1. Síndrome de Down. 2. mRNA. 3. Expressão gênica. 4. Doenças autoimunes;. 5. Doenças inflamatórias.
I. Santos, Neide. (Orient.). II. Silva, Jaqueline de Azevêdo. (coorient.). III. Título.

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-266

CARLA FERNANDES DOS SANTOS

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

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de mestrado em Genética e Biologia Molecular. Área de concentração: Genética.

Aprovada em: 23 / 10 / 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Camilla Albertina de Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Juan Luiz Coelho da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sempre esteve ao meu lado me dando proteção, sabedoria, resiliência e discernimento. A ti toda honra e toda glória, Pai.

À minha família, pelas orações, pelo apoio, amor, carinho e incentivo necessários. Especialmente aos meus queridos pais, Cíntia e Oscar, aqueles que não só me trouxeram a este mundo, mas me auxiliaram a moldar meu caráter e me tornar a pessoa que sou hoje. A Tiago, meu esposo, por acreditar em mim mais do que eu mesma e me incentivar a alcançar meus sonhos. Ao meu irmão, meus avós, minhas tias, primas e primos. Vocês são incríveis e sou grata a Deus por tê-los.

Aos meus amigos e amigas do LGCAH, especialmente Juliana e Aldianne, e do departamento de genética. Vocês tornaram tudo mais leve, guardarei comigo todas as boas lembranças. Espero levar a amizade de vocês para a vida.

À minha orientadora, Professora Neide Santos, que além de ser uma excelente profissional, é também uma ótima pessoa. Sou grata pela compreensão, paciência, cuidado e carinho para comigo. A senhora é um exemplo a ser seguido. À Professora Jaqueline de Azevêdo, minha coorientadora, pelas contribuições fornecidas durante essa jornada. Que Deus continue as abençoando ricamente.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite e pela dedicação ao avaliar este trabalho.

Às pessoas com síndrome de Down e aos seus responsáveis pela confiança em nós depositada ao permitir a realização deste trabalho. Aos profissionais envolvidos, especialmente os da GURI e a Dra Bárbara Gomes, médica da Endocrinologia Pediátrica do HC/UFPE, por contribuírem com este projeto.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa e auxílios financeiros, e ao PPGGBM.

RESUMO

A síndrome de Down (SD) é resultado da trissomia do cromossomo 21, possuindo uma incidência estimada de 1:700 nascidos vivos. Os indivíduos com SD apresentam uma maior frequência de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas do que a população em geral. No entanto, estudos de alterações na expressão de genes importantes na regulação do sistema imunológico são escassos na SD. O objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de expressão dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* em indivíduos com SD. Por meio de ensaios de expressão gênica relativa, comparamos os níveis de mRNA dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* entre indivíduos com SD (n=22) e grupo controle saudável (CT) (n=13), cuja média de idade foi de 10,9 anos e 11,6 anos, respectivamente. Uma comparação da expressão gênica também foi realizada entre indivíduos com SD estratificados com base na presença de hipotireoidismo e nos níveis de Proteína C-reativa ultrasensível (PCR-us). Não houve diferença na expressão gênica entre indivíduos SD estratificados com relação à PCR-us e ao hipotireoidismo. Mas observamos diferença significativa na expressão do *CTLA-4* (FC: -1,71; p=0,0014) e do *VDR* (FC: +1,86; p=0,0096) de indivíduos com SD em relação aos controles, porém não do *PTPN22* (FC: +1,30; p=0,8007). A expressão aumentada do *VDR* pode estar relacionada à regulação do metabolismo da vitamina D (vit D) como um mecanismo para melhor utilizar os níveis de vit D e contribuir para um desempenho mais eficiente do sistema imune. E a expressão reduzida do *CTLA-4* sugere uma provável contribuição para o desequilíbrio imunológico frequentemente relatado na SD. Mais estudos são necessários para inferir uma relação entre a expressão diferencial desses genes e a propensão a doenças autoimunes e inflamatórias crônicas nesses indivíduos.

Palavras-chave: Síndrome de Down; mRNA; Expressão gênica; Doenças autoimunes; Doenças inflamatórias.

ABSTRACT

Down syndrome (DS) results from trisomy of chromosome 21, with an estimated incidence of 1:700 live births. Individuals with DS have a higher frequency of autoimmune and chronic inflammatory diseases than the general population. However, studies of changes in the expression of genes in the regulation of the immune system are scarce in DS. The objective of this study was to evaluate the expression profile of the *CTLA-4*, *VDR* and *PTPN22* genes in individuals with DS. Through relative gene expression assays, we compared the mRNA levels of the *CTLA-4*, *VDR* and *PTPN22* genes between individuals with DS (n=22) and the healthy control group (CT) (n=13), with mean ages of 10.9 years and 11.6 years, respectively. Gene expression was also compared among individuals with DS stratified based on the presence of hypothyroidism and ultrasensitive C-reactive Protein (us-CRP) levels. There was no difference in gene expression between DS individuals stratified with respect to us-CRP and hypothyroidism. However, we observed a significant difference in the expression of *CTLA-4* (FC: -1.71; p=0.0014) and *VDR* (FC: +1.86; p=0.0096) in individuals with DS compared to controls, but not *PTPN22* (FC: +1.30; p=0.8007). The increased *VDR* expression may be related to the regulation of vitamin D (vit D) metabolism as a mechanism to better utilize vit D levels and contribute to more efficient immune system. The reduced expression of *CTLA-4* suggests a probable contribution to the immune imbalance often reported in DS. Further studies are needed to infer a relationship between the differential expression of these genes and the propensity for autoimmune and chronic inflammatory diseases in these individuals.

Key words: Down Syndrome; mRNA; Gene expression; Autoimmune diseases; Inflammatory diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Cariótipo humano 47,XX,+21 com bandeamento G.....	16
Figura 2	– Translocações Robertsoniana envolvendo o cromossomo 21.....	17
Figura 3	– Representação esquemática da meiose feminina normal, da não-disjunção do cromossomo inteiro e da separação prematura das cromátides irmãs.....	18
Figura 4	– Gametas aneuploides formando zigotos aneuploides.....	18
Figura 5	– Ilustração de uma mulher apresentando mosaicismos cromossômico na SD.....	19
Figura 6	– Características comuns presentes em pessoas com SD.....	22
Figura 7	– Variabilidade no fenótipo de pessoas com mosaicismos para trissomia 21.....	22
Figura 8	– Região crítica da síndrome de Down (DSCR) no cromossomo 21....	26
Figura 9	– Interações entre CD28, CTLA-4 e seus ligantes naturais.	27
Figura 10	– Localização do gene <i>CTLA-4</i> no cromossomo 2.....	28
Figura 11	– Estrutura do gene <i>CTLA-4</i>	28
Figura 12	– Isoformas da proteína CTLA-4 em humanos.....	29
Figura 13	– Localização do gene <i>VDR</i> no cromossomo 12.....	31
Figura 14	– Mecanismo genômico de ação da Vit D envolvido na regulação da expressão gênica.....	32
Figura 15	– Estrutura da região genômica do gene <i>VDR</i> no cromossomo 12q13.11.....	32
Figura 16	– Localização do gene <i>PTPN22</i> no cromossomo 1 indicada pelo traço vermelho.....	34
Figura 17	– Ilustração dos domínios da proteína PTPN22 codificada pelo gene <i>PTPN22</i>	34
Figura 18	– Expressão dos genes <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> e <i>VDR</i> em indivíduos com SD vs CT.....	44
Figura 19	– Expressão dos genes <i>CTLA-4</i> , <i>PTPN22</i> e <i>VDR</i> em indivíduos com SD e hipotireoidismo vs indivíduos com SD sem hipotireoidismo.....	45

Figura 20 – Expressão dos genes *CTLA-4*, *PTPN22* e *VDR* em indivíduos com SD e dosagem da PCR-us para alto risco para desenvolvimento de doenças inflamatórias de fase aguda vs indivíduos com SD e dosagem da PCR-us para médio a baixo risco..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização citogenética dos indivíduos com SD.....	41
Tabela 2 –	Diagnóstico de doenças endócrinas dos indivíduos com SD....	42
Tabela 3 –	Níveis séricos individuais dos pacientes com SD.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
1/4CTLA-4	Isoforma CTLA-4 contendo éxon 1 e 4
AA	Alopécia areata
APCs	Células apresentadores de antígenos
AR	Artrite Reumatoide
BCR	Receptor de células B
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CT	Controle saudável
<i>CTLA-4</i>	Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4
DAIs	Doenças autoimunes
DAITs	Doenças autoimunes da tireoide
DC	Doença celíaca
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM	Diabetes mellitus
DG	Doença de Graves
EM	Esclerose Múltipla
fiCTLA-4	Isoforma CTLA-4 de comprimento completo
GME	Glicose Média Estimada
GURI	Grupo Universitário de Reabilitação Infantil
HbA1c	Hemoglobina Glicada
HE	Hipotireoidismo Evidente
HS	Hipotireoidismo Subclínico
ISCN	Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
liCTLA-4	Isoforma independente de ligante
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LGCAH	Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana
Lyp	<i>lymphoid-specific phosphatase</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

PCR-us	Proteína C Reativa Ultrassensível
<i>PTPN22</i>	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 gene
RCSD	Região Crítica da Síndrome de Down
RNA	Ácido ribonucleico
RXR	Receptor do retinoide X
sCTLA-4	Isoforma CTLA-4 solúvel
SNVs	Variantes de único nucleotídeo
ST	Síndrome de Turner
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TCR	Receptor de células T
Treg	Célula T reguladora
TSH	Hormônio Tireoestimulante
T4 Livre	Tiroxina Livre
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
Vit D	Vitamina D
<i>VDR</i>	Vitamin D Receptor
VDRE	Elemento de resposta à vitamina D

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Síndrome de Down	16
2.1.1	Cariótipos e etiologia	16
2.1.2	Ocorrência e Expectativa de vida	20
2.1.3	Manifestações clínicas	21
2.1.4	Desordens imunológicas e/ou inflamatórias crônicas na SD..	23
2.2	Genes de suscetibilidade candidatos a doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas.....	26
2.2.1	Gene <i>CTLA-4</i>	27
2.2.2	Gene <i>VDR</i>	30
2.2.3	Gene <i>PTPN22</i>	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo Geral	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Seleção de indivíduos e achados clínicos.....	37
4.2	Coleta das amostras.....	38
4.3	Cultura de linfócitos e Análise Citogenética.....	38
4.4	Análise Molecular	39
4.4.1	Ensaio de expressão gênica	39
4.4.2	Análise dos dados	39
4.5	Aspectos éticos da pesquisa	40
5	RESULTADOS	41
5.1	Análise citogenética.....	41
5.2	Exames bioquímicos e achados clínicos.....	41
5.3	Perfil de expressão dos genes <i>CTLA-4</i> , <i>VDR</i> e <i>PTPN22</i>	44
5.4	Perfil de expressão dos genes <i>CTLA-4</i> , <i>VDR</i> e <i>PTPN22</i> em relação à presença de hipotireoidismo e à dosagem da PCR-us..	45
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	53

REFERÊNCIAS..... 54
ANEXOS 64

1 INTRODUÇÃO

A trissomia do cromossomo 21 resulta em um conjunto de características clínicas comumente conhecidas como síndrome de Down (SD). Com uma incidência estimada de 1:700 nascidos vivos, o cariótipo mais prevalente na síndrome é a trissomia livre, mas podem ser observados outros cariótipos com mosaicismos cromossômico ou alterações estruturais envolvendo o cromossomo 21, como translocações Robertsonianas.

Os indivíduos com a síndrome apresentam uma variedade de manifestações clínicas que podem afetar múltiplos sistemas, principalmente os sistemas musculoesquelético, cardiovascular e neurológico, sendo considerada a causa genética mais comum de deficiência intelectual. Além disso, a SD é a síndrome genética mais frequentemente associada à desregulação imune e os indivíduos apresentam taxas de doenças autoimunes (DAIs) e/ou inflamatórias crônicas (DICs) de aproximadamente quatro a seis vezes maior do que a população em geral, por exemplo, doenças autoimunes da tireoide, diabetes mellitus tipo 1, doença celíaca, alopecia, vitiligo, artrite idiopática e obesidade.

A maior parte das características clínicas na SD estão relacionadas à superexpressão dos genes localizados no cromossomo 21, que acabam resultando em interações desequilibradas com outros genes. A desregulação do sistema imunológico na SD, que favorece a predisposição a DAIs, vem sendo investigada e várias alterações nos componentes da resposta imune inata e adaptativa têm sido consideradas como possíveis candidatas para explicá-lá.

A disfunção imunológica na SD tem sido atribuída à diminuição do número de linfócitos B, modificações nos subconjuntos de células T, bem como alterações nos níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias. Além disso, embora os mecanismos exatos das DAIs ainda sejam indefinidos, fatores genéticos também desempenham um papel importante na patogênese.

Estudos envolvendo genes com funções importantes na manutenção da homeostase do sistema imunológico, como o Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (*CTLA-4*), o Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 gene (*PTPN22*) e o Vitamin D Receptor (*VDR*) são numerosos na literatura. Os genes *CTLA-4* e *PTPN22* atuam como importantes reguladores negativos da resposta imune. O primeiro é um regulador crucial da homeostase e da autotolerância das

células T. A expressão e a função biológica dele são importantes para a regulação negativa das respostas dessas células. Já o *PTPN22* atua como regulador negativo da sinalização do receptor de células T (TCR) e do receptor de células B (BCR). O gene *VDR* medeia a maioria das ações biológicas do calcitriol (forma ativa da vitamina D) por meio do seu produto, o receptor de vitamina D, o qual foi identificado em quase todas as células imunes.

Estudos prévios mostram que alterações na expressão desses genes podem estar associadas a DAIs e/ou inflamatórias na população em geral, porém não há estudos nesse contexto em indivíduos com SD, mesmo eles apresentando uma alta propensão a essa categoria de doenças. Diante disso, é possível que haja um perfil de expressão diferencial desses genes relacionado ao desenvolvimento de desordens autoimunes e inflamatórias na síndrome. O presente estudo é o primeiro trabalho a analisar a expressão do *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* em indivíduos com SD.

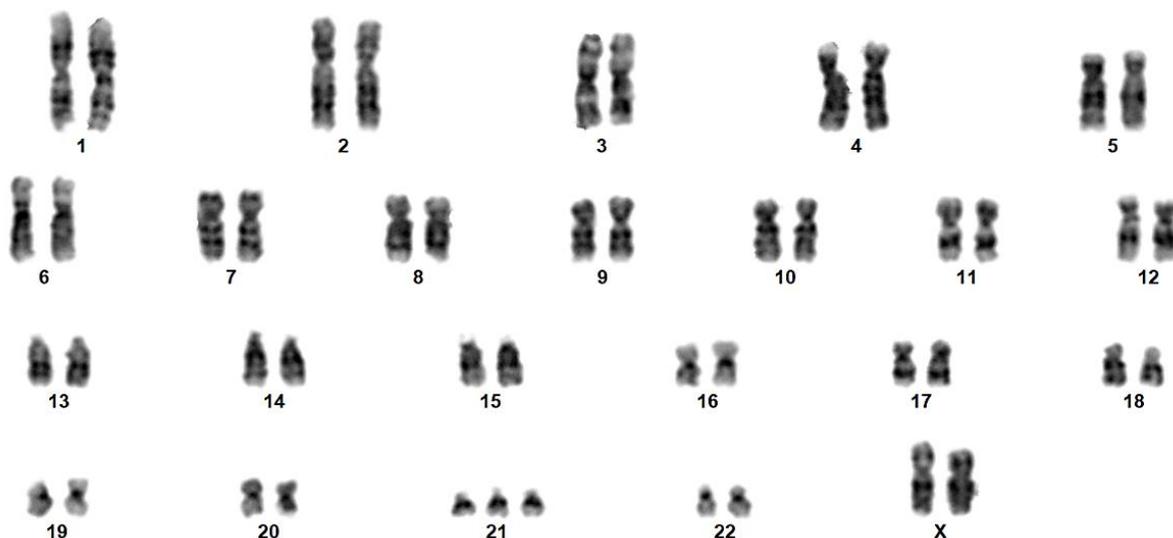
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síndrome de Down

2.1.1 Cariótipos e Etiologia

A síndrome de Down (SD) (OMIM #190685, Online Mendelian Inheritance in Man, um Catálogo Online de Genes Humanos e Distúrbios Genéticos) é um distúrbio genético causado por uma trissomia parcial ou completa do cromossomo 21 (Franceschi *et al.*, 2019). Citogeneticamente, o cariótipo mais prevalente é a trissomia livre (47,XX,+21 ou 47,XY,+21) (Figura 1), estando presente em aproximadamente 95% dos indivíduos com SD; a translocação Robertsoniana (Figura 2) é responsável pela trissomia 21 em cerca de 5% dos indivíduos afetados, enquanto que o mosaïcismo cromossômico para trissomia 21 ocorre em aproximadamente 2% dos indivíduos com SD (Antonarakis *et al.*, 2020).

Figura 1 – Cariótipo humano 47,XX,+21 com bandeamento G.

