

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

ADRIANA VALÉRIA SALES BISPO

**SÍNDROME DE TURNER: ESTUDO CROMOSSÔMICO E ANÁLISE DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO METABOLISMO DO FOLATO COMO
FATORES DE RISCO NA NÃO-DISJUNÇÃO**

**RECIFE - PE
2011**

ADRIANA VALÉRIA SALES BISPO

**SÍNDROME DE TURNER: ESTUDO CROMOSSÔMICO E ANÁLISE DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO METABOLISMO DO FOLATO
COMO FATORES DE RISCO NA NÃO-DISJUNÇÃO**

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Neide Santos

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Tereza Cartaxo Muniz

Recife, PE
2011

Bispo, Adriana Valéria Sales

Síndrome de Turner: estudo cromossômico e análise de polimorfismos genéticos do metabolismo do folato como fatores de risco na não-disjunção / Adriana Valéria Sales Bispo. – Recife: O Autor, 2011.

84 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos

Co-Orientadora: Maria Tereza Cartaxo Muniz

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Genética, 2011.

Inclui bibliografia e anexos

1. Doenças hereditárias 2. Genética médica 3. Turner, Síndrome de 4. Polimorfismo (Genética) I. Título.

616.042

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-096

ADRIANA VALÉRIA SALES BISPO

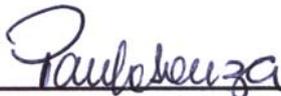
**SÍNDROME DE TURNER: ESTUDO CROMOSSÔMICO E ANÁLISE DE
POLIMORFISMOS GENÉTICOS DO METABOLISMO DO FOLATO
COMO FATORES DE RISCO NA NÃO-DISJUNÇÃO**

APROVADO EM 02/03/2011

BANCA EXAMINADORA:



Presidente: Profª. Drª. Neide Santos
Depto. de Genética/CCB/UFPE

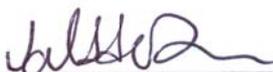


1º Examinador: Prof. Dr. Paulo R. Eleutério de Souza
Depto. de Biologia/UFRPE



2º Examinador: Prof. Dr. Marcos André C. Bezerra
Depto. de Biofísica/UFPE

3º Examinador: Profª. Drª Paula Sandrin Garcia
Depto. de Genética/CCB/UFPE



Prof. Valdir Balbino
Coordenador da Pós-graduação em Genética/UFPE

Recife, PE
2011

Para minha querida e eternamente amada, tia Cláudia (*in memoriam*), por ter proporcionado a base de minha educação, ensinando-me a conquistar tudo que eu sou. Todas as minhas vitórias são dedicadas a ti.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que dá sentido a tudo em minha vida e me fortalece para enfrentar todos os obstáculos do caminho.

À minha querida família, pelo apoio e amor incondicionais. Minha amada mãe Elza, que não me deu a luz, mas me criou como sua filhinha preferida. Ao meu amado pai, pela proteção, amor e as várias gargalhadas que nunca me deixaram entristecer até nos momentos mais tristes. Minha mãedrastra Leninha pelo carinho e consideração. Em especial a minha amada mãe Valéria, que está sempre lutando pela minha felicidade, amo você!

Aos meus queridos irmãos Nando, Natália, Leo e Lilian, amo vocês por tudo de maravilhoso que compartilhamos todos esses anos juntos! Com todo carinho, ao menino mais lindo do mundo, meu sobrinho Ryzinho, a quem tia “Nana” ama de todo o coração! E minha sobrinha Lara que em pouco tempo estará conosco.

Ao meu querido e amado San, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio, carinho e companheirismo incondicional. Obrigada por tudo de bom que você proporcionou na minha vida!

À minha amiga e também orientadora Neide, quem admiro pelo esforço, dedicação e carinho e por ter dado sentido ao meu curso, mostrando um caminho a seguir quando eu quis desistir. Muito obrigada, você vai estar sempre em meu coração!

À minha grande amiga Polly e sua linda família, Dr. Dedé e Juju, pelo imenso carinho e apoio incondicional, por estarem presentes quando eu mais precisei, eterna gratidão a vocês.

Aos meus queridos e novos amigos do mestrado, por um ano incrível e cheio de aventuras, especialmente a minha querida e amada do meu coração Nanda, pela verdadeira amizade, e ser esta pessoa tão importante na minha vida, sei que estaremos sempre juntas gatona.

As minhas amadas e saudosas amigas da faculdade, pelo carinho, apoio e amizade. Sou muito grata pela minha bela turminha Zoide, Visnu, Diana, Gleicinha, Lígia e Érica. Foi maravilhoso conviver com vocês, é um belo presente que todos vocês permaneçam em minha vida como verdadeiras amizades.

Ao professor e amigo Paulo Santos, pelo suporte e atenção nas questões estatísticas.

As professoras do laboratório de genética e citogenética animal, Vilma Loreto e Maria José e a todos os amigos que fazem ou fizeram parte do nosso querido laboratório (o melhor de todos!!), Xurupita, Zaque, Marcolino, Luiz Camões, Cir, Kalyne, Bené, Dani, Jeff, Amanda, Jéssica, Catarina, Andrezza, Dyogo, Sarah, pela amizade e momentos de alegria e muita diversão, em especial as minhas belas amigas Merizinha, Helenzinha, Carolyne, Bela, Ituzinha, pela amizade verdadeira que nós construímos. Obrigada por transformar meu trabalho em um ambiente tão feliz e acolhedor. Adoro vocês todos!!!

Ao grupo de Citogenética Humana, Myrella, Suelen e Luana, pelo esforço, carinho e dedicação em realizar nosso trabalho e pela amizade que construímos juntas.

À equipe dos laboratórios de Citogenética e de Biologia Molecular do CEONHPE, em especial a minha co-orientadora a Prof^a Tereza Cartaxo pela atenção, carinho e ajuda que foram fundamentais para a elaboração da biologia molecular e aos novos amigos conquistados, Deta, Thalita, Nara, Dayse, Maíra e sua Bia, Dyego, Leo, Felipe, Helker, Bethânia Eliane, Karina, Nel e Will. Obrigada pelo apoio e colaboração, adorei conhecer todos vocês!!

Às Dras. Gabriela Ferraz e Andréa Rezende do Serviço de Genética Médica do IMIP e a equipe da Endocrinologia Pediátrica do HC pela atenção e ajuda no encaminhamento das pacientes para a realização das coletas.

Às pacientes e responsáveis que autorizaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

A FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio financeiro ao projeto.

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e
de repente você estará fazendo o impossível”*

São Francisco de Assis

RESUMO

Folatos são vitaminas do complexo B requeridas em processos biossintéticos e epigenéticos. Disfunções no seu metabolismo resultam em quebras cromossômicas, alterações na metilação do DNA e aneuploidia. Polimorfismos genéticos que alteram enzimas envolvidas neste metabolismo são considerados uma possível causa de não-disjunção cromossômica por hipometilação. A Síndrome de Turner (ST) é um importante modelo de investigação para os polimorfismos dos genes na rota do folato e a não-disjunção cromossômica somática devido a alta frequência de mosaicismos nestas pacientes. Neste trabalho, reportamos a prevalência das alterações cromossômicas e o seu potencial efeito fenotípico em pacientes com ST. Também investigamos uma possível associação entre os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MS* e *TS*, e o risco de não-disjunção somática na ST. Foram cariotipadas 110 pacientes, das quais 53 apresentaram alterações cromossômicas compatíveis com a ST. O cariótipo 45,X ocorreu em 56,6% dos casos. Clinicamente, as pacientes com ST apresentaram fenótipos distintos, entretanto estes distúrbios clínicos estavam de acordo com os relatos da literatura. A análise citogenética exerceu um importante papel no prognóstico e no direcionamento do tratamento adequado. As frequências dos alelos mutantes *MTHFR* 1298C, *MS* 2756G e repetição *em tandem* *TS* 2R não foram significativamente diferentes entre pacientes ST e controles. Contudo, no *MTHFR* 677T o alelo mutante apresentou-se mais frequente nos controles, reforçando assim a ausência de associação destas mutações com o risco da não-disjunção. A análise das frequências genotípicas mostrou que apenas o gene *MS* exibiu uma frequência maior do genótipo mutante recessivo GG nas portadoras da ST, porém esta diferença não foi associada a um aumento significativo no risco. No presente estudo não foi possível estabelecer uma associação entre os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MS* e *TS*, e o risco na não-disjunção somática na ST, demonstrando que as mutações dos genes envolvidos na rota do folato podem não representar uma importante contribuição para os mecanismos de geração das aneuploidias.

Palavras-chave: Alterações cromossômicas; aneuploidia; hipometilação; genes *MTHFR*, *MS* e *TS*; síndrome de Turner.

ABSTRACT

Folates are B-complex vitamins required in biosynthetic and epigenetic processes. Dysfunctions in their metabolism result in chromosomal breakage, aberrant DNA methylation and aneuploidy. Genetic polymorphisms that alter enzymes involved in this metabolism have been considered a possible cause of chromosome nondisjunction by hypomethylation. Turner syndrome (TS) is an important model for investigation of gene polymorphisms on the folate pathway and somatic chromosome nondisjunction due to high frequency of mosaicism in these patients. This work reports the prevalence of chromosomal abnormalities and their potential phenotypic in TS patients. We also investigated a possible association between polymorphisms of genes *MTHFR*, *MS* and *TS* and the risk of somatic nondisjunction in TS. 110 patients were karyotyped, of which 53 showed chromosomal abnormalities consistent with ST. The karyotype 45,X occurred in 56,6% of cases. Clinically, TS patients showed different phenotypes, although these clinical disorders were in agreement with the literature reports. Cytogenetic analysis played an important role in prognosis and in directing appropriate treatment. The frequencies of mutant alleles *MTHFR* 1298C, *MS* 2756G and tandem repeat *TS* 2R were not significantly different between TS patients and controls. However, the mutant allele *MTHFR* 677T was more frequent in controls, enhancing the lack of association of these mutations with the risk of nondisjunction. Analysis of genotype frequencies showed that only the *MS* gene exhibited a higher frequency of genotype with recessive mutant GG in the TS patients, however this difference was not associated with a significant increase in risk. In this study, it was not possible to establish an association between polymorphisms of genes *MTHFR*, *MS* and *TS*, and the risk to somatic nondisjunction in TS, demonstrating that mutations of genes involved in folate pathway may not represent an important contribution to the mechanisms generating aneuploidy.

Keywords: Chromosomal abnormalities, aneuploidy, genes *MTHFR*, *MS* and *TS*, Turner syndrome.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação da meiose feminina. a. Meiose normal; b. Não-disjunção do cromossomo inteiro, levando a presença de ambos os homólogos na metáfase II; c. Pré-divisão das cromátides-irmãs, resultando na presença de uma cromátide livre na metáfase II; d. Metáfase II de ovócito humano, mostrando cromátide livre indicada pela seta.....	4
Figura 2. Metabolismo do folato e vias relacionadas. Figura simplificada ilustrando o metabolismo interconectado do folato com suas principais enzimas, inseridas nas elipses, e os substratos, nos retângulos. RFC, carreador de folato reduzido; hFR, receptor de folato de humano; MTHFR, metilenotetrahidrofolato redutase; SHMT, serinahidroximetil transferase; DHFR, dihidrofolato redutase; THF, tetrahidrofolato; dUMP, deoxiuridina monofosfato; dTMP deoxitimidina monofosfato; DHF, dihidrofolato; GAR, glicinamida ribonucleotídeo; AICAR, aminoimidazol carboxamida ribonucleotídeo; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; X, vários substratos para metilação.....	11
Figura 3. Esquema estrutural do gene <i>MTHFR</i> e localização das mutações que provocam diminuição da atividade da enzima.....	13
Figura 4. Principais regiões dos cromossomos sexuais X e Y. Regiões pseudoautossômicas (PAR1 e PAR2); <i>SHOX</i> , gene homeobox da baixa estatura (cromossomo X); <i>SHOXY</i> , gene homeobox da baixa estatura (cromossomo Y); <i>SRY</i> , locus de determinação testicular.....	22
Figura 5. Percentual das alterações cromossômicas nas pacientes com Síndrome de Turner.....	33
Figura 6. Frequência de baixa estatura, atraso puberal e cardiopatia de acordo com o cariótipo.....	38
Figura 7. Frequência dos sinais dismórficos de acordo com o cariótipo.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização citogenética das pacientes com alterações não associadas a ST.....	32
Tabela 2. Dados clínicos das pacientes diagnosticadas com ST e cariótipos 45,X.....	34
Tabela 3. Dados clínicos das pacientes diagnosticadas com ST e cariótipos com alterações estruturais e/ou mosaicismo.....	36
Tabela 4. Números e frequências dos alelos para os genes <i>MTHFR</i> , <i>MS</i> e <i>TS</i> nas pacientes com ST e controles, com destaque para os alelos mutante.....	40
Tabela 5. Distribuição genotípica dos polimorfismos <i>MTHFR</i> C677T, <i>MTHFR</i> A1298C, <i>MS</i> A2756G e as repetições 3R/2R do <i>TS</i>	41
Tabela 6. Interação gene-gene entre os genótipos combinados dos genes <i>MTHFR</i> (C677T e A1298C), <i>MS</i> (A2756G) e <i>TS</i> (3R/2R).....	43
Tabela 7. Interação gene-gene entre os genótipos isolados dos genes <i>MTHFR</i> (C677T e A1298C), <i>MS</i> (A2756G) e <i>TS</i> (3R/2R).....	44
Tabela 8. Comparação entre o número de alelos 677T, 1298C, 2756G e 2R por indivíduo nas pacientes e controles.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

5-aza-C	5-azacitidina
5,10-metilTHF	5,10-metiltetrahidrofolato
5'-UTR	5'-não traduzida
AICAR	Aminoimidazol carboxamida ribonucleotideo
ASA	<i>Allele Specific Amplification</i> / Amplificação alelo específica
BEI	Baixa estatura idiopática
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CH ₃	Metil
CpG	Dinucleotídeos citosina-guanina
Cyp 46	Cytochrome P/ Citocromo P 46
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato redutase
DL	Desequilíbrio de ligação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTs	DNA metil-transferases
DNMT3B	DNA metil-transferase 3B
dNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
dUMP	Deoxiuridina monofosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
FOP 1	Falência ovariana prematura 1
FOP 2	Falência ovariana prematura 2
GAR	Glicinamida ribonucleotídeo
GB	Gonadoblastoma
GH	Hormônio do crescimento
hCG	Gonadotrofina coriônica
hFR	Receptor de folato de humano
HUOC	Hospital Universitário Osvaldo Cruz
IC	Intervalo de confiança
ICF	Imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
ISCN	Sistema internacional para nomenclatura de citogenética humana
KCl	Cloreto de potássio
Md	Mediana
MeCP2	Proteína de ligação metil-CpG 2
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio

MS	Metionina sintase
mRNA	RNA mensageiro
MTHFR	metilenotetrahidrofolato redutase
MTR	5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase/ Metionina sintase
MTRR	Metionina sintase redutase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
ND	Não-disjunção
OR	Odds Ratio
PAR1	Região Pseudoautosômica Primária
PAR2	Região Pseudoautosômica Secundária
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em cadeia da Polimerase
PD	Pré-divisão
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> / Polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição
RFC-1	Carreador de folato reduzido
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucléico
SAH	S-adenosilhomocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SF-1	<i>Splicing factor 1</i>
SHMT	Serina-hidroximetil transferase
SHOX	<i>Short stature homeobox gene</i> / Gene homeobox da baixa estatura
SHOXY	Gene homeobox da baixa estatura no cromossomo Y
SISNEP	Sistema nacional de informação sobre ética em pesquisa envolvendo seres humanos
SOX9	<i>SRY (sex determining region Y)-box 9</i>
SD	Síndrome de Down
ST	Síndrome de Turner
SRY	<i>Sex-determining Region Y</i> (Locus de determinação sexual)
THF	Tetrahidrofolato
TS	Timidilato sintase
TSER	<i>Thymidylate synthase in enhancer region</i> (Região acentuadora da Timidilato sintase)
TYMS	Timidilato sintase
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
χ^2	Qui-quadrado
XIST	<i>X-inactive specific transcript</i> / Transcrito específico do X inativo
X ^M	Cromossomo X materno
X ^P	Cromossomo X paterno

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Aneuploidia: Aspectos Gerais e Mecanismos de Origem	3
2.2 Metilação do DNA e não-disjunção	7
2.3 Metabolismo do Folato	9
2.3.1 Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR)	12
2.3.2 Metionina sintase (MS)	14
2.3.3 Timidilato sintase (TS ou TYMS)	15
2.4 Aneuploidias e Metabolismo do Folato	16
2.5 Síndrome de Turner	18
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Desenho do estudo	25
4.2 Pacientes	25
4.3 Estratégia de seleção do controle	26
4.4 Cultura de Linfócitos	26
4.5 Bandeamento G	26
4.6 Biologia Molecular	27
4.6.1 Extração de DNA	27
4.6.2 Determinação dos polimorfismos MTHFR C677T	27
4.6.3 Determinação dos polimorfismos MTHFR A1298C	28
4.6.4 Determinação do polimorfismo MS A2756G	29
4.6.5 Determinação do polimorfismo para TS	30
4.6.6 Processamento e análise dos dados	30
4.7 Critérios Éticos	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Estudos citogenéticos e associação fenotípica	32
5.2 Metabolismo do folato e o risco na não-disjunção	39
5.2.1 Frequências alélicas	39
5.2.2 Polimorfismo no gene MTHFR e o risco na não-disjunção	40
5.2.3 Polimorfismo no gene MS e o risco na não-disjunção	42

5.2.4 Polimorfismo no gene <i>TS</i> e o risco na não-disjunção	42
5.2.5 Interação gene-gene e o risco na não-disjunção	42
6. DISCUSSÃO	46
6.1 Estudo citogenético e associação fenotípica	46
6.2 Metabolismo do folato e o risco na não-disjunção.....	51
7. CONCLUSÕES	57
8. REFERÊNCIAS	58
9. MEMORIAL	70
APÊNDICES	71
APÊNDICE A – Dados clínicos e citogenéticos das pacientes normais.	72
APÊNDICE B - Cariótipos observados no presente estudo.	74
APÊNDICE C - Fotografias dos produtos da PCR em géis de agarose.	78
ANEXOS	80
ANEXO A - Parecer do comitê de ética e pesquisa em seres humanos do Instituto de Medicina Integral – IMIP.	80
ANEXO B - Parecer do comitê de ética e pesquisa de ética e pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE.	82
ANEXO C - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido.	83

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Aneuploidia: Aspectos Gerais e Mecanismos de Origem	3
2.2 Metilação do DNA e não-disjunção	7
2.3 Metabolismo do Folato	9
2.3.1 Metilenotetrahidrofolato Redutase (MTHFR)	12
2.3.2 Metionina sintase (MS)	14
2.3.3 Timidilato sintase (TS ou TYMS)	15
2.4 Aneuploidias e Metabolismo do Folato	16
2.5 Síndrome de Turner	18
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral	24
3.2 Objetivos Específicos	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 Desenho do estudo	25
4.2 Pacientes	25
4.3 Estratégia de seleção do controle	26
4.4 Cultura de Linfócitos	26
4.5 Bandeamento G	26
4.6 Biologia Molecular	27
4.6.1 Extração de DNA	27
4.6.2 Determinação dos polimorfismos MTHFR C677T	27
4.6.3 Determinação dos polimorfismos MTHFR A1298C	28
4.6.4 Determinação do polimorfismo MS A2756G	29
4.6.5 Determinação do polimorfismo para TS	30
4.6.6 Processamento e análise dos dados	30
4.7 Critérios Éticos	31
5. RESULTADOS	32
5.1 Estudos citogenéticos e associação fenotípica	32
5.2 Metabolismo do folato e o risco na não-disjunção	39
5.2.1 Frequências alélicas	39
5.2.2 Polimorfismo no gene MTHFR e o risco na não-disjunção	40
5.2.3 Polimorfismo no gene MS e o risco na não-disjunção	42

5.2.4 Polimorfismo no gene <i>TS</i> e o risco na não-disjunção	42
5.2.5 Interação gene-gene e o risco na não-disjunção	42
6. DISCUSSÃO	46
6.1 Estudo citogenético e associação fenotípica	46
6.2 Metabolismo do folato e o risco na não-disjunção.....	51
7. CONCLUSÕES	57
8. REFERÊNCIAS.....	58
9. MEMORIAL	70
APÊNDICES	71
APÊNDICE A – Dados clínicos e citogenéticos das pacientes normais.	72
APÊNDICE B - Cariótipos observados no presente estudo.	74
APÊNDICE C - Fotografias dos produtos da PCR em géis de agarose.	78
ANEXOS	80
ANEXO A - Parecer do comitê de ética e pesquisa em seres humanos do Instituto de Medicina Integral – IMIP.	80
ANEXO B - Parecer do comitê de ética e pesquisa de ética e pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE.	82
ANEXO C - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido.	83

1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios cromossômicos são responsáveis por importantes doenças genéticas, respondendo por uma proporção significativa dos insucessos reprodutivos, malformações congênitas e retardo mental. Em termos clínicos, as aneuploidias são os distúrbios cromossômicos mais comuns e significativos, sendo identificadas em aproximadamente 5% de todas as gestações clinicamente reconhecidas, 0,3% dos nascimentos e aproximadamente 33% de todos os abortamentos espontâneos. Embora o avanço da idade materna seja o principal fator etiológico associado à ocorrência de conceitos aneuplóides, estudos sobre a segregação meiótica têm mostrado que outros fatores também predisõem à não-disjunção cromossômica como a degradação das coesinas, padrões alterados de recombinação cromossômica, hipometilação do DNA, metabolismo do folato e certos tipos de polimorfismos.

A Síndrome de Turner (ST) consiste em um dos mais prevalentes distúrbios cromossômicos humanos, afetando aproximadamente 1:2500 nascimentos femininos. Citogeneticamente, esta síndrome é caracterizada pela ausência total ou parcial de um cromossomo sexual. O cariótipo 45,X ocorre em aproximadamente 50% dos casos e o restante apresenta outras alterações estruturais do cromossomo X ou Y e/ou mosaïcismo. O quadro clínico desta síndrome é evidenciado pela baixa estatura e disgenesia gonadal, além de uma variedade de sinais dismórficos. Clinicamente, em contraste com outras síndromes cromossômicas, as pacientes com ST apresentam fenótipos completamente distintos inclusive as 45,X. Uma das explicações para esse fato pode ser a presença de mosaïcismo não detectado. A definição do cariótipo, bem como a relação com os sinais fenotípicos exerce um importante papel no prognóstico dessa síndrome.

Folatos são nutrientes essenciais para processos biossintéticos de um carbono e epigenéticos, sendo requeridos na síntese de nucleotídeos e nas reações de metilação do DNA. Deficiências de folato celular resultam em mutações de ponto, quebras cromossômicas, padrão aberrante de metilação do DNA, recombinação cromossômica alterada e erros de segregação cromossômica. Dessa forma, alterações nas reações ligadas ao metabolismo do folato, ocasionada por fatores

genéticos ou ambientais, podem promover falhas na segregação cromossômica por efeito indireto da metilação do DNA, afetando a estrutura da cromatina.

Com base nestas evidências, James et al. (1999) sugeriram pela primeira vez que alterações no metabolismo do folato, devido a polimorfismos genéticos que alteram as enzimas metabólicas, e hipometilação podem aumentar o risco de não-disjunção cromossômica. Esta publicação estimulou considerável investigação sobre a possível associação do folato na segregação cromossômica e, apesar de muitos estudos nesta área, os resultados são frequentemente conflitantes ou inconclusivos, mantendo a questão não resolvida.

A ST pode ser um importante modelo de investigação para os polimorfismos dos genes da rota do folato e a não-disjunção cromossômica somática devido a alta frequência de mosaicismo nestas pacientes. Até o momento, apenas dois trabalhos avaliaram a influência de polimorfismos do gene *MTHFR*, que codifica uma enzima chave no metabolismo do ácido fólico, na ST e apresentaram resultados conflitantes. Por outro lado, nenhum estudo avaliou a influência de polimorfismos dos genes *MS* e *TS*, também envolvidos no metabolismo do folato, como fator de risco na não-disjunção nesta síndrome.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aneuploidia: aspectos gerais e mecanismos de origem

As alterações cromossômicas determinam uma importante categoria de doenças genéticas e são responsáveis por uma proporção significativa das malformações congênitas, insucessos reprodutivos e retardo mental. Estão classificadas em numéricas ou estruturais, podendo envolver os cromossomos autossômicos, sexuais ou ambos, simultaneamente, e afetam aproximadamente 7,5% de todas as concepções, estando presente em 2% das gestações clinicamente reconhecidas de mulheres com mais de 35 anos e em metade dos abortos espontâneos no primeiro trimestre (ROBINSON et al., 2001; LUETJENS et al., 2002).

As aneuploidias são os tipos mais comuns e clinicamente significativos de distúrbios cromossômicos em humanos, geralmente ocorre o excesso (trissomia) ou a falta (monossomia) de um cromossomo no complemento, sendo identificadas em aproximadamente 5% de todas as gestações clinicamente reconhecidas, 0,3% dos nascimentos e aproximadamente 33% de todos os abortamentos espontâneos. Entre os conceitos que sobrevivem a termo, as aneuploidias constituem a principal causa genética de falhas no desenvolvimento físico e retardo mental (HASSOLD & HUNT, 2001; HASSOLD et al., 2007). Adicionalmente, tem sido especulado que as aneuploidias em tecidos somáticos constituem o mecanismo de condução na tumorigênese, uma vez que 90% dos tumores sólidos são aneuplóides (COMPTON, 2010).

Estudos sobre a etiologia das aneuploidias demonstram dois principais mecanismos de geração: a não-disjunção (ND), definida como a falha dos cromossomos homólogos em segregar corretamente na divisão celular, e a pré-divisão (PD), caracterizada pela separação precoce das cromátides-irmãs durante a meiose I, podendo resultar na segregação conjunta de um cromossomo e uma única cromátide do seu homólogo (Fig. 1) (ANGELL, 1997; PELLESTOR et al., 2004).