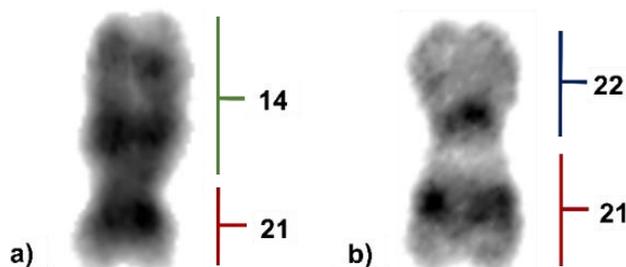


Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana – LGCAH/UFPE.

A idade materna avançada está relacionada com o aumento da incidência de trissomia do cromossomo 21 na concepção, bem como para as outras trissomias autossômicas humanas, sendo a prevalência delas maiores em mães com mais de 40 anos quando comparadas àquelas com idade entre 25 e 29 anos (Loane *et al.*,

2012; Coppedè, 2016). Isso acontece, principalmente, devido aos erros de origem meiótica nos oócitos (Mccoy *et al.*, 2015).

Figura 2 – Translocação Robertsoniana (rob) envolvendo o cromossomo 21 com banda G.

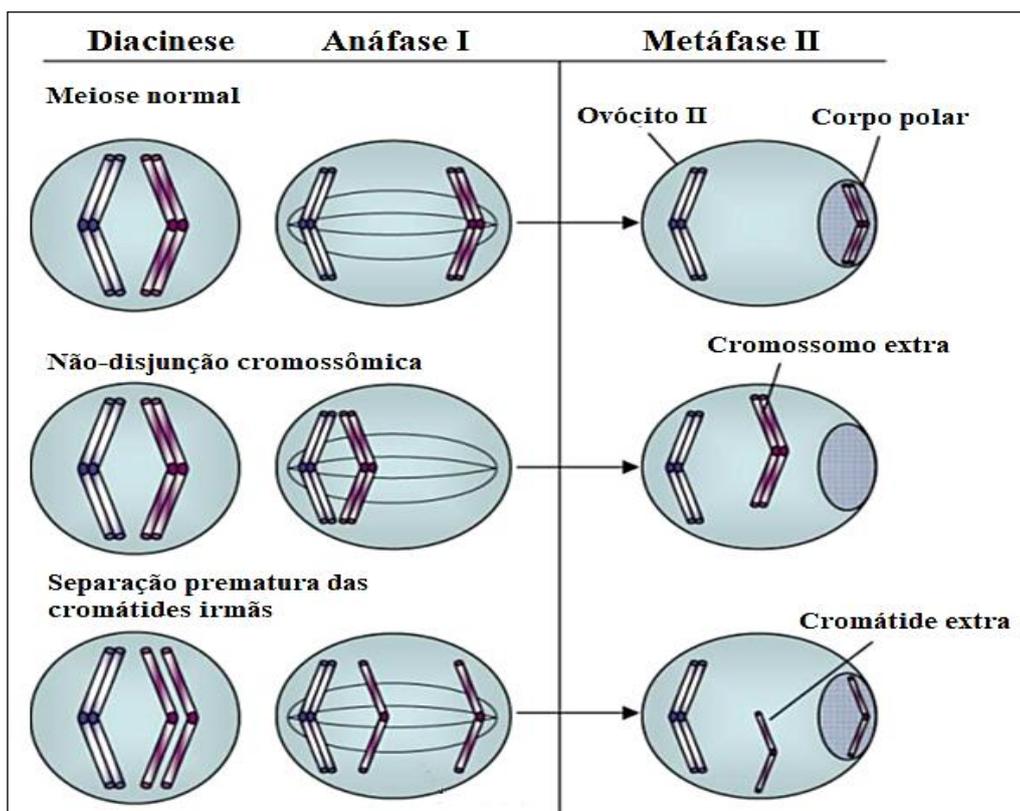


Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana – LGCAH/UFPE.
 Legenda: a) rob(14;21); b) rob(21;22).

As duas principais vias sugeridas para explicar os erros de segregação cromossômica na meiose são: (1) a não-disjunção na meiose, na qual os cromossomos homólogos ou as cromátides irmãs falham em segregar na meiose I ou na meiose II, respectivamente, e (2) a separação prematura das cromátides irmãs durante a meiose I, fazendo com que uma cromátide de um par de cromossomos homólogos se junte com o outro par de cromossomos homólogos, resultando em um gameta com desequilíbrio cromossômico (Figura 3) (Webster; Schuch, 2017). Os erros meióticos afetarão todo o embrião, pois os zigotos formados pela fertilização envolvendo um gameta anormal são aneuploides (Prakash, 2019).

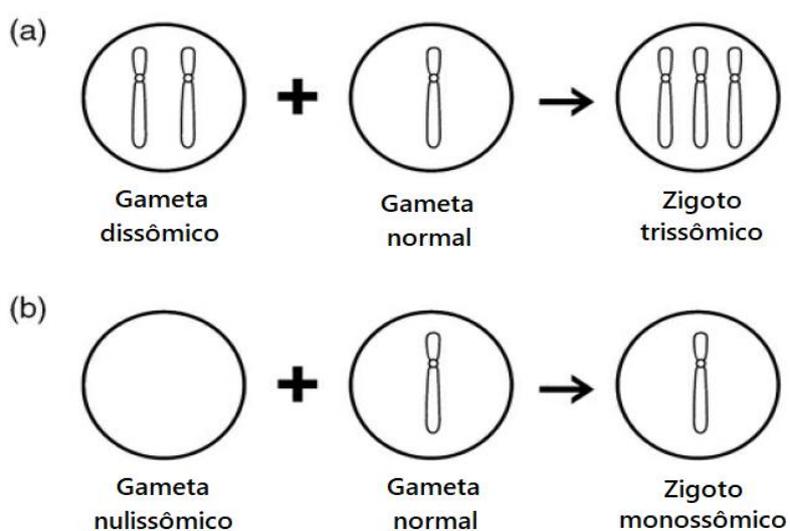
Após esses erros de segregação, se houver a fertilização de gametas nulissômicos com gametas normais, haverá a formação de zigotos monossômicos, enquanto a fertilização de gametas dissômicos com gametas normais resultará na formação de zigotos trissômicos (Figura 4) (Gardner; Amor, 2018).

Figura 3 – Representação esquemática da meiose feminina normal, da não-disjunção do cromossomo inteiro e da separação prematura das cromátides irmãs.



Fonte: Adaptado de Pellestor *et al.* (2005).

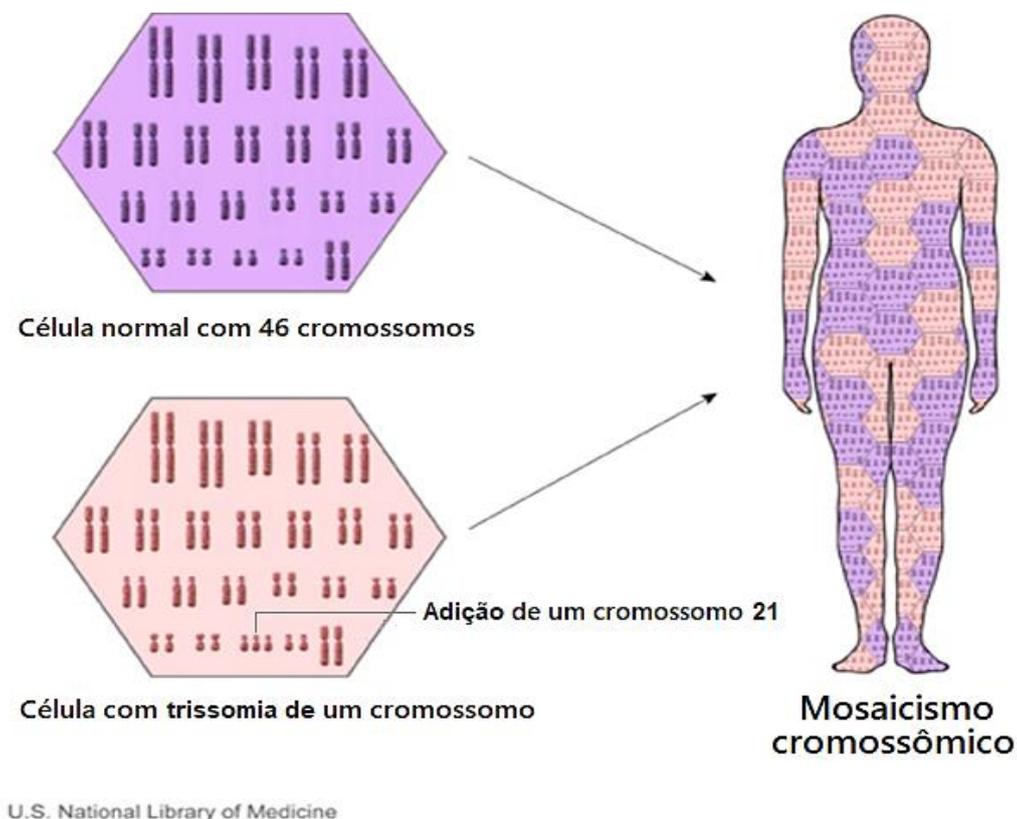
Figura 4 – Gametas aneuploides formando zigotos aneuploides.



Fonte: Adaptado de Gardner e Amor (2018).

Quando uma anormalidade cromossômica ocorre na mitose, em um embrião que está em estágio de desenvolvimento inicial, algumas células herdam um complemento cromossômico normal, enquanto outras serão aneuploides, resultando em mosaicismos que pode ser confinado a um ou poucos tecidos, dependendo do momento em que o erro ocorreu (D'gama; Walsh, 2018; Prakash, 2019; West; Everett, 2022). O mosaicismos cromossômico é definido como a presença de duas ou mais linhagens celulares com cariótipos distintos (Figura 5) em um indivíduo que se desenvolveu a partir de um único zigoto (Lebedev; Zhigalina, 2021). Ao contrário dos erros meióticos, os erros mitóticos não estão significativamente associados à idade materna avançada (Mccoy *et al.*, 2015).

Figura 5 – Ilustração de uma mulher apresentando mosaicismos cromossômico na SD.



Fonte: Adaptado de MedLinePlus, National Library of Medicine.

Os fatores ambientais também podem influenciar o risco de não disjunção, mas são difíceis de identificar devido ao problema inerente de definir a exposição, dosagem e tempo de cada fator (Antonarakis *et al.*, 2020). Alguns desses fatores

que influenciam o risco de trissomia 21 incluem tabagismo, falta de suplementação de ácido fólico e uso de contraceptivos orais (Coppedè, 2016).

2.1.2 Ocorrência e Expectativa de vida

A SD está entre as condições genéticas mais complexas e a aneuploidia autossômica mais frequente compatível com a sobrevivência humana (Paz-Y-Miño *et al.*, 2020). No Brasil, estima-se que 1:700 nascidos vivos apresentem a SD, o que totaliza em torno de 270 mil pessoas com SD, enquanto que no mundo essa estimativa é de 1:1000 nascidos vivos (Brasil, 2019). No entanto, uma estimativa global precisa não pode ser calculada de forma confiável até que mais registros de nascimentos sejam criados nos países, e mais dados estejam disponíveis sobre a sobrevivência histórica e atual de pessoas com SD em diferentes partes do mundo (Antonarakis *et al.*, 2020).

Os dados de prevalência da população podem ser úteis no planejamento de longo prazo para o bem-estar médico e social. A melhor opção para obter prevalência de nascimentos seria um sistema nacional de registro de nascimentos e óbitos de pessoas com deficiência que funcionasse bem. No entanto, apenas alguns países estabeleceram tais sistemas, incluindo Dinamarca, Suécia e, de forma mais limitada, o Reino Unido e Portugal (De Graaf *et al.*, 2017).

Em um estudo recente, Laignier *et al.* (2021) observaram uma prevalência de 4/10.000 casos de nascidos vivos com SD por meio da Certidão de Nascido Vivo, no período de 2012 a 2018, no Brasil. No entanto, segundo os autores, essa menor prevalência pode ser devido à possibilidade de subnotificação de eventos e à variabilidade na qualidade dos dados e informações relacionadas às anormalidades congênitas na Declaração de Nascido Vivo. Isso pode, muitas vezes, estar relacionado à falta de treinamento e supervisão do profissional no preenchimento da Certidão de Nascido Vivo e na inserção desses dados no sistema. Nos EUA, a partir de 2013, dados sugerem que ~ 1 em cada 779 bebês nascidos tinha SD (~ 12,8 por 10.000 nascidos vivos) (De Graaf *et al.*, 2019; Antonarakis *et al.*, 2020). Para a Europa, entre 2011–2015, a prevalência anual de nascidos vivos foi de 10,1 por 10.000, porém esse valor seria maior, em torno de 21,7 por 10.000 nascidos vivos, se não houvesse interrupções eletivas (De Graaf *et al.*, 2021).

As trissomias viáveis compartilham algumas características clínicas, tais como defeitos cardiovasculares e craniofaciais, deficiência intelectual e expectativa de vida reduzida (Li *et al.*, 2017). Porém, devido às mudanças das iniciativas governamentais e não governamentais, bem como às melhorias nos cuidados e serviços médicos para pessoas com SD, como a melhoria dos tratamentos cirúrgicos das cardiopatias congênitas (Bertapelli *et al.*, 2016; Dieudonné *et al.*, 2020), a expectativa de vida de indivíduos com SD melhorou significativamente. Por exemplo, nos Estados Unidos a expectativa de vida aumentou de uma média estimada de 26 anos e mediana de 4 anos em 1950 para 53 anos e 58 anos, respectivamente, em 2010 (De Graaf *et al.*, 2017).

Com o aumento da prevalência e a expectativa de vida mais longa dos indivíduos com SD, é importante compreender as ocorrências comuns de condições concomitantes, ou comorbidades, ao longo do ciclo de vida do desenvolvimento para práticas de triagem mais apropriadas, diretrizes de cuidados médicos personalizadas, melhor utilização dos recursos de saúde e planejamento e gerenciamento atualizados do cuidado aos indivíduos com SD (Chicone *et al.*, 2021).

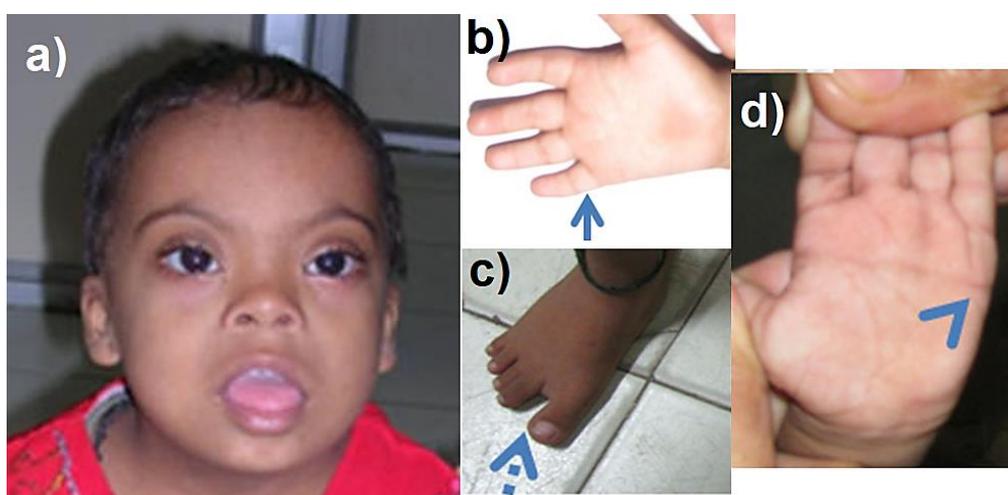
2.1.3 Manifestações clínicas

A SD é a causa genética mais comum de deficiência intelectual, sendo tipicamente associada a características fenotípicas bem definidas (Figura 6), incluindo características faciais distintas e malformações congênitas maiores (Franceschi *et al.*, 2019). Entre as características faciais, observa-se a presença de olhos oblíquos, queixo pequeno, rosto redondo, ponte nasal plana, manchas de Brushfield na íris, orelhas externas anormais e nariz achatado (Cornejo *et al.*, 2017).

Com a trissomia do 21 existente em todas as células, não é surpreendente descobrir que todos os sistemas são afetados de alguma forma. No entanto, nem todo indivíduo com SD tem os mesmos problemas ou condições associadas, havendo uma variabilidade na maneira como a condição afeta as pessoas com SD (Asim *et al.*, 2015), e isso pode tornar o diagnóstico desafiador em casos de bebês prematuros, algumas pessoas mais velhas, certos grupos étnicos e com mosaicismos cromossômico (Gupta; Kabra, 2014).

Nesses casos em especial, as investigações citogenéticas para trissomia do 21 são essenciais para a confirmação do diagnóstico clínico (Chandra *et al.*, 2010). Clinicamente, não há diferenças entre indivíduos com trissomia livre e translocação Robertsoniana. No entanto, os indivíduos com SD com cariótipo em mosaïcismo podem apresentar um fenótipo menos expressivo, dependendo da extensão e distribuição tecidual da linhagem celular normal (Figura 7) (Gupta; Kabra, 2014; Papavassiliou *et al.*, 2015).

Figura 6 – Características comuns presentes em pessoas com SD.



Fonte: Adaptado de Gupta e Kabra (2014).

Legenda: a) Criança apresentando face plana com olhos amendoados, aparência de boca aberta e língua protusa; b) mão com dedos curtos e clinodactilia (seta sólida); c) espaço extra entre o hálux e o segundo dedo do pé (seta pontilhada); d) vinco símio (cabeça de seta).

Figura 7 – Variabilidade no fenótipo de pessoas com mosaïcismo para trissomia 21.



Fonte: Papavassiliou *et al.* (2015).

O fenótipo da SD envolve manifestações que afetam múltiplos sistemas, especialmente os sistemas musculoesquelético, cardiovascular e neurológico. Devido a isso, indivíduos com SD geralmente apresentam baixa estatura, hipotonia muscular, instabilidade atlantoaxial, densidade neuronal reduzida, hipoplasia cerebelar, deficiência intelectual e defeitos cardíacos congênitos (particularmente defeitos do septo atrioventricular) (Antonarakis *et al.*, 2020). Além disso, nesses indivíduos, os distúrbios endócrinos, como disfunção da tireoide, baixa densidade óssea, diabetes, baixa estatura, infertilidade e propensão a sobrepeso/obesidade são muito mais comuns que na população em geral (Whooten *et al.*, 2018).

Entre as anormalidades endócrinas, as disfunções tireoidianas são uma das anormalidades mais comuns que coexistem em crianças com SD e foram relatadas em até 28% a 40% dos indivíduos, com frequência aumentando com a idade em até 54% (Szeliga *et al.*, 2022). O espectro de disfunção tireoidiana em indivíduos com SD inclui hipotireoidismo congênito (TSH plasmático elevado no período neonatal), hipotireoidismo subclínico (TSH plasmático elevado com T4 plasmático normal no diagnóstico), hipotireoidismo evidente (TSH plasmático elevado e T4 plasmático baixo a qualquer momento) e hipertireoidismo (TSH plasmático baixo com nível T4 alto) (Pierce; Lafranchi; Pinter, 2017; Mulu; Fantahun, 2022). Desses, o hipotireoidismo subclínico (HS) é a apresentação mais frequente em crianças com SD (Szeliga *et al.*, 2022).

De acordo com Türemen *et al.* (2011), pacientes com HS apresentam inflamação crônica de baixo grau devido à tireoidite autoimune. Em relação às doenças autoimunes da tireoide, a tireoidite de Hashimoto (TH) é mais comum que a doença de Graves (Amr, 2018; Mulu; Fantahun, 2022).

2.1.4 Desordens imunológicas e/ou inflamatórias crônicas na SD

A inflamação crônica é definida pela persistência de processos inflamatórios além de sua função fisiológica, resultando na destruição tecidual. Ela está implicada na progressão de muitas doenças crônicas, desempenhando um papel central nas doenças inflamatórias crônicas e autoimunes (Nasef; Mehta; Ferguson, 2017). As DAIs ocorrem quando o sistema imunológico ataca moléculas próprias como resultado de uma quebra da tolerância imunológica às células imunes autorreativas. (Samuels *et al.*, 2022).

Apesar dos cuidados aprimorados para doenças cardíacas congênitas tenham diminuído a mortalidade e a morbidade, as complicações relacionadas às doenças imunomediadas continuam a limitar a expectativa de vida em pessoas com SD, aumentando as taxas de infecções, malignidades hematológicas e autoimunidade (Ferrari; Stagi, 2021). Dentre as síndromes genéticas conhecidas atualmente, a SD representa a mais comumente associada à desregulação imunológica (Cruz *et al.*, 2009), e a extensão dessa desregulação na síndrome é substancial, abrangendo os sistemas inato e adaptativo, alterações nas células T e B, fenótipo anormal de monócitos, quimiotaxia de neutrófilos, citocinas circulantes e respostas de anticorpos subótimas que contribuem para um fenótipo com risco de aumento de infecções, piores resultados clínicos e inflamação crônica (Huggard; Doherty; Molloy, 2020).

A população com SD apresenta um risco geral de desenvolver DAIs de aproximadamente quatro a seis vezes maior quando comparados com a população em geral (Ferrari; Stagi, 2021). Esses indivíduos apresentam suscetibilidade a várias Doenças inflamatórias crônicas (DICs) e/ou DAIs, como tireoidite de Hashimoto (TH), doença de Graves (DG), diabetes mellitus tipo 1 (DM1), doença celíaca (DC), alopecia, vitiligo e artrite idiopática (Aversa *et al.*, 2018; Verstegen; Chang; Kusters, 2019).

Nos indivíduos com SD, o risco de desenvolver DC é aumentado de 6 a 10 vezes em comparação com a população geral. Para a DM1, há um risco 3 a 4 vezes maior, a qual ocorre com mais frequência em uma idade mais jovem para esses indivíduos, com 17% diagnosticados na idade de 2 anos ou menos, em comparação com apenas 4% na mesma faixa etária na população em geral (Mortimer; Gillespie, 2020; Ferrari; Stagi, 2021). A alopecia areata (AA) afeta até 8,9% desses indivíduos, e está relacionada à presença de doença da tireoide (Verstegen; Chang; Kusters, 2019).

Em relação às doenças autoimunes da tireoide (DAITs), a TH apresenta prevalência de 13 a 34% versus 1,3% em indivíduos saudáveis, seguida pela DG, com prevalência seis vezes maior que a população pediátrica geral. Curiosamente, ambas se iniciam em idade mais jovem e não apresentam as características bem estabelecidas em doenças autoimunes, como prevalência no sexo feminino e história familiar positiva (Aversa *et al.*, 2018). Outra questão diferente é a detecção

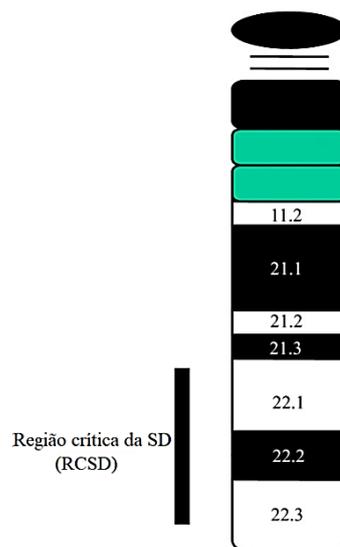
precoce de autoanticorpos tireoidianos. De acordo com Amr (2018), muitos autores afirmam que o hipotireoidismo autoimune geralmente é diagnosticado após os 8 anos de idade, porém ele pode ser detectado em idades mais jovens também.

Além das DAIs, jovens com SD apresentam taxas mais altas de sobrepeso e obesidade comparados aos jovens sem SD. A prevalência combinada de sobrepeso e obesidade variou entre 23-70% em indivíduos com SD (sobrepeso: 13.3-52.9%; obesidade: 0-62.5%) (Bertapelli *et al.*, 2016). A obesidade é uma condição inflamatória na qual o sistema imune inato é cronicamente ativado (Frasca; Blomberg, 2017). Há evidências crescentes de estudos clínicos e experimentais indicando a associação da obesidade visceral com um estado pró-inflamatório, além disso, foi relatado que pessoas obesas com SD sofrem de inflamação sistêmica de baixo grau (Fructuoso *et al.*, 2018).

A maioria das características da SD está relacionada à superexpressão dos genes localizados no cromossomo 21, especialmente aqueles da Região Crítica da SD (RCSD) (Figura 8), resultando em interações desequilibradas com outros genes (Asim *et al.*, 2015). Para o cromossomo 21 humano, a versão atual do GENCODE/ENSEMBL (GENCODE versão 32) lista 233 genes codificadores de proteínas, 423 genes não codificadores de proteínas e 188 pseudogenes. É importante ressaltar que 48% do cromossomo 21 não foi anotado, e que a maior parte dessa porcentagem contém elementos repetitivos (como é o caso de todos os cromossomos humanos) (Antonarakis *et al.*, 2020). Entre as proteínas conhecidas por serem codificadas pelo cromossomo 21 humano, 23 proteínas estão envolvidas na transdução de sinal e 31 proteínas são fatores de transcrição que podem influenciar a expressão de outros genes no genoma (Antonarakis, 2016).

Compreender como a triplicação desses 233 genes no cromossomo 21 afeta o sistema imune é essencial para permitir a seleção racional e o desenvolvimento de terapias para mitigar especificamente a autoimunidade associada à SD. Além disso, esse conhecimento pode avançar nossa compreensão de como os mecanismos relacionados promovem a autoimunidade na população em geral (Lambert *et al.*, 2022).

Figura 8 – Região crítica da síndrome de Down (DSCR) no cromossomo 21.



Fonte: Adaptado de Mortimer e Gillespie (2020).

2.2 Genes de suscetibilidade candidatos a doenças autoimunes e/ou inflamatórias crônicas

Várias alterações nos componentes da resposta imune inata e adaptativa têm sido consideradas como possíveis candidatas para explicar a predisposição observada de pacientes com SD a DAIs (Ferrari; Stagi, 2021). A disfunção do sistema imunológico na SD tem sido atribuída à diminuição do número de linfócitos B, modificações nos subconjuntos de células T, bem como alterações nos níveis de citocinas anti e pró-inflamatórias (Zaki *et al.*, 2016). Embora os mecanismos exatos das DAIs ainda sejam indefinidos, fatores genéticos também desempenham um papel importante na patogênese (Lee *et al.*, 2020).

Estudos envolvendo genes importantes na regulação do sistema imunológico, como o Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen-4 (*CTLA-4*), o Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 22 gene (*PTPN22*) e o Vitamin D Receptor (*VDR*), mostraram que variantes de nucleotídeo único (SNVs), que resultam em alterações das atividades desses genes estão envolvidos na regulação imune para conferir suscetibilidade para uma variedade de DAIs na população em geral, como DM1, DAIT e Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) (Santos *et al.*, 2018; Frommer; Kahaly, 2021; Gootjes *et al.*, 2022; Meza-Meza *et al.*, 2022).

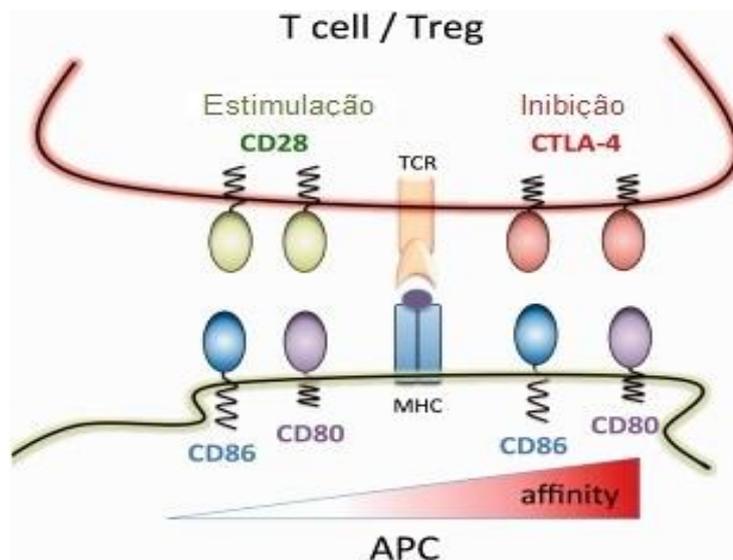
Além disso, também há estudos que investigaram a associação desses genes com DAIs/DICs em indivíduos que apresentam síndromes genéticas, como

síndrome de Turner (ST) (Bianco *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2020). No entanto, apesar dos indivíduos com SD apresentarem uma alta propensão a essa categoria de doenças, ainda não há na literatura estudos que avaliem a expressão dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* em indivíduos com a síndrome, impossibilitando a avaliação do perfil de expressão desses genes e sua associação ao desenvolvimento de desordens autoimunes e inflamatórias.

2.2.1 Gene *CTLA-4*

O CTLA-4 é um receptor inibitório, codificado pelo gene *CTLA-4*, pertencente à subfamília das imunoglobulinas CD28 e expresso principalmente por células T. Seus ligantes, CD80 e CD86, são tipicamente encontrados na superfície das células apresentadoras de antígenos (APCs) e podem ligar-se a CD28 ou CTLA-4, resultando em uma resposta coestimulatória ou coinibitória, respectivamente (Van Coillie *et al.*, 2020). O CTLA-4 compete com o CD28 pela ligação do CD80/CD86 nas APCs para limitar a ativação das células T (Figura 9) (Verma *et al.*, 2017).

Figura 9 – Interações entre CD28, CTLA-4 e seus ligantes naturais.

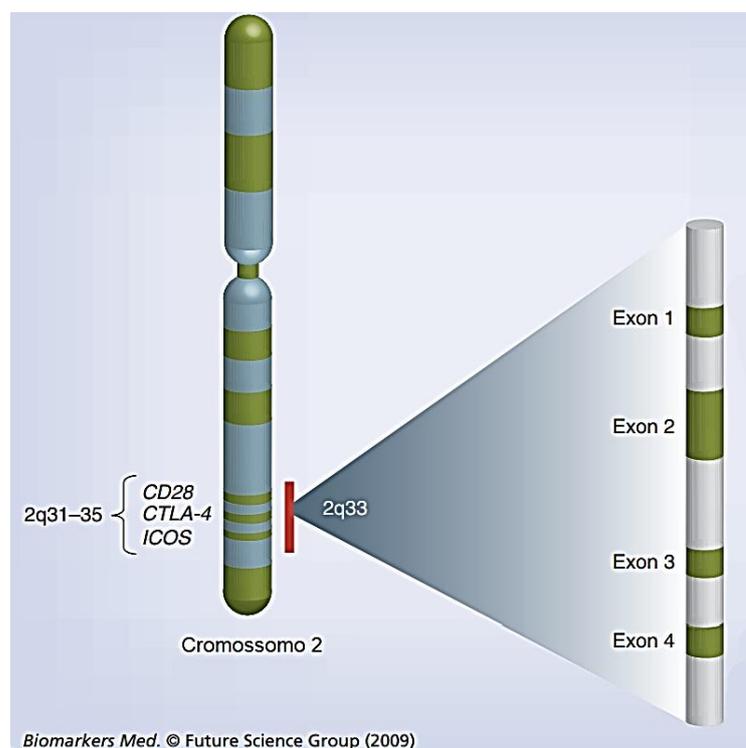


Fonte: Adaptado de Verma *et al.* (2017).

Nota: Ilustração mostrando a sinapse imunológica entre uma célula T que expressa CTLA-4 ou uma célula T reguladora (Treg) e uma APC que expressa CD80 e CD86. A afinidade das interações é representada da direita para a esquerda com a menor interação CD86-CD28 à esquerda e a maior CD80-CTLA-4 à direita.

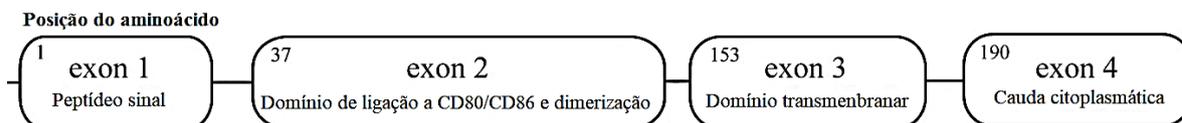
O gene *CTLA-4*, também conhecido como *CD152*, está localizado junto com o *CD28* no cromossomo 2 (2q33) e é composto por quatro éxons, que codificam 223 aminoácidos (Figura 10) (Mitsuiki *et al.*, 2018). O éxon 1 codifica um peptídeo líder, o éxon 2 um domínio de ligação ao ligante extracelular, o éxon 3 uma região transmembranar e o éxon 4 uma cauda citoplasmática contendo um motivo YVKM (Hosseini *et al.*, 2020) (Figura 11).

Figura 10 – Localização do gene *CTLA-4* no cromossomo 2.



Fonte: Adaptado de Kumar *et al.* (2009).

Figura 11 – Estrutura do gene *CTLA-4*.



Fonte: Adaptado de Mitsuiki *et al.* (2018).