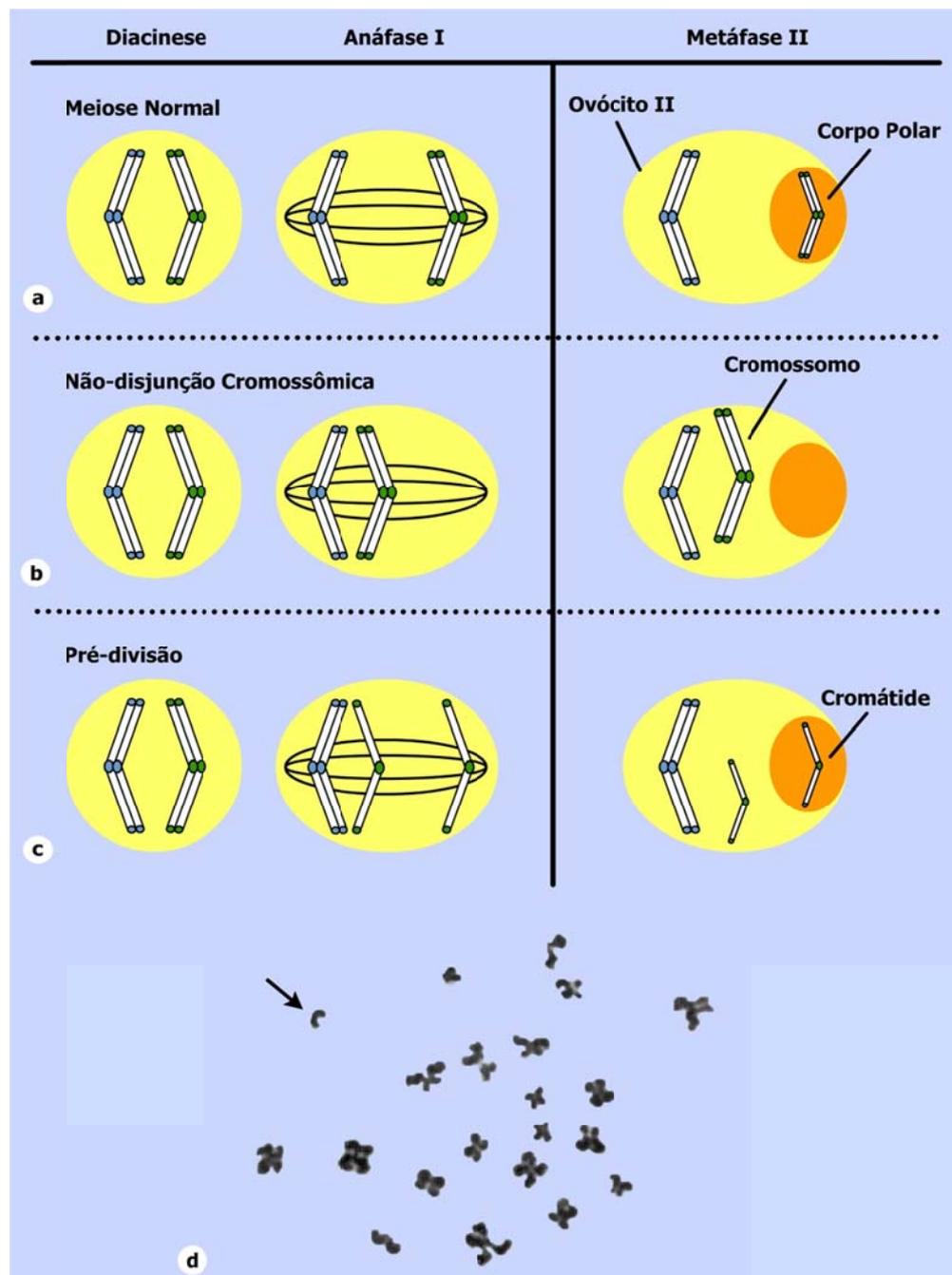


Figura 1. Representação da meiose feminina. **a.** Meiose normal; **b.** Não-disjunção do cromossomo inteiro, levando a presença de ambos os homólogos na metáfase II; **c.** Pré-divisão das cromátides-irmãs, resultando na presença de uma cromátide livre na metáfase II; **d.** Metáfase II de ovócito humano, mostrando a cromátide livre indicada pela seta. (Fonte: adaptado de PELLESTOR et al., 2004).

Análises com marcadores de DNA polimórficos, a fim de determinar a origem parental das trissomias, indicam que a maioria das aneuploidias possui origem materna, ocorrem preferencialmente durante a primeira divisão meiótica e a

proporção de casos maternalmente derivados aumenta progressivamente com a idade (NICOLAIDIS & PETERSEN, 1998; HASSOLD & HUNT, 2001; HASSOLD et al., 2007).

O avanço da idade materna é o principal fator etiológico que modula o risco das aneuploidias humanas. A dimensão desse efeito é evidenciada em mulheres com mais de 40 anos, as quais apresentam trissomias em 35% das gestações clinicamente reconhecidas, enquanto nas mulheres com até 25 anos de idade, essa frequência é de apenas 2% (PELLESTOR et al., 2004; HASSOLD & HUNT, 2009). Uma vez que o ovócito permanece na prófase I por anos, anormalidades surgindo neste estágio parecem ser as candidatas mais óbvias para a gênese deste efeito. No entanto, diversas evidências demonstram que a natureza dessa relação é multifatorial e no contexto geral ocorre uma gradual degradação na integridade do aparato meiótico com o aumento da idade materna predispondo a erros na gametogênese feminina (GARDNER & SUTHERLAND, 2004; PELLESTOR et al., 2006).

Com o objetivo de elucidar os mecanismos que resultam nos erros de segregação meiótica, análises em ovócitos humanos têm demonstrado que existe uma grande deterioração na qualidade do ovócito associada à idade, estando a base deste fenômeno possivelmente relacionada a um defeito no *checkpoint* do fuso, com a perda ou degradação gradual das coesinas durante a meiose I (PELLESTOR et al., 2004; HASSOLD & HUNT, 2009; VANNESTE et al., 2009). Recentemente foi evidenciado o aumento nas taxas de não-disjunção cromossômica em ovócitos com idade avançada devido ao comprometimento na coesão das cromátides-irmãs correlacionado a reduzidas quantidades da coesina Rec8. A redução da coesão centromérica interrompe a geometria normal que favorece a ligação do cinetócoro aos microtúbulos do fuso, tornando a configuração meiótica propensa a erros (SUBRAMANIAN & BICKEL, 2008; COMPTON, 2010).

Embora diversos trabalhos tenham focado na coesão das cromátides-irmãs, inúmeros modelos baseados em fatores que promovem erros meióticos têm sido sugeridos para explicar a não-disjunção dependente da idade: defeitos na formação do complexo sinaptonêmico (YUAN et al., 2002), alterações na manutenção dos telômeros (KEEFE & LIU, 2009), níveis de acetilação das histonas (AKIYAMA et al., 2006), desequilíbrios hormonais (WARBURTON, 1989), aceleração da maturação

folicular (EICHENLAUB-RITTER & BOLL, 1989), depleção de ovócitos (ZHENG & BYERS, 1992) e redução do suprimento de oxigênio (VAN BLERKOM et al., 1997).

Alterações na recombinação meiótica também constituem um risco para não-disjunção cromossômica. Análises do padrão de herança com alelos polimórficos em conceptos trissômicos, que permitem identificar a localização e número de *crossing overs*, demonstraram que padrões de recombinação aberrantes constituem o segundo fator etiológico mais importante associado às aneuploidias humanas (LAMB et al., 2005; HALL et al., 2006; OLIVER et al., 2008). Frequentemente o efeito é atribuído à falha na recombinação entre os homólogos que resulta em segregação aleatória e, conseqüentemente, em 50% de chance para não-disjunção. Por outro lado, para um grupo de cromossomos, tem se verificado um padrão alterado de recombinação, com a formação de quiasmas muito próximos ou muito distantes do centrômero. Especificamente, redução na recombinação tem sido associada à não-disjunção dos cromossomos 13, 15, 18, 21, 22 e sexuais, e alterações na localização dos quiasmas nas trissomias dos cromossomos 16, 21 e sexuais (BUGGE et al., 1998; THOMAS et al., 2001; HALL et al., 2006; SHERMAN et al., 2006; CHENG et al., 2009).

Diversas abordagens têm utilizado a trissomia do cromossomo 21 como modelo da não-disjunção, que ocorre durante a formação dos ovócitos, para determinar uma possível associação entre recombinação e idade materna. Sherman et al. (2006) demonstraram que a quantidade de trocas meióticas não difere expressivamente em relação a idade. Por outro lado, a proporção de ovócitos na meiose I com os padrões de recombinação suscetíveis na região telomérica foi maior entre mães jovens e diminuiu significativamente no grupo etário mais alto. Estes resultados evidenciam que o grande fator de risco associado a mulheres jovens é a presença de padrões de trocas susceptíveis no ovócito. Em contraste, análises de erros na meiose II revelam que trocas na região pericentromérica ocorrem mais frequentemente no grupo de idade mais avançada. Este padrão de troca poderia comprometer as proteínas envolvidas na coesão centromérica, aumentando a degradação deste importante complexo com o avanço da idade (SHERMAN et al., 2006; OLIVER et al., 2008). Os resultados sumarizados em distintos estudos indicam que existem múltiplos fatores de risco para a não-disjunção, dependentes ou não da idade, que atuam em diferentes momentos do processo da meiose (SUBRAMANIAN & BICKEL, 2008; HASSOLD & HUNT, 2009; COMPTON, 2010).

Outros fatores genéticos e ambientais têm sido sugeridos como responsáveis pela predisposição à não-disjunção, incluindo: irradiação, tabagismo, contraceptivos orais, diabetes materna e fatores intrínsecos como polimorfismos de genes no metabolismo do folato (HASSOLD & HUNT, 2001; PELLESTOR et al., 2004; HASSOLD et al., 2007). James et al. (1999) propuseram que alterações no padrão de metilação do DNA, como resultado de mutação no gene *MTHFR* (metilenotetrahidrofolato redutase) envolvido no metabolismo do folato, aumentam o risco de não-disjunção meiótica em mães de indivíduos portadores da síndrome de Down (SD). Embora os resultados de estudos posteriores ainda permaneçam controversos, a associação entre as variantes do metabolismo do folato e aneuploidias cromossômicas representa uma importante abordagem nas pesquisas das alterações cromossômicas humanas (ANELLO et al., 2004; SMULDERS & STEHOUWER, 2005; COPPEDÈ, 2009; ZHAO et al., 2009).

2.2 Metilação do DNA e não-disjunção

A metilação do DNA é uma marca epigenética herdável que regula a estrutura da cromatina e a expressão gênica em processos como a inativação do cromossomo X, *imprinting*, gametogênese, embriogênese e silenciamento de elementos de DNA repetitivo, estando geralmente associada à repressão transcricional (LI, 2002; GOPALAKRISHNAN et al., 2008). O processo de metilação envolve a adição covalente de um grupo metil (CH_3) na posição 5 da base citosina em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG). Em mamíferos, aproximadamente 4% das citosinas são metiladas e os padrões desta metilação são estabelecidos e mantidos pelas DNA metil-transferases (DNMTs), as quais, são essenciais para a expressão gênica adequada (GOLL & BESTOR, 2005). Em experimentos com animais, a remoção dos genes que codificam as enzimas DNMTs é letal, enquanto em humanos a desregulação dessas enzimas tem sido associada ao desenvolvimento de vários tipos de câncer (ROBERTSON, 2002; RODENHISER & MANN, 2006).

O centrômero é uma importante estrutura cromossômica requerida durante a divisão celular por assegurar a distribuição equitativa dos cromossomos às células-filhas. A estrutura secundária da heterocromatina pericentromérica, nas sequências-

satélites repetitivas, é geralmente metilada e está envolvida na ligação de proteínas ao DNA e na coesão das cromátides-irmãs (NEGLIA et al., 2003). Proteínas de ligação ao DNA metilado, como a MeCP2 (proteína de ligação metil-CpG 2), formam complexos com as histonas desacetilases, as quais se ligam preferencialmente ao DNA pericentromérico, promovendo uma desacetilação local e consequente condensação da cromatina (FUKS et al., 2003; VALINLUCK et al., 2004). Adicionalmente, várias evidências ligando a metilação do DNA com a desacetilação de histonas resultando na condensação da cromatina foram reportadas, dando suporte à possibilidade do padrão de metilação estar ligado as alterações epigenéticas da cromatina, as quais são requeridas para a segregação cromossômica normal (FUKS et al., 2003; WANG et al., 2008).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado a importância da metilação pericentromérica para estabilidade da cromatina e segregação correta dos cromossomos (HOBBS et al., 2000). Por exemplo, uma desordem autossômica recessiva rara, a síndrome ICF (Imunodeficiência, instabilidade Centromérica e anomalias Faciais), exibe profunda instabilidade cromossômica associada à hipometilação centromérica do DNA α -satélite, descondensação da heterocromatina e rearranjos complexos dos cromossomos em estruturas multirradiadas. A origem genética desta síndrome é atribuída a uma mutação no gene que codifica a DNA metil-transferase 3B (*DNMT3B*) e dá suporte a relação causal entre hipometilação do DNA, descondensação pericentromérica e segregação anormal dos cromossomos (EHRLICH, 2002; VALINLUCK et al., 2004; GISSELSSON et al., 2005).

Estudos realizados com 5-azacitidina (5-aza-C), um potente agente desmetilador, proporcionaram evidências adicionais da associação entre hipometilação do DNA e instabilidade cromossômica. Culturas de células tratadas com 5-aza-C apresentaram hipometilação pericentromérica, erros de segregação cromossômica e aneuploidias (LEYTON et al., 1995; MOSIOLEK et al., 2005). Além disso, tem sido evidenciado que as aneuploidias e a instabilidade cromossômica, presentes na maioria dos cânceres humanos, estão diretamente relacionadas à hipometilação do DNA, confirmando que o padrão de metilação do DNA também contribui para a carcinogênese (EHRLICH, 2002; GOPALAKRISHNAN et al., 2008). Juntos, esses dados sugerem que a metilação adequada do DNA pericentromérico é essencial para a organização e segregação cromossômica normal.

O folato desempenha um importante papel na manutenção da metilação do DNA e, assim, na estabilidade estrutural do genoma. O metabolismo do folato é responsável, em uma de suas vias, pela síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador intracelular de grupos metil para as reações de metilação do DNA, proteínas e lipídios. A deficiência de ácido fólico *in vivo* e *in vitro* tem sido associada à hipometilação do DNA (JACOB et al., 1998), quebras na fita de DNA (DUTHIE, 2002), alterações na recombinação cromossômica (MACGREGOR et al., 1997), além de falhas na segregação dos cromossomos (XU et al., 1999). Dessa forma, alterações nas reações ligadas ao metabolismo do folato, ocasionada por fatores genéticos ou ambientais, podem promover falhas na segregação cromossômica por efeito indireto da metilação do DNA, afetando a estrutura da cromatina (HOBBS et al., 2000).

2.3 Metabolismo do folato

O ácido fólico, folato ou ácido pteroilglutâmico faz parte do complexo vitamínico B (vitamina B9), sendo considerado um nutriente essencial para o homem. O termo folato representa todas as formas da vitamina B9, incluindo seus muitos derivados encontrados nos sistemas biológicos. Tais compostos atuam como cofatores em inúmeras reações bioquímicas, devido à sua capacidade de doar ou receber unidades monocarbonadas, envolvendo a biossíntese dos precursores de nucleotídeos (purinas e timidilato), catabolismo de histidina e ácido fórmico, síntese de aminoácidos (serina, metionina e glicina), assim como a metilação de ilhas CpG no DNA (ASSARAF, 2007; KOPPEN et al., 2010).

Naturalmente o ácido fólico é composto por três componentes estruturais, o anel de pteridina, o ácido p-aminobenzóico e o resíduo glutamato (ASSARAF, 2007). Os mamíferos não são capazes de sintetizar ácido fólico “*de novo*” por isso devem obtê-lo pela dieta alimentar ou através da flora bacteriana do intestino, uma vez que a ingestão adequada de folato é vital para a divisão e homeostase celular, e sua deficiência determina sérias desordens funcionais (DUTHIE et al., 2002). Os produtos metabólicos do folato, obtido a partir da dieta, atuam em três principais ciclos: (1) na metilação do DNA, que utiliza o metiltetrahidrofolato na síntese de

metionina, (2) na biossíntese de timidilato, que emprega o mesmo substrato e (3) na síntese de purinas, com o uso do 10-formiltetrahydrofolato (CHOI & MASON, 2002).

Após sua absorção intestinal, o folato é rapidamente reduzido e metilado no fígado para formar 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-metilenoTHF). Subsequentemente, ocorre uma importante reação catalisada pela enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR) que reduz irreversivelmente o 5,10-metilenoTHF a 5-metilTHF, a principal forma circulante de folato no plasma (Fig. 2) (FRISO et al., 2002; ZHAO et al., 2009). Os produtos destas reações são grupos metil utilizados na síntese de metionina, importantes para as reações de metilação, e na biossíntese de nucleotídeos (COPPEDÈ, 2009).

Na etapa subsequente deste metabolismo, a enzima metionina sintase (MS) catalisa a remetilação da homocisteína à metionina, utilizando o 5-metilTHF como doador do radical metil e a vitamina B12 (ou cobalamina) como cofator para esta reação (Fig. 2). A metionina é então adenilada para formar S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador intracelular de grupos metil, utilizado em mais de 100 reações de transmetilação, incluindo a metilação do DNA, RNA, proteínas, neurotransmissores e lipídeos (CHOI & MASON, 2002; NICLOT et al., 2006; COPPEDÈ et al., 2010). A cobalamina se oxida ao longo do tempo e a enzima MS se torna inativa, dessa forma, a enzima metionina sintase redutase (MTRR) é requerida para a regeneração funcional da MS e manutenção de seu estado ativo (COPPEDÈ et al., 2010).

Outra importante função dos derivados metabólicos do folato é a síntese dos precursores de ácidos nucléicos. A timidilato sintase (TS) é uma enzima crítica na biossíntese de nucleotídeos (pirimidinas), convertendo dUMP (deoxiuridina monofosfato) a dTMP (deoxitimidina monofosfato), com a conversão simultânea de 5,10-metilenotetrahydrofolato em dihydrofolato (Fig. 2). Esta enzima desempenha um papel crucial na biossíntese de DNA por ser a única fonte *de novo* de timidilato. Desta forma, a TS é importante para a conservação da integridade gênica e alterações ligadas a esta enzima têm sido associadas com danos cromossômicos (HISHIDA et al., 2003; ULRICH et al., 2005; ZHUANG et al., 2009).

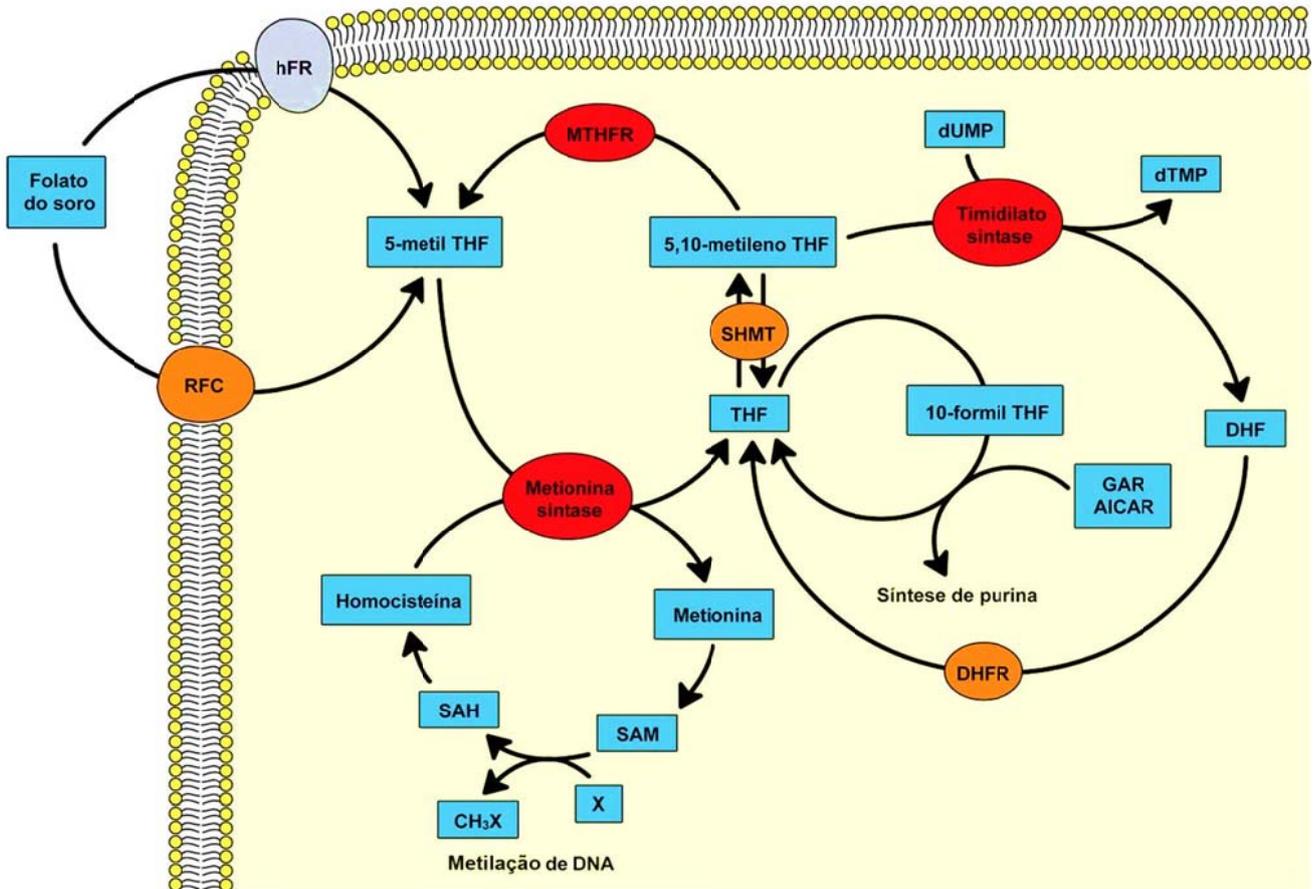


Figura 2. Metabolismo do folato e vias relacionadas. Figura simplificada ilustrando o metabolismo interconectado do folato com suas principais enzimas, inseridas nas elipses, e os substratos, nos retângulos. RFC, carreador de folato reduzido; hFR, receptor de folato de humano; MTHFR, metilenotetrahydrofolato redutase; SHMT, serinahidroxi metil transferase; DHFR, dihidrofolato redutase; THF, tetrahydrofolato; dUMP, deoxiuridina monofosfato; dTMP deoxitimidina monofosfato; DHF, dihidrofolato; GAR, glicinamida ribonucleotídeo; AICAR, aminoimidazol carboxamida ribonucleotídeo; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; X, vários substratos para metilação (Fonte: adaptado de ULRICH et al., 2003).

O ácido fólico é, portanto, essencial para os processos epigenéticos e manutenção da estabilidade genômica. A deficiência de folato celular resulta em padrões alterados de metilação do DNA, mutações de ponto, quebras cromossômicas e aumento na frequência de micronúcleos (FENECH, 2001; COPPEDÈ, 2009). Além disso, alterações no metabolismo do folato, resultantes de polimorfismos funcionais dos genes que codificam as principais enzimas

metabólicas, têm sido associadas com diversas doenças humanas incluindo vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, defeitos no tubo neural e aneuploidias (SKIBOLA et al., 2004; PATTERSON, 2008; TRABETTI, 2008; MOLLOY et al., 2009).

2.3.1 Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)

A metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) é uma enzima chave no metabolismo do ácido fólico, que converte, irreversivelmente, o 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, a forma primária circulante do folato (SHARP & LITTLE, 2004; KOPPEN et al., 2010). A enzima humana consiste em uma flavoproteína encontrada no citoplasma sob a forma de estruturas homodiméricas que possui duas isoformas com peso molecular de 77kDa e 70kDa (GOS & SZPECHT-POTOCKA, 2002).

O gene *MTHFR* está localizado no cromossomo 1 (1p36.3) e apresenta 11 éxons (Fig. 3) (GOYETTE et al., 1998). A região promotora apresenta vários sítios de ligação a fatores de transcrição, mas não apresenta uma sequência TATA-Box (HOMBERGER et al., 2000). A enzima tem dois domínios: o catalítico (N-terminal) de ligação a FAD (flavina adenina dinucleotídeo), NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) e metiltetrahidrofolato, e o domínio regulatório (C-terminal) que interage com SAM (YAMADA et al., 2001; GOS & SZPECHT-POTOCKA, 2002).

Entre as variantes descritas para o gene *MTHFR*, dois polimorfismos têm sido amplamente estudados por reduzirem a atividade da enzima, um na posição 677 (éxon 4), localizado na região amino-terminal do domínio catalítico, constitui uma transição de uma citosina por uma timina, e outro na posição 1298 que se localiza na região carboxi-terminal do domínio regulatório e estabelece a transversão de uma adenina por uma citosina (Fig. 3) (WEISBERG et al., 1998; de JONGE et al., 2009). Outras mutações foram descritas para o gene *MTHFR*, mas a maioria delas é rara ou distribuída em populações isoladas (SIBANI et al., 2003).

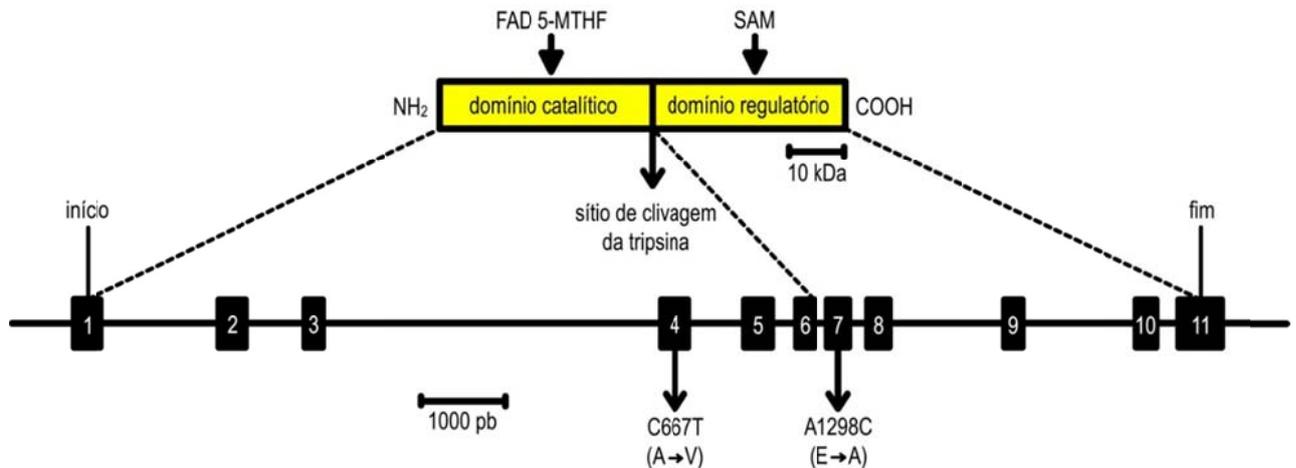


Figura 3. Esquema estrutural do gene *MTHFR* e localização das mutações que provocam diminuição da atividade da enzima (Fonte: adaptado de GOS & SZPECHT-POTOCKA, 2002).

O polimorfismo C677T provoca a substituição de uma alanina por uma valina no aminoácido 222 do domínio catalítico da enzima (SCHWAHN & ROZEN, 2001, CASTRO et al., 2003). Esta substituição altera a estrutura secundária do peptídeo e a interação entre os monômeros, modificando assim o sítio de ligação da FAD, um importante cofator para MTHFR (GOS & SZPECHT-POTOCKA, 2002). Ensaio realizados *in vitro* demonstram que esta variante polimórfica produz uma enzima termolábil e portadores homocigotos para esta mutação possuem uma drástica redução da atividade enzimática (CHIUSOLO et al., 2004).

Indivíduos com o genótipo 677TT produzem uma proteína com 30% de atividade enzimática, enquanto os indivíduos heterocigotos CT apresentam uma enzima com aproximadamente 60% de atividade em relação à encontrada nos indivíduos com genótipo selvagem CC (FROSST et al., 1995). A redução da atividade enzimática, principalmente em indivíduos com o genótipo 677TT, está associada ao aumento dos níveis plasmáticos de homocisteína e a diminuição significativa da metilação do DNA (FRISO et al., 2002).

Na posição 1298, o polimorfismo determina a substituição de um glutamato por uma alanina no aminoácido 429 no domínio regulatório da enzima (HOMBERGER et al., 2000). Esta substituição também gera uma enzima com atividade reduzida, sendo mais pronunciada nos homocigotos (CC) que no estado

heterozigoto (AC) (WEISBERG et al., 1998; CASTRO et al., 2003). Os efeitos da mutação 1298A→C sobre as concentrações plasmáticas de homocisteína permanecem controversos, alguns autores relatam que indivíduos homozigotos para o alelo 1298C parecem não ter níveis séricos mais elevados de homocisteína quando comparados com o genótipo selvagem (MEISEL et al., 2001; BISELLI et al., 2009). Contudo, Castro et al. (2003) demonstraram que esta mutação do gene *MTHFR* apresentou um efeito significativo sobre os níveis de homocisteína total no plasma.

2.3.2 Metionina sintase (MS)

A metionina sintase (MS), também conhecida como 5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase (MTR), é outra enzima importante no metabolismo do folato, a qual mantém os níveis adequados de folato intracelular e catalisa a remetilação da homocisteína para metionina utilizando como cosubstrato a cobalamina e o 5-metiltetrahidrofolato que serve como doador de grupamentos metil. Essa reação produz simultaneamente tetrahidrofolato que é convertido novamente pela serinahidroximetil transferase (SHMT) a 5,10 metilenoTHF (SKIBOLA et al., 2002; SHARP & LITTLE 2004; NICLOT et al., 2006).