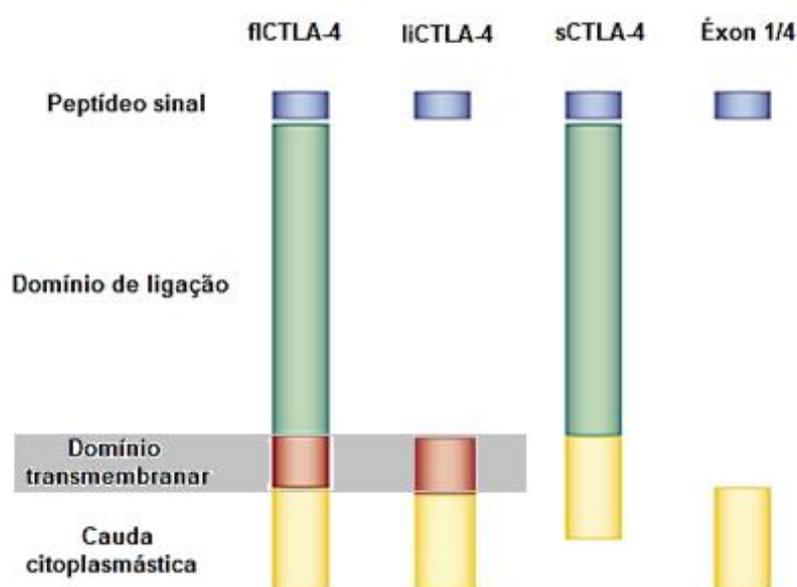
A região extracelular é caracterizada por um único domínio V-like de imunoglobulina e contém um motivo MYPPPY, que é crítico para a ligação a CD80 e CD86, e o local de dimerização (Mitsuiki *et al.*, 2018). O CTLA-4 se liga a seus

ligantes na membrana plasmática e subsequentemente os internaliza por endocitose (devido à presença do motivo 'YVKM' em sua cauda citoplasmática) resultando na remoção desses ligantes da APC, tornando-a incapaz de estimular células T por meio de CD28 (Verma *et al.*, 2017).

As isoformas resultantes do *splicing* alternativo do *CTLA-4* estão ainda mais ligadas à autoimunidade. Há quatro formas de *splicing* alternativo de CTLA-4 descritas, estando três delas presentes em humanos (Figura 12), essas são: a proteína CTLA-4 (fiCTLA-4) de comprimento completo que é codificada por todos os quatro éxons, a isoforma solúvel (sCTLA-4) sem o éxon 3 e uma que consiste no éxon 1 e 4 (1/4CTLA-4) (Hosseini *et al.*, 2020). Em células de camundongos, uma forma independente de ligante, sem o éxon 2, (liCTLA-4) pode ser detectada (Lingel; Brunner-Weinzierl, 2019).

A sCTLA-4 induz a função de células Treg, e a perda dela prejudica a função dessas células. Além disso, ela protege contra DM1 e a expressão reduzida dela acelerou o aparecimento de diabetes autoimune (Gerold *et al.*, 2011). Enquanto a isoforma 1/4CTLA-4 pode aumentar a ativação das células T, promovendo assim a autoimunidade, a liCTLA-4 é capaz de inibir as respostas das células T e sua expressão pode, portanto, proteger contra o aparecimento de DAIs (Lingel; Brunner-Weinzierl, 2019).

Figura 12 – Isoformas da proteína CTLA-4.



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

O *CTLA-4* é um regulador imunológico negativo da ativação das células T, desempenhando um papel importante na tolerância periférica e na prevenção de doenças autoimunes pela inibição da ativação das células T (Mitsuiki *et al.*, 2018). Mutações no gene *CTLA-4* em humanos influenciam a sua expressão e podem levar ao desenvolvimento de DAIs, como DM1, DAIT, artrite, psoríase, vitiligo, LES (Verma *et al.*, 2017; Gootjes *et al.*, 2022).

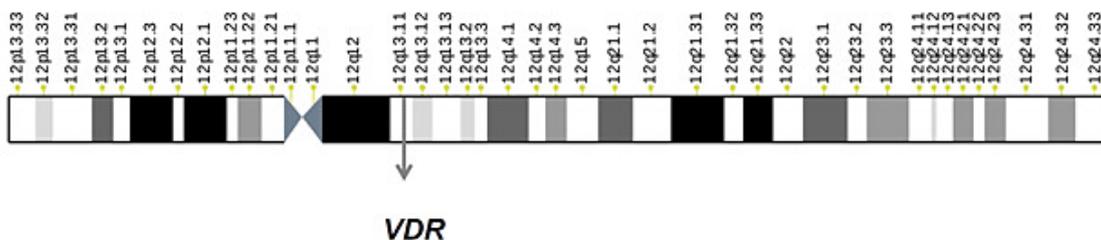
Reduções na expressão do mRNA do *CTLA-4* foram associadas à presença de hipotireoidismo autoimune (Kucharska *et al.*, 2009; Patel *et al.* 2016). E baixos níveis de mRNA de *CTLA-4* foram observados nas células Treg de crianças com diabetes em comparação com os controles saudáveis (Łuczyński *et al.*, 2009). De acordo com os autores, a expressão diminuída do *CTLA-4* e de outros elementos importantes na função das Treg pode ser o resultado de um desequilíbrio imunológico que acompanha o início do diabetes. Em pacientes com vitiligo, Gouda *et al.* (2021) relataram que os níveis relativos de expressão de *CTLA-4* foram comparáveis aos dos controles saudáveis. Mas ao comparar os níveis de expressão em pacientes com genótipos diferentes, os portadores de G/G do polimorfismo rs231775 (c.49A>G) exibiram um perfil de expressão significativamente menor do que os outros genótipos ($p=0,007$), mostrando que a expressão gênica estava associada a essa variante.

2.2.2 Gene VDR

O gene *VDR* humano está localizado no cromossomo 12 (12q13.1) (Figura 13) e é composto por oito éxons codificadores, os quais codificam o receptor de vitamina D (VDR), pertencente à superfamília de receptores nucleares de esteroides/hormônios tireoidianos presentes no citoplasma e no núcleo (Zenata; Vrzal, 2017; Christakos *et al.*, 2016). O VDR funcional foi identificado em quase todas as células imunes, incluindo APCs e linfócitos T, fornecendo assim uma evidência indireta da ação da vitamina D (Vit D) no sistema imunológico. Além disso, células imunes – especialmente APCs (macrófagos ativados e células dendríticas) – expressam a enzima 1 α -hidroxilase que converte o precursor 25-hidroxivitamina D3 (25-OHD3) em 1,25-(OH)2D3, de modo que os microambientes

imunológicos são capazes de ativar e responder à vitamina D (Harrison *et al.*, 2019; Infante *et al.*, 2019).

Figura 13 – Localização do gene *VDR* no cromossomo 12.

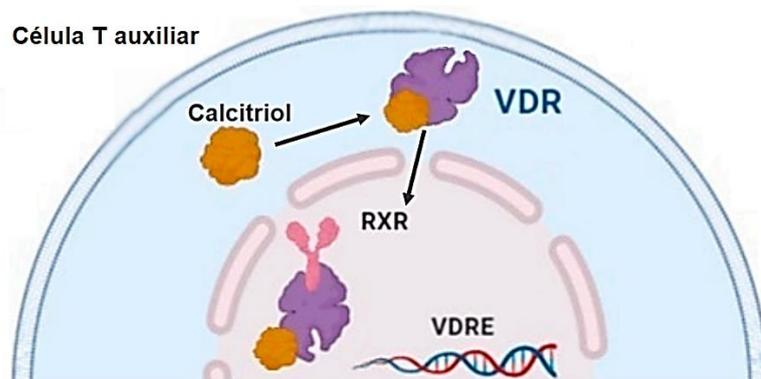


Fonte: Adaptado de Tamasauskiene *et al.* (2021).

A Vit D é produzida principalmente pela pele (cerca de 80%) na forma de colecalciferol, quando a pele é exposta à luz ultravioleta B, e os 20% restantes são obtidos da dieta como ergocalciferol ou como colecalciferol (Christakos *et al.*, 2016). No sangue, o colecalciferol e o ergocalciferol ligam-se à proteína de ligação à Vit D (VDBP) para serem transportados para o fígado, onde são convertidos em 25(OH)D ou calcidiol (principal forma circulante de Vit D, cuja concentração no soro tem servido como um dos biomarcadores mais confiáveis do *status* da Vit D), que então se liga à VDBP para ser transportado para o rim, onde é convertida em calcitriol (Ballesteros *et al.*, 2020).

O calcitriol (1,25(OH)₂D₃) é a forma funcional e hormonalmente ativa da Vit D, sendo responsável pela maioria das ações biológicas dela, as quais são mediadas pelo VDR. O VDR funciona como um heterodímero obrigatório com o receptor do retinoide X (RXR) para ativação de genes alvo da Vit D (Christakos *et al.*, 2016). Depois que o calcitriol entra nas células-alvo e se liga ao VDR, o complexo VDR-calcitriol no citosol é translocado para o núcleo, onde se liga ao RXR para formar um heterodímero e regular a expressão de genes-alvo da Vit D por meio de sua ligação ao elemento de resposta à Vit D (VDRE; sequência nucleotídica curta com repetições diretas, evertidas ou invertidas) encontrado em suas regiões reguladoras (Figura 14) (Zenata; Vrzal, 2017; Ruiz-Ballesteros *et al.*, 2020).

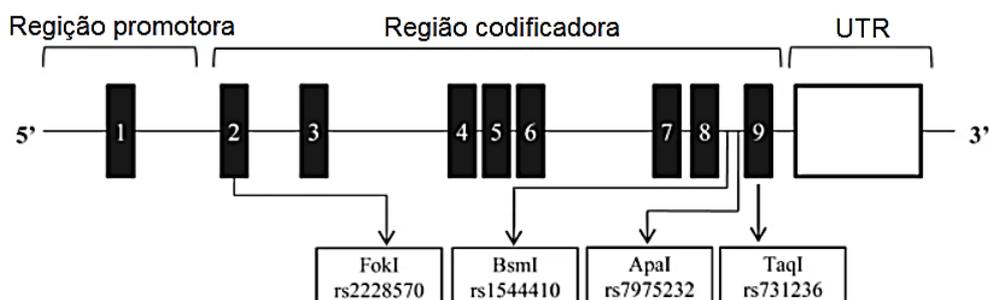
Figura 14 – Mecanismo genômico de ação da Vit D envolvido na regulação da expressão gênica.



Fonte: Adaptado de Ruiz-Ballesteros *et al.* (2020).

O *VDR* é expresso por muitas células do sistema imunológico e os efeitos resultantes incluem a modulação do fenótipo das células T para suprimir as células T pró-inflamatórias Th1 e Th17 CD4+ e promover a regulação tolerogênica (Harrison *et al.*, 2019). Polimorfismos no gene *VDR* podem levar a alterações na expressão gênica e na sua função, podendo assim modular os níveis e a ação da Vit D e influenciar o risco de distúrbios autoimunes (Altieri *et al.*, 2017; Ruiz-Ballesteros *et al.*, 2020). Existem quatro polimorfismos do *VDR* bem conhecidos (Figura 15) que foram amplamente estudados por seu papel potencial na autoimunidade (*Apa I*, *Bsm I*, *Taq I* e *Fok I*) e todos eles foram associados ao risco de desenvolver uma DAI, podendo atuar como fator protetor ou de risco (Dankers *et al.*, 2017).

Figura 15. Estrutura da região genômica do gene *VDR*.



Fonte: Adaptado de Triantos *et al.* (2018).

Legenda: As caixas pretas demonstram os éxons e as setas indicam as localizações aproximadas dos polimorfismos.

A Vit D demonstrou desempenhar um papel significativo na função do sistema imunológico, melhorando o sistema imune inato e regulando o adaptativo de uma forma que parece promover a tolerância imunológica e atuando para diminuir a probabilidade de desenvolver DAIs (Rosen *et al.*, 2016). Estudos recentes relataram uma associação significativa entre deficiência de Vit D e aumento da incidência ou agravamento de doenças infecciosas e doenças autoimunes inflamatórias, como DAIs, LES, artrite reumatoide (AR), esclerose múltipla (EM) e diabetes mellitus tipo 1 (Ruiz-Ballesteros *et al.*, 2020; Ao; Kikuta; Ishii, 2021).

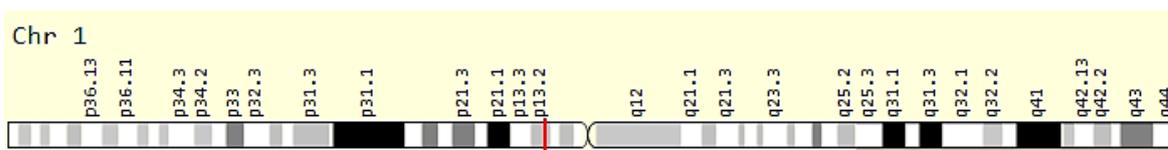
Como a Vit D desempenha um papel importante como imunomodulador nas respostas imunes através do VDR, o nível de expressão do gene *VDR* tem sido avaliado em contextos autoimunes e mostrou associações significativas com DAIs, como Esclerose múltipla (EM), LES e Artrite Reumatoide (AR) (Cavalcanti *et al.*, 2016; Sadeghi *et al.*, 2017; Khalilian *et al.*, 2021; Meza-Meza *et al.*, 2022)

O VDR desempenhou um papel importante na limitação do fenótipo inflamatório em um modelo de AR em camundongos. Os efeitos da ausência do VDR foram investigados em camundongos transgênicos de TNF humano, um modelo de rato com artrite inflamatória, por cruzamento com camundongos deficientes em VDR. O estudo revelou que a ausência de sinalização VDR causa um fenótipo pró-inflamatório de monócitos associado ao aumento da inflamação, danos à cartilagem e erosão óssea (Zwerina *et al.*, 2011).

2.2.3 Gene *PTPN22*

O gene *PTPN22* está localizado no cromossomo 1 (1p13) (Figura 16) e codifica uma proteína tirosina fosfatase de 110 kDa conhecida como Lyp (*lymphoid-specific phosphatase*), também chamada de PTPN22 em humanos (Abbasifard *et al.*, 2020; Tizaoui *et al.*, 2021). Lyp é expressa em leucócitos e atua como um regulador negativo da sinalização do receptor de células T (TCR) e do receptor de células B (BCR) (Armitage; Wallet; Mathews, 2021). Ela é importante na prevenção da ativação espontânea de células T, desenvolvimento e inativação de quinases associadas a receptores de células T e seus substratos (Tizaoui *et al.*, 2022).

Figura 16 – Localização do gene *PTPN22* no cromossomo 1 indicada pelo traço vermelho.



Fonte: GeneCards, The Human Gene Database.

A proteína PTPN22 contém três domínios, incluindo: um domínio catalítico PTP N-terminal; uma região interdomínio; e um domínio C-terminal com quatro regiões ricas em prolina que funcionam como motivos para interação com outras proteínas (Figura 17) (Stanfor; Bottini. 2014).

Figura 17 – Ilustração dos domínios da proteína PTPN22 codificada pelo gene *PTPN22*.



Fonte: Adaptado de Stanfor e Bottini (2014).

Em humanos, *Lyp* existe em três formas de *splicing* designadas *Lyp1*, *Lyp2* e *Lyp3*: *Lyp1*, cujo comprimento total é de 807aa, é a mais abundante das 3 isoformas e tem sido objeto de todos os estudos funcionais até o momento; *Lyp2* é a variante de *splicing* mais curta e contém apenas o primeiro motivo P1 dentro do N-terminal; enquanto *Lyp3* tem uma deleção de 28 aminoácidos entre P1 e P2. As funções de *Lyp2* e *Lyp3* não são conhecidas. *Lyp* pode ser ligado à membrana por meio de interações com outras proteínas, ou citosólico, mas a localização subcelular das diferentes isoformas ainda não foi relatada (Burn *et al.*, 2011).

O gene *PTPN22* é reconhecido como um dos riscos genéticos mais fortes para promover o desenvolvimento de autoimunidade fora do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Stanfor; Bottini, 2014). Polimorfismos nesse gene foram identificados como fatores de risco para o desenvolvimento de autoimunidade em humanos, como DM1, AR, LES, DAITs e vitiligo (Brownlie; Zamoyska; Salmond, 2018; Abbasifard *et al.*, 2020; Tizaoui *et al.*, 2022). Devido ao seu papel modulador em uma ampla variedade de vias de sinalização, perturbações na expressão de *PTPN2* estão associadas a diversos processos patogênicos,

incluindo vários distúrbios autoimunes, como LES, DM1 e AR (Moore *et al.*, 2009; Machado-Contreras *et al.*, 2016; Ramírez-Pérez *et al.*, 2019; Román-Fernández *et al.*, 2022).

Em pacientes com LES, a expressão relativa do gene *PTPN22* foi correlacionada com a atividade da doença, podendo ser incluída como um marcador biológico para monitorar essa atividade nesses pacientes (Machado-Contreras *et al.*, 2016; Román-Fernández *et al.*, 2022; Moneim *et al.*, 2023). Na AR foram relatadas, em diferentes coortes, expressões reduzidas e aumentadas de *PTPN22*, sendo essa última ainda maior em pacientes portadores do genótipo G/A do polimorfismo *PTPN22* +788 G>A (rs33996649) quando comparado com portadores de outros genótipos (Ramírez-Pérez *et al.* 2019; Abdelnaby *et al.* 2022).

A supressão de *PTPN2* sensibiliza as células β pancreáticas à apoptose induzida por citocinas, amplificando a perda de células β sob condições inflamatórias e contribuindo para DM1 (Moore *et al.*, 2009). Recentemente, um estudo revelou novas interações, tanto bioquímicas quanto estatísticas, entre *PTPN22* e *UBASH3A* (dois loci de risco independentes de DM1), que podem afetar a função das células T e aumentar o risco de DM1. O gene *UBASH3A* está localizado no cromossomo 21 humano (21q22.3), sendo expresso principalmente em células T do sistema imunológico adaptativo (Newman *et al.*, 2023).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de expressão dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* em indivíduos com síndrome de Down.