O gene que codifica a MS está localizado na região terminal do cromossomo 1 (1q34) e apresenta 12 éxons codificando uma proteína com 1265 aminoácidos e peso molecular de 140 kDa (GOS & SZPECHT-POTOCKA, 2002). A enzima apresenta quatro domínios funcionais: dois domínios N-terminais, que ligam a homocisteína e 5,metilTHF; o domínio central, altamente conservado, onde ocorre a ligação à cobalamina; e o domínio C-terminal, que constitui o domínio regulatório da enzima e também interage com a enzima MTRR (WOLTHERS & SCRUTTON, 2009).

O polimorfismo mais comum no gene *MS* é a substituição A2756G, que acarreta na troca de um ácido aspártico por uma glicina na proteína. O ácido aspártico é um aminoácido fortemente polar localizado na α -hélice da proteína, entre os domínios de ligação a cobalamina e regulatório. A troca por um aminoácido não polar, a glicina (chamada de quebradora de hélice), leva a perturbações na estrutura tridimensional e na função da proteína (CHEN et al., 1997). Este polimorfismo está

associado à indução da hipometilação do DNA, um importante fator na carcinogênese (SKIBOLA et al., 2002).

A atividade da enzima MS é importante para manter níveis adequados de metionina e prevenir o acúmulo de homocisteína. O aumento dos níveis sanguíneos de homocisteína tem sido associado à maior probabilidade de desenvolver doenças cardiovasculares, defeitos congênitos e aneuploidia na síndrome de Down, além de afetar o desenvolvimento de diversos tipos de câncer (CARMEL & JACOBSEN 2001; WATKINS et al., 2002). A MS também é crítica para o ciclo de metilação, por manter satisfatórios, os níveis de S-adenosilmetionina (SAM) e derivados de metionina. Tais moléculas atuam como doadoras de grupo metil em uma grande variedade de processos celulares (WATKINS et al., 2002).

2.3.3 Timidilato sintase (TS ou TYMS)

A timidilato sintase (TS ou TYMS) exerce uma função crucial na manutenção do fornecimento equilibrado de desoxinucleotídeos necessária para a síntese e reparo do DNA, através da síntese *de novo* de pirimidinas (CANDELARIA et al., 2005). Esta enzima catalisa a metilação redutiva de 2'-deoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) em 2'-deoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP) utilizando o cofator 5,10-metilenotetrahidrofolato como doador hidroximetil e produzindo dihidrofolato (KANAAN et al., 2009). Desta forma, a TS compete com a enzima MTHFR pelo mesmo substrato (5,10-metilenoTHF) para realizar esta conversão (SKIBOLA et al., 2002).

O gene *TS* está localizado no braço curto do cromossomo 18 (18p11.32) e seu produto apresenta 313 aminoácidos (HISHIDA et al., 2003). O gene possui um polimorfismo na região promotora acentuadora (TSER, *thymidylate synthase inenhancer region*), mais especificamente, na região 5' não traduzida (5'-UTR), imediatamente anterior ao códon de iniciação ATG (KANEDA et al., 1987). Esta sequência polimórfica consiste em 28pb repetidos *em tandem* duas (2R) ou três (3R) vezes (SKIBOLA et al., 2002). A presença de 3R versus 2R, mostrou aumentar a transcrição do mRNA e a expressão da proteína *in vitro* e *in vivo*, conseqüentemente, uma expressão aumentada deste gene, pode aumentar a conversão de dUMP para dTMP, reduzindo a chance de má incorporação de uracil no DNA (KAWAKAMI, 1999; HISHIDA et al., 2003).

A enzima TS atua na manutenção da estrutura e no mecanismo de reparo do DNA, sendo responsável pela única fonte de timidilato no interior da célula (KANAAAN et al., 2009, ZHUANG et al., 2009). A inibição dessa enzima resulta na diminuição da quantidade de deoxitimidina trifosfato (dTTP), indução de quebras cromossômicas, formação de sítios frágeis e morte celular (MARSH, 2005).

2.4 Aneuploidias e metabolismo do folato

Dados da literatura sugerem que a cromatina estável do DNA centromérico depende da herança epigenética de padrões específicos na metilação do centrômero, bem como da ligação de enzimas metil sensíveis que mantêm a arquitetura de ordem maior do DNA, necessária para a montagem do cinetócoro. Assim, alterações no padrão de metilação do DNA têm sido consideradas potenciais causadoras do mecanismo de não-disjunção. De acordo com esta teoria, a hipometilação centromérica levaria a anomalias na formação no cinetócoro, resultando em aneuploidias (HOBBS et al., 2000; COPPEDÈ et al., 2009).

Defeitos no metabolismo do ácido fólico têm sido considerados como uma possível causa de não-disjunção cromossômica por hipometilação. James et al. (1999) estudaram mães de crianças com síndrome de Down e encontraram uma alta frequência de mães que eram heterozigotas para o polimorfismo C677T, sugerindo que esta mutação pode ser um fator de risco para a não-disjunção do cromossomo 21. Em um estudo posterior, Hobbs et al. (2000) investigaram essa associação em adição com o gene *MTRR*, também envolvido no metabolismo do folato, e encontraram que o polimorfismo 66 A→G também estava associado com o fator de risco para a não-disjunção cromossômica.

A associação entre os polimorfismos *MTHFR* C667T e *MTRR* A66G ainda é controverso. Estudos subsequentes em diferentes populações da Europa, Estados Unidos e Turquia não encontraram associação entre *MTHFR* C677T, *MTRR* A66G e *MTHFR* A1298C e a não-disjunção do cromossomo 21 (CHADEFAUX-VEKEMANS et al., 2002; O'LEARY et al., 2002; BODUROGHU et al., 2004; CHANGO et al., 2005). Da Silva et al. (2005) mostraram uma alta frequência do alelo 677T e níveis elevados de homocisteína em mães com crianças com SD no Brasil, mas considerou isto como um fator de baixo risco para a SD.

Ainda na busca de associação entre polimorfismos na rota do folato e SD, Bosco et al. (2003) estudaram três principais variantes, *MTHFR* C677T, *MTR* A2756G e *MTRR* A66G em mães de crianças com SD e associaram o alelo *MTR* 2756G como fator de risco a não-disjunção na SD. Duplos heterozigotos para *MTR* A2756G e *MTRR* A66G foram combinados e resultaram em um aumento para o risco desta síndrome. Adicionalmente, Rai et al. (2006) realizaram a avaliação do polimorfismo C677T e A1298C do *MTHFR*, em um total de 314 mães de origem indiana, das quais 149 possuíam crianças com SD e 165 controles. Estes autores demonstraram a associação dos polimorfismos nas mães de crianças com SD em homozigose para os alelos 677T e 1298C e destacaram que as mães jovens com o genótipo TT são geneticamente predispostas à não-disjunção devido ao metabolismo anormal do folato.

Hassold et al. (2001) pesquisaram uma possível relação entre os polimorfismos *MTHFR* C677T e *MTRR* A66G com outras aneuploidias cromossômicas, incluindo trissomias dos cromossomos sexuais e dos autossomos 2, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 18 e 22. Após comparar a distribuição dos genótipos, estes autores observaram um aumento significativo na frequência do alelo 677T apenas nas mães de indivíduos com a trissomia do cromossomo 18.

A associação entre polimorfismos do gene *MTHFR* e não-disjunção foi investigada em pacientes com Síndrome de Turner (ST) e foi relatado que em homozigose a mutação C677T deve ter um efeito na não-disjunção cromossômica somática pelo decréscimo da atividade da enzima MTHFR (SANTOS et al., 2006). Por outro lado, em um estudo subsequente, o polimorfismo A1298C e não o C677T do *MTHFR* foi relacionado às aneuploidias cromossômicas na ST (OLIVEIRA et al., 2008). Indivíduos com ST frequentemente apresentam mosaicismos e a presença de linhagens celulares normais juntamente com linhagens 45,X parece ser responsável pelo aumento da probabilidade de sobrevivência desses pacientes quando comparados com aqueles 45,X (KELLY et al., 1992). De acordo com Santos et al. (2006) a ST é um importante modelo para investigar a associação entre polimorfismos do gene *MTHFR* e a não-disjunção devido à alta frequência de mosaicismos cromossômicos nesta síndrome. Esses trabalhos demonstraram a existência de uma contribuição gênica na não-disjunção que, se confirmada, representará uma importante evidência de um componente genético associado à segregação meiótica incorreta dos cromossomos na espécie humana

2.5 Síndrome de Turner (ST)

A síndrome de Turner (ST) foi descrita em 1930 por Otto Ullrich e posteriormente por Henry Turner, que em 1938 publicou a descrição da tríade *infantilismo sexual – pescoço alado – cúbito valgo* em sete pacientes do sexo feminino com baixa estatura. No ano de 1959, Ford et al. demonstraram que a síndrome estava vinculada a monossomia do cromossomo X (*Apud*: LIPAY et al., 2005).

A ST consiste em um dos mais prevalentes distúrbios cromossômicos humanos, afetando aproximadamente 1:2500 nascimentos femininos (STOCHHOLM et al., 2006). O número de recém-nascidas corresponde a uma pequena fração dos conceptos com ST, uma vez que, embora 3% de todas as concepções femininas na espécie humana tenham a constituição cromossômica 45,X, aproximadamente 99% destas são espontaneamente abortadas (LIPAY et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009). Esse fato tem levantado a hipótese de que para ser viável, o conceito 45,X deve possuir outra linhagem celular ao menos em alguns órgãos ou períodos embriogênicos críticos (ARAÚJO & RAMOS, 2008; OLIVEIRA et al., 2009).

Citogeneticamente, a ST é caracterizada pela ausência total ou parcial de um cromossomo sexual. O cariótipo 45,X ocorre em 50% a 60% dos casos. Alterações estruturais do cromossomo X, como isocromossomo do braço longo, deleções, cromossomo em anel estão presentes em aproximadamente 30% dos casos, com cariótipos homogêneos ou mosaicos que incluem uma linhagem celular 45,X (OLIVEIRA et al., 2009). Poucos casos apresentam cariótipos complexos que incluem a formação de cromossomos X derivativos (BINKERT et al., 2010; BURÉGIO-FROTA et al., 2010). Frequentemente as portadoras da ST apresentam uma segunda linhagem celular, que pode incluir o cromossomo Y normal ou estruturalmente alterado em 5 a 6% dos casos (Gravholt, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que a presença do cromossomo Y ou fragmentos deste em pacientes com ST está relacionada com o aumento de 30% no risco em desenvolver o gonadoblastoma (GB) (CANTO et al., 2004; MAZZANTI et al., 2005; BIANCO et al., 2009). O GB é uma neoplasia composta por células germinativas associadas a cordões de células sexuais. Apesar de ser considerado um tumor benigno, o mesmo pode estar associado ao risco de desenvolvimento de disgerminomas invasivas em 60% dos casos e outros elementos malignos de células

germinativas. Desta forma, é recomendada a realização da gonadectomia bilateral profilática em pacientes com gônadas disgenéticas e sequências Y positivas (KILDAL et al., 2003; COLEMAN & MACLENNAN, 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

O quadro clínico na ST é evidenciado pela baixa estatura e a disgenesia gonadal, levando ao atraso no desenvolvimento puberal, amenorreia primária e esterilidade. Também podem ocorrer anomalias cardiovasculares e renais, deficiência auditiva, hipertensão, doenças tireoidianas, osteoporose e obesidade. Além de alguns sinais dismórficos, como pescoço curto e/ou alado, tórax largo e em escudo, cúbito valgo, mamilos hipoplásicos, baixa implantação dos cabelos na nuca, orelhas proeminentes e de implantação baixa, ptose palpebral e pregas epicânticas entre outros (SYBERT & MCCAULEY, 2004; BALDIN et al., 2005). As consequências fenotípicas da ST são explicadas pela haploinsuficiência, em que uma única cópia do material genético é incapaz de efetuar as funções normalmente desempenhadas em diploidia, prejudicando o desenvolvimento humano normal, e/ou pelo *imprinting* genético, definido como um fenômeno epigenético, em que certos genes se expressam exclusivamente em um dos cromossomos parentais (RANKE & SAENGER, 2001; BONDY, 2009).

A origem parental do cromossomo X na ST pode influenciar o fenótipo de acordo com o cromossomo X conservado. Diferenças físicas e comportamentais entre pacientes com $45,X^M$ materno e $45,X^P$ paterno indicam a existência de *imprinting* genético na expressão de alguns genes envolvidos nas anomalias cardiovasculares e renais, funções sociocognitivas, perfil lipídico aterogênico e perda de audição (HAMELIN et al., 2006; VAN et al., 2006; SAGI et al., 2007). Além disso, fetos abortados apresentam maior incidência de $45,X^P$, evidenciando que o *imprinting* genético pode exercer uma importante função na eliminação de fetos com ST (MARTINEZ-PASARELL et al., 1999).

A presença de mosaïcismo com baixa contagem de células $45,X$ e/ou anomalias estruturais dos cromossomos sexuais, podem atenuar a expressão clínica, levando ao aparecimento de poucos estigmas da ST (HANSON et al., 2001). Os mosaicos apresentam uma menor prevalência de doenças cardiovasculares e hipertensão, além disso, ocorrem gestações com maior frequência em pacientes com mosaïcismo (LANDIN-WILHELMSSEN et al., 2001). Barrenãs et al. (2000) reportaram que a perda da audição com a idade é maior nas portadoras de ST com alta proporção de células $45,X$. Assim, para as pacientes diagnosticadas com

monossomia total, a detecção de uma possível segunda linhagem celular implica em um prognóstico mais favorável.

O diagnóstico da ST pode ser realizado através da avaliação pré-natal, com sinais sugestivos ao ultrassom fetal de rotina que incluem: higroma cístico, hidropsia fetal, edema subcutâneo, fêmur curto, aumento da translucência nucal, retardo do crescimento, anormalidades cardíacas e renais. Em adição, pode-se encontrar na triagem materna tríplice outros indicativos da ST como a redução nas dosagens de α -fetoproteína, estriol não conjugado e aumento das dosagens de gonadotrofina coriônica (hCG) (HAAK et al., 2002; BRONSHTEIN et al., 2003). Apesar de estabelecer o diagnóstico no período pré-natal, existe a necessidade obrigatória de confirmação pós-natal através do cariótipo, uma vez que os sinais nestas avaliações não são patognomônicos (RANKE & SAENGER, 2001).

Apenas 15% das pacientes com ST são diagnosticadas durante o período neonatal, a suspeita clínica nesta fase surge pela presença de edema congênito nas mãos e pés, pescoço alado, baixa implantação do cabelo e/ou orelhas, prega nucal evidente e anomalias cardíacas. Na infância, a baixa estatura e velocidade de crescimento reduzida incluem os sinais indicativos da ST. Aproximadamente 26% dos casos são diagnosticados durante a adolescência, quando se investiga a baixa estatura, retardo puberal e amenorreia primária ou secundária. Em média, 38% dos casos não são diagnosticados até a fase adulta, onde anovulação e infertilidade são as principais manifestações clínicas que conduzem ao diagnóstico da ST (CONWAY, 2004; GRAVAHOLT, 2005; HJERRILD et al., 2008).

A baixa estatura é um dos principais estigmas clínicos associados a ST e afeta 95% a 99% das portadoras, sendo caracterizada pelo retardo do crescimento que começa na vida intrauterina, persiste através da infância e se agrava durante a puberdade. A altura final da mulher adulta com ST varia de 133 a 157 cm, aproximadamente 20 cm abaixo da população com a mesma origem étnica (SAENGER et al., 2001; GRAVAHOLT, 2004). Esta falha no crescimento, bem como outras alterações esqueléticas (palato alto, quarto metacarpo curto, cúbito valgo, pescoço curto e deformidade de Madelung) é atribuída à haploinsuficiência do gene *SHOX* (*Short stature Homeobox gene*), localizado na região pseudoautosômica dos cromossomos sexuais X (Xp22.3) e Y (Yp11.3) (Fig.4) (BONDY, 2009; DAVENPORT, 2010). Ogata et al. (2002) sugerem que o *SHOX* tenha uma função repressora da maturação óssea, pois sua haploinsuficiência está relacionada a uma

maior susceptibilidade à ação estrogênica nos tecidos ósseos, que leva a fusão prematura das placas de crescimento.

A falência gonadal está presente em mais de 90% das pacientes, sendo responsável pelo infantilismo sexual, ausência de menstruação (amenorreia primária) e esterilidade (SAENGER et al., 2001; BONDY, 2009). As gônadas disgenéticas (ou em fita) das pacientes com ST são constituídas somente por tecido fibroso, não têm função hormonal nem capacidade de produção de gametas, existindo apenas tecido conjuntivo e estroma ovariano. A falência ovariana na ST resulta da aceleração no processo natural de degeneração dos ovócitos, concomitante a um aumento de fibrose no estroma, possivelmente devido à haploinsuficiência dos genes requeridos no segundo cromossomo X, que são reativados durante a ovogênese (MODI et al., 2003; BONDY, 2009; DAVENPORT, 2010). Em algumas pacientes com ST há evidências de função ovariana na puberdade, 10 a 30% apresentam desenvolvimento puberal espontâneo, podendo haver também fertilidade espontânea em 1 a 5% dos casos, geralmente em virtude de mosaïcismo, sugerindo uma função ovariana com produção residual de hormônios (LIPAY et al., 2005; BONDY, 2009).

A região de maior importância para a função ovariana é considerada a Xq13-q26 (Fig. 4) e translocações neste segmento resultam em apoptose ovocitária com falência ovariana. Por outro lado, deleções do braço curto do cromossomo X levam à perda do pareamento entre os homólogos e atresia dos ovócitos. Dois segmentos contêm *loci* relacionados à falência ovariana: *FOP1* (falência ovariana prematura 1) localizado em Xq26-qter e *FOP2* (falência ovariana prematura 2) em Xq13.3-q22. Deleções distais que afetem o segmento cromossômico *FOP1* resultam em falência ovariana entre 24 e 29 anos e mutações em *FOP2* levam a disfunção ovariana mais precocemente, entre 16 e 21 anos (DAVISON et al., 2000; BADALOTTI et al., 2006).

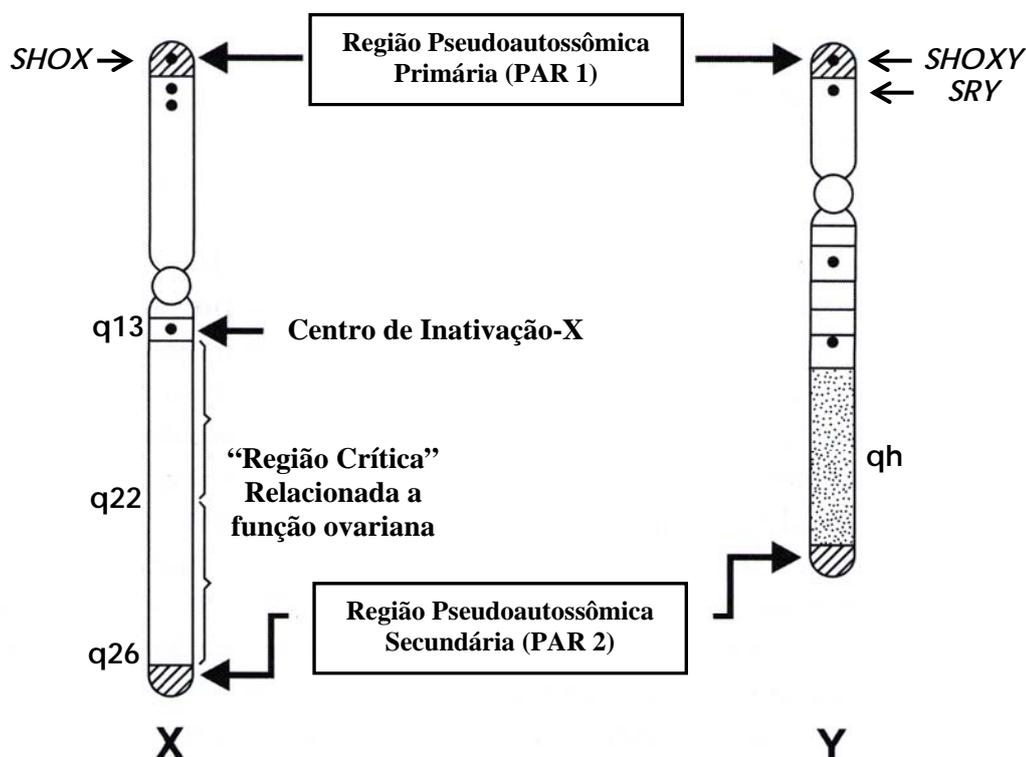


Figura 4. Principais regiões dos cromossomos sexuais X e Y. Regiões pseudoautosômicas (PAR1 e PAR2); *SHOX*, gene homeobox da baixa estatura (cromossomo X); *SHOXY*, gene homeobox da baixa estatura (cromossomo Y); *SRY*, lócus de determinação sexual (Fonte: adaptado de GARDNER & SUTHERLAND, 2004).

O padrão de inteligência é considerado normal em pacientes com ST, porém algumas dificuldades específicas de aprendizagem são relatadas, como distúrbios de memória visual, atenção e raciocínio matemático, em consequência de problemas na percepção espacial e temporal, além de dificuldades psicossociais, déficits psicomotores e neurofisiológicos (LAWRENCE et al., 2003; ROVET, 2004; ROSS et al., 2006). Entretanto, em alguns casos pode ocorrer deficiência mental acentuada associada a um quadro dismórfico distinto do habitual da ST, incluindo severas malformações congênitas em pacientes portadoras do cromossomo X em anel. Esta deficiência está relacionada à ausência de inativação do cromossomo em anel devido à perda do centro de inativação do cromossomo X, levando a dissomia de vários genes que alteram o mecanismo de compensação de dose e o balanceamento da expressão gênica (EL ABD et al., 1999; SUZIGAN et al., 2005).

A baixa estatura e a ausência de caracteres sexuais são os principais fatores que aumentam os riscos de dificuldades psicológicas, sociais e cognitivas. Embora a

maioria das portadoras de ST não apresente deficiência de hormônio do crescimento (GH), a terapia com GH recombinante melhora a altura final destas pacientes (STEPHURE, 2005). No entanto, os benefícios do tratamento com GH dependem do início e duração terapêutica, além da dose implementada, pois alguns efeitos colaterais podem incluir resistência insulínica, aumento dos níveis pressóricos, hipertensão intracraniana benigna, retenção de líquidos nas extremidades, além de conduzir ao hipotireoidismo autoimune e a elevação das transaminases hepáticas (GHARIB et al., 2003).

Apenas 10 a 20% das meninas com ST secretam estrógenos suficientes para que ocorra o desenvolvimento sexual espontâneo. Portanto, a deficiência estrogênica crônica atinge a maioria das pacientes que necessitam de reposição hormonal para desenvolver as características sexuais secundárias, além do ganho e manutenção da massa óssea. Assim, no aspecto geral, o tratamento da ST tem como objetivos principais promover o crescimento, repor esteroides sexuais, corrigir sempre que possível as anomalias congênitas ou adquiridas, oferecer suporte psicossocial e conseqüentemente melhorar a qualidade de vida dessas pacientes (SUZIGAN et al., 2005; MORGAN, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Realizar análises citogenética e molecular em pacientes com suspeita clínica da síndrome de Turner a fim de estabelecer uma associação entre genótipo-fenótipo nesta síndrome e avaliar os polimorfismos genéticos relacionados ao metabolismo do folato como possíveis fatores de risco a não-disjunção cromossômica.

3.2 Objetivos Específicos

1. Estabelecer a frequência cariotípica e o potencial efeito fenotípico dos diferentes rearranjos cromossômicos das pacientes diagnosticadas citogeneticamente com ST;
2. Determinar a frequência das mutações C677T e A1298C do gene *MTHFR*, e A2756G do *MS* nas pacientes com ST e controles;
3. Determinar as frequências das repetições *em tandem* 2R e 3R no promotor do gene *TS* nas pacientes com ST e controles;
4. Verificar se existe associação entre os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MS* e *TS* e a não-disjunção cromossômica somática nas pacientes com ST.
5. Verificar se existe uma possível interação entre os genes *MTHFR*, *MS* e *TS* modulando o risco associado a erros na segregação cromossômica desta síndrome.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo transversal de caráter analítico com comparação de grupos, constituído de um braço retrospectivo e outro prospectivo. No braço retrospectivo foram determinadas as frequências alélicas e genótípicas dos genes *MTHFR* (polimorfismos C677T e A1298C), *MS* (polimorfismo A2756G) e *TS* (repetições 2R/3R) das pacientes cariotipadas no período de maio de 2006 a março de 2009, para a investigação da associação dos polimorfismos como fator de risco na não-disjunção cromossômica somática nas portadoras da ST. No braço prospectivo foram analisadas as pacientes com suspeita clínica da síndrome de Turner no período de abril de 2009 a outubro de 2010, com os objetivos propostos anteriormente. As análises citogenéticas foram realizadas no laboratório de Genética e Citogenética Animal CCB/UFPE e a análise dos polimorfismos foram conduzidas no laboratório de Biologia Molecular do Centro de Oncohematologia Pediátrica de Pernambuco/HUOC.

4.2 Pacientes

Nesse estudo foram analisadas as pacientes com suspeita clínica da síndrome de Turner, provenientes do Serviço de Genética Médica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e da Unidade de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFPE. Os achados clínicos foram obtidos dos prontuários das pacientes atendidas nos Serviços supracitados. As amostras de sangue circulante periférico foram colhidas por punção venosa com seringas previamente heparinizadas, sendo retirados 5 ml de sangue de cada paciente.

4.3 Estratégia de seleção do controle

Na amostra do grupo controle foi utilizado um banco de DNA para estudo molecular de pacientes atendidos em um serviço de referência em Identificação Humana da cidade do Recife. Os controles incluíram amostras do sexo feminino e não portadoras de síndromes cromossômicas com a mesma faixa etária das pacientes.

4.4 Cultura de Linfócitos

As preparações citológicas para as análises cromossômicas foram obtidas a partir de cultura de linfócitos. Para esta cultura, foram adicionados 0,5 mL de sangue total nos frascos de cultura contendo 4 mL meio RPMI 1690 suplementado com 1mL de soro bovino fetal e 0,2 mL de fitohemaglutinina. Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37 °C, por 72 horas. Após 70 horas foi adicionado 0,1 mL de colchicina 0,0016%. Ao completar 72 horas de cultivo, o material foi centrifugado por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante desprezado, e em seguida adicionado 8mL de KCl previamente aquecido a 37 °C, para que ocorresse o choque hipotônico. Após a hipotonia, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram novamente centrifugados por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante retirado, sendo então adicionado o fixador metanol: ácido acético (3:1) até completar 8 mL. Para a preparação de lâminas teste, foram realizadas tantas centrifugações e trocas de fixador quanto o necessário para que o conteúdo da cultura ficasse transparente.

4.5 Bandeamento G

O bandeamento G foi realizado segundo Seabright (1972). As lâminas foram envelhecidas por alguns dias, em seguida incubadas numa solução de tripsina (0,10 gramas do pó da Tripsina 1:250 em 100 mL de Dulbeco), a 37 °C durante 6 a 10 segundos. As lâminas foram então mergulhadas em soro fisiológico, para interromper a ação da tripsina, e em seguida coradas com uma solução de Giemsa a 5% por 8 minutos. Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN) de

2009. A análise cromossômica foi realizada em microscopia óptica utilizando em média 20 células com o bandeamento G.

4.6 Biologia Molecular

4.6.1 Extração de DNA

O DNA das pacientes foi extraído a partir dos leucócitos do sangue periférico, através do Kit para purificação de DNA Illustra blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare). Para cada amostra foi incubado 200 µL de sangue total em um tubo de microcentrífuga de 2,0 mL e adicionado 20 µL de proteinase K e 400 µL de tampão de lise por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida o material foi transferido para uma minicoluna agregada a um tubo coletor, centrifugado e o material do tubo coletor descartado. Este processo foi repetido com a adição de 500 µL de tampão de lise na minicoluna. Em seguida foram adicionados 500 µL de tampão de lavagem na minicoluna e após centrifugação o material do tubo coletor foi descartado. A minicoluna foi então agregada a um novo tubo de microcentrífuga e foram adicionados 200 µL de tampão de eluição pré-aquecido a 70 °C. Após incubação por 1 minuto em temperatura ambiente o material foi centrifugado e minicoluna descartada.