3.2 Objetivos específicos

1. Mapear doenças endócrinas no grupo de indivíduos com SD
2. Analisar se existe uma expressão diferencial dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* em indivíduos com SD em comparação com um grupo controle saudável;
3. Analisar se existe uma expressão diferencial dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* em indivíduos com SD em relação à presença de hipotireoidismo e aos níveis de proteína C Reativa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de indivíduos e achados clínicos

O estudo é do tipo transversal de caráter analítico. Nesse estudo foram analisados um total de 68 indivíduos com diagnóstico clínico e citogenético confirmado para a SD, provenientes do Grupo Universitário de Reabilitação Infantil (GURI) ou por meio de contato direto com responsáveis de pessoas com SD a partir de um grupo, via o aplicativo Whatsapp, criado especificamente para esse propósito. O número amostral para esse trabalho começou do zero como uma iniciativa do grupo do LGCAH de formar um banco de amostras de indivíduos com SD do estado de Pernambuco.

Para os ensaios de expressão gênica, dentre os 68 indivíduos cariotipados foram selecionados 22 indivíduos para compor o grupo amostral SD para análise da expressão gênica, sendo 12 do sexo masculino e 10 do sexo feminino. Esses indivíduos apresentavam uma média de idade de 10,9 anos \pm 1,6 (Mediana = 10,3 anos), variando de 8,6 anos a 14,1 anos. Para o grupo controle, foram selecionados 13 indivíduos saudáveis sem SD e sem histórico relatado de DAIs e/ou DICs, sendo 10 do sexo masculino e 3 do sexo feminino. A média de idade do grupo controle foi de 11,6 anos \pm 2,7 (Mediana = 12,3 anos), variando de 8 anos a 14,7 anos. Todos os indivíduos desse estudo são oriundos do estado de Pernambuco (PE).

Os critérios de inclusão foram: apresentar idades entre 8 a 14 anos e confirmação citogenética da SD. Os critérios de exclusão foram: presença de sinais clínicos sugestivos de infecção aguda, incluindo sintomas de resfriado, tosse ou febre recentes ao momento da coleta de sangue.

Todos os indivíduos que participaram das análises de expressão gênica realizaram exames clínicos em laboratório especializado para avaliar os níveis do(a): Hormônio Tiroestimulante ultrasensível (TSH) e T4 livre (Tiroxina Livre) para detecção de doença da tireoide; Hemoglobina Glicada (HbA1c) e Glicose Média Estimada (GME) para detecção de diabetes. Além disso, esses indivíduos também foram avaliados quanto à dosagem da Proteína C Reativa Ultrasensível (PCR-us) e da 25(OH)D.

Para o *status* de vitamina D, as faixas de referência para definição de suficiência, insuficiência e deficiência de 25(OH)D foram, respectivamente: 20 a 100 ng/mL; 12 a 20 ng/mL; <12 ng/mL, de acordo com a Pediatric Endocrine

Society. Os valores de referência para a PCR-us foram: Baixo risco: <0,1mg/dL; Médio risco: 0,1 a 0,2mg/dL; Alto risco: >0,2mg/dL; Muito alto risco: >1mg/dL e Doenças inflamatórias fase aguda: \geq 1mg/dL

A doença da tireoide foi caracterizada seguindo os critérios a seguir: hipotireoidismo subclínico (HS) para casos de TSH “alto” com T4 livre normal no momento do diagnóstico ou sem medicação, e hipotireoidismo evidente (HE) para casos de TSH “alto” com T4 livre baixo a qualquer momento, ambos os casos foram identificados conforme indicado por um médico endocrinologista por meio da avaliação do exame clínico.

A classificação de “alto” e “baixo” foi avaliada para intervalos laboratoriais normais individuais de acordo com os valores de referência a seguir: 0,30 a 4,20 μ UI/mL para TSH e 0,82 a 1,62 ng/dL para T4 livre. A diabetes mellitus foi definida quando ambos os valores de referência laboratoriais para hemoglobina glicada e glicose média estimada foram: igual ou superior a 6,5%; e a partir de 126 mg/dL, respectivamente.

4.2 Coleta das amostras

A coleta das amostras de sangue periférico foi realizada por meio de punção venosa utilizando a metodologia de coleta de sangue à vácuo com tubos contendo heparina e EDTA como anticoagulante, e foi coletado 8 mL de sangue de cada indivíduo. Para os indivíduos do grupo controle foi coletado sangue periférico apenas em tubo EDTA. Posteriormente, as amostras foram conduzidas para o Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH), do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) onde foram realizadas as culturas de linfócito para as análises citogenéticas e os ensaios de biologia molecular.

4.3 Cultura de linfócitos e Análise citogenética

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir da cultura de linfócitos do sangue periférico. Cerca de 20 metáfases por indivíduo foram analisadas por bandeamento G, e cerca de 30 metáfases para indivíduos que apresentaram mosaicismos cromossômicos. A quantidade de células analisadas e a identificação e

classificação dos cromossomos estão de acordo com o Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN) de 2020.

4.4 Análise molecular

4.4.1 Ensaios de Expressão Gênica

Para avaliar os níveis de mRNA dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* em indivíduos SD (n=22) e no grupo controle (CT) (n=13), o RNA foi extraído dos leucócitos totais das amostras de sangue periférico utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA). Após esta etapa, o RNA total foi armazenado em freezer -80 e, posteriormente, foi quantificado no equipamento NanoDrop™, a partir da espectrofotometria, para avaliar a concentração total e pureza do RNA.

Para a síntese de cDNA, a concentração de RNA total foi padronizada em 500 ng em todas as reações usando o kit comercial Reverse Transcription High Capacity (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante.

Os ensaios de expressão foram realizados com sondas fluorogênicas do tipo Taqman® para os genes alvos *CTLA-4* (Hs.00175480), *VDR* (Hs.01045843) e *PTPN22* (Hs.01587526) e o sistema SyBR Green para os genes endógenos *EF1A* (F - GAGGCTGCTGAGATGGGAAA e R - CGTTCACGCTCAGCTTTTCAG) e *HPRT1* (F - ACAGGACTGAACGTCTTGCT e R - GAGCACACAGAGGGCTACAA).

Os ensaios foram realizados no equipamento ABI7500 (Applied biosystems), disponível no Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE e o método de análise foi por fator de normalização para a quantificação relativa da expressão gênica. Os genes de referência utilizados foram escolhidos após testes com cinco genes candidatos (*EF1A*, *HPRT1*, *G6PD*, *GAPDH* e *BACT*), em que os genes *HPRT1* e *EF1A* se mostraram mais estáveis segundo a plataforma geNorm.

4.4.2 Análise dos dados

Na análise da expressão gênica foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar se as amostras apresentavam distribuição normal. A análise estatística para as amostras não normalizadas (gene *VDR*) foi realizada utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney e para o grupo amostral com distribuição normal (genes *CTLA-4* e *PTPN22*) foi o utilizado o teste paramétrico T Student, ambos com

nível de significância de 5% ($p < 0,05$), a partir do programa R. Os gráficos foram gerados a partir do programa GraphPad.

4.5 Aspectos éticos da pesquisa

Este estudo foi desenhado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (CNS), em sua resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e o projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde/CCS/UFPE, Nº 5.482.843 (Anexo A). Todos os responsáveis pelos indivíduos envolvidos foram orientados sobre a proposta do estudo e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B). Os aspectos éticos da resolução 466/12 do CNS foram respeitados seguindo os seguintes parâmetros de acordo com o presente projeto:

a) Respeito ao participante

Será respeitado o participante da pesquisa em sua dignidade e autonomia, reconhecendo sua vulnerabilidade, assegurando sua vontade de contribuir e permanecer, ou não, na pesquisa, por intermédio de manifestação expressa, livre e esclarecida.

b) Ponderação entre riscos e benefícios

O projeto se comprometerá ao máximo em obter resultados promissores para o beneficiamento da saúde humana, evitando o máximo de riscos possível durante a coleta.

c) Garantia de que danos previsíveis serão evitados

Todos os cuidados serão levados em conta para que diminua qualquer risco à saúde física do paciente

5 RESULTADOS

5.1 Análise citogenética

Todos os 68 indivíduos clinicamente diagnosticados com SD tiveram os cariótipos confirmados pelo bandeamento G (Tabela 1). O cariótipo mais frequente foi a trissomia livre do cromossomo 21, presente em 88,2% dos indivíduos, os outros cariótipos apresentaram mosaicismos cromossômicos (8,8%) e translocação Robertsoniana (2,9%). Entre os cinco indivíduos com mosaicismos cromossômicos, uma criança do sexo feminino apresentou cariótipo com cinco linhagens celulares diferentes e uma criança do sexo masculino apresentou cariótipo com dupla aneuploidia (síndrome de Down e Klinefelter). Em relação ao sexo, 55,9% eram do sexo masculino e 44,1% do sexo feminino.

Tabela 1 – Caracterização citogenética dos indivíduos com SD.

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

Fonte: A autora (2023)

5.2 Exames bioquímicos e achados clínicos

As doenças endócrinas foram diagnosticadas em metade dos indivíduos (Tabela 2). O hipotireoidismo (doença da tireoide) foi observado em 45,5% dos indivíduos, sendo seis indivíduos do sexo feminino e quatro do sexo masculino. Em 7/9 (77,8%) pacientes com HS, as concentrações séricas de TSH estavam entre 4,47 e 10,0 μ UI/mL, enquanto em 2/9 (22,2%) casos o nível de TSH estava acima de 10 μ UI/mL (Tabela 3).

O indivíduo diagnosticado com diabetes mellitus é do sexo feminino, e os valores de HbA1c e GME estão disponíveis na tabela 3 (indivíduo 8).

Tabela 2 – Diagnóstico de doenças endócrinas dos indivíduos com SD.

Clínica da SD	N	%
Sem doenças endócrinas identificadas	11	50
Doenças endócrinas		
DM	1	4,5
Doenças da tireoide		
HS	9	40,9
HE	1	4,5
Total	22	100

Fonte: A autora (2023)

Legenda: HS, hipotireoidismo subclínico; HE, hipotireoidismo evidente; DM, diabetes mellitus.

Na tabela 3 está disponível os níveis séricos individuais de PCR-us, TSH, T4 livre, 25(OH)D, HbA1c e GME dos 22 indivíduos com SD. Em relação à dosagem da PCR-us, 9/22 (40,9%) apresentaram alto risco para doenças inflamatórias de fase aguda, com valores variando de 0,27 mg/dL a 0,95 mg/dL e média de 0,5 mg/dL \pm 0,23.

Sobre a dosagem da 25(OH)D, todos os indivíduos apresentaram níveis suficientes (Tabela 3). Para todo o grupo, os valores foram superiores a 20 ng/mL, com valores variando de 20,8 ng/mL a 43,4 ng/mL e média de 29,8 ng/mL \pm 5,8. Até o momento, foi possível obter informações sobre a suplementação de Vit D de 16 indivíduos, e desses, apenas os indivíduos 9, 12 e 14 fazem suplementação e o 18 já fez suplementação.

Tabela 3 – Níveis séricos individuais dos pacientes com SD.

N	Cariótipos	PCR-us (mg/dL)	TSH (μ UI/mL)	T4 livre (ng/dL)	25(OH)D (ng/mL)	HbA1c (%)	GME (mg/dL)
1	47,XY,+21	0,05	6,46*	1,04	34,3	5,2%	103
2	47,XX,+21	0,02	2,95	1,11	23,1	5,3%	104
3	47,XY,+21	<0,02	4,14	1,23	34,1	5,5%	110
4	47,XY,+21	0,08	2,1	1,59	27,4	5,4%	109
5	47,XX,+21	0,19	1,45	0,92	25,3	5,1%	99
6	47,XX,+21	0,02	5,31*	0,86	28,1	4,5%	82
7	47,XX,+21	0,63*	5,38*	1,32	28,6	5,2%	102
8	47,XX,+21	0,79*	6,73*	1,44	23,4	8,0%	183
9	47,XX,+21	0,41*	3,01	0,94	27,9	4,9%	95
10	47,XX,+mar/47,XX,+21/ 48,XX,+2mar/49,XX,+3 mar/46,XX	<0,02	2,76	0,99	27,4	5,5%	111
11	47,XX,+21	0,17	49,32*	0,77*	24,4	5,0%	97
12	47,XY,+21	0,33*	3,11	1,16	28,2	5,3%	104
13	47,XY,+21	0,02	4	1,12	24,9	5,0%	97
14	47,XY,+21[48]/46,XY	0,95*	3,61	1,56	31	5,0%	96
15	47,XX,+21	0,55*	4,47*	1,13	38,6	5,6%	114
16	47,XY,+21	0,27*	2,97	1,14	31,2	5,8%	119
17	47,XY,+21	0,15	16,96*	1,04	26,7	4,6%	86
18	47,XY,+21	0,15	2,76	1,37	43,4	4,6%	86
19	47,XY,+21	0,19	11,65*	1,44	36,2	5,6%	115
20	47,XY,+21/47,XXY	0,28*	7,38*	1,04	41,3	5,5%	112
21	47,XY,+21	0,11	4,18	1,21	20,8	5,2%	102
22	47,XY,+21	0,29*	9,35*	0,97	29,4	5,6%	115

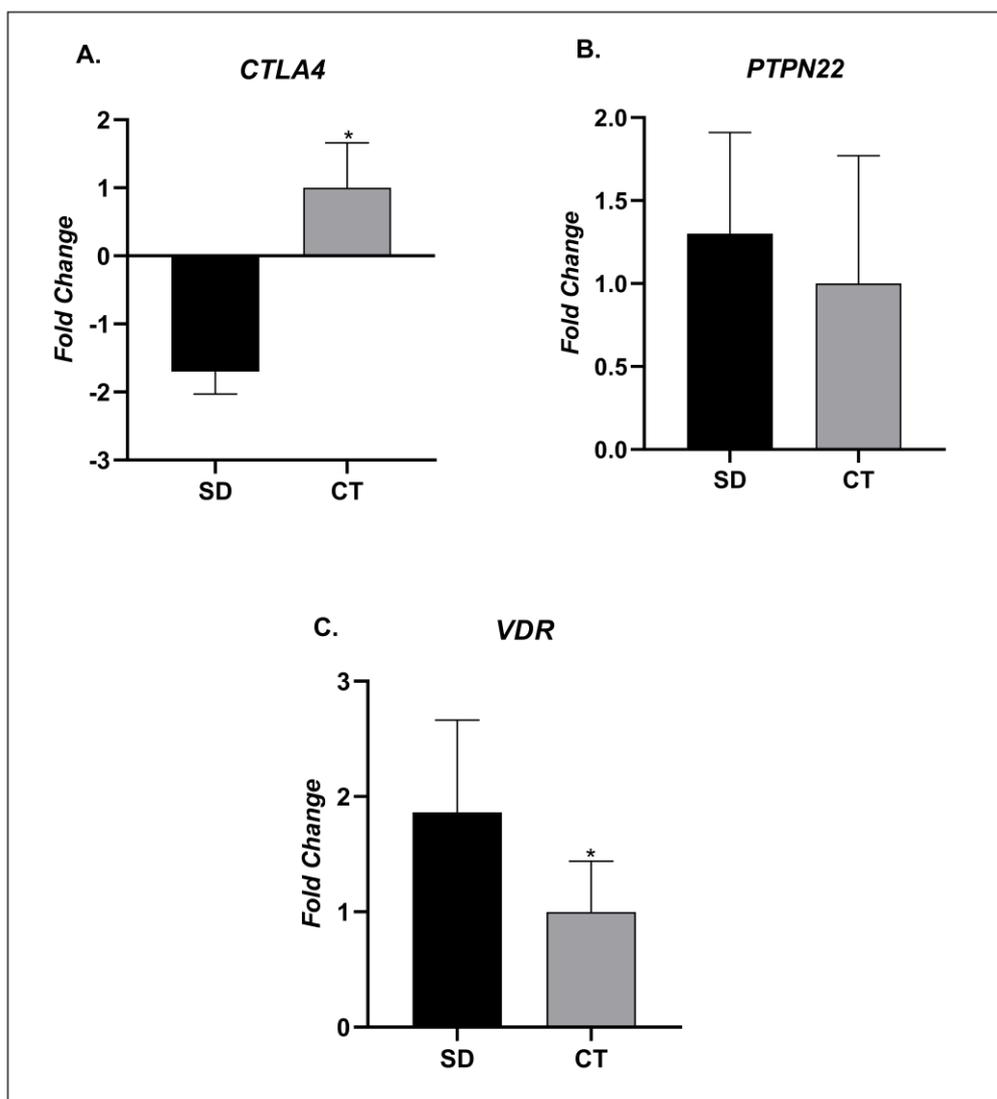
Fonte: A autora (2023)

Legenda: * na Proteína C-reativa ultrasensível (PCR-us) indica que os níveis foram correspondentes a alto risco para doenças inflamatórias de fase aguda, e na coluna do Hormônio Tireoestimulante (TSH) e Tiroxina livre (T4) livre que o valor estava fora do intervalo de referência.

5.3 Perfil de expressão dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22*

Por meio de ensaios de expressão gênica, comparamos os níveis de mRNA dos genes *CTLA-4*, *PTPN22* e *VDR* de indivíduos com SD (n=22) e CT (n=13) (Figura 18). Em relação aos níveis de mRNA, observamos diferença estatisticamente significativa quanto ao gene *CTLA-4* ($p=0,0014$) e ao *VDR* ($p=0,0096$), porém não em relação ao gene *PTPN22* ($p=0,8007$). O gene *CTLA-4* apresentou uma regulação negativa de -1,71 vezes no grupo SD em comparação ao CT, enquanto o *VDR* e o *PTPN22* apresentaram regulação positiva de 1,86 vezes e 1,30, respectivamente.

Figura 18 – Expressão dos genes *CTLA-4*, *PTPN22* e *VDR* em indivíduos com SD vs CT.



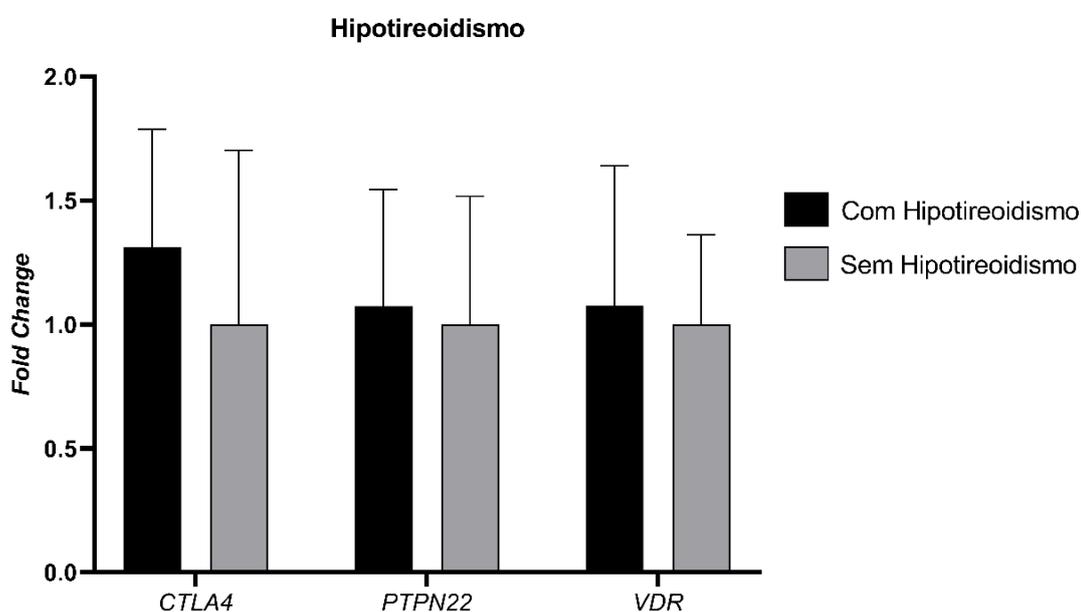
Fonte: A autora (2023)

Legenda: O asterisco (*) indica que o valor-p foi estatisticamente significativo ($p < 0.05$).

5.4 Perfil de expressão dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* em relação à presença de hipotireoidismo e à dosagem da PCR-us

Ao analisar a expressão gênica estratificando a amostra SD (n=22) com base no diagnóstico de hipotireoidismo, ou seja, um grupo caso de indivíduos com hipotireoidismo (n=10) e um grupo controle sem hipotireoidismo (n=12), não foi observada diferença significativa na expressão de nenhum dos três genes avaliados (Figura 19).

Figura 19 – Expressão dos genes *CTLA-4*, *PTPN22* e *VDR* em indivíduos com SD e hipotireoidismo vs indivíduos com SD sem hipotireoidismo.

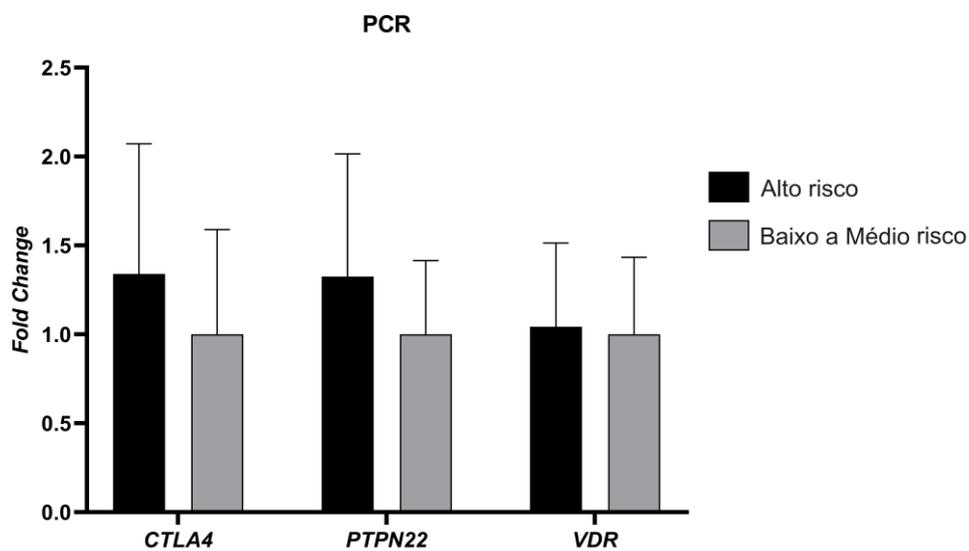


Fonte: A autora (2023)

Nota: Sem diferenças estatísticas significativas.

Outra análise que avaliamos, por meio da estratificação do grupo SD (n=22), foi a expressão gênica entre indivíduos com níveis da PCR-us referente a alto risco para desenvolvimento de doenças inflamatórias de fase aguda (n=9) e indivíduos com dosagem da PCR-us de médio a baixo risco (de acordo com os valores de referência) (n=13), e novamente não observamos diferença significativa na expressão gênica de nenhum dos três genes avaliados (Figura 20).

Figura 20 – Expressão dos genes *CTLA-4*, *PTPN22* e *VDR* em indivíduos com SD e dosagem da PCR-us para alto risco vs indivíduos com SD e dosagem da PCR-us para baixo a médio risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias de fase aguda.



Fonte: A autora (2023)

Nota: Sem diferenças estatísticas significativas.

6 DISCUSSÃO

Na maioria dos casos de SD, mais de 95% dos indivíduos possuem cariótipo com trissomia livre do 21, enquanto em uma frequência menor encontra-se casos de translocações Robertsonianas (~5%) e mosaïcismo cromossômico (~2%) (Vičić *et al.*, 2017; Jaiswal *et al.*, 2021). Em nossos resultados, a trissomia livre também estava presente na maior parte dos casos (88,2%). Contudo, encontramos uma frequência de mosaïcismo cromossômico em nosso estudo (8,8%) maior do que geralmente é relatada, enquanto a da translocação Robertsoniana foi menor.

Esses achados são congruentes com os relatados por Chandra *et al.* (2010), em um estudo envolvendo 1.020 indivíduos com SD, no qual, 83,8% dos cariótipos apresentaram trissomia livre, 10,8% mosaïcismo cromossômico e 5% translocações Robertsonianas. Com base nisso, pode-se inferir que diferenças na frequência dessas duas formas clássicas, menos predominantes da SD, podem não estar necessariamente relacionadas ao tamanho da amostra.

Cerca de 25% dos casos de translocação Robertsoniana na SD são de origem familiar, enquanto o resto surge *de novo*. Contudo, nos dois casos aqui descritos ainda não foi possível realizar o cariótipo dos pais para definição da origem dessa alteração cromossômica. Os casos de rob(14;21) e rob(21;21) são as formas mais comuns (Shaw *et al.*, 2008; Morris *et al.* 2012; Wilch; Morton, 2018). Casos de rob(21;22), como o encontrado nesse estudo, são muito raros e há um número pequeno descrito na literatura. Morris *et al.* (2012) relataram apenas 5% de casos de rob(21;22) dentre as 441 translocações Robertsonianas encontradas, no período de 1989 e 2009 na Inglaterra e no País de Gales, incluídos no National Down Syndrome Cytogenetic Register.

No presente estudo, 45,5% (n=10/22) dos indivíduos avaliados apresentaram hipotireoidismo, sendo seis do sexo feminino e quatro do masculino. Em uma análise retrospectiva de registros conduzidos por Pierce, Lafranchi e Pinter (2017), foi observado que a ocorrência da doença da tireoide na SD era mais comum e se manifestava em uma idade mais precoce do que na população em geral, além de ser frequentemente transitória e não relacionada ao sexo, obesidade ou outras comorbidades.

A prevalência de HS em crianças com SD é maior do que na população pediátrica saudável em geral, com frequência relatada de até 81,8% (Szeliga *et al.*,

2022). Esse dado está de acordo com nossos resultados, visto que o HS foi o distúrbio da tireoide mais prevalente, presente em 40,9% dos indivíduos com SD. De acordo com a literatura, grande parte do HS na SD não está relacionado à autoimunidade (Pierce; Lafranchi; Pinter, 2017; Pepe *et al.*, 2020; Szeliga *et al.*, 2022). No entanto, em nosso estudo, não foi possível avaliar se o HS presente nos indivíduos era autoimune, visto que a maior parte dos indivíduos não possuíam um prontuário médico e a realização de exames para anticorpos antitireoidianos não teve como ser realizada até o momento.

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

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

Com relação à expressão dos genes *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22* entre indivíduos com SD (n=22) e indivíduos controles (n=13), os genes *CTLA-4* (p=0,0014) e *VDR* (p=0,0096) foram diferencialmente expressos nos indivíduos com SD, mas o *PTPN22* (p=0,8007) não.

Reduções mais sutis na expressão ou função do gene *CTLA-4* podem determinar a suscetibilidade a doenças autoimunes comuns, visto que o *CTLA-4* é um importante regulador negativo da resposta imune mediada por células T e a expressão e a função biológica dele são importantes para a regulação negativa dessas células (Anjos *et al.*, 2002; Hosseini *et al.*, 2020). Em nosso estudo, o *CTLA-*

4 foi 1,71 vezes ($p=0,0014$) menos expresso nos indivíduos com SD do que nos controles. Com esse resultado, pode-se presumir que a regulação negativa do *CTLA-4* possivelmente contribui para o desequilíbrio imunológico frequentemente relatado na síndrome.

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

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

O *status* de Vit D é definido de acordo com a concentração sérica de 25(OH)D (25-hidroxivitamina D) (Stagi *et al.*, 2015). Por meio da avaliação dos níveis de 25(OH)D, nossos resultados mostraram que a suficiência de Vit D estava presente em todos os indivíduos avaliados, com uma média de $29,8 \pm 5,8$ ng/mL. Até onde sabemos, esse resultado é o primeiro, se não o único a relatar suficiência de vitamina D em todos os indivíduos com SD. Hisbiyah *et al.* (2022) relataram que a suficiência de Vit D foi mais prevalente do que a insuficiência em crianças indonésias com SD, com nível médio de $36,85 \pm 20,322$ ng/mL. No entanto, a suficiência estava presente em apenas 53,1% da amostra desse estudo.

Os estudos que avaliaram os níveis de Vit D em indivíduos com SD são poucos, e a grande parte deles relataram que a maioria dos indivíduos não apresentam suficiência de Vit D (Stagi *et al.*, 2015; Zubillaga *et al.*, 2015; El-Hawary *et al.*, 2019). A deficiência de Vit D mais evidente na SD foi publicada por Stagi *et al.* (2015), em que o nível médio de Vit D observado foi de $14,34 \pm 8,31$ ng/mL, e apenas dois (6,5%) dos 31 pacientes avaliados apresentaram níveis suficientes.

Além disso, os autores também observaram diferenças estatísticas significativas entre indivíduos com SD com peso normal e aqueles que eram obesos ($P < 0,05$) e indivíduos com SD sem e com ($P < 0,005$) histórico de doenças autoimunes.

É importante ressaltar que os estudos sobre insuficiência de Vit D relatados acima levaram em consideração o valor de referência suficiente como acima de 30 ng/mL, enquanto nesse estudo, os valores de referência considerados suficientes foram acima de 20 ng/mL. Caso o valor suficiente fosse 30 ng/mL, 63,6% (14/22) dos indivíduos SD da nossa amostra estariam com níveis insuficientes. Esse valor de referência está de acordo com a mudança publicada pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) e da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) em 2017, a qual alterou o valor de referência da suficiência de Vit D de acima de 30 ng/mL para acima de 20 ng/mL para a população saudável, enquanto que valores entre 30 e 60 ng/mL é o recomendado para grupos de risco como: idosos, gestantes, pacientes com osteomalácia, raquitismos, osteoporose, hiperparatireoidismo secundário, doenças inflamatórias, doenças autoimunes, doença renal crônica e síndromes de má absorção (clínicas ou pós-cirúrgicas) (Ferreira *et al.*, 2017). Essa alteração está de acordo com o que foi definido pelo Consenso Global em 2016 (Munns *et al.*, 2016). Como não confirmamos a presença de doenças autoimunes em nossa amostra, foi considerado o valor acima de 20 ng/mL.

Em relação à expressão relativa do *VDR* nos indivíduos do presente estudo, pôde-se observar que ele foi significativamente mais expresso 1,86 vezes ($p = 0,0096$) no grupo com SD no que no grupo controle. Diferente do observado neste estudo, Santos *et al.* (2020) observaram uma regulação negativa de -2,84 vezes ($p < 0,001$) do *VDR* em pacientes brasileiras com Síndrome de Turner (ST) em comparação aos controles saudáveis, a qual pode contribuir para o desequilíbrio imunológico na ST. Além disso, níveis reduzidos de mRNA do *VDR* foram observados em pacientes brasileiros com AR com alta atividade da doença quando comparados a pacientes em remissão, sublinhando a importância desse gene no desenvolvimento da AR (Cavalcanti *et al.*, 2016)

Estudos avaliando a expressão do *VDR* em indivíduos sem SD e com doenças autoimunes também relataram regulação positiva desse gene. Segundo Meza-Meza *et al.* (2022) uma expressão 9,56 vezes maior foi observada em

pacientes com LES em comparação com o grupo controle. Eles argumentaram que, segundo Dankers *et al.* (2017), como o *VDR* é expresso em diferentes células do sistema imunológico, sua expressão aumentada em pacientes com LES poderia ser um reflexo da hiperativação do sistema imunológico, bem como a presença de níveis elevados de calcitriol observados nesses pacientes, uma vez que o *VDR* é um receptor dependente desse ligante. Na presença de níveis elevados de calcitriol, uma maior captação e processamento de autoantígenos poderia favorecer a resposta imune autorreativa, portanto, o efeito benéfico da Vit D pode ser obtido em doses moderadas (Häusler *et al.*, 2019).

Em outro estudo, realizado por O'Neill *et al.* (2013) em uma população sul-africana, os autores avaliaram o efeito combinado da Vit D, etnia e genótipo *Fok I* na expressão e nas capacidades funcionais do *VDR*, e concluíram que a expressão diferencial do *VDR* está relacionada com a etnia, e não com o *status* de 25(OH)D₃ e o genótipo *Fok I*.

De acordo com Balta *et al.* (2018), a expressão do gene *VDR* no sangue total foi significativamente maior em um grupo de crianças com TEA (Transtorno do espectro autista) em comparação aos controles saudáveis ($p < 0,0001$). Eles sugeriram que as vias de sinalização da Vit D e do *VDR* podem ser direta ou indiretamente prejudicadas no TEA, e que o aumento da expressão do gene *VDR* em pacientes com TEA pode estar de acordo com um aumento na resposta imune inata nesses pacientes. O TEA é mais prevalente em indivíduos com SD do que na população em geral, afetando entre 2% e 10%, porém o diagnóstico de TEA na SD é subestimado, pois é necessário compreender quais aspectos do fenótipo comportamental estão relacionados à SD e quais estão relacionados ao TEA (Diniz *et al.*, 2022).

Para Sadeghi *et al.* (2017), a interação entre os genes e a incerteza sobre os níveis de transcrição e proteína aumentam a complexidade analítica. Por exemplo, embora as pessoas que participaram do estudo tivessem níveis normais de Vit D, o aumento na expressão do *VDR* pode ser uma resposta ao processamento defeituoso da Vit D. Outra possibilidade é que fatores como micro-RNAs possam resultar na sua desativação, dessa forma um aumento no nível de expressão do *VDR* pode ser visto como uma resposta compensatória.

Diante disso, embora os indivíduos com SD dese estudo tenham apresentado níveis suficientes de Vit D, o aumento nos níveis de expressão do *VDR* pode estar relacionado a uma interação complexa envolvendo vários fatores. Sendo, portanto, necessário mais estudos em indivíduos com SD sobre o *VDR* e fatores que possam interagir com ele e seu produto gênico a fim de fornecer uma melhor compreensão desse perfil de expressão diferencial na síndrome.

Neste trabalho, os indivíduos com SD mostraram níveis de expressão de mRNA do *PTPN22* 1,30 vezes maior que o do que o CT, porém essa expressão não diferiu significativamente ($p=0,8007$). Sendo assim, a expressão gênica do *PTPN22* não esteve relacionada com a síndrome no nosso grupo de estudo.