4.6.2 Determinação dos polimorfismos *MTHFR* C677T

As genotipagens foram realizadas através do método PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*) para o polimorfismo *MTHFR* C677T. Foram utilizados os *primers* (direto) 5'-TGA AGG AGA AGG TGT CTG CGG GA-3' e (reverso) 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3'. A reação da PCR teve um volume final de 25 µL com tampão 1x, 1U de Taq polimerase, 0,016 mM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,4 pmoles de *primers* (direto e reverso) e 100-300 ng de DNA. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial de 95 °C por 6 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 62,5 °C por 1 minuto e 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e um ciclo de extensão final de 72 °C por 7 minutos.

O produto amplificado foi então digerido com a enzima de restrição *Hinfl* (Fast Digest – Promega) com 0,6 µL da enzima, 1,5x de seu respectivo tampão e 10 µL do produto da PCR, após permanência em banho-maria a 37 °C por 30 minutos (FROSST et al., 1995 adaptado).

O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 3% em solução tampão de Tris-acetato a 40 mmol com EDTA a 1mmol, corados por brometo de etídio a 0,5 µg/mL, submetidos à diferença de potencial de 100 volts por 60 minutos e visualizados em transiluminador de ultravioleta (Ultralum).

O polimorfismo C677T do gene *MTHFR* cria um sítio de restrição para a enzima *Hinfl*. Desta forma, após digestão enzimática, o homozigoto selvagem apresentou apenas o fragmento não-digerido com 198 pb correspondente ao genótipo CC, o heterozigoto mostrou os fragmentos 198 pb (não-digerido, referente ao alelo C), 175 pb e 23 pb (fragmentos digeridos, referente ao alelo T) para o genótipo CT, o homozigoto mutante apresentou apenas os fragmentos digeridos com 175 pb e 23 pb para o genótipo TT (ANEXO C).

4.6.3 Determinação dos polimorfismos *MTHFR* A1298C

A genotipagem do polimorfismo A1298C do *MTHFR* foi realizada pelo método PCR-ASA (*Polymerase Chain Reaction – Allele Specific Amplification*) e foram utilizados os *primers* (direto) 5'- GGA GCT GAC CAG TGA AGA -3' e (reverso) 5'- TGT GAC CAT TCC GGT TTG -3 para amplificação do alelo A (0,5 pmoles); e os *primers* (direto) 5'-CTT TGG GGA GCT GAA GGA -3 e (reverso) 5'- AAG ACT TCA AAG ACA CTT G - 3' para amplificar o alelo C (0,5 pmoles). O controle interno da reação foi do gene *Cyp 46* e foram utilizados os seguintes *primers* (direto) 5'-TGA AAA CGA GTT TCC CGT CC-3' (0,3 pmoles) e (reverso) 5'-GTG TGA CCA GGT AAC AGT CA-3' (0,3 pmoles). A reação da PCR teve um volume final de 25 µL com tampão 1x, 1,5U de Taq polimerase, 0,2 mM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂ e 100-300 ng de DNA. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial de 94 °C por 2 minutos seguidos por 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72 °C por 50 segundos para extensão da cadeia (BISELLI et al., 2008 adaptado).

O produto da amplificação foi separado por eletroforese em gel de agarose a 3% em uma solução tampão de Tris-acetato a 40 mmol com EDTA a 1mmol, corados por brometo de etídio a 0,5 µg/mL, submetidos à diferença de potencial de 100 volts por trinta minutos e visualizados em transiluminador de ultravioleta (Ultralum).

Para cada paciente foi realizada a PCR com cada alelo em tubos separados. O gene *Cyp-46*, de controle interno da reação, produziu um fragmento de 285 pb, observado em todas as amostras. A amplificação do alelo A apresentou fragmento de 77 pb e o alelo C amplificou um fragmento de 120 pb (ANEXO C).

4.6.4 Determinação do polimorfismo *MS A2756G*

Para a genotipagem do polimorfismo *MS A2756G*, foram utilizados os *primers* (direto) 5'-TGT TCC CAG CTG TTA GAT GAA AAT C-3' e (reverso) 5'-GAT CCAAAG CCT TTT ACA CTC CTC-3'. A reação da PCR teve um volume final de 25µL com tampão 1x, 1U de Taq polimerase, 0,016 mM da dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0,4 pmoles de *primers* (direto e reverso) e 100-300 ng de DNA. O programa de amplificação consistiu de um ciclo de 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 62 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e um ciclo de 72 °C por 7 minutos. Os produtos amplificados foram digeridos pela enzima de restrição *HaeIII* (0,6 µL da enzima e 1x de seu respectivo tampão), depois de 8 horas em banho-maria a 37 °C (MATSUO et al., 2001).

O produto da digestão foi separado por eletroforese em gel de agarose 3% em solução tampão de Tris-acetato a 40 mmol com EDTA a 1mmol, corados por brometo de etídio a 0,5µg/mL, submetidos à diferença de potencial de 100 volts por 50 minutos e visualizados em transiluminador de ultravioleta (Ultralum).

O polimorfismo *MS A2756G* cria um sítio de restrição para a enzima *HaeIII*. Assim, os indivíduos homozigotos selvagem apresentam apenas um fragmento não digerido 211 pb (referente ao alelo A), o homozigoto mutante apresentou os fragmentos resultantes da digestão de 131 e 80 pb (referente ao alelo G) e os heterozigotos produziram bandas de para cada alelo 211 pb (não digerida) e 131pb e 80 pb (digerido).

4.6.5 Determinação do polimorfismo para *TS*

A frequência das repetições *em tandem* 2R e 3R foi feita por PCR utilizando o par de *primers* (direto) 5'-CGT GGC TCC TGC GTT TCC-3' e (reverso) 5'-GAG CCG GCC ACA GGC AT-3'. A reação da PCR teve um volume final de 12,5µL com 6,25µL ou 1x de tampão Master Mix, 2,6 µL de DMSO, 0,4 pmoles de *primers* (direto e reverso) e 100-200 ng de DNA. O programa de amplificação consistiu em ciclo de 94 °C por 5 minutos e 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 66 °C por 1 minuto, 72 °C por 2 minutos e um ciclo de 72 °C por 7 minutos. (HISHIDA et al., 2003).

Os produtos da amplificação foram separados, eletroforéticamente, em gel de agarose 3%, usando solução tampão de Tris-Borato a 40 mmol com EDTA a 1mmol, corados por brometo de etídio a 0,5µg/mL e visualizados em transiluminador de ultravioleta (Ultralum).

As repetições *em tandem* foram identificadas por comparação com controles positivos para cada repetição 3R/3R, 3R/2R e 2R/2R.

4.6.6 Processamento e análise dos dados

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). A influência de cada polimorfismo sobre o risco de não-disjunção foi estimada pelo teste de Odds Ratio (OR) utilizando intervalo de confiança de 95% para os parâmetros.

As frequências dos alelos foram estimadas pelo método de contagem gênica. As diferenças entre as frequências alélicas de pacientes e controles foi avaliada pelo teste exato de Fisher. Através do princípio de Hardy-Weinberg, a estimação das frequências genotípicas esperadas pôde ser calculada. A prevalência dos diferentes genótipos nos pacientes e controles foi analisada pelo teste do χ^2 em tabelas de contingência ou através do teste G quando duas ou mais variáveis foram menores que cinco.

Para verificar a relação entre o número de alelos polimórficos por indivíduo e a não-disjunção, a proporção de alelos polimórficos foi calculada, sendo aplicado posteriormente o teste Mann-Whitney para comparar as medianas entre os casos e controles, seguido de análise de regressão logística. Para esta análise, a amostra foi dividida em dois grupos, (0 – 2) e (3 – 6) alelos.

4.7 Critérios Éticos

Este estudo foi desenhado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde, em sua resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996, visando assegurar os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica, aos sujeitos da pesquisa e ao Estado.

Todos os pacientes receberam informação clara e suficiente sobre a natureza e objetivos deste estudo, e foram incluídos nele após consentimento assinado, livre e esclarecido. Ressalta-se a adoção de medidas que asseguraram a confidencialidade e a privacidade das pacientes, bem como o sigilo e a segurança dos dados obtidos. Os resultados da pesquisa serão tornados públicos após a finalização dos estudos propostos. O projeto foi cadastrado no SISNEP (FR – 225776) e submetido ao Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (Registro CEP/CCS/UFPE N° 330/08).

5. RESULTADOS

5.1 Estudos citogenéticos e associação fenotípica

Neste trabalho foram analisadas citogeneticamente 110 pacientes com suspeita clínica da síndrome de Turner. As análises cariotípicas revelaram alterações cromossômicas compatíveis com a ST em 53 pacientes, ou seja, 48,18% da amostra. Por outro lado, 42 pacientes obtiveram o cariótipo considerado normal (46,XX), na análise do sangue periférico, seis pacientes apresentaram inversão pericêntrica do cromossomo 9, uma apresentou o cariótipo 46,XY e o restante obteve cariótipos com alterações diversas (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização citogenética das pacientes com alterações não associadas a ST.

Cariótipo	Nº de Pacientes
46,XX,inv(9)(p11q13)	6
46,XX/47,XX,+mar	2
46,XX,9qh ⁺	1
46,XX,9qh ⁺ ,add(20p)	1
46,XX,add(9q),del(11q)	1
46,XX/46,XX,del(1q)	1
46,XX/46,XX,del(5p)	1
46,XX,add(14q)	1
46,XY	1
Total	15

Entre as pacientes com ST, 56,6% apresentaram monossomia do cromossomo X, 35,85% exibiram mosaicismos com a presença de uma segunda linhagem 45,X e 7,55% das pacientes obtiveram cariótipos com alterações estruturais, que incluíram a formação de isocromossomos e duplicação do braço longo do X, em todas as células analisadas sem a presença de mosaicos (Fig. 5).

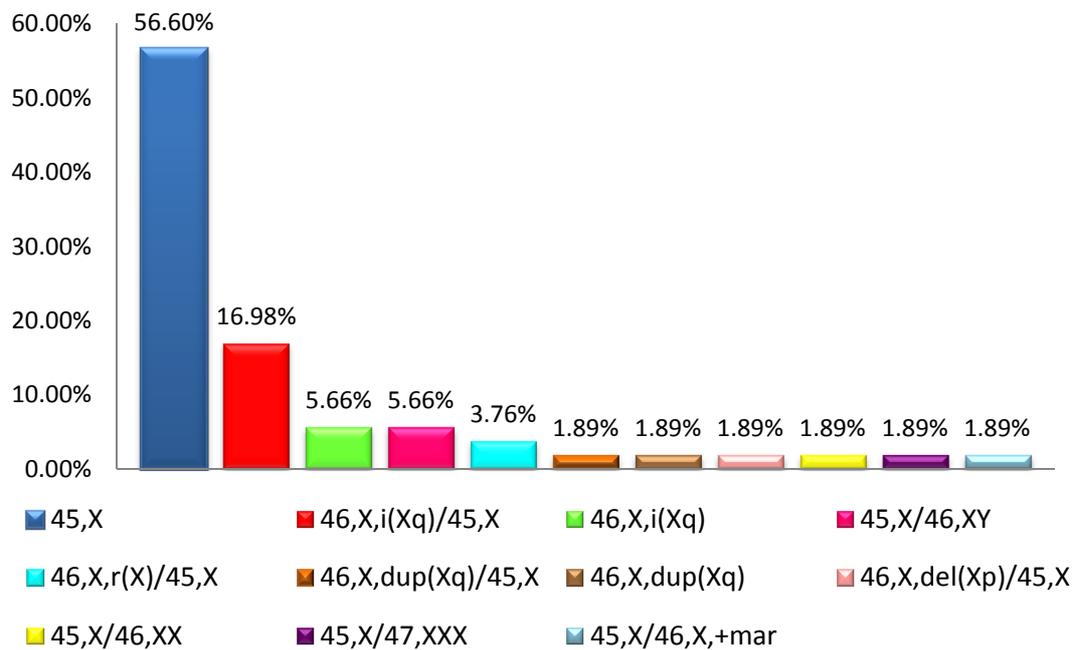


Figura 5. Percentual das alterações cromossômicas nas pacientes com Síndrome de Turner.

Diferentes alterações citogenéticas não relacionadas a ST foram detectadas neste trabalho, envolvendo os cromossomos 1, 5, 14, cromossomos marcadores e principalmente o cromossomo 9. Apesar de ser considerada uma variante populacional normal, a inversão pericêntrica do cromossomo 9 foi a principal alteração cromossômica não compatível com a ST, estando presente em 40% das pacientes deste grupo e em 5,45% da amostra total, associada ao quadro clínico característico desta síndrome. As principais características fenotípicas associadas a inv(9) também incluíram a baixa estatura e o atraso do desenvolvimento puberal, evidenciando que, apesar de serem aspectos clínicos típicos da ST, estes distúrbios clínicos estão relacionados a uma ampla variedade de fatores etiológicos.

As informações clínicas e citogenéticas das pacientes diagnosticadas com a ST estão dispostas nas tabelas 2 e 3, que incluem as informações das pacientes 45,X e das portadoras de alterações estruturais e/ou mosaicismo, respectivamente.

Tabela 2. Dados clínicos das pacientes diagnosticadas com ST e cariótipo 45,X.

Paciente	Idade	Cariótipo	Dados Clínicos
01	14a	45,X [20]	Baixa estatura, amenorreia primária, sem desenvolvimento mamário, útero hipoplásico e ovários não visualizados, otite média crônica, e unhas com implantação profunda.
02	2a	45,X[41]	Baixa estatura, fronte proeminente, pescoço curto com redundância de pele, depressão xifoide e atraso neuropsicomotor.
03	1a	45,X[20]	Pescoço curto com redundância de pele, discreto edema no dorso dos pés, unhas hipoplásicas e cardiopatia.
04	5m	45,X[20]	Ao nascer apresentava pescoço curto e alado, excesso de pele na região posterior do pescoço, edema no dorso dos pés, cardiopatia congênita (coarctação da aorta).
05	6a	45,X[20]	Baixa estatura, útero de volume reduzido, ovários não visualizados, depressão esternal, cúbito valgo bilateral, edema nos pés e nas mãos ao nascer e implantação profunda das unhas.
06	22a	45,X[20]	Baixa estatura e amenorreia primária.
07	2a	45,X[40]	Fronte estreita, implantação baixa dos cabelos, raiz nasal baixa, palato estreito, pescoço curto e unhas hipoplásicas profundamente implantadas.
08	15a	45,X[16]	Baixa estatura, ovários não visualizados, mamilos afastados e hipoplásicos, fáceis sindrômicas, sopro cardíaco, depressão xifoide, pregas epicânticas bilaterais, edema nos pés e nas mãos ao nascer, orelhas grandes e baixas, pescoço curto com redundância de pele e discreta hipoplasia das unhas.
09	2a	45,X[20]	Pescoço curto com redundância de pele, ovário esquerdo não visualizado, implantação posterior baixa dos cabelos, hipoplasia das unhas, déficit de aprendizagem e dificuldade de falar.
10	11a	45,X[25]	Baixa estatura, pescoço curto, baixa implantação dos cabelos na nuca, hipertelorismo mamário, discreto atraso mental, ovários não visualizados, malformação renal, rim direito com ectasia da pelve renal, fáceis sindrômicas
11	6a	45,X[20]	Baixa estatura, ovários não visualizados, orelhas grandes e pouco acidatadas, pescoço com redundância de pele, mamilos invertidos e afastados, edema moderado no dorso dos pés, hipoplasia das unhas, pele um pouco flácida.
12	9m	45,X[24]	Não disponível
13	10a	45,X[20]	Baixa estatura, útero de volume reduzido, ovários não visualizados, depressão esternal, cúbito valgo bilateral, edema nos pés e nas mãos ao nascer e implantação profunda das unhas.
14	RN	45,X[20]	Cardiopatia congênita, problemas renais, pescoço curto com excesso de pele, edema no dorso dos pés, epicanto bilateral.
15	22a	45,X[20]	Baixa estatura, ausência de características sexuais secundárias.
16	16a	45,X[25]	Não disponível
17	14a	45,X[20]	Baixa estatura, útero normal, ovário direito normal e ovário esquerdo não visualizado, bexiga e rins normais, critérios de Tanner P2 e M1, pescoço curto, tórax largo, implantação baixa dos cabelos, desalinhamento dentário, palato em ogiva, otite fúngica e epilepsia.
18	23a	45,X[20]	Baixa estatura, cardiopatia congênita, estenose aórtica com v. bicúspide, rins normais, útero reduzido e ovários não visualizados, fenótipo compatível com ST, atraso puberal, FSH > 100UI/L, valor de menopausa, estradiol não detectado.
19	12a	45,X[15]	Baixa estatura evidente, hipertelorismo mamário, implantação baixa do cabelo, cúbito valgo, pescoço largo e com prega, rinite alérgica persistente.
20	1a	45,X[25]	Edema no dorso dos pés e mãos, excesso de pele na nuca, pescoço alado, implantação baixa das orelhas, fronte quadrangular, cardiopatia (arco aórtico tortuoso e pequeno forame oval patente),

sist. urinário normal.

21	13a	45,X[20]	Baixa estatura, geno valgo, hipertelorismo mamário, baixa velocidade de crescimento e encurtamento dos metacarpos.
22	11a	45,X[20]	Encurtamento do 5º metacarpo, malformação pododáctilos, hipertelorismo mamário.
23	17a	45,X[20]	Baixa estatura
24	21a	45,X[20]	Baixa estatura, amenorreia primária, unhas de implantação profunda, útero reduzido, ovários não visualizados.
25	7m	45,X[20]	Edema no dorso dos pés, aumento acentuado de prega na nuca, encurtamento dos ossos do antebraço (restante dos ossos longos com textura normais), pulmão e coração sem alterações.
26	1a	45,X[25]	Edema no dorso dos pés ao nascimento e excesso de pele no pescoço, epicanto bilateral, unhas de implantação profunda, cardiopatia congênita, taquicardia sinusal, aparelho circulatório anormal clinicamente.
27	10a	45,X[20]	Baixa estatura, pregas epicânticas, sobrancelhas arqueadas, orelhas rodadas para trás e mais acidentadas, pescoço curto com implantação baixo posterior dos cabelos, mamilos invertidos e afastados, cúbito valgo e unhas hipoplásicas.
28	-	45,X[25]	Edema no dorso dos pés e mãos ao nascimento, certa redundância de pele no pescoço, hipoplasia dos 4º metacarpos, hipoplasia das unhas, sobretudo dos pés.
29	-	45,X[25]	Não disponível
30	-	45,X[25]	Não disponível

a = anos; m = meses; RN = recém-nascido; - = não informada

A idade das pacientes com cariótipo normal (46,XX) variou de nove meses a 33 anos no período da análise, entretanto, na maioria dos casos o diagnóstico foi estabelecido entre seis a 15 anos de idade. A baixa estatura foi a principal característica relacionada com a suspeita clínica da ST, estando presente em 60,6% das pacientes citogeneticamente normais, para as quais os dados clínicos estavam disponíveis. Outra importante característica fenotípica associada as pacientes 46,XX foi ausência de desenvolvimento puberal, incluindo atraso das características sexuais secundária, amenorreia, falência ovariana e infertilidade, presentes na maioria das pacientes em idade púbere. Os principais sinais dismórficos relacionados com a ST, como pescoço curto e/ou alado, tórax largo e em escudo, cúbito valgo, baixa implantação dos cabelos na nuca, entre outros, foram de fato pouco relevantes para a indicação clínica da ST entre as pacientes que revelaram o cariótipo 46,XX após o exame citogenético.

Tabela 3. Dados clínicos das pacientes com ST e alterações estruturais e/ou mosaicismo.

Paciente	Idade	Cariótipo	Dados Clínicos
31	6a	46,X,i(Xq)[21]/45,X[4]	Baixa estatura, hipertrofia de adenoide, baixo peso, hipoplasia das unhas, atraso no desenvolvimento físico e cognitivo com retardo mental leve, dificuldades de aprendizado e baixo rendimento escolar.
32	10a	46,X,i(Xq)[20]/45,X[10]	Baixa estatura, útero visualizado e ovários reduzidos.
33	25a	46,X,i(Xq)[23]/45,X[7]	Amenorreia primária, ausência de características sexuais secundárias, útero e ovários reduzidos, poptose ocular bilateral, anomalias nos pés, mamas não desenvolvidas, cúbito valgo, ectrodactilia nos pés e sindactilia total.
34	11a	46,X,i(Xq)[12]/45,X[27]	Baixa estatura, pescoço alado, ausência de caracteres sexuais secundários.
35	-	46,X,i(Xq)[9]/45,X[8]	Baixa estatura, olhos amendoados, cúbito valgo.
36	-	45,X[20]/46,X,i(Xq)[5]	Baixa estatura, ausência de caracteres sexuais secundários, cúbito valgo.
37	8a	46,X,i(Xq)[5]/45,X[25]	Baixa estatura, bexiga normal, rins multicístico em aspecto de ferradura, cardiopatia congênita, perda auditiva leve bilateral, cúbito valgo, dificuldade de aprendizado.
38	5a	46,X,i(Xq)[12]/45,X[10]	Não disponível
39	18a	45,X[13]/46,X,i(Xq)[5]	Não disponível
40	9a	46,X,i(Xq)[25]	Baixa estatura.
41	10a	46,X,i(Xq)[16]	Baixa estatura, útero e ovários de volumes reduzidos, genitália com hipoplasia dos pequenos lábios, malformação renal, encurtamento dos ossos dos antebraços, perda auditiva.
42	17a	46,X,i(Xq)[25]	Baixa estatura, amenorreia primária e útero e ovários infantis.
43	15a	45,X[15]/46,XY[5]	Baixa estatura, unhas de implantação profunda, útero reduzido, ovários não visualizados.
44	17a	45,X[31]/46,XY[4]	Amenorreia primária, atraso puberal, ausência de desenvolvimento sexual, sem desenvolvimento das mamas, estradiol não detectado, FSH>100 (hipogonadismo hipergonadotrófico), idade óssea atrasada, rins e bexiga normais.
45	17a	45,X[11]/46,XY[9]	Baixa estatura, amenorreia primária, ausência de caracteres sexuais secundários, útero reduzido, ovários não visualizados, baixa implantação dos cabelos, cúbito valgo, unhas discretamente sulcadas, sem anormalidades cardiológicas.
46	18a	45,X[33]/46,X,r(X)[7]	Baixa estatura, pescoço alargado, ausência de caracteres sexuais secundários.
47	16a	46,X,r(X)[16]/45,X[14]	Não disponível
48	22a	46,X,dup(Xq)[35]/45,X[15]	Baixa estatura, amenorreia primária, pouco desenvolvimento mamário, útero infantil, ovários não visualizados e pescoço curto e largo.
49	9a	46,X,dup(Xq)[30]	Baixa estatura, amenorreia primária, cúbito valgo bilateral, pescoço curto com excesso de pele, unhas com implantação profunda.
50	15a	46,X,del(Xp)[16]/45,X[16]	Baixa estatura, ovários atroficos, útero visualizado, atraso puberal, implantação baixa dos cabelos
51	16a	45,X[21]/46,XX[3]	Baixa estatura, ausência de características sexuais secundárias, pescoço alado, hipoplasia de unhas.
52	3a	45,X[25]/47,XXX[15]	Não disponível
53	-	45,X[22]/46,X,+mar[5]	Baixa estatura, tórax em escudo, unhas com implantação profunda e sopro cardíaco.

a = anos; - = não informada

Para as pacientes com cariótipos compatíveis com a ST, a idade em que o diagnóstico foi estabelecido variou entre zero, ou seja, recém-nascido, a 25 anos. De modo geral a ST foi precocemente diagnosticada entre as pacientes com monossomia do X, sendo em grande parte dos casos (36,7%) o cariótipo estabelecido antes de dois anos de idade. Por outro lado, para a proporção mais significativa das portadoras de mosaicismo e/ou alterações estruturais do X (39,13%), o diagnóstico citogenético só foi instituído entre 15 a 20 anos de idade, mostrando que a presença de mosaicismo geralmente acentua o quadro clínico levando a um diagnóstico tardio.

Os principais achados clínicos que conduziram a análise cariotípica antes de dois anos de idade nas pacientes 45,X incluem pescoço curto e alado, com redundância de pele, edema no dorso das mãos e dos pés, cardiopatia congênita, unhas hipoplásicas e de implantação profunda, demonstrando que ao nascimento essas são as características fenotípicas determinantes do quadro clínico desta síndrome.

A baixa estatura foi o distúrbio clínico mais frequente nos casos de ST, totalizando 73,33% da amostra com os achados clínicos disponíveis. Essa falha no crescimento apresentou uma frequência maior entre as pacientes com alterações estruturais e/ou mosaicismo (Fig. 6), podendo esta diferença ser atribuída à faixa etária mais alta neste grupo de pacientes, o que torna esta característica mais evidente. Outra importante alteração clínica foi ausência de desenvolvimento puberal, incluindo atraso das características sexuais secundárias, amenorreia primária, ovários não detectados e hipogonadismo, presentes em 68% das pacientes em idade púbere. Este distúrbio clínico foi uma característica constante entre as pacientes com alterações estruturais e/ou mosaicismo, contrastando com as portadoras da monossomia do X, que exibiram atraso puberal em apenas 38,46% dos casos (Fig. 6).

Outros sinais clínicos importantes associados a ST encontrados neste trabalho abrangem as cardiopatias congênitas, como coarctação da aorta, em 15,56% das pacientes, sendo também mais frequente nos casos com cariótipo 45,X (Fig. 6), malformações renais (8,89%), perda auditiva (4,44%) e retardo mental leve em duas pacientes.

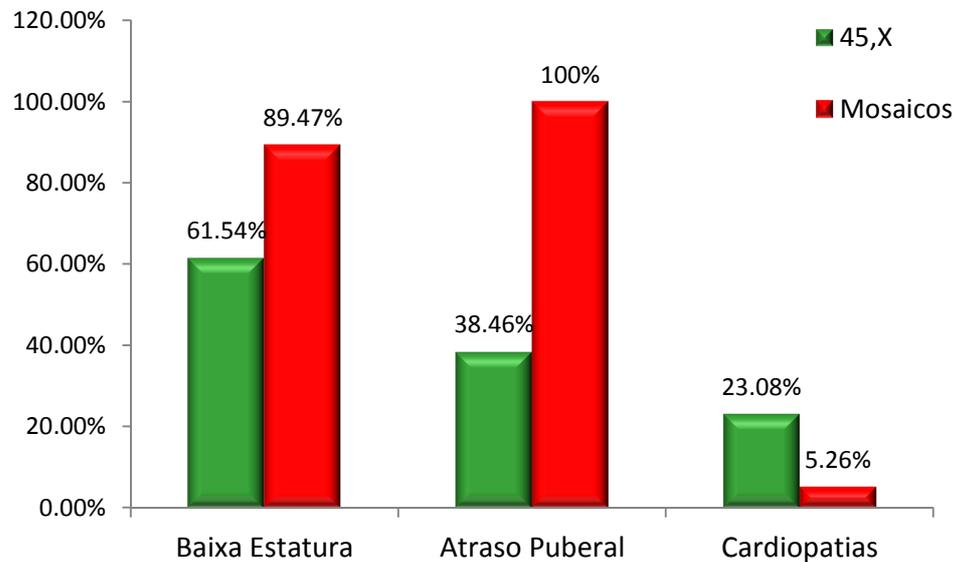


Figura 6. Frequência de baixa estatura, atraso puberal e cardiopatias de acordo com o cariótipo.

Diversos sinais dismórficos relacionados com a ST foram descritos, como baixa implantação dos cabelos na nuca, tórax em escudo, hipertelorismo mamário, pregas epicânticas, encurtamento dos metacarpos, palato em ogiva. Entretanto os sinais clínicos mais prevalentes foram pescoço curto e/ou alado presente em 48,9% dos casos, unhas hipoplásicas e de implantação profunda (35,55%), que exibiram uma maior frequência nas pacientes 45,X e cúbito valgo (26,67%), o qual se mostrou mais frequente nos mosaicos (Fig. 7). Dados clínicos incomuns e geralmente não associados a ST incluíram a ectrodactilia nos pés e sindactilia total exibida por uma paciente com cariótipo 46,X,i(Xq)/45,X.

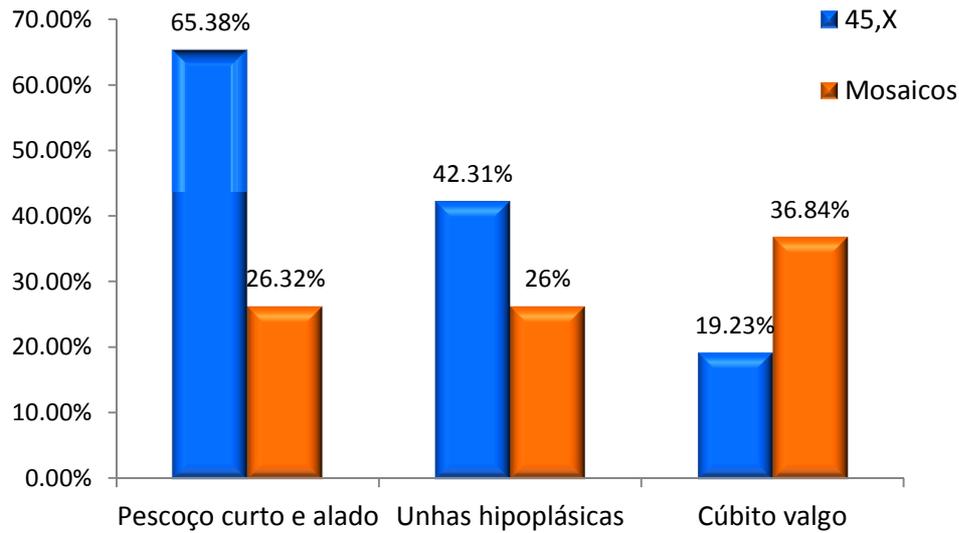


Figura 7. Frequência dos sinais dismórficos de acordo com o cariótipo.

5.2 Metabolismo do folato e o risco na não-disjunção

Os polimorfismos dos genes *MTHFR* e *TS* foram avaliados em 51 pacientes com ST, entretanto para o gene *MS* esta análise abrangeu apenas 49 pacientes, pois em duas pacientes este gene não foi amplificado devido a problemas técnicos na PCR. No grupo controle, a avaliação de todos os polimorfismos incluídos neste estudo foi realizada em 70 indivíduos do sexo feminino. As distribuições alélicas e genotípicas de pacientes e controles mostraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg para todos os genes avaliados.

5.2.1 Frequências alélicas

As frequências alélicas dos genes *MTHFR*, *MS* e *TS* das pacientes e controles estão descritas na tabela 4. As frequências do alelo mutante *MTHFR* 677T foram 0,2255 nas pacientes com ST e 0,3857 nos controles. Esses dados mostram uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0058$), atribuída a frequência mais elevada do alelo mutado (677T) nos controles. Por outro lado, para os alelos *MTHFR* 1298C, *MS* 2756G e repetições *em tandem* *TS* 3R/2R, as frequências não foram significativamente diferentes entre pacientes ST e controles.

Tabela 4. Números e frequências dos alelos para os genes *MTHFR*, *MS* e *TS* nas pacientes com ST e controles, com destaque para os alelos mutantes.

Alelo	Paciente ST N (%)	Controle N (%)	p do Fisher	Alelo mutante	Frequência Alélica	
					Paciente ST	Controle
<i>MTHFR</i> C677T						
C	79 (77,45)	86 (61,43)	0,0058	677T	0,2255	0,3857
T	23 (22,55)	54 (38,57)				
<i>MTHFR</i> A1298C						
A	83 (81,37)	105 (75)	0,154	1298C	0,1863	0,25
C	19 (18,63)	35 (25)				
<i>MS</i> A2756G						
A	82 (83,67)	117 (83,57)	0,565	2756G	0,1633	0,1643
G	16 (16,33)	23 (16,43)				
Repetições <i>TS</i>						
3R	64 (62,75)	81 (57,86)	0,2636	2R	0,3725	0,4214
2R	38 (37,25)	59 (42,14)				

5.2.2 Polimorfismo no gene *MTHFR* e o risco na não-disjunção

Os dados na tabela 5 mostram que as frequências dos genótipos CC, CT e TT do gene *MTHFR* entre as portadoras da ST foram 62,8%, 29,4% e 7,8%. As frequências correspondentes entre os controles foram 34,3%, 54,3% e 11,4%. A presença da substituição 677C→T em um ou dois alelos também foi avaliada, estando presente em 37,2% das pacientes e 65,7% dos controles. O teste do qui-quadrado de heterogeneidade mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as frequências genotípicas das pacientes e controles ($p = 0,0078$), que são atribuídas a uma maior prevalência do alelo mutante 677T no grupo controle. O *odds ratio* (OR) para o genótipo heterozigoto C/T foi 0,29 (95% IC 0,13 – 0,66), enquanto para o homozigoto TT foi 0,37 (95% IC 0,10 – 1,39). A análise combinada dos genótipos com alelo mutante resultou no OR de 0,31 (95% IC 0,15 – 0,66). Esses resultados reafirmam que não houve um risco significativo associado polimorfismo *MTHFR* C677T.

Em relação a substituição 1298A→C do *MTHFR*, a distribuição dos genótipos nas pacientes com ST foi 64,7% para os homozigotos selvagens (AA), 33,3% para os heterozigotos (AC) e 2% para os homozigotos recessivos (CC). As frequências

correspondentes dos genótipos AA, AC e CC nos controles foram 55,7%, 38,6% e 5,7%, respectivamente (Tabela 5). A análise combinada dos genótipos mutantes (AC+CC) apresentou a frequência de 35,3% nas pacientes e 44,3% nos controles. Apesar de uma maior prevalência do alelo mutante 1298C nos controles, esta diferença não se apresentou estatisticamente significativa, de acordo com o teste G de heterogeneidade ($p = 0,4428$). O teste do OR foi realizado como uma segunda abordagem estatística que reforça a ausência de associação ou risco do polimorfismo *MTHFR* A1298C com a não-disjunção somática na ST (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição genotípica dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MS* A2756G e as repetições 3R/2R do *TS*.

Genótipo	Pacientes ST N (%)	Controle N (%)	χ^2 / G	p do χ^2 / G	OR (95% IC)	p do OR
<i>MTHFR</i> 677						
CC	32 (62,8)	24 (34,3)			1,0 Referência	
CT	15 (29,4)	38 (54,3)	9,71*	0,0078*	0,29 (0,13 - 0,66)	0,004
TT	4 (7,8)	8 (11,4)			0,37 (0,10 - 1,39)	0,24
CT+TT	19 (37,2)	46 (65,7)			0,31 (0,15 - 0,66)	0,003
<i>MTHFR</i> 1298						
AA	33 (64,7)	39 (55,7)			1,0 Referência	
AC	17 (33,3)	27 (38,6)	1,72	0,4428	0,74 (0,35 - 1,57)	0,5712
CC	1 (2)	4 (5,7)			0,29 (0,03 - 2,77)	0,5095
AC+CC	18 (35,3)	31 (44,3)			0,68 (0,33 - 1,14)	0,4194
<i>MS</i> 2756						
AA	36 (73,5)	50 (71,4)			1,0 Referência	
AG	10 (20,4)	17 (24,3)	0,4	0,8189	0,82 (0,33 - 1,99)	0,8255
GG	3 (6,1)	3 (4,3)			1,39 (0,26 - 7,28)	0,9704
AG+GG	13 (26,5)	20 (28,7)			0,9 (0,4 - 2,05)	0,9707
Repetições <i>TS</i>						
3R/3R	19 (37,2)	26 (37,2)			1,0 Referência	
3R/2R	26 (51)	29 (41,4)	2,18*	0,3362*	1,23 (0,55 - 2,71)	0,7619
2R/2R	6 (11,8)	15 (21,4)			0,55 (0,18 - 1,67)	0,4281
3R/2R+2R/2R	32 (62,7)	44 (62,8)			1,0 (0,47 - 2,1)	0,8588

* Casos que o teste do χ^2 foi aplicado.

5.2.3 Polimorfismo no gene *MS* e o risco na não-disjunção

A distribuição genotípica do *MS* nas pacientes foi 73,5% para os homozigotos selvagem (AA), 20,4% para o genótipo heterozigoto (AG) e 6,1% para os homozigotos recessivos (GG). Para os controles, as frequências genotípicas foram 71,4%, 24,3% e 4,3% para os genótipos AA, AG e GG, respectivamente (Tabela 5). O polimorfismo 2756A→G em um ou dois alelos esteve presente em 26,5% das pacientes e 28,7% dos controles. A frequência do genótipo mutante GG foi maior nas portadoras da ST quando comparada aos controles, porém o teste G de heterogeneidade mostrou que esta diferença não foi significativa ($p = 0,8189$). Além disso, esta mutação não foi associada com um aumento significativo de risco na não-disjunção (OR 1,39; 95% IC 0,26 – 7,28; $p = 0,9704$).

5.2.4 Polimorfismo no gene *TS* e o risco na não-disjunção

As repetições *em tandem* no promotor do gene *TS*, 3R/3R, 3R/2R e 2R/2R apresentaram as frequências de 37,2%, 51% e 11,8%, respectivamente, na amostra com ST. As frequências correspondentes nos controles foram 37,2% para as repetições 3R/3R, 41,4% para 3R/2R e 21,4% 2R/2R (Tabela 5). A análise combinada das repetições do promotor (3R/2R+2R/2R) mostrou uma frequência de 62,7% nos pacientes e 62,8% nos controles. As repetições em estado heterozigoto 3R/2R foram mais prevalentes nas portadoras da ST quando comparadas com o grupo controle, entretanto este resultado não foi estatisticamente significativo pelo teste do qui-quadrado ($p = 0,3362$), e não apresentou um aumento significativo no risco associado, com valor de OR 1,23 (95% IC 0,55 – 2,71; $p = 0,7619$).

5.2.5 Interação gene-gene e o risco na não-disjunção

Para avaliar uma potencial interação entre os genes, todas as possíveis combinações entre os polimorfismos dos genes *MTHFR* (C677T e A1298C), *MS* (A2756G) e *TS* (repetições 3R/2R) foram analisados em tabela dois x quatro, como sugerido por Botto & Mastroiacovo (1998). Utilizando esta abordagem é possível avaliar o risco associado a cada genótipo independente, bem como estimar o risco combinado quando ambos os polimorfismos estão presentes. A tabela 6 mostra a

análise com a presença dos genótipos mutantes combinados para todos os genes estudados, por outro lado, a tabela 7 apresenta os resultados da influência de cada polimorfismo individualmente, com enfoque nos genótipos que possuem um ou dois alelos mutantes.

Tabela 6. Interação gene-gene entre os genótipos combinados dos genes *MTHFR* (C677T e A1298C), *MS* (A2756G) e *TS* (3R/2R).

Genótipo		Pacientes ST N (%)	Controle N (%)	OR (95%CI)	p do OR
<i>MTHFR</i> 677 <i>MTHFR</i> 1298					
CC	AA	17 (33,3)	7 (10)	1,0 Referência	
CC	AC+CC	15 (29,41)	17 (24,29)	0,36 (0,11 - 1,11)	0,1285
CT+TT	AA	16 (31,37)	32 (45,71)	0,21 (0,07 - 0,59)	0,0058
CT+TT	AC+CC	3 (5,88)	14 (20)	0,05 (0,01 - 0,22)	<0,0001
<i>MTHFR</i> 677 <i>MS</i> 2756					
CC	AA	20 (39,21)	13 (18,57)	1,0 Referência	
CC	AG+GG	10 (19,61)	9 (12,86)	0,72 (0,23 - 2,26)	0,7879
CT+TT	AA	16 (31,37)	35 (50)	0,29 (0,11 - 0,74)	0,0156
CT+TT	AG+GG	3 (5,88)	10 (14,29)	0,19 (0,04 - 0,84)	0,0404
<i>MTHFR</i> 677 Repetições <i>TS</i>					
CC	3R/3R	12 (25,53)	8 (11,43)	1,0 Referência	
CC	3R/2R+2R/2R	20 (39,22)	16 (22,86)	0,83 (0,27 - 0,52)	0,9679
CT+TT	3R/3R	7 (13,73)	18 (25,71)	0,26 (0,07 - 0,9)	0,0635
CT+TT	3R/2R+2R/2R	12 (23,53)	28 (40)	0,28 (0,09 - 0,87)	0,0504
<i>MTHFR</i> 1298 <i>MS</i> 2756					
AA	AA	25 (49,1)	31 (44,28)	1,0 Referência	
AA	AG+GG	7 (13,73)	8 (11,43)	1,08 (0,35 - 3,4)	0,879
AC+CC	AA	11 (21,57)	18 (25,71)	0,75 (0,3 - 1,9)	0,7172
AC+CC	AG+GG	6 (11,76)	11 (15,71)	0,67 (0,23 - 1,97)	0,687
<i>MTHFR</i> 1298 Repetições <i>TS</i>					
AA	3R/3R	12 (23,53)	14 (20)	1,0 Referência	
AA	3R/2R+2R/2R	21 (41,18)	25 (35,71)	0,98 (0,37 - 2,57)	0,8374
AC+CC	3R/3R	7 (13,73)	12 (17,14)	0,68 (0,2 - 2,28)	0,7496
AC+CC	3R/2R+2R/2R	11 (21,57)	19 (27,14)	0,67 (0,23 - 1,97)	0,6546
<i>MS</i> 2756 Repetições <i>TS</i>					
AA	3R/3R	15 (29,41)	19 (27,14)	1,0 Referência	
AA	3R/2R+2R/2R	21 (41,18)	29 (41,43)	0,91 (0,38 - 2,21)	0,9744
AG+GG	3R/3R	4 (7,84)	6 (8,57)	0,84 (0,2 - 3,54)	0,8949
AG+GG	3R/2R+2R/2R	9 (17,65)	13 (18,57)	0,88 (0,29 - 2,59)	0,9685

Tabela 7. Interação gene-gene entre os genótipos isolados dos genes *MTHFR* (C677T e A1298C), *MS* (A2756G) e *TS* (3R/2R).

Genótipo		Pacientes ST N (%)	Controle N (%)	OR (95%CI)	p do OR
<i>MTHFR</i> 677 <i>MTHFR</i> 1298					
CC	AA	17 (33,3)	7 (10)	1,0 Referência	
CT	AC	3 (5,88)	13 (18,57)	0,095 (0,02 - 0,44)	0,0037
CT	CC	0 (-)	1 (1,43)	0 (-)	
TT	AC	0 (-)	0 (-)	0 (-)	
TT	CC	0 (-)	0 (-)	0 (-)	
<i>MTHFR</i> 677 <i>MS</i> 2756					
CC	AA	20 (39,21)	13 (18,57)	1,0 Referência	
CT	AG	0 (-)	7 (10)	0 (-)	
CT	GG	1 (1,96)	1 (1,43)	0,65 (-)	0,6556
TT	AG	2 (3,92)	2 (2,86)	0,65 (-)	0,8957
TT	GG	0 (-)	0 (-)	0 (-)	
<i>MTHFR</i> 677 Repetições <i>TS</i>					
CC	3R/3R	12 (25,53)	8 (11,43)	1,0 Referência	
CT	3R/2R	9 (17,65)	16 (22,86)	0,37 (0,11 - 1,26)	0,1926
CT	2R/2R	1 (1,96)	5 (7,14)	0,13 (0,01 - 1,36)	0,1626
TT	3R/2R	1(1,96)	2 (2,86)	0,33 (-)	0,807
TT	2R/2R	1(1,96)	3 (4,28)	0,22 (-)	0,4637
<i>MTHFR</i> 1298 <i>MS</i> 2756					
AA	AA	25 (49,1)	31 (44,28)	1,0 Referência	
AC	AG	5 (9,8)	8 (11,43)	0,77 (0,22 - 2,66)	0,9247
AC	GG	1(1,96)	1 (1,43)	1,24 (-)	0,5661
CC	AG	0 (-)	0 (-)	0 (-)	
CC	GG	0 (-)	2 (2,86)	0 (-)	
<i>MTHFR</i> 1298 Repetições <i>TS</i>					
AA	3R/3R	12 (23,53)	14 (20)	1,0 Referência	
AC	3R/2R	11 (21,57)	12 (17,14)	1,07 (0,35 - 3,29)	0,8652
AC	2R/2R	0 (-)	5 (7,14)	0 (-)	
CC	3R/2R	0 (-)	0 (-)	0 (-)	
CC	2R/2R	0 (-)	2 (2,86)	0 (-)	
<i>MS</i> 2756 Repetições <i>TS</i>					
AA	3R/3R	15 (29,41)	19 (27,14)	1,0 Referência	
AG	3R/2R	5 (9,8)	8 (11,43)	0,79 (0,21 - 2,92)	0,9832
AG	2R/2R	2 (3,92)	3 (4,28)	0,84 (-)	0,7569
GG	3R/2R	2(3,92)	1 (1,43)	2,53 (-)	0,8831
GG	2R/2R	0 (-)	1 (1,43)	0 (-)	

Os valores do OR indicam que ambas as abordagens também não conferiam risco significativo às pacientes com ST associado ao processo de não-disjunção somática, demonstrando que neste estudo também não foi evidenciada uma potencial

interação entre os genes do metabolismo do folato modulando o risco de erros na segregação cromossômica desta síndrome.

Outra importante abordagem para avaliar a relação gene-gene, que permite estimar a interação simultânea de todos os genes analisados, é o teste para verificar a possível associação entre o número de alelos polimórficos por indivíduo para os quatro loci estudados, entre pacientes e controles, e a ocorrência de não-disjunção. A proporção de alelos polimórficos por indivíduo está representada na tabela 8. O teste Mann-Whitney indicou que existe diferença significativa ($p = 0.0089$) na composição do número de alelos polimórficos entre as pacientes com ST e controles, resultante de uma maior frequência nos controles a partir de três alelos polimórficos (Tabela 8), entretanto as medianas do grupo com ST e controles foram iguais ($Md = 2$). Esses dados demonstram que a relação entre o número de alelos mutantes dos genes *MTHFR*, *MS* e *TS* não representa um aumento no risco de não disjunção somática na ST, que também pode ser confirmado pelo OR 0,26 (95% IC 0,11 – 0,56 $p = 0,001$).

Tabela 8. Comparação entre o número de alelos 677T, 1298C, 2756G e 2R por indivíduo nas pacientes e controles.

	Número de Alelos Polimórficos por indivíduo						
	0	1	2	3	4	5	6
Casos ST N	5	13	20	9	4	0	0
(%)	(9,8)	(25,49)	(39,22)	(17,65)	(7,84)	(0)	(0)
Controle N	2	12	26	17	10	2	1
(%)	(2,86)	(17,14)	(37,14)	(24,28)	(14,28)	(2,86)	(1,43)

6. DISCUSSÃO

6.1 Estudo citogenético e associação fenotípica

A síndrome de Turner (ST) é uma doença crônica relacionada com a ausência ou alteração de um cromossomo sexual, causando a haploinsuficiência de genes envolvidos no desenvolvimento e na manutenção da função ovariana em pacientes com fenótipo feminino (FÉNICHEL & LETUR, 2008). Esta síndrome está envolvida em uma grande variedade de malformações com frequências variáveis relacionadas principalmente ao tipo de rearranjo cromossômico. Assim, o quadro clínico da ST apresenta uma ampla variabilidade de características fenotípicas que podem ser comuns a outras doenças e fatores etiológicos distintos, evidenciada neste estudo pela alta frequência (51,82%) de pacientes com suspeita clínica da ST e cariótipos normais ou com alterações cromossômicas não relacionadas a esta síndrome.

Para as pacientes diagnosticadas citogeneticamente normais neste trabalho, é importante uma análise clínica mais cuidadosa dos sinais que levaram a indicação da ST, uma vez que, diante de um quadro clínico extremamente indicativo, é importante investigar a possibilidade das pacientes serem mosaicos não detectados, pois o mosaicismo é identificado em apenas 30-40% dos casos através do cariótipo (HANSON et al., 2001). A identificação de mosaicismo depende do número de células analisadas, do tipo e número de tecidos estudados, além da sensibilidade do método (BINDER et al., 1995). Adicionalmente, o uso de técnicas moleculares como hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e PCR melhoram substancialmente a detecção de células de baixa frequência e possíveis alterações estruturais (OLIVEIRA et al., 2008).

A baixa estatura e outras alterações esqueléticas observadas nas pacientes com cariótipo normal podem estar relacionadas a deleções terminais no braço curto do cromossomo X, não detectadas pela análise citogenética clássica, que levam a monossomia do gene *SHOX*. Em um estudo citogenético, Viguetti & Maciel-Guerra (1994) mostraram que uma em cada oito meninas com baixa estatura e bom desenvolvimento neuropsicomotor, independente da presença de sinais dismórficos, apresentaram diagnóstico de ST, confirmando a importância da busca dessa síndrome em meninas com estatura abaixo da média.

Esta falha no crescimento, bem como outras alterações esqueléticas (palato alto, quarto metacarpo curto, cúbito valgo, pescoço curto) encontradas em portadoras da ST, é devida a haploinsuficiência do gene *SHOX*, porém, pacientes portadoras de deleção neste gene são classificadas com ST apenas quando a perda é proximal a junção entre Xp22.2 e Xp22.3 (SAENGER et al., 2001). Além disso, vários fatores têm sido associados à baixa estatura, como mutações em genes responsáveis por secreção, liberação e resposta ao hormônio do crescimento. O crescimento é determinado por um padrão de herança multifatorial, havendo interação de fatores genéticos e ambientais. Cerca de 3% das crianças que apresentam estatura abaixo da média populacional para idade e sexo não têm um fator etiológico reconhecido e são classificadas como portadoras de baixa estatura idiopática (BEI) (ATTIE, 2000).

No presente estudo, o atraso no desenvolvimento puberal foi o segundo estigma mais importante, observado com alta frequência tanto nas pacientes com cariótipo normal quanto nas portadoras da ST. De acordo com D'Agostini et al. (2005), deve-se considerar a realização do cariótipo em pacientes sem desenvolvimento das mamas até os 13 anos, com parada puberal e amenorreia primária para excluir a ST. Embora a falência gonadal e o atraso no desenvolvimento puberal estejam associados a ST, os distúrbios gonadais podem ser causados por outras alterações cromossômicas, como translocações, mosaicismos, mutações ou deleções envolvendo os genes *SRY*, *SOX9*, *SF-1*, *WT1*, rearranjos no cromossomo X e no DNA mitocondrial, como também a determinantes poligênicos e multifatoriais (BADALOTTI et al., 2006). A disfunção ovariana também pode ser causada por diminuição, atresia ou apoptose dos folículos primordiais que resulta na perda da fertilidade e hipoestrogenismo. A etiologia é complexa e inclui fatores genéticos, imunes (falência poliglandular), infecciosos (ooforites) e metabólicos (galactosemia) (BADALOTTI et al., 2006).

Em relação as análise citogenéticas, nosso trabalho corrobora, de modo geral, com os dados descritos na literatura que relatam uma frequência de monossomia do X entre 50% a 60%, alterações estruturais acompanhadas ou não de mosaicismos com uma linhagem 45,X em aproximadamente 30% e presença do cromossomo Y em 5% dos casos (GRAVHOLT et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2009). Entretanto, apenas uma paciente, ou seja, 1,9% da amostra, obteve o cariótipo 45,X/46,XX apesar de mosaicismos com linhagem celular normal (46,XX) serem

descritos em 15 a 17% das portadoras de ST (GRAVHOLT, 2005; SCHOEMAKER et al., 2008).

Alguns estudos mostram um diagnóstico mais precoce nos casos de monossomia, também demonstrado em nosso trabalho (SYBERT et al., 2002; ELLEUCH et al., 2010). Sybert et al. (2002) observaram que 25% das portadoras mosaicos são diagnosticadas apenas na idade adulta. No presente estudo, 21% dos mosaicos foram diagnosticados na fase adulta, enquanto apenas 13,3% das pacientes com monossomia do X receberam o diagnóstico nesta fase, estando grande parte dos casos (36,7%) o cariótipo 45,X estabelecido precocemente, antes de dois anos de idade. De acordo com Hanson et al. (2001) o tipo e o grau de mosaicismo parecem afetar o prognóstico, a ocorrência e morbidade dos estigmas de Turner. De maneira geral, os indivíduos 45,X apresentam uma tendência a fenótipos mais severos e as formas de mosaicos modificam a expressão clínica em direção ao fenótipo normal diminuindo a possibilidade do diagnóstico precoce (SAENGER et al., 2001; DAVENPORT, 2010).

O isocromossomo (Xq) foi o rearranjo estrutural mais encontrado nos casos de ST afetando 22,64% das portadoras. Uma vez que a maioria dos genes responsável pelo fenótipo Turner está localizado no braço curto, o cariótipo 46,X,i(Xq) apresentou um fenótipo similar ao 45,X, com exceção da paciente 33 (Tabela 3) que exibiu sinais fenotípicos incomuns a ST como ectrodactilia nos pés e sindactilia total. Alguns autores têm sugerido que a ocorrência do i(Xq) pode induzir ao hipotireoidismo ou diabetes por autoimunidade, devido à presença aumentada de anticorpos, além da probabilidade de 11-12% de desenvolver cardiopatias (ELMANSOURY et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009), porém esta associação não foi encontrado neste estudo.

A disgenesia gonadal na ST é devida à haploinsuficiência dos genes envolvidos na manutenção ovariana, localizados no braço longo do cromossomo X Xq26 (*FOP1*) e Xq13-21 (*FOP2*), em contraste, deleções distais do braço curto são compatíveis com uma função ovariana normal (DAVISON et al., 2000; PIENKOWSKI et al., 2008). Embora no i(Xq) os genes da função ovariana permaneçam ativos, as pacientes 41 e 42 exibiram distúrbios gonadais, o que pode ser atribuído a um mosaicismo confinado as gônadas.

A presença do cromossomo X em anel (r(X)) está associada ao retardo mental e sinais dismórficos severos em algumas pacientes com ST. O tamanho

relativo deste cromossomo é de extrema importância para se determinar a extensão do efeito fenotípico. Em um estudo sobre retardo mental em 190 indivíduos com ST, Van Dyke et al. (1991) relataram que as portadoras de $r(X)$ com tamanho semelhante ao X normal apresentaram inteligência nos padrões normais devido a conservação do $XIST$. Esses autores inferiram que o risco de retardo mental está associado aos menores $r(X)$ devido ao excesso gênico resultante da ausência de inativação. Duas pacientes (46 e 47) apresentaram cariótipos $46,X,r(X)/45,X$ e a presença de alterações clínicas características da ST na paciente 46 indica uma inativação eficiente do cromossomo em anel. Os achados clínicos da paciente 47 estavam indisponíveis, impossibilitando assim a correlação com os dados citogenéticos.

O padrão de inteligência é considerado normal em pacientes com ST, porém algumas dificuldades específicas de aprendizagem são relatadas (ROVET, 2004). Entretanto, as pacientes 10 e 31 apresentaram retardo mental associado aos cariótipos $45,X$ e $46,Xi(Xq)/45,X$. O retardo mental na ST está relacionado com a preservação da atividade do $r(X)$, assim, o cromossomo X em anel inativado é associado a inteligência normal (ROSS et al., 2006). Dessa forma, a deficiência mental nestas pacientes é um achado incomum, e sua etiologia pode estar ligada a fatores genéticos ainda não elucidados como mosaicismos ocultos e outros distúrbios gênicos.

Cardiopatias congênitas, consideradas o problema clínico mais grave, ocorrem em aproximadamente 25 a 50% das portadoras de ST. Entre as quais, defeitos obstrutivos do lado esquerdo são predominantes, especialmente válvula aórtica bicúspide e coarctação da aorta (BONDY, 2009; DAVENPORT, 2010). Os adultos com ST possuem uma taxa de mortalidade prematura 4 a 5 vezes maior, o que é atribuído principalmente às complicações de doenças cardíacas congênitas (STOCHHOLM et al., 2006). Como a expressão fenotípica em pacientes com ST está correlacionada com o genótipo apresentado, geralmente indivíduos $45,X$ apresentam uma maior prevalência de anomalias cardíacas quando comparados com aqueles que possuem mosaicismos (LANDIN-WILHELMSSEN et al., 2001; HJERRILD et al., 2008). Apesar da baixa frequência de alterações cardiológicas (15,56%), nosso estudo reforça a relação de maior comprometimento cardíaco relacionado a monossomia do X (Fig. 6), demonstrando que essa linhagem celular exerce um importante papel no prognóstico dessa síndrome.

As pacientes 48 e 49 apresentaram características clínicas típicas da ST, como baixa estatura, amenorreia primária e outros pequenos distúrbios, e a análise citogenética revelou os cariótipos 46,X,dup(Xq)/45,X e 46,X,dup(Xq), respectivamente. A ST consiste em um dos mais prevalentes distúrbios cromossômicos humano, sendo o critério mínimo de diagnóstico a presença de um cariótipo anormal, em que parte ou todo cromossomo X está ausente. Por outro lado, duplicações do X em pacientes com ST são alterações cromossômicas raras.

Duplicações envolvendo o cromossomo X são infrequentes e ocorrem predominantemente em homens estando associadas a anormalidades congênitas múltiplas e atraso no desenvolvimento (CHENG et al., 2005). Poucos relatos têm sido descritos em mulheres e o fenótipo geralmente inclui atraso do crescimento e desenvolvimento, baixa estatura e menores distúrbios (ARMSTRONG et al., 2003; CHENG et al., 2005). Fatores vistos com menos frequência associados a duplicação (Xq) são assimetria do corpo, pés e mãos pequenas, disgenesia gonadal e outras características da ST. Como nas mulheres o cromossomo X derivado é preferencialmente inativado, a maioria das portadoras de dup(Xq) geralmente são fenotipicamente normais (PETKOVIC et al., 2003).

A relação entre fenótipo e dup(Xq) em fêmeas ainda não está clara, alguns autores sugerem que a característica que diferencia mulheres, portadoras de duplicações semelhantes no cromossomo X, fenotipicamente normais daquelas com fenótipo alterado é o status diferencial de inativação do material genético presente em excesso (ARMSTRONG et al., 2003). Portanto, a presença de alterações clínicas na paciente 49 (46,X,dup(Xq)) pode estar ligado a uma inativação irregular do cromossomo duplicado, em contraste, os estigmas de Turner presentes na paciente 48 podem ser atribuídos a linhagem 45,X e a inativação preferencial do cromossomo X derivado.

Clinicamente, em contraste com outras síndromes cromossômicas, as pacientes com ST apresentaram fenótipos completamente distintos inclusive as 45,X. Mesmo a baixa estatura, considerada uma característica geral, apresentou-se inconsistente em relação a frequência relatada na literatura. Uma das explicações para esse fato pode ser a presença de mosaïcismo não detectado. Nazarenko et al. (1999) observaram que a análise citogenética dos linfócitos pode não fornecer informações precisas sobre a presença de mosaïcismo cromossômico em pacientes com ST. Esses autores observaram uma constituição cromossômica distinta em

diferentes tecidos do mesmo indivíduo, e inferiram que a análise adicional de células oriundas de tecidos com origens embrionárias distintas (linfócitos do mesoderma e células do epitélio bucal do ectoderma) permitem uma maior precisão na definição do diagnóstico citogenético. Em adição ao mosaicismo oculto, outros fatores afetando o fenótipo ainda não foram completamente elucidados, incluindo *imprinting* genômico e inativação irregular, dificultando o diagnóstico e a correlação genética (ARAÚJO & RAMOS, 2008).

Os resultados citogenéticos neste trabalho permitiram estabelecer o diagnóstico para cada paciente analisada, determinando a presença da ST ou de outras alterações cromossômicas que levaram ao quadro clínico. As relações entre as manifestações clínicas e genotípicas nas pacientes com ST foram essenciais para um diagnóstico precoce, tornando-se fundamental para que a paciente receba o direcionamento do tratamento adequado. Assim, as portadoras da ST poderão usufruir uma qualidade de vida satisfatória, melhorando seu desenvolvimento psicológico e social.

6.2 Metabolismo do folato e o risco na não-disjunção

Folatos são essenciais para processos biossintéticos de um carbono e epigenéticos, sendo requeridos na síntese de nucleotídeos e nas reações de metilação do DNA. Deficiências de folato celular resultam em mutações de ponto, quebras cromossômicas, padrão aberrante de metilação do DNA, recombinação cromossômica alterada e erros de segregação cromossômica (POGRIBNY et al., 1995; XU et al., 1999; FENECH, 2001; COPPEDÈ, 2009). Com base nestas evidências, James et al. (1999) sugeriram pela primeira vez que alterações no metabolismo do folato, devido a polimorfismos genéticos que alteram as enzimas metabólicas, e hipometilação podem aumentar o risco de não-disjunção cromossômica. Esta publicação estimulou considerável investigação sobre a possível associação do folato na segregação cromossômica e, apesar de muitos estudos nesta área, os resultados são frequentemente conflitantes ou inconclusivos, assim a questão ainda permanece não resolvida (ANELLO et al., 2004; SMULDERS & STEHOUWER, 2005; COPPEDÈ, 2009; ZHAO et al., 2009).

No presente estudo foi verificada a possível associação entre o risco de não-disjunção cromossômica somática e os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MS* e *TS*, envolvidos no metabolismo do ácido fólico na ST. Esta síndrome pode ser um importante modelo de investigação para os polimorfismos dos genes da rota do folato e a não-disjunção cromossômica somática devido a alta frequência de mosaicismo nestas pacientes (SANTOS et al., 2006). Dados da literatura demonstram que a presença de um segundo cromossomo sexual é necessária para sobrevivência do feto com ST. Dessa forma, virtualmente todo indivíduo 45,X nascido vivo deve apresentar mais de uma linhagem celular, constituindo assim, um mosaico (HELD et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2009). Esta hipótese é baseada na frequência bem maior de mosaicismo cromossômico nas recém-nascidas vivas com ST quando comparadas com fetos abortados. Além disso, aproximadamente 99% das concepções humanas puramente 45,X são naturalmente abortadas nos primeiros estágios do desenvolvimento (HELD et al., 1992; ARAÚJO & RAMOS, 2008).

Até a presente data, apenas dois trabalhos avaliaram a influência dos polimorfismos C677T e A1298C do gene *MTHFR* na ST, apresentando resultados conflitantes. Santos et al. (2006) estudaram 49 pacientes com ST e 200 controles, e encontraram uma alta frequência do genótipo 677TT no grupo de portadoras da ST, estes autores concluíram que a mutação *MTHFR* C677T deve ter um efeito na não-disjunção cromossômica por hipometilação.

O segundo trabalho, realizado por Oliveira et al. (2008), que incluiu 140 pacientes com ST e 209 controles, não observou associação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e a não-disjunção. Entretanto, este estudo evidenciou uma maior frequência do genótipo *MTHFR* 1298CC nas pacientes com ST, sugerindo seu envolvimento na formação das aneuploidias cromossômicas. Em contraste com os resultados anteriormente reportados para ST, o presente trabalho não observou associação entre o risco de não-disjunção somática e os polimorfismos do gene *MTHFR*. Além disso, nosso estudo avalia pela primeira vez a influencia dos alelos polimórficos dos genes *MS* e *TS*, bem como uma possível interação entre os genes da rota do folato e o processo de não-disjunção na ST.

Diversos estudos têm avaliado a função dos polimorfismos do gene *MTHFR* como fator de risco para as aneuploidias cromossômicas, especialmente na síndrome de Down. O polimorfismo *MTHFR* 677C→T se mostrou um fator de risco

independente para SD nas populações dos Estados Unidos e Canadá, Egito e China (JAMES et al., 1999; HOBBS et al., 2000; MEGUID et al., 2008; WANG et al., 2008). Por outro lado, nenhum estudo realizado na Europa (O'LEARY et al., 2002; STUPPIA et al., 2002; COPPEDÈ et al., 2009; POZZI et al., 2009), Turquia ou Japão (BODUROGLU et al., 2004; TAKAMURA et al., 2004) relacionou este polimorfismo como fator de risco independente. O contraste destes resultados podem ser devido à heterogeneidade genética entre as populações, amostras de tamanhos diferentes ou influência de fatores ambientais, como a dieta (COPPEDÈ et al., 2006).

No Brasil, os resultados obtidos em diferentes estudos com SD e ST têm sido contraditórios. Alguns trabalhos evidenciaram associação entre o polimorfismo *MTHFR* C677T e o risco de não-disjunção (GRILLO et al., 2002; da SILVA et al., 2005; SANTOS et al., 2006; BRANDALIZE et al., 2009), enquanto outros não conseguiram demonstrar esta relação (BISELLI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2008).

O polimorfismo *MTHFR* 1298A→C tem sido estudado menos extensivamente que o *MTHFR* 677C→T. A primeira associação entre o alelo 1298C e o risco de SD foi descrita por Grillo et al. (2002) na população brasileira, os autores também observaram uma interação entre os polimorfismos C677T e A1298C aumentando o risco de SD. Oliveira et al. (2008) também mostraram a influência do polimorfismo *MTHFR* 1298A→C associada ao risco de erros na segregação cromossômica da ST. Diferentes estudos realizados no Brasil sugerem que a combinação dos polimorfismos do gene *MTHFR*, pode exercer uma função na ocorrência das aneuploidias cromossômicas (GRILLO et al., 2002; ACÁCIO et al., 2005; BRANDALIZE et al., 2009). Nosso trabalho corrobora com os dados da literatura que não relacionaram os polimorfismos 677C→T e 1298A→C do gene *MTHFR*, isolados ou combinados, como fatores de risco para as aneuploidias cromossômicas.

Um desequilíbrio de ligação (DL) entre os alelos *MTHFR* 677T e 1298C tem sido reportado (STEGMANN et al., 1999; SHI et al., 2003), entretanto este DL não é completo, uma vez que alguns estudos observaram frequências abaixo de 0,005 do haplótipo raro 677T-1298C (YAMADA et al., 2001; SCALA et al., 2006). Em nosso estudo, do total de 121 mulheres genotipadas incluindo pacientes e controles, nenhuma exibiu o genótipo 677TT/1298CC e apenas uma apresentou genótipo com três mutações 677CT/1298CC (Tabela 7), confirmando a seleção negativa deste haplótipo. Uma explicação biológica para a existência deste DL que existe entre os dois polimorfismos do gene *MTHFR* foi sugerida por Ulvik et al. (2007). Estes

autores inferiram que a estabilidade do dímero que compõe a enzima MTHFR depende dos aminoácidos presentes nas posições 222 e 429, resultantes dos polimorfismos 677 e 1298, assim, a presença de mais de duas mutações nesta combinação de genótipos resulta em severa instabilidade enzimática, pois compromete a associação dos monômeros da enzima.

A primeira evidência de uma possível contribuição do polimorfismo *MS* 2756A→G surgiu quando Bosco et al. (2003) avaliaram o risco de não-disjunção para SD na população da Sicília. Esses autores relataram que os genótipos *MS* 2756AG e 2756GG foram fatores de risco significantes para esta síndrome. Contudo, estudos subsequentes realizados em diferentes países, incluindo França, Itália e Brasil, não observaram esta associação (CHANGO et al., 2005; SCALA, et al., 2006; BISELLI et al., 2008). Em um estudo conduzido na Itália, Coppedè et al. (2009) observaram uma associação entre os genótipos combinados *MS* 2756AA/*MTHFR* 677TT com o aumento do risco de SD. Nossos resultados mostraram um aumento na frequência do genótipo *MS* 2756GG no grupo das pacientes, com um risco estimado em 1,39 (95% IC 0.26 - 7.28), porém este resultado não se mostrou estatisticamente significativo (Tabela 5), apoiando assim, a ausência de associação deste polimorfismo como fator de risco a não-disjunção somática na ST.

As enzimas MTHFR e TS requerem 5,10 metilenoTHF como substratos em seus respectivos ciclos, a primeira para metilação do DNA e a última na síntese de pirimidina. Polimorfismos associados com redução da atividade da enzima MTHFR modificam o *pool* de 5,10 metilenoTHF em direção a síntese de DNA, enquanto polimorfismos que afetam a enzima TS alteram o ciclo do folato favorecendo a metilação do DNA. Portanto, considerando que ambas as enzimas utilizam o mesmo substrato, é provável que combinações entre os genótipos de *MTHFR* e *TS* possam afetar a segregação cromossômica (COPPEDÈ, 2009). Em nosso trabalho não foi possível estabelecer nenhuma associação significativa do gene *TS*, independente ou combinado com qualquer outro gene, incluindo o *MTHFR*, com o risco da ST. Recentemente foi observada uma interação entre os polimorfismos dos genes *TS* e *MTHFR* no aumento do risco de SD, sugerindo que alterações no equilíbrio entre síntese de DNA e o processo de metilação podem favorecer erros na segregação dos cromossomos (COPPEDÈ et al., 2009).

Resultados conflitantes de diversos trabalhos emergem principalmente quando cada polimorfismo é avaliado isoladamente como fator de risco a não-

disjunção. Assim, a opinião atual é que a presença combinada de vários polimorfismos da rota metabólica do folato, bem como a interação com fatores ambientais podem aumentar o risco de erros na segregação cromossômica (HOBBS et al., 2000; ACÁCIO et al., 2005; BISELLI et al., 2008; COPPEDÈ, 2009; COPPEDÈ et al., 2010).

Os resultados de vários estudos que avaliaram as interações gene-gene sugerem um elevado risco de não-disjunção na SD para portadores de combinações com ambos os alelos 677T e 1298C do gene *MTHFR*, e/ou outros polimorfismos genéticos de diferentes genes participantes da rota metabólica do folato, incluindo o *MS*, *TS*, *MTRR* e carreador de folato reduzido (*RFC1*) (COPPEDÈ et al., 2006; RAI, et al., 2006; SCALA et al., 2006; WANG et al., 2008; Coppedè et al., 2009). Além disso, interações entre três ou mais polimorfismos, incluindo o alelo *MTHFR* 677T, têm sido associados a um aumento significativo do risco para SD (da SILVA et al., 2005; COPPEDÈ et al., 2007; BISELLI et al., 2008). De maneira geral, estes resultados indicam que interações complexas entre diferentes polimorfismos dos genes envolvidos no metabolismo do ácido fólico, e não a presença de uma única variante, podem modular o risco das aneuploidias.

O presente trabalho avaliou, pela primeira vez, possíveis interações gene-gene entre os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MS* A2756G e *TS* 3R/2R na ST, entretanto, nenhuma combinação de genótipos evidenciou um risco associado ao processo de não-disjunção cromossômica somática nesta síndrome (Tabelas 6 e 7). Mesmo a segunda abordagem utilizada em nosso estudo, a qual tem como objetivo avaliar uma possível interação simultânea entre todos os genes, não representou um risco maior associado ao número de alelos polimórficos na ST (Tabela 8), conflitando assim, com alguns dados descritos para SD.

Em um estudo realizado no Brasil, da Silva et al. (2005) inferiram que quando os alelos variantes *MTHFR* 677T, *MTHFR* 1298C, *MS* 2756G, *MTRR* 66G são avaliados juntos na SD, os casos tendem a apresentar um maior número de alelos polimórficos quando comparados com os controles. Resultados similares foram obtidos por Biselli et al. (2008), quando avaliaram as variantes alélicas *MTHFR* 677T, *MTHFR* 1298C, *MS* 2756G e *RFC1* 80G juntas, em um segundo estudo também realizado no Brasil com SD.

De maneira geral, os resultados discrepantes obtidos em diferentes trabalhos podem também refletir interações entre fatores genéticos e ambientais implicados no metabolismo do folato (JAMES, 2004). Fatores de riscos podem depender de polimorfismos genéticos ou da interação com ambiente, representada pela dieta, em particular a ingestão de ácido fólico, que pode ser crucial na manutenção dos efeitos dos polimorfismos (MARTÍNEZ-FRÍAS et al., 2006). Além disso, as diferenças na distribuição alélica sugerem que o impacto destes polimorfismos pode variar em função da área geográfica ou origem étnica do grupo, e que outros fatores determinantes que afetam a metilação e o metabolismo do folato ou um efeito cromossomo-específico permanecem a ser identificados (BOSCO et al., 2003; WANG et al., 2004; COPPEDÈ et al., 2010).

Apesar de estudos *in vitro* e *in vivo* indicarem que alterações no metabolismo do folato podem resultar em erros de segregação cromossômica, o processo de não-disjunção parece resultar da interação de vários fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e estocásticos, o que torna difícil discriminar a contribuição individual de cada um deles (COPPEDÈ, 2009; COPPEDÈ et al., 2010).

Em conclusão, nosso estudo evidencia a ausência de associação entre os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MS* e *TS*, e o risco de não-disjunção somática na ST, bem como a inexistência de interação entre os alelos polimórficos modulando este risco. Portanto, as mutações dos genes envolvidos na rota do folato podem não representar uma importante contribuição para os mecanismos de geração das aneuploidias.

7. CONCLUSÕES

1. As frequências das alterações cromossômicas nas pacientes com ST se assemelham com a literatura com exceção da baixa frequência de mosaicismo com linhagem celular normal;
2. Clinicamente foi observada grande variação fenotípica nas portadoras da ST, inclusive as 45,X, podendo esta variação estar relacionada ao mosaicismo críptico, *imprinting* genômico e inativação irregular do cromossomo X;
3. Este estudo evidenciou sinais fenotípicos atípicos a ST, como ectrodactilia nos pés e sindactilia total, associados ao cariótipo 46,X,i(Xq)/45,X;
4. A análise citogenética exerceu um importante papel no prognóstico, através da relação clínica-citogenética foi possível oferecer um diagnóstico para as pacientes com ST e, por conseguinte o direcionamento do tratamento adequado;
5. As frequências dos alelos polimórficos *MTHFR* 1298C, *MS* 2756G e *TS* 2R, não apresentaram diferenças significativas entre pacientes com ST e controles. Por outro lado, no polimorfismo *MTHFR* C677T, foi evidenciada a presença significativamente mais alta do alelo mutante nos controles;
6. Não foi possível estabelecer uma associação entre os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MS* A2756G e *TS* 3R/2R, independentes, e o risco na não-disjunção somática na ST;
7. A interação gene-gene entre os polimorfismos dos genes *MTHFR*, *MS* e *TS* também não representou um risco associado a erros na segregação cromossômica na ST;
8. Com este trabalho foi possível analisar as relações clínico-citogenéticas e os possíveis mecanismos de origem das aneuploidias na síndrome de Turner, em pacientes do Estado de Pernambuco.

8. REFERÊNCIAS

- ACÁCIO, G.L.; BARINI, R.; BERTUZZO, C.S.; et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. **Prenat Diagn**, 25:1196–1199, 2005.
- AKIYAMA, T.; NAGATA, M.; AOKI, F. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103:7339–7344, 2006.
- ANELLO, R.M.; GUEANT-RODRÍGUEZ, P.; BOSCO, J.L.; et al. Homocysteine and methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in Alzheimer's disease. **Neuroreport**, 15 859–861, 2004.
- ANGELL, R. First-meiotic-division nondisjunction in human oocytes. **Am J Hum Genet**, 61: 23-32, 1997.
- ARAÚJO, A.; RAMOS, E.S. Cryptic mosaicism involving a second chromosome X in patients with Turner syndrome. **Bras J Med Biol Res**, 41:368-372, 2008.
- ARMSTRONG, L; MCGOWAN-JORDAN, J.; BRIERLEY, K.; ALLANSON, J.E. De novo dup(X)(q22.3q26) in a girl with evidence that functional disomy of X material is the cause of her abnormal phenotype. **Am J Med Genet**, 116A:71-76, 2003.
- ASSARAF, Y.G. Molecular basis of antifolate resistance. **Cancer Metastasis**, 26:153–181, 2007.
- ATTIE, K.M.A. Genetic studies in idiopathic short stature. **Curr Opin Pediatr**, 12: 400-404, 2000.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS A.A. **Bioestat: aplicações estatísticas nas áreas de ciências biológicas e médicas**. Manaus, 2007. Versão 5.0 1 CD-ROM.
- BADALOTTI, M.; ARENT, A.; POLANCZICK, A.; et al. Falência ovariana precoce associada a deleção no braço longo do cromossomo: relato de dois casos e revisão da literatura. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 28:551-556, 2006.
- BALDIN, A.D.; ARMANI, M.C.; MORCILLO, A.M.; et al. Proporções corporais em um grupo de pacientes com Síndrome de Turner. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 49: 529-535, 2005.
- BARRENÑAS, M.L.; NYLÉN, O.; HANSON, C. The influence of karyotype on the auricle, otitis media and hearing in Turner syndrome. **Hear Res**, 138: 163-170, 2000.
- BIANCO, B.; LIPAY, M.; GUEDES, A.; et al. SRY gene increases the risk of developing gonadoblastoma and/or nontumoral gonadal lesions in Turner syndrome. **Int J Gynecol Pathol**, 28 :197-200, 2009.
- BINDER, G.; KOCH, A.; WAJS, E.; RANKE, M.B. Nested polymerase chain reaction study of 53 cases with Turner's syndrome: is cytogenetically undetected Y mosaicism common? **J Clin Endocrinol Metab**, 80: 3532-3536, 1995.

- BINKERT, F.; SPREIZ, A.; HÖCKNER, M.; et al. Parental origin and mechanism of formation of a 46,X,der(X)(pter-->q21.1::p11.4-->pter)/45,X karyotype in a woman with mild Turner syndrome. **Fertil Steril**, 94 :350.e12-5, 2010.
- BISELLI, J.M.; GOLONI-BERTOLLO, E.M.; ZAMPIERI, B.L.; et al. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. **Genet Mol Res**, 7:33–42, 2008.
- BODUROGLU, K.; ALANAY, Y.; KOLDAN, B.; et al. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphism as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. **Am J Med Genet**, 127A: 5-10, 2004
- BONDY, C. A. Turner syndrome 2008. **Horm Res**, 1:52-6, 2009.
- BOSCO, P.; GUEANT-RODRIGUEZ, R.M.; ANELLO, G.; et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A > G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. **Am J Med Genet**, 121:219–224, 2003.
- BRANDALIZE, A.P.; BANDINELLI, E.; dos SANTOS, P.A.; et al. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. **Am J Med Genet A**, 149A:2080-7, 2009.
- BRONSHTEIN, M.; ZIMMER, E.Z.; BLAZER, S. A characteristic cluster of fetal sonographic markers that are predictive of fetal Turner syndrome in early pregnancy. **Am J Obstet Gynecol**, 188:1016-20, 2003.
- BOTTO, L.D.; MASTROIACOVO, P. Exploring gene-gene interactions in the etiology of neural tube defects. **Clin Genet**, 53:456–459, 1998.
- BUGGE, M.; COLLINS, A.; PETERSEN, M.B.; et al. Non-disjunction of chromosome 18. **Hum Mol Genet**, 7:661–669, 1998.
- BURÉGIO-FROTA, P.; VALENÇA, L.; LEAL, G.F.; et al. Identification of a de novo inv dup(X)(pter--> q22) by multicolor banding in a girl with Turner syndrome. **Genet Mol Res**, 9 :780-4, 2010.
- CANTO, P.; KOFMAN-ALFARO, S.; JIMÉNEZ, A.L.; et al. Gonadoblastoma in Turner síndrome patients with nonmosaic 45,X karyotype and y chromosome sequences. **Cancer Genet and Cytogenet**, 150: 70-72, 2004.
- CASTRO, R.; RIVERA, I.; RAVASCO, P.; et al. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677C→T and 1298A→C mutations are genetic determinants of elevated homocysteine. **QJM**, 96:297–303, 2003.
- CANDELARIA, M.; TAJA-CHAYEB, L.; ARCE-SALINAS, C.; et al. Genetic determinants of cancer drug efficacy and toxicity: practical considerations and perspectives. **Anti-Cancer Drugs**, 16:923–933, 2005.
- CARMEL, R.; JACOBSEN, D.W. **Homocysteine in health and disease**. Cambridge University Press, 2001.

- CHADEFAUX-VEKEMANS, B.; COUDE, M.; MULLER, F.; et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. **Pediatr Res**, 51: 766-767, 2002.
- CHANGO, A.; FILLON-EMERY, N.; MIRCHER, C.; et al. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. **Br J Nutr**, 94: 166-169, 2005.
- CHEN, L.H.; LIU, M.; HWANG, H.; et al. Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization and expression. **J Biol Chem**, 272: 3628-3634, 1997.
- CHENG, E.Y.; HUNT, P.; NALUAI-CECCHINI, T.A.; et al. Meiotic recombination in human oocytes. **PLoS Genet** 5:e100066, 2009.
- CHENG, S.F.; RAUEN, K.A.; PINKEL, D.; et al. Xq chromosome duplication in males: clinical, cytogenetic and array CGH characterization of a new case and review. **Am J Med Genet**, 135A:308-313, 2005.
- CHIUSOLO, P.; REDDICONTO, G.; CIMINO, G.; et al. Methylene-tetrahydrofolate reductase genotypes do not play a role in acute lymphoblastic leukemia pathogenesis in the Italian population. **Haematol**, 89:139 – 144, 2004.
- CHOI, S.W.; MASON, J.B. Folate status: effects on pathways of colorectal carcinogenesis. **J Nutr**, 132:2413S-2418S, 2002.
- COLEMAN, J.F.; MACLENNAN, G.T. Gonadoblastoma. **J of Urol**, 175:2300, 2006.
- COMPTON, D. A. Mechanisms of aneuploidy. **Curr Opin Cell Biol**, 23:1-5, 2010
- CONWAY, G.S. Considerations for transition from paediatric to adult endocrinology: women with Turner's syndrome. **Growth Horm IGF Res**, 14 (Suppl A): S77-S84, 2004.
- COPPEDÈ, F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. **Mutat Res**, 682:54-70, 2009.
- COPPEDÈ, F.; COLOGNATO, R.; BONELLI, A.; et al. Polymorphisms in folate and homocysteine metabolizing genes and chromosome damage in mothers of Down syndrome children. **Am J Med Genet A**, 143A:2006-15, 2007.
- COPPEDÈ, F.; GROSSI, E.; MIGHELI, F.; MIGLIORE, L. Polymorphisms in folate-metabolizing genes, chromosome damage, and risk of Down syndrome in Italian women: identification of key factors using artificial neural networks. **BMC Med Genomics**, 24;3:42, 2010.
- COPPEDÈ, F.; MARINI, G.; BARGAGNA, S.; et al. Folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women. **Am J Med Genet A**, 140:1083-1091, 2006.
- COPPEDÈ, F.; MIGHELI, F.; BARGAGNA, S.; et al. Association of maternal polymorphisms in folate metabolizing genes with chromosome damage and risk of Down syndrome offspring. **Neurosci Lett**, 449:15-9, 2009.
- D'AGOSTINI, C.; GUS, R.; CAPP, E.; et al. Estudo citogenético das gônadas em pacientes com amenorréia primária. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 27:125-129, 2005.

- da SILVA, L.R.; VERGANI, N.; GALDIERI, L. de C.; et al. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. **Am J Med Genet**, 135: 263-267, 2005.
- DAVENPORT, M.L. Approach to the patient with Turner syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 95:1487-95, 2010.
- DAVISON, R.M.; FOX, M.; CONWAY, G.S. Mapping of the POF1 locus and identification of putative genes for premature ovarian failure. **Mol Hum Reprod**, 6:314-8, 2000.
- de JONGE, R.; TISSING, W.J.E.; HOOIJBERG, J.H.; et al. Polymorphisms in folate-related genes and risk of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, 113: 2284-2289, 2009.
- DUTHIE, S.J.; NARAYANAN, S.; BRAND, G.M.; et al. Impact of Folate Deficiency on DNA Stability. **J Nutr**, 132:2444-2449, 2002.
- EHRlich, M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. **J Nutr**, 132:2424S-2429S, 2002.
- EICHENLAUB-RITTER, U.; BOLL, I. Nocodazole sensitivity, age-related aneuploidy, and alterations in the cell cycle during maturation of mouse oocytes. **Cytogenet Cell Genet**, 52:170-176, 1989.
- ELLEUCH, M.; FEKI, M.; KAMMOUN, M; et al. Descriptive analyses of Turner syndrome: 49 cases in Tunisia. **Ann Endocrinol**, 71:111-6, 2010.
- EL ABD, S.; PATTON, M.A.; TURK, J.; et al. Communicational and behavioral deficits associated with ring X Turner Syndrome. **Am J Med Genet**, 88:510-516, 1999.
- EL-MANSOURY, M.; BRYMAN, I.; BERNTOPR, K.; et al. Hypothyroidism is common in Turner syndrome: results of the five-year follow-up. **J Clin Endocrinol Metab**, 90:2131-5, 2005.
- FENECH, M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. **Mutat Res**, 475:57-67, 2001.
- FÉNICHEL, P.; LETUR, H. Procreation in Turner's syndrome: which recommendations before, during and after pregnancy? **Gynecol Obstet Fertil**, 36:891-7, 2008.
- FRISO, S.; CHOI, S.W.; GIRELLI, D.; et al. A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. **Proc Natl Acad Sci USA**, 99:5606-5611, 2002.
- FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat Genet**, 10:111-113, 1995.
- FUKS, F.; HURD, P.J.; WOLF, D. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. **J Biol Chem**, 278 :4035-4040, 2003.
- GARDNER, R.J.M.; SUTHERLAND, G.R. **Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling** Ed. Oxford University Press. 2004.

- GHARIB, H.; COOK, D.M.; SAENGER, P.H.; et al. American Association of Clinical Endocrinologists medical guidelines for clinical practice for growth hormone use in adults and children—2003 update. **Endocr Pract**, 9:64-76, 2003.
- GISSELSSON, D.; SHAO, C.; TUCK-MULLER, C.M. Interphase chromosomal abnormalities and mitotic missegregation of hypomethylated sequences in ICF syndrome cells. **Chromosoma**, 114:118-26, 2005.
- GOS, M.; SZPECHT-POTOCKA, A. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. **J Appl Genet**, 43:511-524, 2002.
- GOYETTE, P.; PAI, A.; MILOS, R.; et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Mamm Genome**, 9:652-656, 1998.
- GRAVHOLT, C.H. Clinical practice in Turner syndrome. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab**, 1:41-52, 2005.
- GRAVHOLT, C.H. Epidemiological, endocrine and metabolic features in Turner syndrome. **Eur J Endocrinol**, 151 :657-87, 2004.
- GRAVHOLT, C.H.; FEDDER, J.; NAERAA, R.W.; MULLER, J. Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner Syndrome and Y chromosome material: A population Study. **J. Clin. Endocrinol Metabol**, 85: 3199-3202, 2000.
- GRILLO, L.B.; ACÁCIO, G.L.; BARINI, R.; et al. Mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome. **Cad. Saude Publica**, 18: 1795–1797, 2002.
- GOLL, M.G.; BESTOR, T.H, Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annu Rev Biochem**, 74 481–514, 2005.
- GOPALAKRISHNAN, S.; VAN EMBURGH, B.O.; ROBERTSON, K.D. DNA methylation in development and human disease. **Mutat Res**, 647: 30-8, 2008.
- HAAK, M.C.; BARTELINGS, M.M.; GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.; VAN VUGT, J.M. Cardiac malformations in first-trimester fetuses with increased nuchal translucency: ultrasound diagnosis and postmortem morphology. **Ultrasound Obstet Gynecol**, 20:14-21, 2002
- HALL, H.; HUNT, P.A.; HASSOLD, T. Meioses and sex chromosome aneuploidy: how meiotic errors cause aneuploidy, how aneuploidy causes meiotic errors. **Curr Opin in Genet and Dev**, 16:323-329, 2006.
- HAMELIN, C.E.; ANGLIN, G.; QUIGLEY, C.A.; DEAL, C.L. Genomic imprinting in Turner syndrome: effects on response to growth hormone and on risk of sensorineural hearing loss. **J Clin Endocrinol Metab**, 8:3002-10, 2006.
- HANSON, L.; BRYMAN, I.; MARIE-LOUISE, B.J.P.; et al. Genetic analysis of mosaicism in 53 women with Turner syndrome. **Hereditas**, 134: 153-159, 2001.
- HASSOLD, T.; BURRAGE, L.C.; CHAN, E.R.; et al. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. **Am J Hum Genet**, 69 :434-9, 2001.

- HASSOLD, T.; HALL, H.; HUNT, P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. **Hum Mol Genet**, 2:R203-8, 2007.
- HASSOLD, T.; HUNT, P. Maternal age and chromosomally abnormal pregnancies: what we know and what we wish we knew. **Curr Opin Pediatr**, 21:703-8, 2009.
- HASSOLD, T.; HUNT, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. **Nat Rev Genet**, 2: 280-291, 2001.
- HELD, K.R.; KEBER, S.; KAMINSKY, E.; et al. Mosaicism in 45,X Turner syndrome: Does survival in early pregnancy depend on the presence of two sex chromosomes? **Hum Genet**, 88:288-294, 1992.
- HISHIDA, A.; MATSUO, K.; HAMAJIMA, N.; et al. Associations between polymorphisms in the thymidilate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. **Haematol**, 88:159-166, 2003.
- HJERRILD, B.E.; MORTENSEN, K.H.; GRAVHOLT, C.H. Turner syndrome and clinical treatment. **Br Med Bull**, 86:77-93, 2008.
- HOBBS, C.A.; SHERMAN, S.L.; YI, P. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Hum Genet**, 67: 623-30, 2000.
- HOMBERGER, A.; LINNEBANK, M.; WINTER, C.; et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. **Eur J Hum Genet**, 8: 725-729, 2000.
- JACOB, R.A.; GRETZ, D.M.; TAYLOR, P.C.; et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. **J Nutr**, 128:1204–1212, 1998.
- JAMES, S.J. Maternal metabolic phenotype and risk of Down syndrome: Beyond genetics. **Am J Med Genet Part A**, 127A:1–4, 2004.
- JAMES, S.J.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I.P.; et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Clin Nutr**, 70:495–50, 1999.
- KANAAN, N.; MARTÍ, S.; MOLINER, V.; et al. QM/MM Study of Thymidylate Synthase: Enzymatic Motions and the Temperature Dependence of the Rate Limiting Step. **J Phys Chem**, 113:2176-82, 2009.
- KANEDA, S.; TAKEISHI, K.; AYUSAWA, D.; et al. Role in translation of a triple tandemly repeated sequence in the 5'-untranslated region of human thymidylate synthase mRNA. **Nucleic Acids Res**, 15:1259-1270, 1987.
- KAWAKAMI, K.; OMURA, K.; KANEHIRA, E.; et al. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. **Anticancer Res**, 19: 3249–3252, 1999.
- KEEFE, D.L.; LIU, L. Telomeres and reproductive aging. **Reprod Fertil Dev**, 21:10–14, 2009.
- KELLY, T.E.; FERGUSON, J.E.; GOLDEN, W. Survival of fetuses with 45,X: an instructive case and an hypothesis. **Am J Med Genet**, 42: 825-826, 1992.

- KILDAL, W.; KRAGGERUD, S.M.; ABELER, V.M.; et al. Genome profiles of bilateral dysgerminomas, a unilateral gonadoblastoma, and a metaphasis from a 46 XY phenotypic female. **Hum Pathol**, 34: 946-949, 2003.
- KOPPEN, I.J.; HERMANS, F.J.; KASPERS, G.J. Folate related gene polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Br J Haematol**, 148:3-14, 2010.
- LAMB, N.E.; SHERMAN, S.L.; HASSOLD, T.J. Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. **Cytogenet Genome Res**, 111:250-5, 2005.
- LANDIN-WILHELMSSEN, K.; BRYMAN, I.; WILHELMSSEN, L. Cardiac malformations and hypertension, but not metabolic risk factors, are common in turner Syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 86: 4166-4170, 2001.
- LAWRENCE, K.; KUNTSI, J.; COLEMAN, M.; et al. Face and emotion recognition deficits in Turner syndrome: a possible role for X-linked genes in amygdala development. **Neuropsychology**, 17: 39-49, 2003.
- LEYTON, C.; MERGUDICH, D.; de la TORRE, C.; et al. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. **Cell Prolif**, 28:481-96, 1995.
- LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development, **Nat Rev Genet**, 3:662-673, 2002.
- LIPAY, M.V.N.; BIANCO, B.; VERRESCHI, I.T.N. Disgenesias Gonadais e Tumores: Aspectos Genéticos e Clínicos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, 49:60-70, 2005.
- LUETJENS, C.M.; ROLF, C.; GASSNER, P.; et al. Sperm aneuploidy rates younger and older men. **Hum Reprod**, 17: 1826-1932, 2002.
- MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.; HIATT, R.A.; et al. Spontaneous genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. **Mutat Res**, 377:125-135, 1997.
- MARSH, S. Thymidylate synthase pharmacogenetics. **Invest New Drugs**, 23:533-7, 2005.
- MARTÍNEZ-FRÍAS, M.L.; PEREZ, B.; DESVIAT, L.R.; et al. Maternal polymorphisms 677C-T and 1298A-C of MTHFR, and 66A-G MTRR genes: Is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? **Am J Med Genet Part A**, 140A:987-997, 2006.
- MARTÍNEZ-PASARELL, O.; TEMPLADO, C.; VICENS-CALVET, E.; et al. Paternal sex chromosome aneuploidy as a possible origin of Turner syndrome in monozygotic twins: case report. **Hum Reprod**, 14: 2735-2738, 1999.
- MATSUO, K.; SUZUKI, R.; HAMAJIMA, N.; et al. Association between polymorphisms of folate- and methionine-metabolizing enzymes and susceptibility to malignant lymphoma. **Blood**, 97: 3205-3209, 2001.
- MAZZANTI, L.; CICOGNANI, A.; BALDAZZI, L.; et al. Gonadoblastoma in Turner syndrome and Y-chromosome-derived material. **Am J Med Genet**, 135A: 150-154, 2005.

- MEGUID, N.A.; DARDIR, A.A.; KHASS, M.; et al. MTHFR genetic polymorphism as a risk factor in Egyptian mothers with Down syndrome children, **Dis Markers**, 24: 19–26, 2008.
- MEISEL, C.; CASCORBI, I.; GERLOFF, T.; et al. Identification of six methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genotypes resulting from common polymorphisms: impact on plasma homocysteine levels and development of coronary artery disease. **Atherosclerosis**, 15:651-8, 2001.
- MODI, D.N.; SANE, S.; BHARTIYA, D. Accelerated germ cell apoptosis in sex chromosome aneuploid fetal human gonads. **Mol Hum Reprod**, 9:219–225, 2003.
- MORGAN, T. Turner syndrome: diagnosis and management. **Am Fam Physician**, 76: 405-10, 2007.
- MOLLOY, A.M.; BRODY, L.C.; MILLS, J.L.; et al. The search for genetic polymorphisms in the homocysteine/folate pathway that contribute to the etiology of human neural tube defects. **Birth Defect Res A Clin Mol Terato**, 85:285–294, 2009.
- MOSIOLEK, M.; PASIERBEK, P.; MALARZ, J.; et al. Rumex acetosa Y chromosomes: constitutive or facultative heterochromatin? **Folia Histochem Cytobiol**, 43:161-7, 2005.
- NAZARENKO, S.A.; TIMOSHEVSKY, V.A.; SUKHANOVA, N.N. High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients. **Clin Genet**, 56:59-65, 1999.
- NEGLIA, M.; BERTONI, L.; ZOLI, W.; GIULOTTO, E. Amplification of the pericentromeric region of chromosome 1 in a newly established colon carcinoma cell line. **Cancer Genet Cytogenet**, 142:99-106, 2003.
- NICLOT, S.; PRUVOT, Q.; BESSON C.; et al. Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas. **Blood**, 108: 278-85, 2006.
- NICOLAIDIS, P.; PETERSEN, M.B. Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies. **Hum Reprod**, 13: 313-319, 1998.
- OLIVER, T.R.; FEINGOLD, E.; YU, K.; et al. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. **PLoS Genet**, 14:4, 2008.
- OGATA, T.; MUROYA, K.; SASAKI, G.; et al. *SHOX* nullizygoty and haploinsufficiency in a Japanese Family: implication for the development of Turner skeletal features. **J Clin Endocrinol Metab**, 87:1390-1394, 2002.
- O'LEARY, V.B.; PARLE-MCDERMOTT, A.; MOLLY, A.M.; et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome **Am J Med Genet**, 107: 151-155, 2002.
- OLIVEIRA, K.C.; BIANCO, B.; VERRESCHI, I.T.; et al. Prevalence of the polymorphism MTHFR A1298C and not MTHFR C677T is related to chromosomal aneuploidy in Brazilian Turner Syndrome patients. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 52 :1374-81, 2008.
- OLIVEIRA, R.M.; VERRESCHI, I.T.; LIPAY, M.V.; et al. Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature. **Sao Paulo Med J**, 127 :373-8, 2009.

- PATTERSON, D. Folate metabolism and the risk of Down syndrome, **Downs Syndr Res Pract**, 12:93–97, 2008.
- PELLESTOR, F.; ANAHORY, T.; HAMAMAH, S. The chromosomal analysis of human oocytes. An overview of established procedures. **Hum Reprod Update**, 11: 15-32, 2004.
- PELLESTOR, F.; ANDRÉO, B.; ANAHORY, T.; et al. The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. **Eur J Med Genet**, 49:103-16, 2006.
- PETKOVIC, I.; BARISIC, I.; BAGO, R. Cytogenetic evaluation, fluorescence *in situ* hybridization, and molecular study of psu idic(X)(pter→q22.3::q22.3→pter) chromosome aberration in a girl with moderate growth retardation. **Croat Med J**, 44:494-499, 2003.
- PIENKOWSKI, C.; MENENDEZ, M.; CARTAULT, A. Syndrome de Turner et procréation. **Gynecol Obstet Fertil**, 36:1030–4, 2008.
- POGRIBNY, I.P.; BASNAKIAN, A.G.; MILLER, B.J.; et al. Breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl-deficient rats. **Cancer Res**, 55:2711, 1995.
- POZZI, E.; VERGANI, P.; DALPRA, L.; et al. Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, 200: 636.e1–636.e6, 2009.
- RAI, A.K.; SINGH, S.; MEHTA, S.; et al. *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. **J Hum Genet**, 51: 278-283, 2006.
- RANKE, M.B.; SAENGER P. Turner's syndrome. **Lancet**, 358: 309-314, 2001.
- ROBERTSON, K.D. DNA methylation and chromatin — unraveling the tangled web. **Oncogene**, 21:5361-79, 2002.
- ROBINSON, W.P.; McFADDEN, D.E.; STEPHENSON, M.D. The origin of abnormalities in recurrent aneuploidy/polyploidy. **Am J Hum Genet**, 69: 1245-1254, 2001.
- RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ**, 174:341-8, 2006.
- ROSS, J.; ROELTGEN, D.; ZINN, A. Cognition and the sex chromosomes: studies in Turner syndrome **Horm Res**, 65: 47-56, 2006.
- ROVET, J. Turner syndrome: a review of genetic and hormonal influences on neuropsychological functioning. **Child Neuropsychology**, 10:262-279, 2004.
- SAENGER, P.; WIKLAND, K.A.; CONWAY, G.S.; et al. Recommendations for the diagnosis and management of Turner syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 86:3061-9, 2001.
- SAGI, L.; ZUCKERMAN-LEVIN, N.; GAWLIK, A.; et al. Clinical significance of the parental origin of the X chromosome in turner syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 3:846-52, 2007.

- SANTOS, K.; LEMOS-MARINI, S.H.V.; BAPTISTA, M.T.M.; et al. Frequency of 677C→T and 1298A→T polymorphisms in the 5,10methylene tetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene in Turner syndrome individuals. **Genet and Mol Bio**, 29:41-44, 2006.
- SEABRIGHT, M. The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. **Chromosoma**, 36:204-210, 1972.
- SCALA, I.; GRANESE, B.; SELLITTO, M.; et al. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. **Genet Med**, 8:409–416, 2006.
- SCHOEMAKER, M.J.; SWERDLOW, A.J.; HIGGINS, C.D. Mortality in women with Turner syndrome in Great Britain: a national cohort study. **J Clin Endocrinol Metab**, 93:4735-42, 2008.
- SCHWAHN, B.; ROZEN, R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences. **Am J Pharmacogenom**, 1:189-201, 2001.
- SHARP, L.; LITTLE, J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. **Am J Epidemiol**, 159:423-43, 2004.
- SHERMAN, S.L.; LAMB, N.E.; FEINGOLD, E. Relationship of recombination patterns and maternal age among non-disjoined chromosomes 21. **Biochem Soc Trans**, 34: 578–580, 2006.
- SHI, M.; CAPRAU, D.; ROMITTI, P.; et al. Genotype frequencies and linkage disequilibrium in the CEPH human diversity panel for variants in folate pathway genes *MTHFR*, *MTHFD*, *MTRR*, *RFC1*, and *GCP2*. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, 67: 545-549, 2003.
- SIBANI, S.; LECLERC, D.; WEISBERG, I.S.; et al. Characterization of mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency reveals an FAD-responsive mutation. **Hum Mutat**, 21:509-520, 2003.
- SKIBOLA, C.F.; MARLYN, S.T.; HUBBARD, A.; et al. Polymorphism in the thymidilate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. **Blood**, 99: 3786-3791, 2002.
- SKIBOLA, C.F.; FORREST, M.S.; COPPEDÉ, F. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. **Blood**, 104:2155-2162, 2004.
- SMULDERS, Y.M.; STEHOUWER, C.D. Folate metabolism and cardiovascular disease, **Semin Vasc Med**, 5 87–97, 2005.
- STEGMANN, K.; ZIEGLER, A.; NGO, E.T.; et al. Linkage disequilibrium of *MTHFR* genotypes 677C/T-1298A/C in the German population and association studies in probands with neural tube defects (NTD). **Am J Med Genet**, 87: 23-29, 1999.
- STEPHURE, D.K. Canadian Growth Hormone Advisory Committee. Impact of growth hormone supplementation on adult height in Turner syndrome: results of the Canadian randomized controlled trial. **J Clin Endocrinol Metab**, 90:3360-6, 2005.
- STOCHHOLM, K.; JUUL, S.; JUEL, K.; et al. Prevalence, incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 91: 3897-902, 2006.

- STUPPIA, L.; GATTA, V.; GASPARI, A.R.; et al. C677T mutation in the 5.10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy, **Eur J Hum Genet**, 10 388–390, 2002.
- SUBRAMANIAN, V.V.; BICKEL, S.E. Aging predisposes oocyte meiotic nondisjunction when the cohesion subunit SMC1 is reduced. **PLoS Genet**, 4:e1000263, 2008.
- SUZIGAN, L.Z.C.; SILVA, R.B.P.; GUERRA, A.T. Aspectos Psicossociais da Síndrome de Turner. **Arq Brás Endocrinol Metab**, 49: 157-164, 2005.
- SYBERT, V.P.; MCCAULEY, E. Turner's syndrome. **N Engl J Med**, 351:1227- 38, 2004.
- SYBERT, V.P. Phenotypic effects of mosaicism for a 47XXX cell line in Turner syndrome. **J Med Genet**, 39:217–21, 2002.
- TAKAMURA, N.; KONDOH, T.; OHGI, S.; et al. Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in Japan. **Eur J Nutr**, 43: 285–287, 2004.
- TRABETTI, E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk. **J Appl Genet**, 49:267–282, 2008.
- THOMAS, N.S.; ENNIS, S.; SHARP, A.J.; et al. Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factors. **Hum Mol Genet**, 10:243–250, 2001.
- ULRICH, C.M.; CURTIN, K.; POTTER, J.D.; et al. Polymorphisms in the Reduced Folate Carrier, Thymidylate Synthase, or Methionine Synthase and Risk of Colon Cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 14: 2509-2516, 2005.
- ULRICH, C.M.; ROBIEN, K.; MCLEOD, H.L. Cancer pharmacogenetics: polymorphisms, pathways and beyond. **Nat Rev Cancer**, 3:912-20, 2003.
- ULVIK, A.; UELAND, P.M.; FREDRIKSEN, A.; et al. Functional inference of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C > T and 1298A > C polymorphisms from a large-scale epidemiological study. **Hum Genet**, 121:57–64, 2007.
- VAN, P.L.; BAKALOV, V.K.; ZINN, A.R.; et al. Maternal X chromosome, visceral adiposity, and lipid profile. **JAMA**, 295:1373-1374, 2006.
- VAN BLERKOM, J.; ANTCZAK, M.; SCHRADER, R. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. **Hum Reprd**, 12: 1047-1055, 1997.
- VAN DYKE, D.L.; WIKTOR, A.; ROBERTSON, J.R.; WEISS, L. Mental retardation in Turner syndrome. **J Pediatr**, 118: 415-417, 1991.
- VALINLUCK, V.; TSAI, H.H.; ROGSTAD, D.K.; et al. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). **Nucleic Acids Res**, 32:4100-8, 2004.
- VANNESTE, E.; BOET, T.; Le CAIGNEC, C.; et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. **Nat Med**, 15:577-583, 2009.
- VIGUETTI, N.L.; MACIEL-GUERRA, A.T. Baixa estatura na infância e síndrome de Turner: uma associação mais frequente do que se supõe. **J Pediatr**, 70:172-4, 1994.

- WANG, S.S.; QIAO, F.Y.; FENG, L.; et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. **J Zhejiang Univ Sci B**, 9:93-9, 2008.
- WARBURTON, D. The effect of maternal age on the frequency of trisomy: change in meiosis or in utero selection? **Prog Clin Biol Res**, 311: 165-181, 1989.
- WATKINS, D.; RU, M.; HWANG, H.Y.; et al. Hyperhomocysteinemia due to methionine synthase deficiency, cblG: structure of the MTR gene, genotype diversity, and recognition of a common mutation, P1173L. **Am J Hum Genet**, 71: 143-153, 2002.
- WEISBERG, I.; TRAN, P.; CHRISTENSEN, B.; et al. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. **Mol Genet Metabol**, 64, 169–172, 1998.
- WOLTERS, K.R.; SCRUTTON, N.S. Cobalamin uptake and reactivation occurs through specific protein interactions in the methionine synthase-methionine synthase reductase complex. **Febs J**, 276:1942-51, 2009.
- XU, G.L.; BESTOR, T.H.; BOURCHIS, D.; et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. **Nature**, 402:187–191, 1999.
- YAMADA, K.; CHEN, Z.; ROZEN, R.; MATTHEWS, R.G. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98:14853-8, 2001.
- YUAN, L.; LIU, J.G.; HOJA, M.R.; et al. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. **Science**, 296:1115–1118, 2002.
- ZHAO, R.; MATHERLY, L.H.; GOLDMAN, I.D. Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. **Expert Rev Mol Med**, 11 e4, 2009.
- ZHENG, C.J.; BYER, B. Oocyte selection: a new model for the maternal-age dependence of Down syndrome. **Hum Genet**, 90: 1–6, 1992.
- ZHUANG, W.; WU, X.T.; ZHOU, Y.; et al. Polymorphisms of Thymidylate Synthase in the 5'- and 3'-Untranslated Regions and Gastric Cancer. **Dig Dis Sci**, 54:1379–1385, 2009.

9. MEMORIAL

Adriana Valéria Sales Bispo, graduada em Ciências Biológicas Bacharelado pela Universidade Federal de Pernambuco. Ingressou na universidade em 2004 e terminou a graduação no segundo semestre de 2008. Prestou concurso para seleção de mestrado no programa de pós-graduação em genética da Universidade Federal de Pernambuco no ano de 2009 e foi aprovada em 1º lugar. Durante a graduação foi monitora da disciplina Citogenética Geral e estagiou no laboratório de genética e citogenética animal CCB/UFPE, desde 2006, estudando os aspectos citogenéticos e moleculares da Síndrome de Turner sob a orientação da Dr^a. Neide Santos e deu prosseguimento a esta linha de pesquisa durante o mestrado, o qual se encerra em 2011.

Em 2009, durante o mestrado, realizou estágio à docência na disciplina Citogenética Humana, oferecida para o curso de biomedicina CCB/UFPE, sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Neide Santos. Neste mesmo ano, participou do 55º Congresso Brasileiro de Genética, apresentando o resumo intitulado “Inversão do Cromossomo 9 Associada ao Atraso Puberal e Estigmas de Síndrome de Turner”. No ano seguinte, 2010, o resumo “Investigação do polimorfismo C677T do gene *MTHFR* em portadoras da Síndrome de Turner como fator de risco a não-disjunção” foi apresentado no 56º Congresso Brasileiro de Genética. Neste mesmo ano, publicou junto com o grupo de pesquisa um artigo científico na revista Genetic na Molecular Research intitulado “Identification of a de novo inv dup(X)(pter--> q22) by multicolor banding in a girl with Turner syndrome.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados clínicos e citogenéticos das pacientes normais.

Tabela 1. Dados clínicos e citogenéticos das pacientes com cariótipo normal.

Paciente	Idade	Cariótipo	Dados Clínicos
01	-	46,XX[20]	Baixa estatura, cúbito valgo bilateral leve, útero visualizado e ovários normais.
02	13a	46,XX[20]	Baixa estatura.
03	19a	46,XX[20]	Baixa estatura, perímetro cefálico abaixo do percentil 2, amenorreia primária, mamas não desenvolvidas; pelos pubianos escassos, hipotrofia de útero e os ovários não visualizados.
04	10a	46,XX[20]	Não disponível
05	-	46,XX[32]	Não disponível
06	9a	46,XX[20]	Palato um pouco alto e estreito, luxação congênita do quadril e lesões hipocrômicas estriadas por todo o corpo.
07	1a	46,XX[20]	Retardo no crescimento intrauterino e cardiopatia congênita.
08	8a	46,XX[8]	Não disponível
09	19a	46,XX[20]	Atraso do desenvolvimento sexual (ausência de características sexuais secundárias)
10	1a	46,XX[20]	Redundância de pele no pescoço
11	9m	46,XX[15]	Não disponível
12	9a	46,XX[16]	Baixa estatura, implantação posterior baixa dos cabelos, útero e ovários com volume discretamente reduzidos, macrossomia, hipotireoidismo congênito, macrocrania, hipertelorismo mamário, unhas hipoplásicas, leve retardo neuropsicomotor, hipotaxia neonatal importante.
13	8a	46,XX[20]	Baixa estatura, hipertelorismo mamário, implantação baixo posterior dos cabelos.
14	-	46,XX[21]	Baixa estatura com velocidade de crescimento reduzida, atraso puberal cúbito valgo.
15	3a	46,XX[20]	Retardo neuropsicomotor, orelha proeminente, redundância de pele nos pescoço, hipoplasia dos mamilos.
16	16a	46,XX[20]	Baixa estatura, desnutrição e baixo peso, atraso puberal, útero e ovários reduzidos, baixo nível de estradiol.
17	8a	46,XX[20]	Baixa estatura, com baixa velocidade de crescimento sem estigmas visíveis.
18	2a	46,XX[20]	Redundância de pele no pescoço, lesões de hemangiomas na pele, discreta assimetria das ventrículas laterais.
19	-	46,XX[20]	Não disponível
20	17a	46,XX[20]	Baixa estatura, ausência de pelos pubianos, assimetria de mamas, hipertelorismo mamário, mamas em M3, presença de cúbito valgo bilateral, diminuição dos 4º e 5º metacarpianos, edema no dorso dos pés até 1 ano de idade, orelhas de implantação um pouco baixa, apresenta dificuldade de aprendizagem e retardo mental moderado.
21	10a	46,XX[20]	Baixa estatura (114 cm), ovários e útero normais, discreto pelos pubianos, bexiga normal e tecido tireoidiano bastante reduzido de volume.
22	4a	46,XX[20]	Baixa estatura, útero e ovários visualizados, pescoço curto e largo, implantação posterior baixa dos cabelos, sopro cardíaco suave.
23	13a	46,XX[20]	Baixa estatura, baixa velocidade de crescimento, hipertireoidismo, genu valgo, retardo do desenvolvimento neuropsicomotor.
24	10a	46,XX[20]	Baixa estatura, encurtamento dos metacarpos e olhos amendoados.

25	18a	46,XX[19]	Hipogonadismo sem total desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários.
26	-	46,XX[25]	Não disponível
27	-	46,XX[21]	Amenorreia primária, não menstrua sem uso de estrógenos. Estradiol menor que 5.0, LH=42,04, FSH=113,9. Útero visualizado, ovário esquerdo com dimensões reduzidas e direito não visualizado.
28	33a	46,XX[20]	Amenorreia crônica, hipoplasia do útero (útero de volume reduzido), ovários não visualizados, estradiol menor que 10 e infertilidade.
29	11a	46,XX[20]	Baixa estatura, pescoço curto e largo, membros curtos e pés chatos, inteligência normal, não desenvolvimento puberal, ovário esquerdo com pequena formação cística e anemia.
30	15a	46,XX[20]	Deficiência auditiva (prótese auditiva), dificuldade renal, portadora de duplicidade pieloureteral esquerda, dificuldade de aprendizagem, hipoplasia cartilagem, sopro cardíaco.
31	5a	46,XX[20]	Baixa estatura, atraso do desenvolvimento puberal, discreto cúbito valgo, tunner M3 P4.
32	2a	46,XX[20]	Baixa estatura, infecções retroauriculares recorrentes, útero de tamanho reduzido, ovários não visualizados bilateralmente, podendo corresponder a ovários em fita, inteligência normal e sem alterações cardiológicas.
33	6a	46,XX[25]	Baixa estatura, fáceis sindrômicas, asma leve, amidalite de repetição, ovários não visualizados, útero de volume reduzido para a idade, clinodactilia de 5º quirodáctilos.
34	7a	46,XX[20]	Baixa estatura e atraso no desenvolvimento, ausência de mamas ou pelos pubianos, presença de edema palpebral.
35	-	46,XX[22]	Baixa estatura, hipertireoidismo.
36	14a	46,XX[24]	Não disponível.
37	24a	46,XX[18]	Subdesenvolvimento dos caracteres sexuais, amenorreia primária, falência ovariana.
38	-	46,XX[17]	Baixa estatura.
39	12a	46,XX[20]	Baixa estatura e baixo peso, com atraso discreto da idade óssea.
40	10a	46,XX[20]	Baixa estatura, déficit de peso, útero normal e ovários não visualizados.
41	18a	46,XX[25]	Não disponível.
42	9a	46,XX[25]	Não disponível.

a = anos; m = meses; RN = recém-nascido; - = não informada.

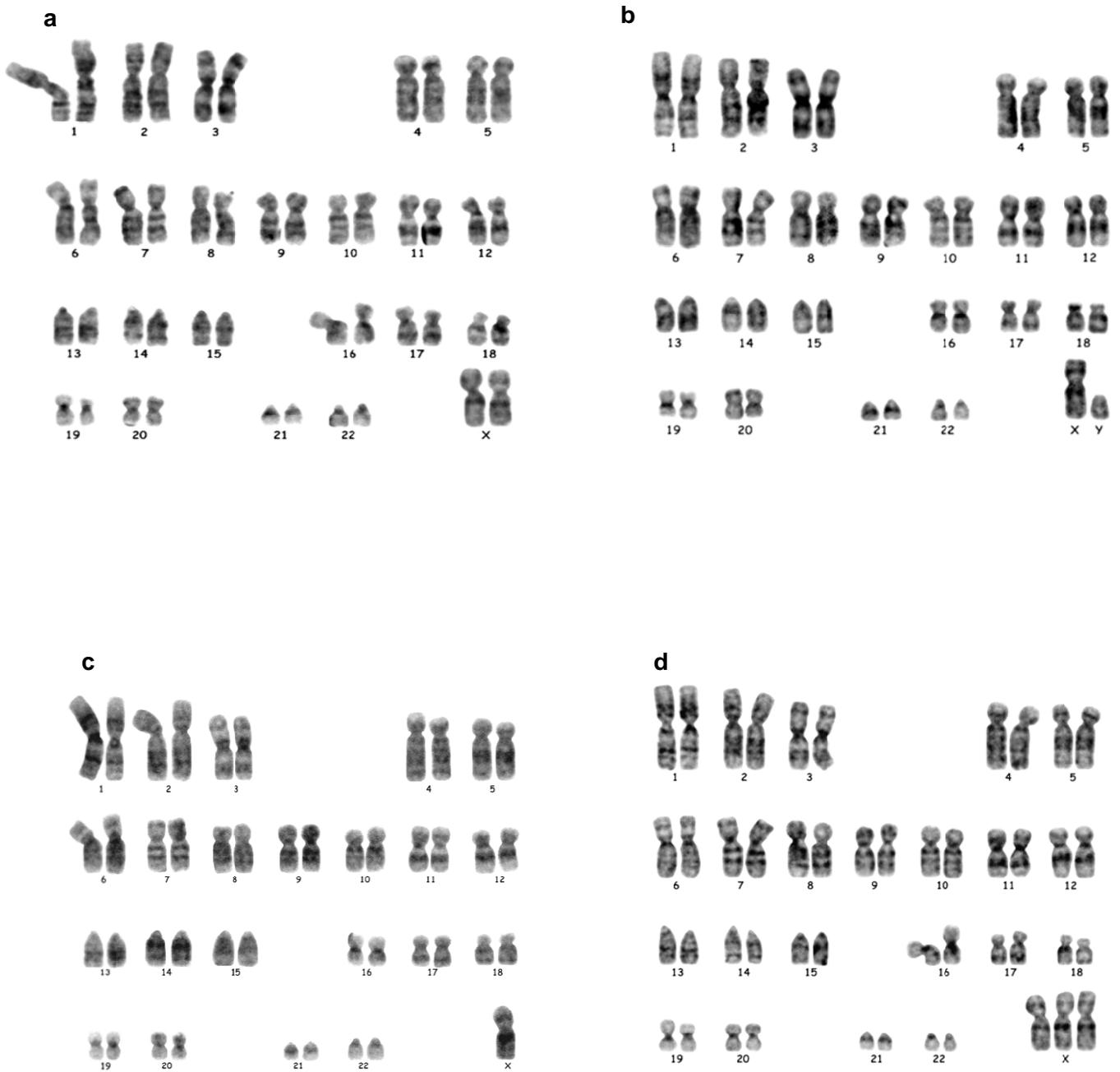
APÊNDICE B - Cariótipos observados no presente estudo.

Figura 1. Cariótipos com bandeamento G. **a.** 46,XX; **b.** 46,XY; **c.** 45,X; **d.** 47,XXX.



Figura 2. Cariótipos com bandeamento G. **a.** 46,X,i(Xq); **b.** 46,X,r(X); **c.** 46,X,del(Xp); **d.** 46,X,+mar.

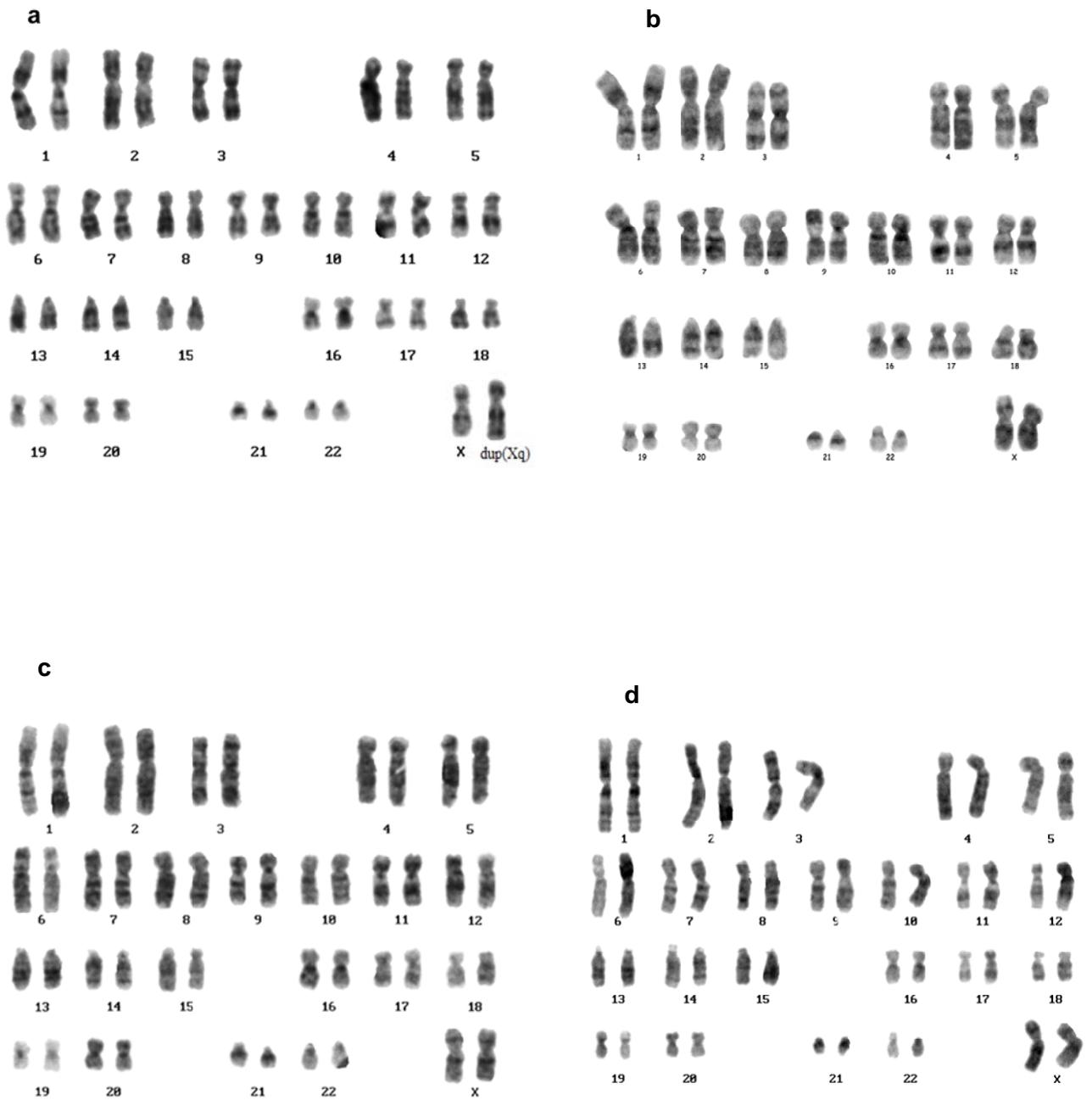


Figura 3. Cariótipos com bandeamento G. **a.** 46,X,dup(Xq); **b.** 46,XX,inv(9); **c.** 46,XX,9qh⁺; **d.** 46,XX,9qh⁺,add(22p).

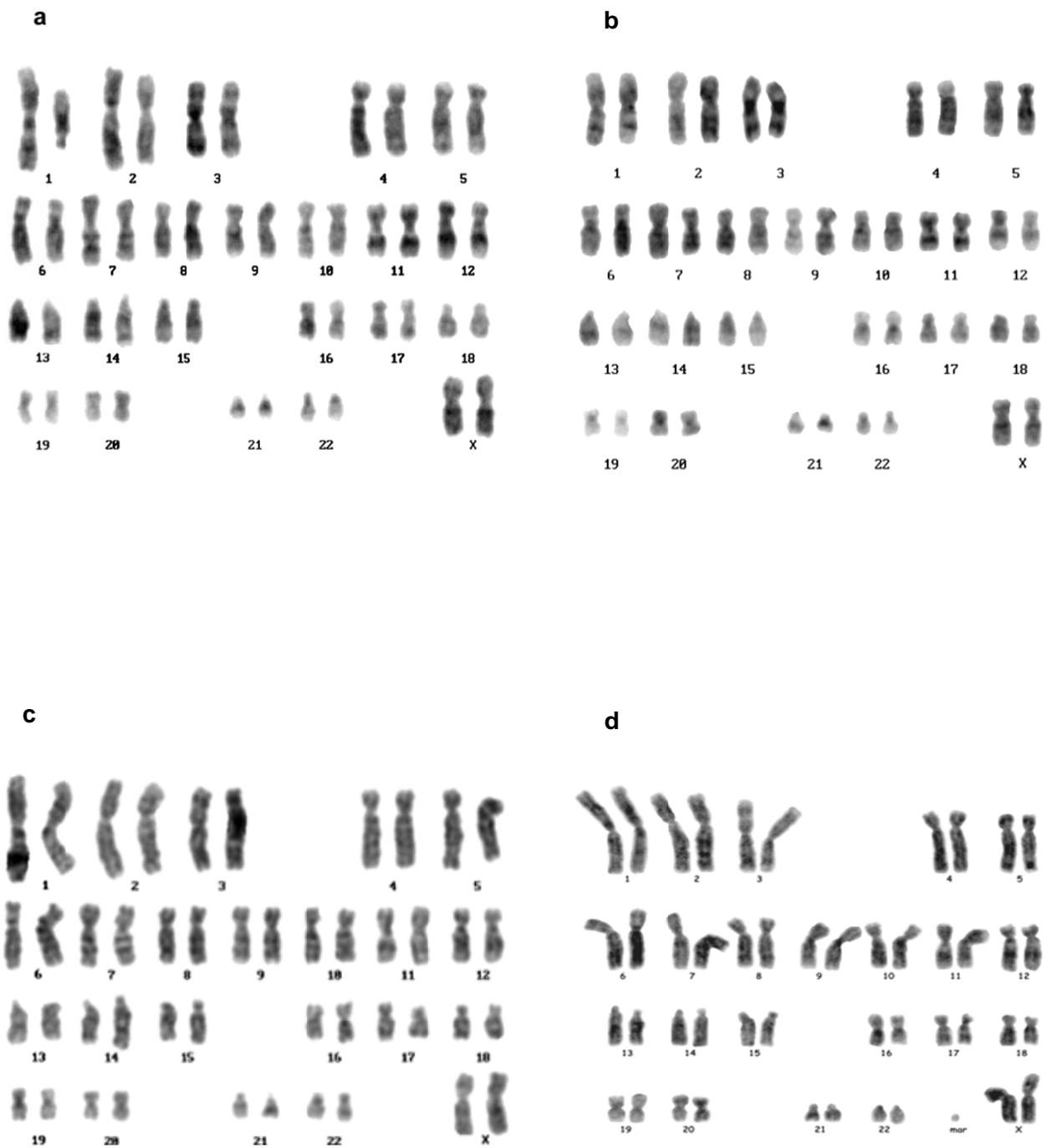


Figura 4. Cariótipos com bandeamento G. **a.** 46,XX, del(1q); **b.** 46,XX,del(5p); **c.** 46,XX,add(14q); **d.** 47,XX,+mar.

APÊNDICE C - Fotografias dos produtos da PCR em géis de agarose.

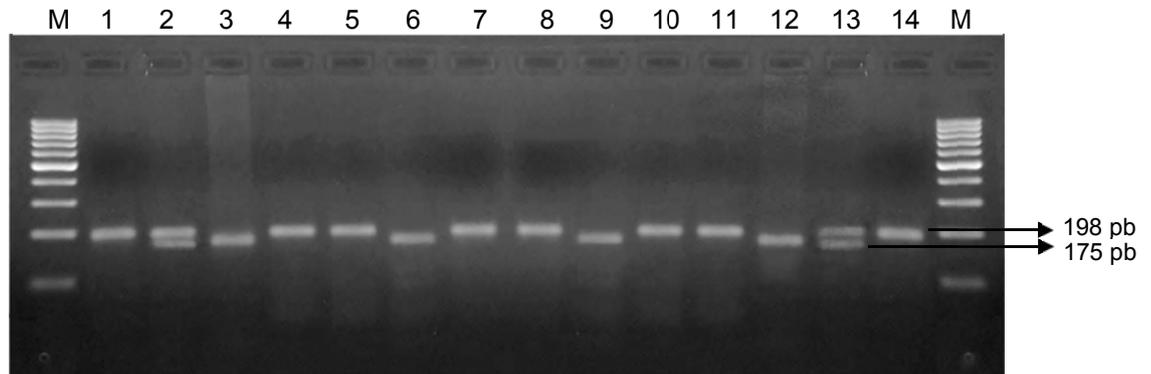


Figura 5. Imagem do gel de agarose 3% apresentando os padrões de migração eletroforética dos produtos de amplificação dos alelos do polimorfismo C677T do gene *MTHFR*. M-Marcador molecular 1kb plus (100 pb). As colunas 1, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 14 apresentam o fragmento de 198 pb correspondente ao genótipo CC. Nas colunas 2 e 13 observa-se o genótipo heterozigoto CT, com a presença de dois fragmentos com 198pb e 175pb. As colunas 3, 6, 9 e 12 apresentam o fragmento de 175pb correspondente ao genótipo TT.

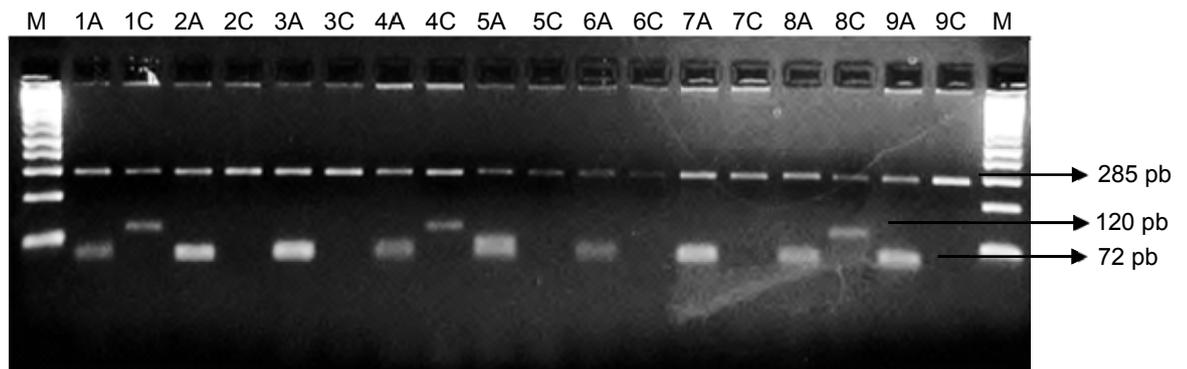


Figura 6. Imagem do gel de agarose 3% apresentando os padrões de migração eletroforética dos produtos de amplificação dos alelos do polimorfismo A1298C do gene *MTHFR*. M-Marcador molecular 1kb plus (100 pb). As colunas 1, 4 e 8 apresentam os fragmentos de 72 e 120 pb correspondentes aos alelos A e C, respectivamente (heterozigoto). Nas colunas 2, 3, 5, 6, 7 e 9, observa-se a presença somente do alelo A (homozigoto selvagem). O fragmento de 285 pb observado em todas as amostras corresponde à sequência do controle interno de amplificação do gene *Cyp-46*.

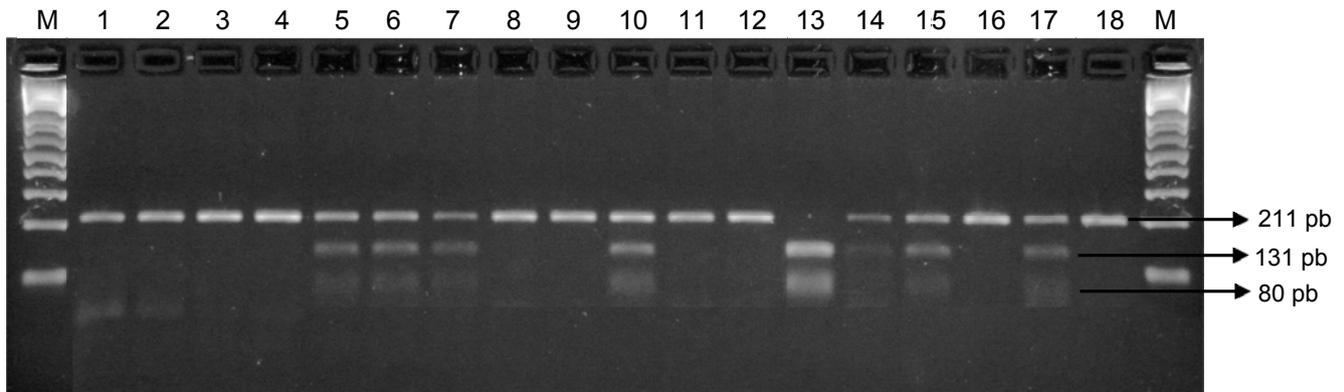


Figura 7. Imagem do gel de agarose 3% apresentando os padrões de migração eletroforética dos produtos de amplificação dos alelos do polimorfismo A2756G do gene *MS*. M-Marcador molecular 1kb plus (100 pb). As colunas 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11, 12, 16 e 18 apresentam o fragmento de 211pb correspondente ao genótipo selvagem (AA). Nas colunas 5, 6, 7, 10, 15 e 17 observa-se as repetições os fragmentos de 211 pb para o alelo A e de 131 e 80 pb para o alelo G, que compõe o heterozigoto. A coluna 13 correspondente ao genótipo GG com os fragmentos de 131 e 80 pb.

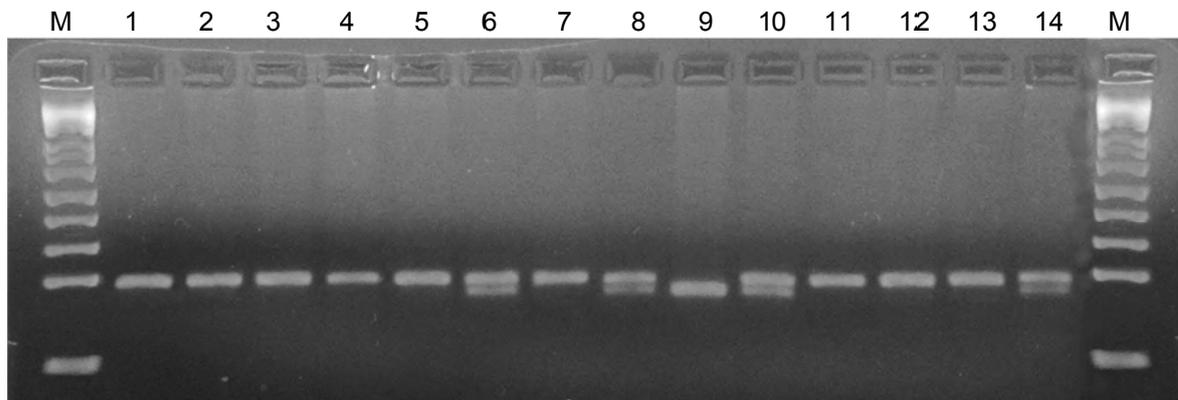


Figura 8. Imagem do gel de agarose 3% apresentando os padrões de migração eletroforética dos produtos de amplificação dos alelos do polimorfismo 3R/2R do gene *TS*. M-Marcador molecular 1kb plus (100 pb). As colunas 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 12, 13 apresentam as repetições 3R/3R. Nas colunas 6, 8, 10, 14 observa-se as repetições 3R/2R e a coluna 9 correspondente as repetições 2R/2R.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer do comitê de ética e pesquisa em seres humanos do Instituto de Medicina Integral – IMIP.

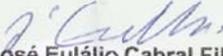
Instituto Materno Infantil
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica



DECLARAÇÃO

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

Recife, 04 de agosto de 2006.


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

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Dec. Lei 9851 de 09/11/87
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Dec. Lei 5013 de 14/09/84
UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. Lei 6628 de 30/7/81
INSCRIÇÃO MUNICIPAL 05.897.1
INSCRIÇÃO ESTADUAL 0000
CNPJ: 10.988.301/0001-29

Rua dos Coelhos, 300 Boa Vista
Recife - PE - Brasil CEP 50.070-550
PABX: (81) 2122.4100
Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 355
e-mail: imip@imip.org.br
home page www.imip.org.br

ANEXO B - Parecer do comitê de ética e pesquisa de ética e pesquisa em seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa**

Of. Nº. 229/2009 - CEP/CCS

Recife, 19 de agosto de 2009

Registro do SISNEP FR – 225776

CAAE – 0322.0.172.000-08

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 330/08

Titulo: “Síndrome de Turner: estudo cromossômico, molecular e investigação da associação de polimorfismos dos genes MTHFR e Timidilato sentas (TS) com o risco na não-disjunção”.

Pesquisador Responsável: Neide Santos

Senhora Pesquisadora:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou, de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, aprovando-o e liberando-o para início da coleta de dados em 18 de agosto de 2009.

Ressaltamos que o pesquisador responsável deverá apresentar o relatório ao final da pesquisa.

Atenciosamente

Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

A
Dra. Neide Santos
Dep. de Genética – CCB/UFPE

ANEXO C - Termo De Consentimento Livre e Esclarecido.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES MENORES DE 21 ANOS**

Eu, _____, responsável por _____ (grau de parentesco: _____; RG: _____) declaro que fui devidamente esclarecido(a) pela Dra. Neide Santos e/ou Dras. Gabriela Ferraz Leal e Jaqueline Araújo sobre a pesquisa “Síndrome de Turner: estudo cromossômico e análise de polimorfismos genéticos do metabolismo do folato como fatores de risco na não-disjunção” e que:

1. Concordei em participar da pesquisa sem receber qualquer pressão dos pesquisadores ou médicos que estão me atendendo;
2. Foi-me assegurado que continuarei a ser atendido no serviço médico independentemente de continuar participando ou não da pesquisa;
3. Concordei em prestar informações pessoais à equipe responsável pela pesquisa, contudo estas informações deverão ser confidenciais;
4. Autorizei a coleta de sangue para realização de exame cromossômico com bandeamento G e análise molecular para pesquisa de polimorfismos genéticos. Declaro ainda que fui informado sobre o objetivo destes exames e que terei livre acesso aos seus resultados;
5. Poderei desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo depois de ter assinado este termo, sem que isto comprometa o meu atendimento no médico.

Recife,

Assinatura do responsável pela paciente

Assinatura do pesquisador

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

Eu, _____, RG: _____, declaro que fui devidamente esclarecido(a) pela Dra. Neide Santos e/ Dras. Gabriela Ferraz Leal e Jaqueline Araújo sobre a pesquisa “Síndrome de Turner: estudo cromossômico e análise de polimorfismos genéticos do metabolismo do folato como fatores de risco na não-disjunção” e que:

1. Concordei em participar da pesquisa sem receber qualquer pressão dos pesquisadores ou médicos que estão me atendendo;
2. Foi-me assegurado que continuarei a ser atendido no serviço médico independentemente de continuar participando ou não da pesquisa;
3. Concordei em prestar informações pessoais à equipe responsável pela pesquisa, contudo estas informações deverão ser confidenciais;
4. Autorizei a coleta de sangue para realização de exame cromossômico com bandeamento G e análise molecular para pesquisa de polimorfismos genéticos. Declaro ainda que fui informado sobre o objetivo destes exames e que terei livre acesso aos seus resultados;
5. Poderei desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo depois de ter assinado este termo, sem que isto comprometa o meu atendimento no médico.

Recife,

Assinatura da paciente

Assinatura do pesquisador