A expressão de *PTPN22* foi associada a doenças autoimunes. Níveis de expressão de mRNA de *PTPN22* foram semelhantes em pacientes inativos com LES e controles saudáveis, porém em pacientes com exacerbação grave a expressão foi quase esgotada, sugerindo que Lyp (proteína codificada pelo gene *PTPN22*) desempenha um importante papel regulador e sua ausência contribui para a resposta inflamatória e atividade da doença no LES (Machado-Contreras *et al.*, 2016). Em uma coorte de pacientes egípcios com AR foi observada uma significativa expressão negativa de *PTPN22* e positiva de *CTLA-4* em comparação aos controles saudáveis ($P=0,0001$ e $P=0,005$, respectivamente) (Abdelnaby *et al.*, 2022).

Uma das principais limitações do nosso estudo foi não poder avaliar as expressões dos genes em indivíduos SD com diagnóstico para doenças autoimunes, impossibilitando assim observar se havia ou não relação entre a expressão gênica e a autoimunidade. Em razão de ser a primeira vez que se observa uma relação entre a expressão dos genes *CTLA-4* e *VDR* e a síndrome de Down, são necessárias mais pesquisas para garantir a precisão desses resultados. Estudos futuros em outras coortes com SD que investiguem a influência de genes envolvidos nos componentes da resposta imune inata e adaptativa, como o *CTLA-4*, *VDR* e *PTPN22*, serão importantes para estabelecer uma melhor compreensão das possíveis interações gênicas na síndrome e do que poderia levar a uma expressão diferencial dos genes *CTLA-4* e *VDR* nesses indivíduos, bem como uma possível associação da expressão com doenças autoimunes.

7 CONCLUSÕES

1. O hipotireoidismo subclínico apresentou uma alta prevalência nos indivíduos com SD.
2. A análise dos níveis de mRNA revelou que houve uma expressão diferencial dos genes *CTLA-4* e *VDR* em indivíduos SD em comparação aos controles, mas não do *PTPN22*.
3. A expressão aumentada do *VDR* pode estar relacionada à regulação do metabolismo da vit D como um mecanismo para melhor utilizar os níveis de Vit D e contribuir para um desempenho mais eficiente do sistema imune.
4. A expressão gênica do *CTLA-4* foi reduzida nos indivíduos com SD, sugerindo uma provável contribuição para o desequilíbrio imunológico frequentemente relatado na síndrome. Contudo, nossos resultados não são suficientes para compreender se essa expressão diferencial estaria efetivamente relacionada à propensão que eles apresentam a determinadas doenças autoimunes/inflamatórias crônicas.
5. Em nossa amostra, as expressões dos genes não estiveram relacionadas ao hipotireoidismo e aos diferentes níveis de PCR-us.

REFERÊNCIAS

- ABBASIFARD, M.; IMANI, D.; BAGHERI-HOSSEINABADI, Z. *PTPN22* gene polymorphism and susceptibility to rheumatoid arthritis (RA): Updated systematic review and meta-analysis. **The Journal of Gene Medicine**, v. 22, n. 9, p. e3204, 2020. doi: 10.1002/jgm.3204.
- ABDELNABY, M. M. *et al.* Three key genes expression profiling in Egyptian rheumatoid arthritis patients. **The Egyptian Journal of Immunology**, v. 29, n. 3, p. 19-28, 2022.
- ALTIERI, B. *et al.* Does vitamin D play a role in autoimmune endocrine disorders? A proof of concept. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 18, p. 335-346, 2017. doi: 10.1007/s11154-016-9405-9.
- AGARWAL GUPTA, N.; KABRA, M. Diagnosis and management of Down syndrome. **The Indian Journal of Pediatrics**, v. 81, p. 560-567, 2014. doi: 10.1007/s12098-013-1249-7.
- AMR, N. H. Thyroid disorders in subjects with Down syndrome: an update. **Acta Bio Medica: Atenei Parmensis**, v. 89, n. 1, p. 132, 2018. doi: 10.23750/abm.v89i1.7120.
- ANJOS, S. *et al.* A common autoimmunity predisposing signal peptide variant of the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 results in inefficient glycosylation of the susceptibility allele. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46478-46486, 2002. doi:10.1074/jbc.M206894200
- ANTONARAKIS, S. E. Down syndrome and the complexity of genome dosage imbalance. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 3, p. 147-163, 2016. doi: 10.1038/nrg.2016.154
- ANTONARAKIS, S. E. Down syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 9, 2020. Doi: 10.1038/s41572-019-0143-7.
- AO, T.; KIKUTA, J.; ISHII, M. The Effects of Vitamin D on Immune System and Inflammatory Diseases. **Biomolecules**, v. 11, n. 11, p. 1624, 2021. doi:10.3390/biom11111624
- ARMITAGE, L. H.; WALLET, M. A.; MATHEWS, C. E. Influence of *PTPN22* Allotypes on Innate and Adaptive Immune Function in Health and Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 636618, 2021. doi:10.3389/fimmu.2021.636618
- ASIM, A. *et al.* Down syndrome: an insight of the disease. **Journal of biomedical science**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 2015. doi:10.1186/s12929-015-0138-y

AVERSA, T. *et al.* Epidemiological and clinical aspects of autoimmune thyroid diseases in children with Down's syndrome. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 44, p. 1-5, 2018. doi:10.1186/s13052-018-0478-9

BALTA, B. *et al.* Increased vitamin D receptor gene expression and rs11568820 and rs4516035 promoter polymorphisms in autistic disorder. **Molecular biology reports**, v. 45, p. 541-546, 2018. doi:10.1007/s11033-018-4191-y

BERTAPELLI, F. *et al.* Overweight and obesity in children and adolescents with Down syndrome—prevalence, determinants, consequences, and interventions: a literature review. **Research in developmental disabilities**, v. 57, p. 181-192, 2016. doi:10.1016/j.ridd.2016.06.018

BIANCO, B. *et al.* *PTPN22* polymorphism is related to autoimmune disease risk in patients with Turner syndrome. **Scandinavian journal of immunology**, v. 72, n. 3, p. 256-259, 2010. doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02438.x

BRASIL. Ministério da Saúde. Biblioteca Virtual em Saúde. “Não deixe ninguém para trás”: Dia internacional da Síndrome de Down 2019. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/nao-deixe-ninguem-para-tras-dia-internacional-da-sindrome-de-down-2020/> . Acesso em: 22 agosto 2023.

BROWNLIE, R. J.; ZAMOYSKA, R.; SALMOND, R. J. Regulation of autoimmune and anti-tumour T-cell responses by *PTPN22*. **Immunology**, v. 154, n. 3, p. 377-382, 2018. doi:10.1111/imm.12919

BURN, G. L. *et al.* Why is *PTPN22* a good candidate susceptibility gene for autoimmune disease?. **FEBS letters**, v. 585, n. 23, p. 3689-3698, 2011. doi:10.1016/j.febslet.2011.04.032

CAVALCANTI, C. A. J. *et al.* Vitamin D receptor polymorphisms and expression profile in rheumatoid arthritis Brazilian patients. **Molecular biology reports**, v. 43, p. 41-51, 2016. doi:10.1007/s11033-015-3937-z

CHANDRA, N. *et al.* Cytogenetic Evaluation of Down Syndrome: A Review of 1020 Referral Cases. **Revista Internacional de Genética Humana**, v. 1-3, p. 87-93, 2010. Doi: 10.1080/09723757.2010.11886090

CHICOINE, B. *et al.* Prevalence of common disease conditions in a large cohort of individuals with Down syndrome in the United States. **Journal of patient-centered research and reviews**, v. 8, n. 2, p. 86, 2021. doi: 10.17294/2330-0698.1824.

CHRISTAKOS, S. *et al.* Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. **Physiological reviews**, v. 96, n. 1, p. 365-408, 2016. doi:10.1152/physrev.00014.2015

COPPEDÈ, F. Risk factors for Down syndrome. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 12, p. 2917-2929, 2016. doi:10.1007/s00204-016-1843-3

CORNEJO, J. Y. R. *et al.* Down syndrome detection based on facial features using a geometric descriptor. **Journal of Medical Imaging**, v. 4, n. 4, p. 044008-044008, 2017. doi:10.1117/1.JMI.4.4.044008

CRUZ, N. V. *et al.* Follow-up study of immune defects in patients with dysmorphic disorders. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 102, n. 5, p. 426-431, 2009. doi: 10.1016/S1081-1206(10)60516-9.

DANKERS, W. *et al.* Vitamin D in autoimmunity: molecular mechanisms and therapeutic potential. **Frontiers in Immunology**, p. 697, 2017. doi:10.3389/fimmu.2016.00697

DE GRAAF, G.; BUCKLEY, F.; SKOTKO, B. G. Estimation of the number of people with Down syndrome in the United States. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 4, p. 439-447, 2017. doi:10.1038/gim.2016.127

DE GRAAF, G, BUCKLEY, F.; SKOTKO, B. G. People living with Down syndrome in the USA: births and population. *Down Syndrome Education International* <https://dsuri.net/us-population-factsheet>. 2019.

DE GRAAF, G.; BUCKLEY, F.; SKOTKO, B. G. Estimation of the number of people with Down syndrome in Europe. **European journal of human genetics**, v. 29, n. 3, p. 402-410, 2021. doi:10.1038/s41431-020-00748-y

DIEUDONNÉ, Y. *et al.* Immune defect in adults with Down syndrome: insights into a complex issue. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 840, 2020. doi:10.3389/fimmu.2020.00840

DINIZ, N. L. F. *et al.* Autism and Down syndrome: early identification and diagnosis. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 80, p. 620-630, 2022. doi: 10.1590/0004-282X-ANP-2021-0156.

D'GAMA, A. M.; WALSH, C. A. Somatic mosaicism and neurodevelopmental disease. **Nature neuroscience**, v. 21, n. 11, p. 1504-1514, 2018. doi:10.1038/s41593-018-0257-3

EL-HAWARY, M. M. *et al.* Assessment of serum level of vitamin D in infants and children with Down syndrome. *Middle East Journal of Medical Genetics*, v. 7, n. 2, p. 104, 2018. doi: 10.4103/MXE.MXE_10_18

FAIZI, M. *et al.* Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 +49A/G polymorphism in Down syndrome children with Hashimoto's thyroiditis. **Biomolecules and Biomedicine**. 2023a. doi:10.17305/bb.2022.7869

FAIZI, M. *et al.* Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22 C1858T gene polymorphism in children with down syndrome and autoimmune thyroid diseases. **Pediatr Med Chir**. v. 45, n. 283. 2023b. doi: 10.4081/pmc.2023.283.

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

FERREIRA, C. E. S. *et al.* Consensus-reference ranges of vitamin D [25 (OH) D] from the Brazilian medical societies. Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine (SBPC/ML) and Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, p. 377-381, 2017.

FRANCESCHI, C. *et al.* Accelerated bio-cognitive aging in Down syndrome: State of the art and possible deceleration strategies. **Aging cell**, v. 18, n. 3, p. e12903, 2019. doi:10.1111/accel.12903

FRASCA, D.; BLOMBERG, B. B. Adipose tissue inflammation induces B cell inflammation and decreases B cell function in aging. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1003, 2017. doi:10.3389/fimmu.2017.01003

FROMMER, L.; KAHALY, G. J. Type 1 diabetes and autoimmune thyroid disease—the genetic link. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, p. 618213, 2021. doi:10.3389/fendo.2021.618213

FRUCTUOSO, M. *et al.* Increased levels of inflammatory plasma markers and obesity risk in a mouse model of Down syndrome. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 114, p. 122-130, 2018. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.021

GARDNER, R. J. M.; AMOR, D. J. **Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling**. 5a ed. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press, 69pp. 2018. doi: 10.1177/003591576205500612

GEROLD, K. D. *et al.* The soluble CTLA-4 splice variant protects from type 1 diabetes and potentiates regulatory T-cell function. **Diabetes**, v. 60, n. 7, p. 1955-1963, 2011. doi:10.2337/db11-0130

GOOTJES, C. *et al.* Functional Impact of Risk Gene Variants on the Autoimmune Responses in Type 1 Diabetes. **Genetic Basis of Tolerance Induction Defects Underlying the Development of Autoimmune Pathologies**, p. 33, 2022. doi:10.3389/fimmu.2022.886736.

GOUDA, N. S.; FAWZY, M. S.; TORAIH, E. A. Impact of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 codon 17 variant and expression on vitiligo risk. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 35, n. 6, p. e23777, 2021. doi: 10.1002/jcla.23777.

HARRISON, S. R. *et al.* Vitamin D, autoimmune disease and rheumatoid arthritis. **Calcified tissue international**, v. 106, p. 58-75, 2020. doi: 10.1007/s00223-019-00577-2.

HÄUSLER, D. *et al.* High dose vitamin D exacerbates central nervous system autoimmunity by raising T-cell excitatory calcium **Brain**, v. 142, n. 9, p. 2737-2755, 2019. doi:10.1093/brain/awz190

HISBIYAH, Y. *et al.* The correlation between vitamin D and levels of IFN- γ , NF- κ B, thyroid antibodies in down syndrome: study in Indonesian children. **Acta Bio Medica: Atenei Parmensis**, v. 93, n. 6, 2022. doi: 10.23750/abm.v93i6.

HOSSEINI, A. *et al.* CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. **International immunopharmacology**, v. 80, p. 106221, 2020. doi:10.1016/j.intimp.2020.106221

HUGGARD, D; DOHERTY, D. G.; MOLLOY, E. J. Immune dysregulation in children with Down syndrome. **Frontiers in pediatrics**, v. 8, p. 73, 2020. doi: 10.3389/fped.2020.00073.

INFANTE, M. *et al.* Influence of vitamin D on islet autoimmunity and beta-cell function in type 1 diabetes. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2185, 2019. doi:10.3390/nu11092185

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

JURY, E. C. *et al.* Abnormal CTLA-4 function in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. **European journal of immunology**, v. 40, n. 2, p. 569-578, 2010. doi:10.1002/eji.200939781

KHALILIAN, S. *et al.* Gene expression profiles of *YAP1*, *TAZ*, *CRB3*, and *VDR* in familial and sporadic multiple sclerosis among an Iranian population. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 7713, 2021. doi:10.1038/s41598-021-87131-z

KUCHARSKA, A. M. *et al.* Expression of *CD152 (CTLA-4)* in children with autoimmune thyroiditis and +49 A/G polymorphism of exon 1 of the CTLA-4 gene. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, n. 5, p. 77-80, 2009.

KUMAR, N.; KAUR, G.; MEHRA, N. Genetic determinants of type 1 diabetes: immune response genes. 2009. doi:10.2217/bmm.09.7

LAIGNIER, M. R. *et al.* Down syndrome in Brazil: occurrence and associated factors. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 22, p. 11954, 2021. doi:10.3390/ijerph182211954

LAMBERT, K. *et al.* Deep immune phenotyping reveals similarities between aging, Down syndrome, and autoimmunity. **Science translational medicine**, v. 14, n. 627, p. eabi4888, 2022. doi:10.1126/scitranslmed.abi4888

LEBEDEV, I. N.; ZHIGALINA, D. I. From contemplation to classification of chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 38, n. 11, p. 2833-2848, 2021. doi:10.1007/s10815-021-02304-z

LEE, K. H. *et al.* Understanding the immunopathogenesis of autoimmune diseases by animal studies using gene modulation: A comprehensive review. **Autoimmunity Reviews**, v. 19, n. 3, p. 102469, 2020. doi: 10.1016/j.autrev.2020.102469.

LEE, S. M. *et al.* The impact of *VDR* expression and regulation in vivo. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 177, p. 36-45, 2018. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.06.002.

LI, T. *et al.* The spontaneous differentiation and chromosome loss in iPSCs of human trisomy 18 syndrome. **Cell death & disease**, v. 8, n. 10, p. e3149-e3149, 2017. doi:10.1038/cddis.2017.565

LINGEL, H.; BRUNNER-WEINZIERL, M. C. *CTLA-4 (CD152): A versatile receptor for immune-based therapy.* In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2019. p. 101298. doi:10.1016/j.smim.2019.101298

LOANE, M. *et al.* Twenty-year trends in the prevalence of Down syndrome and other trisomies in Europe: impact of maternal age and prenatal screening. **European Journal of Human Genetics**, v. 21, n. 1, p. 27-33, 2012. doi: 10.1038/ejhg.2012.94

ŁUCZYŃSKI, W. *et al.* Diminished expression of *ICOS*, *GITR* and *CTLA-4* at the mRNA level in T regulatory cells of children with newly diagnosed type 1 diabetes. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 361-370, 2009.

MACHADO-CONTRERAS, J. R. *et al.* Distribution of *PTPN22* polymorphisms in SLE from western Mexico: correlation with mRNA expression and disease activity. **Clinical and experimental medicine**, v. 16, p. 399-406, 2016. doi: 10.1007/s10238-015-0359-0

MCCOY, R. C. *et al.* Evidence of selection against complex mitotic-origin aneuploidy during preimplantation development. **PLoS genetics**, v. 11, n. 10, p. e1005601, 2015. doi:10.1371/journal.pgen.1005601

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

MEZA-MEZA, M. R. *et al.* Vitamin D Receptor (VDR) Genetic Variants: Relationship of FokI Genotypes with VDR Expression and Clinical Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus Patients. **Genes**, v. 13, n. 11, p. 2016, 2022. doi:10.3390/genes13112016

MONEIM, N. H. A. *et al.* Relative *CTLA-4*, *PTPN-22*, and *interleukin 37* mRNA expressions in patients with lupus nephritis. **Reumatología Clínica**, v. 19, n. 4, p. 180-187, 2023. doi: 10.1016/j.reumae.2023.03.004.

MOORE, F. *et al.* *PTPN2*, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates interferon- γ -induced pancreatic β -cell apoptosis. **Diabetes**, v. 58, n. 6, p. 1283-1291, 2009. doi: 10.2337/db08-1510.

MORRIS, J. K. *et al.* Cytogenetic and epidemiological findings in Down syndrome: England and Wales 1989–2009. **American journal of medical genetics Part A**, v. 158, n. 5, p. 1151-1157, 2012. doi:10.1002/ajmg.a.35248

MORTIMER, G. L.; GILLESPIE, K. M. Early onset of autoimmune diabetes in children with Down syndrome—two separate aetiologies or an immune system pre-programmed for autoimmunity?. **Current diabetes reports**, v. 20, p. 1-9, 2020. doi: 10.1007/s11892-020-01318-8.

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

MUNNS, C. F. *et al.* Global consensus recommendations on prevention and management of nutritional rickets. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 101, n. 2, p. 394-415, 2016. doi: 10.1210/jc.2015-2175.

NASEF, N. A.; MEHTA, S.; FERGUSON, L. R. Susceptibility to chronic inflammation: an update. **Archives of toxicology**, v. 91, p. 1131-1141, 2017. doi: 10.1007/s00204-016-1914-5.

NEWMAN, J. R. B; CONCANNON, P.; YAN, G.E. UBASH3A Interacts with PTPN22 to Regulate IL2 Expression and Risk for Type 1 Diabetes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 8671, 2023. doi: 10.3390/ijms24108671.

O' NEILL, V. *et al.* Vitamin D receptor gene expression and function in a South African population: Ethnicity, vitamin D and Fok I. **PLOS one**, v. 8, n. 6, p. e67663, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0067663

PAPAVASSILIOU, P. *et al.* Mosaicism for trisomy 21: a review. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 167, n. 1, p. 26-39, 2015. doi:10.1002/ajmg.a.36861

PATEL, H. *et al.* Association of *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4)* and *thyroglobulin (TG)* genetic variants with autoimmune hypothyroidism. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0149441, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0149441

PAZ-Y-MIÑO, C. *et al.* Multi-institutional experience of genetic diagnosis in Ecuador: National registry of chromosome alterations and polymorphisms. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 8, n. 2, p. 1–14, 2020. doi: 10.1002/mgg3.1087

PELLESTOR, F.; ANAHORY, T.; HAMAMAH, S. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 1, p. 15–32, 2005. doi: 10.1093/humupd/dmh051

PEPE, G. *et al.* Prospective evaluation of autoimmune and non-autoimmune subclinical hypothyroidism in Down syndrome children. **European Journal of Endocrinology**, v. 182, n. 4, p. 385-392, 2020. doi: 10.1530/EJE-19-0823.

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

PRAKASH, S. K. The impact of somatic mosaicism on bicuspid aortic valve and aortic dissection in Turner Syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics**, v. 181, n. 1, p. 7–12, 2019. doi: 10.1002/ajmg.c.31691

RAMÍREZ-PÉREZ, S. *et al.* *PTPN22* +788 G>A (R263Q) polymorphism is associated with mRNA expression but it is not a susceptibility marker for rheumatoid arthritis patients from Western Mexico. **Biochemical genetics**, v. 57, p. 455-465, 2019. doi: 10.1007/s10528-019-09902-8.

ROMÁN-FERNÁNDEZ, I. V. *et al.* Altered *PTPN22* and *IL10* mRNA Expression Is Associated with Disease Activity and Renal Involvement in Systemic Lupus Erythematosus. **Diagnostics**, v. 12, n. 11, p. 2859, 2022. doi:10.3390/diagnostics12112859

ROSEN, Y. *et al.* Vitamin D and autoimmunity. **Scandinavian journal of rheumatology**, v. 45, n. 6, p. 439-447, 2016. doi:10.3109/03009742.2016.1151072

RUIZ-BALLESTEROS, A. I. *et al.* Association of vitamin D metabolism gene polymorphisms with autoimmunity: evidence in population genetic studies. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 24, p. 9626, 2020. doi:10.3390/ijms21249626

SADEGHI, H. *et al.* *VDR* and *CYP24A1* Expression Analysis in Iranian Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. **Cell Journal (Yakhteh)**, v. 19, n. 3, p. 352, 2017. doi: 10.22074/cellj.2017.4192.

SAMUELS, H. *et al.* Autoimmune Disease Classification Based on PubMed Text Mining. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 15, p. 4345, 2022. doi:10.3390/jcm11154345

SANTOS, L. O. *et al.* *CTLA-4* gene polymorphisms are associated with obesity in Turner Syndrome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, p. 727-734, 2018. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2017-0312

SANTOS, L. O. *et al.* Vitamin D receptor (*VDR*) gene polymorphisms and expression profile influence upon the immunological imbalance in Turner syndrome. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 43, p. 505-513, 2020. doi:10.1007/s40618-019-01135-1

SHAW, S. *et al.* Gene dosage change of *TPTE* and *BAGE2* and breakpoint analysis in Robertsonian Down syndrome. **Journal of human genetics**, v. 53, p. 136-143, 2008. doi:10.1007/s10038-007-0229-z

STAGI, S. *et al.* Determinants of vitamin d levels in children and adolescents with down syndrome. **International journal of endocrinology**, v. 2015, 2015. doi: 10.1155/2015/896758

STANFORD, S. M.; BOTTINI, N. PTPN22: the archetypal non-HLA autoimmunity gene. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 10, n. 10, p. 602-611, 2014. doi:10.1038/nrrheum.2014.109

SZELIGA, K. *et al.* Subclinical Hypothyroidism as the Most Common Thyroid Dysfunction Status in Children with Down's Syndrome. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 782865, 2022. doi: 10.3389/fendo.2021

TAMASAUSKIENE, L. *et al.* Vitamin D receptor gene polymorphisms in atopy. **Immunity, Inflammation and Disease**, v. 9, n. 4, p. 1153-1159, 2021. doi:10.1002/iid3.487

TIZAOUI, K. *et al.* The role of *PTPN22* in the pathogenesis of autoimmune diseases: A comprehensive review. In: **Seminars in arthritis and rheumatism**. WB Saunders, 2021. p. 513-522. doi:10.1016/j.semarthrit.2021.03.004

TIZAOUI, K. *et al.* Genetic polymorphism of *PTPN22* in autoimmune diseases: a comprehensive review. **Medicina**, v. 58, n. 8, p. 1034, 2022. doi:10.3390/medicina58081034

TRIANOS, C. *et al.* Prognostic significance of *vitamin D receptor (VDR)* gene polymorphisms in liver cirrhosis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 14065, 2018. doi:10.1038/s41598-018-32482-3

TÜREMEN, E. E. *et al.* Endothelial dysfunction and low grade chronic inflammation in subclinical hypothyroidism due to autoimmune thyroiditis. **Endocrine journal**, v. 58, n. 5, p. 349-354, 2011.

VALK, E. R. C. E, Schneider H. CTLA-4 trafficking and surface expression (2008) *Trends Immunol* 29(6):272-9.

VAN COILLIE, S.; WIERNICKI, B.; XU, J. Molecular and cellular functions of CTLA-4. **Regulation of Cancer Immune Checkpoints: Molecular and Cellular Mechanisms and Therapy**, p. 7-32, 2020. doi:10.1007/978-981-15-3266-5_2

VERMA, N. *et al.* Immune deficiency and autoimmunity in patients with *CTLA-4 (CD152)* mutations. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 190, n. 1, p. 1-7, 2017. doi:10.1111/cei.12997

VERSTEGEN, R. H. J; Chang, K. J. J; Kusters, M. A. A. Clinical implications of immune-mediated diseases in children with Down syndrome. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 31, n. 2, p. 117-123, 2019. doi: 10.1111/pai.13133.

VIČIĆ, A. *et al.* Prenatal diagnosis of Down syndrome: A 13-year retrospective study. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 6, p. 731-735, 2017. doi:10.1016/j.tjog.2017.10.004

VIEIRA, I. H.; RODRIGUES, D.; PAIVA, I.. Vitamin D and Autoimmune Thyroid Disease—Cause, Consequence, or a Vicious Cycle?. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2791, 2020. doi: 10.3390/nu12092791.

WEBSTER, A.; SCHUH, M. Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. **Trends in Cell Biology**, v. 27, n. 1, p. 55- 68, 2017. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.09.002

WEST, J. D.; EVERETT, C. A. Preimplantation chromosomal mosaics, chimaeras and confined placental mosaicism. **Reproduction & Fertility**, v. 3, n. 2, p. R66, 2022. doi:10.1530/RAF-21-0095

WILCH, E. S.; MORTON, C. C. Historical and clinical perspectives on chromosomal translocations. **Chromosome translocation**, p. 1-14, 2018. doi:10.1007/978-981-13-0593-1_1

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

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

ZAHIRI, L. *et al.* Association Between *IL-17A*, *FOXP3*, and *CTLA4* Genes Expression and Severity of Lupus Nephritis. **Iranian Journal of Kidney Diseases**, v. 16, n. 1, 2022. doi: 10.52547/ijkd.6537

ZAKI, M. E. *et al.* Coenzyme Q10 and pro-inflammatory markers in children with Down syndrome: clinical and biochemical aspects☆. **Jornal de Pediatria**, v. 93, p. 100-104, 2017. doi:10.1016/j.jpmed.2016.04.012

ZENATA, O.; VRZAL, R. Fine tuning of vitamin D receptor (VDR) activity by post-transcriptional and post-translational modifications. **Oncotarget**, v. 8, n. 21, p. 35390, 2017. doi:10.18632/oncotarget.15697

ZUBILLAGA, P. *et al.* Effect of vitamin D and calcium supplementation on bone turnover in institutionalized adults with Down's Syndrome. *European journal of clinical nutrition*, v. 60, n. 5, p. 605-609, 2006. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602357

ZWERINA, K. *et al.* Vitamin D receptor regulates TNF-mediated arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 70, n. 6, p. 1122-1129, 2011. doi: 10.1136/ard.2010.142331

GeneCards, The Human Gene Database, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTPN22> (27 de fevereiro de 2023).

MedLinePlus, Trusted Health Information For You <https://medlineplus.gov/genetics/condition/turner-syndrome/> (27 de fevereiro de 2023).

ANEXOS

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de polimorfismos e expressão de genes relacionados às doenças autoimunes/inflamatórias em pacientes com síndrome de Down

Pesquisador: JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58177422.2.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.482.843

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

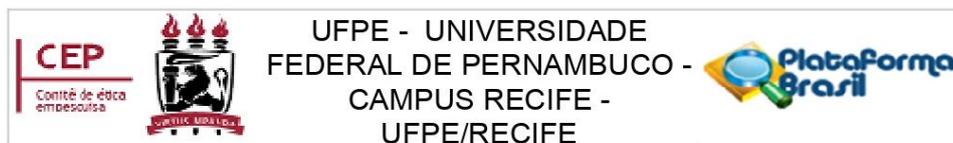
OBJETIVO GERAL

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

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.482.843

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

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

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

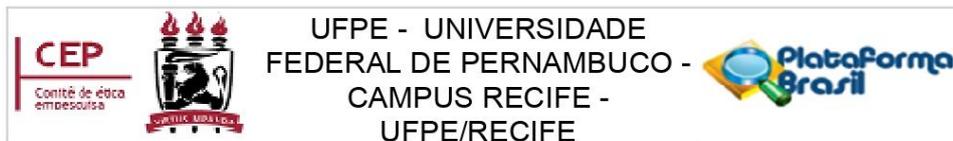
O tema é importante. O estudo será do tipo transversal, analítico com comparação de grupos (caso – controle) com amostras independentes constando de dados nominais (genótipo). Nesse estudo serão analisados 200 pacientes clinicamente diagnosticados com a síndrome de Down provenientes de ONGs (foi anexada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

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

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

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

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.482.843

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

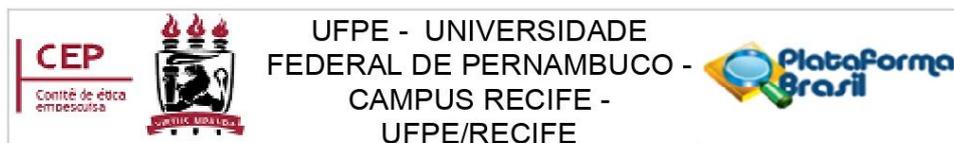
As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação",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

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

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

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

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



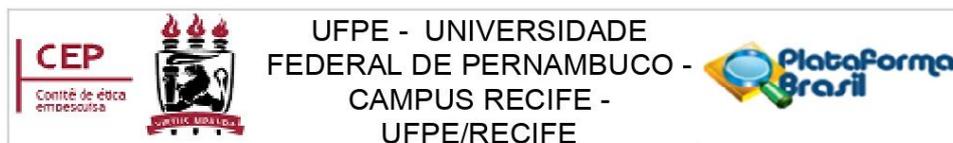
Continuação do Parecer: 5.482.843

Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1671322.pdf	21/06/2022 17:57:55		Aceito
Outros	Carta_anuencia_LIKA.pdf	21/06/2022 17:57:19	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	Carta_anuencia_GURI.jpg	21/06/2022 17:56:44	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.docx	21/06/2022 17:53:41	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEMenor7a18.doc	21/06/2022 17:51:20	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEResponsaveismenores.doc	21/06/2022 17:51:04	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEMaiores18.doc	21/06/2022 17:50:47	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_JulianaVieira.docx	21/06/2022 17:49:58	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	DISPENSA_CARTADEANUENCIA.docx	26/04/2022 13:44:55	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	Termo_confidencialidade.docx	26/04/2022 13:44:27	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	declaracao_20193009811.pdf	25/04/2022 21:23:34	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito
Outros	CurriculoLattes_NeideSantos.pdf	25/04/2022 21:22:50	JULIANA VIEIRA DE BARROS ARCOVERDE	Aceito

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.482.843

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 22 de Junho de 2022

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

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

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



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

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

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

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

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

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

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

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

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

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

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

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

Assinatura do pesquisador (a)

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DO/A VOLUNTÁRIO

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

Local e data _____

Assinatura do (da) responsável: _____

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **Avaliação de polimorfismos e expressão de genes relacionados à doenças autoimunes/inflamatórias em pacientes com síndrome de Down**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Juliana Vieira de Barros Arcoverde, Rua Frei Gaspar da Madre de Deus, 58, UR 06 Ibura, CEP: 54230-181. Telefone: (81) 9.98793064. E-mail: juhdebarros@hotmail.com.

Também participam também desta pesquisa os pesquisadores: Carla Fernandes dos Santos. Telefone (81) 991293439. E-mail: carlafernandes_08@hotmail.com. Sob a orientação de Neide Santos. Telefone: (81) 9991455405. E-mail: santos_neide@yahoo.com.br.

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização 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.

O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

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

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

compressas mornas podem ser colocadas no local para acelerar o desaparecimento do hematoma. Se houver qualquer outra reação ou dor no local, o colaborador será encaminhado ao médico.

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

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

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, o (a) senhor (a) 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: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

(assinatura do pesquisador)

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 **Avaliação de polimorfismos e expressão de genes relacionados à doenças autoimunes/inflamatórias em pacientes com síndrome de Down** como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes 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: _____

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO D - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE 7 A 18 ANOS



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

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 7 a 18 ANOS)

OBS: Este Termo de Assentimento para o menor de 7 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: **Avaliação de polimorfismos e expressão de genes relacionados à doenças autoimunes/inflamatórias em pacientes com síndrome de Down**. Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Juliana Vieira de Barros Arcoverde, Rua Frei Gaspar da Madre de Deus, 58, UR 06 Ibura, CEP: 54230-181. Telefone: (81) 9.98793064. E-mail: juhdebarros@hotmail.com. Também participam também desta pesquisa os pesquisadores: Carla Fernandes dos Santos. Telefone (81) 991293439. E-mail: carlafernandes_08@hotmail.com. Sob a orientação de Neide Santos. Telefone: (81) 9991455405. E-mail: santos_neide@yahoo.com.br.

Você será esclarecido (a) sobre qualquer dúvida com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via deste termo lhe será entregue para que seus pais ou responsável possam guarda-la e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Você 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, um responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

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

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

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

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

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: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

Assinatura do pesquisador (a)

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

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **Avaliação de polimorfismos e expressão de genes relacionados à doenças autoimunes/inflamatórias em pacientes com síndrome de Down**, 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: