

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

RAYSA SAMANTA MORAES LARANJEIRA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO DO GENE *FOXP3* E SUA
RELAÇÃO COM DOENÇAS AUTOIMUNES/INFLAMATÓRIAS NA SÍNDROME
DE TURNER**

**Recife
2018**

RAYSA SAMANTA MORAES LARANJEIRA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO DO GENE *FOXP3* E SUA RELAÇÃO COM
DOENÇAS AUTOIMUNES/INFLAMATÓRIAS NA SÍNDROME DE TURNER**

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

Área de concentração: Genética

Orientador: Profa. Dra. Neide Santos

Coorientador: Profa. Dra. Jaqueline de Azevedo Silva

**Recife
2018**

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/ 1728)

Laranjeira, Raysa Samanta Moraes

Análise de polimorfismos e expressão do gene FOXP3 e sua relação com doenças autoimunes/inflamatórias na síndrome de Turner / Raysa Samanta Moraes Laranjeira- 2018.

68 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Neide Santos

Coorientadora: Jaqueline de Azevedo Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Genética.
Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. Turner, Síndrome de 2. Polimorfismo (Genética) 3. Doenças autoimunes I. Santos, Neide (orient.) II. Silva, Jaqueline de Azevedo (coorient.) III. Título

616.978

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-197

Raysa Samanta Moraes Laranjeira

Análise de polimorfismos e expressão do gene *FOXP3* e sua relação com doenças autoimunes/inflamatórias na síndrome de Turner.

Aprovado em 23/02/2018

Banca Examinadora

Dra Neide Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Monica Lúcia Adam
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Ronaldo Celerino da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Paula Sandrin Garcia
Universidade Federal de Pernambuco

Recife
2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por ter me dado saúde, força e sabedoria para superar as dificuldades, iluminando meus caminhos.

Aos meus pais Ana Patricia e Luis Carlos, pelo apoio e paciência, pois há dois anos decidi morar próximo à universidade para facilitar o acesso e tempo investidos nos experimentos em laboratório e no mestrado, o que fez com que ficássemos um pouco distantes fisicamente, mas unidos por tanto amor incondicional. Minhas sinceras desculpas pela ausência física, mas em momento algum deixei de pensar em vocês. Devo-lhes todo o meu sucesso e espero um dia conseguir retribuir tudo o que fazem por mim. Amo vocês!

À minha irmã Luana, na qual sou eternamente grata pela amizade, ajuda e conselhos em todos esses anos. Graças a ela consegui finalizar a escrita da dissertação, por ter me emprestado seu notebook, visto que o meu havia dado problema durante a finalização da escrita. Muito obrigada, mana!

À minha amiga e irmã Arley Nascimento, que me recebeu com tanto carinho para compartilharmos, não somente do mesmo apartamento, como também de tanta união. Espero que nosso laço nunca se desfaça e que continuemos morando juntas por muito tempo. Foi muito importante para mim, poder compartilhar todos os meus momentos com você, sejam de alegrias ou tristezas. Conte comigo!

À minha orientadora Prof^a Neide Santos por ser uma pessoa iluminada e por toda ajuda, compreensão e incentivo para meu crescimento. Assim como, minha coorientadora Prof^a Jaqueline Azevedo e aos demais colaboradores do LIKA. Agradeço muito pelo apoio, ensinamentos e por todo o suporte.

À minha grande amiga e parceira de laboratório, Luana Oliveira. Muito obrigada por todos os ensinamentos passados, pela paciência, conselhos e pela amizade que construímos ao longo desse tempo. Sua amizade foi muito importante, tanto para meu crescimento pessoal e acadêmico, quanto por tornar meus dias melhores. Conte sempre comigo!

À minha parceira de mestrado e amiga, Juliana Oliveira. Obrigada por todos os ensinamentos em laboratório, pelos conselhos e alegrias que compartilhamos em todos esses anos. Que Deus ilumine teu caminho e conte sempre comigo!

Aos demais amigos do Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana (LGCAH), pelo ótimo convívio e por toda a nossa união!

Aos meus amigos da informática (Iuri, Jymmy e Dudu) que chegaram em meados de 2017 e preencheram um espaço no meu elo de amizades, juntamente com os nossos queridos colegas do “DAMUC”, Helena e Cláudio. Espero que nossa amizade continue firme e torço muito pela felicidade de cada um de vocês!

Aos que fazem parte do Departamento de Genética e que estão sempre presentes em nossos dias: Seu Romildo, Dona Zizi e Manassés. Obrigada por toda a ajuda prestada! Que Deus abençoe vocês!

Aos amigos que a biomedicina me presenteou: Bibia, Dé, Everton, Jeyse e Mary. Obrigada pela amizade, apoio e alegrias que me proporcionaram por todos esses anos! Que nossa amizade dure sempre e estarei torcendo pelo sucesso e felicidade de cada um de vocês. Contem comigo!

Às pacientes e responsáveis que contribuíram para a realização deste trabalho. À FACEPE pela concessão da bolsa e auxílio financeiro do projeto e ao PPGG. Os meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A síndrome de Turner (ST) caracteriza-se pela ausência, parcial ou total, de um segundo cromossomo sexual, afetando cerca de 1:2500 nascimentos femininos. Um risco aumentado de desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias tem sido observado em portadoras da ST quando comparadas às mulheres em geral. Diferentes genes têm sido associados ao desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias, dentre eles se destaca o gene *FOXP3*, que regula a diferenciação e ativação das células T reguladoras, funcionando como fator transcricional indispensável para a função supressora da autoimunidade. Esse estudo teve como objetivo investigar se polimorfismos do gene *FOXP3* rs3761548 (C>A), rs3761549 (C>T) e sua expressão podem modular a susceptibilidade a doenças autoimunes/inflamatórias na ST. A amostra constituiu de 97 pacientes portadoras de ST, entre as quais 38 possuíam doenças autoimunes/inflamatórias. A análise dos polimorfismos foi realizada utilizando o sistema Taqman e os dados foram analisados pelo programa SNPStats, com nível de significância de 0,05. Para avaliar os níveis de mRNA de *FOXP3* em pacientes com ST (n = 17) em comparação com o grupo controle (n = 15), foi realizado um teste de expressão gênica relativa. Não foi possível estabelecer uma associação entre polimorfismos do gene *FOXP3* com doenças autoimunes/inflamatórias na ST. Contudo, uma expressão elevada do gene *FOXP3* foi observada nas pacientes ST em relação aos indivíduos saudáveis (p = 1,533e-6).

Palavras-chave: síndrome de Turner. Doenças autoimunes. Doenças inflamatórias. *FOXP3*. Polimorfismos. Expressão.

ABSTRACT

Turner syndrome (TS) is characterized by partial or total absence of a second sexual chromosome, and affects about 1:2500 female births. Still, an increased risk of developing autoimmune / inflammatory diseases has been observed in TS patients when compared to women in general. Different genes have been associated with the development of autoimmune / inflammatory diseases, among them the *FOXP3* gene. This gene regulates the differentiation and activation of regulatory T cells, functioning as an indispensable transcriptional factor for the autoimmune suppressive function. This study aimed to investigate whether polymorphisms of the *FOXP3* gene rs3761548 (C> A), rs3761549 (C> T) and its expression modulate the susceptibility to autoimmune / inflammatory diseases in TS. From a total of 97 TS patients, 38 had autoimmune / inflammatory diseases. Analysis of the polymorphisms was performed by Taqman system and the data were analyzed by the SNPStats program, with a significance level of 0,05. To evaluate *FOXP3* mRNA levels in TS patients (n = 17) compared to the control group (n = 15), a relative gene expression test was performed. Even though it was not possible to establish an association between *FOXP3* gene polymorphisms with autoimmune / inflammatory diseases in TS. However, it was observed an increase of *FOXP3* gene expression in TS patients compared to healthy individuals (p = 1.533e-6).

Keywords: Turner syndrome. Autoimmune diseases. Inflammatory diseases. *FOXP3*. Polymorphisms. Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cariótipo mais comum na ST - 45,X. Em destaque a monossomia do cromossomo sexual X.....	20
Figura 2 - Principais achados fenotípicos em pacientes portadoras de ST. A) Paciente portadora de ST; (B) Redundância de pele; (C e D) Linfendema nas mãos e pés.....	22
Figura 3 - Expressão fenotípica da célula T reguladora. Células Tregs naturais expressam CD4+, CD25+, GITR e CTLA-4 na membrana e FOXP3 no núcleo.....	24
Figura 4 - Mecanismos de ação das células Tregs: a) supressão por citocinas inibitórias; b) supressão por citólise; c) interrupção metabólica; d) supresão por modulação da maturação ou função de células dendríticas.....	26
Figura 5 - Diagrama esquemático do gene <i>FOXP3</i> (a) cromossomo (b) gene. A figura mostra duas isoformas do gene e alguns SNPs, dentre eles em destaque (amarelo) os SNPs analisados no presente estudo.....	32
Figura 6 - Estrutura da proteína FOXP3, com o domínio repressor, central composto por dedos de zinco (ZnF) e zíper de leucina (Zip), e o domínio forkhead. A régua representa o número de aminoácidos de 1 a 431.....	34
Figura 7 - O controle da expressão da proteína FOXP3 por fatores de transcrição e elementos reguladores dentro do lócus do gene <i>FOXP3</i>	36
Figura 8 - Cariótipo de uma paciente portadora de mosaicismos cromossômico com a linhagem 46,X,+mar.....	46
Figura 9 - Cariótipo de uma paciente portadora de mosaicismos cromossômico com a linhagem 46,X,i(Xq).....	47
Figura 10 - Cariótipo de uma paciente portadora de mosaicismos cromossômico com a linhagem 46,X,del(Xp).....	47
Figura 11- Níveis de mRNA de <i>FOXP3</i> em pacientes ST e controles saudáveis. Uma maior expressão do gene <i>FOXP3</i> foi observada em pacientes com ST em comparação com o grupo controle (n = 15; p <0,001).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
Ag	Antígeno
AIJ	Artrite Idiopática Juvenil
AMP	Monofosfato de adenosina
APCs	Células apresentadoras de antígeno
AR	Rinite alérgica
CBF β	Do inglês Core-binding factor subunit- β
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CDs	Células dendríticas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEU	Caucasoide
CNS	Sequências não-codificantes conservadas
ATF1	Do inglês activating transcription factor 1
CTLA-4	Do inglês <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
DAIs	Doenças autoimunes
DCs	Células dendríticas
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FOXP3	Do inglês <i>forkhead box P3</i>
GD	Doença de Graves
GITR	Do inglês <i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor</i>
HC	Hospital das Clínicas
HLA-DR	Do inglês <i>human leucocyte antigen</i>
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IL	Interleucina
IL-2R	Receptor de interleucina 2
IMIP	Serviço de Genética Médica do Instituto de Medicina Integral

IPEX	Desregulação imune, Poliendocrinopatia, Enteropatia, Síndrome ligada ao X
ISCN	Sistema Internacional para Nomenclatura de Citogenética Humana
MAF	Frequência alélica mínima
NFAT	Do inglês <i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NK	Natural Killers
OD	Razão de Odds
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
Runx1	Do inglês <i>Runt-related transcription factor 1</i>
SD	Síndrome de Down
SHOX	Do inglês short stature homeobox-containing
SNP	Do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
ST	Síndrome de Turner
STAT	Do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
pSTAT5	STAT5 fosforilada
TGF- β	Do inglês <i>transforming growth factor β</i>
TNFR-2	Do inglês <i>tumor necrosis factor receptor-2</i>
Tregs	T reguladoras
tTreg	T reguladoras derivadas do Timo
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
YRI	Yoruba
ZnF	Zinco
A	Adenina
C	Citosina
del(Xp)	Deleção no braço curto do cromossomo X
G	Guanina
i(Xq)	Isocromossomo do braço longo do cromossomo X
KCl	Cloreto de potássio
ml	Mililitro
r(X)	Cromossomo X em anel
T	Timina

%	Porcentagem
°C	grau Celsius
μL	Microlitro
x ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 SÍNDROME DE TURNER	16
2.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS CONDIÇÕES AUTOIMUNES/ INFLAMATÓRIAS	19
2.2.1 Mecanismos de ação das células Tregs	21
2.4 GENE <i>FOXP3</i>	26
2.4.1 Estrutura e função do FOXP3	27
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	33
4.3 ANÁLISE CITOGENÉTICA	33
4.3.1 Cultura de linfócitos	33
4.3.2 Bandeamento G	33
4.4 ANÁLISE MOLECULAR	34
4.4.1 Extração de DNA e ensaios de genotipagem	34
4.4.2 Ensaios de Expressão Gênica	34
4.4.3 Análise dos dados	35
5 RESULTADOS	36
5.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA	36
5.2 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>FOXP3</i>	40
5.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE <i>FOXP3</i>	43
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO A - Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos CCS-UFPE	62

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO(PARA RESPONSÁVEL LEGAL PELO MENOR DE 18 ANOS - Resolução 466/12)	65
ANEXO C - TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE	68

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Turner (ST) é caracterizada pela monossomia cromossômica e, conseqüentemente, haploidia de genes que geralmente são expressos nos dois cromossomos X. Acomete 1 a cada 2.500 meninas, sendo a única monossomia compatível com a vida em humanos. Apesar dessa compatibilidade, apenas 1% dos fetos com o cariótipo 45,X são nativos, uma vez que 99% são abortados espontaneamente.

O diagnóstico é realizado através do cariótipo, no qual cerca da metade das pacientes portadoras de ST apresentam um cariótipo 45,X, 20% a 30% apresentam mosaicismo (45,X e, pelo menos, mais uma linhagem celular), e o restante apresentam alterações estruturais de um cromossomo X.

As manifestações clínicas da ST são muito variáveis, sendo a característica física mais associada a esta síndrome a baixa estatura, entretanto os indivíduos também podem apresentar pescoço curto e / ou alado, cúbito valgo, tórax em escudo, baixa implantação de cabelos e distúrbios gonadais como, amenorreia primária e infertilidade. Aumento dos níveis de autoanticorpos em pacientes ST foram relatados, bem como um risco aumentado de desenvolver algumas doenças autoimunes, como tireoidite de Hashimoto, diabetes mellitus tipo I, doença celíaca, doença de Crohn e colite ulcerativa, artrite reumatoide juvenil, doença de Addison, psoríase, vitiligo e alopecia.

Vários mecanismos regulatórios são usados para manter a homeostase imune, prevenir a autoimunidade e a inflamação moderada induzida por agentes patogênicos e fatores ambientais. O principal desses envolvem as células T reguladoras (Tregs), consideradas como os principais mediadores da tolerância periférica, desempenhando um papel fundamental na prevenção de doenças autoimunes, como diabetes mellitus tipo 1 (DM1), limitando doenças inflamatórias crônicas, como asma e doença inflamatória intestinal.

Um avanço na análise de células Tregs identificou um fator de transcrição chave, o FOXP3 (*forkhead box P3*), que é necessário para o desenvolvimento, manutenção e função dessas células desempenhando um papel fundamental no estabelecimento da homeostase imune. Análise de polimorfismos no gene *FOXP3* evidenciou associação com doenças linfoproliferativas autoimunes fatais em seres humanos e camundongos. Dessa forma, polimorfismos no gene *FOXP3*, bem como

sua expressão de forma alterada, podem levar ao desequilíbrio do sistema imunológico e mediar o desenvolvimento de doenças humanas clinicamente importantes.

No presente estudo, investigamos se os polimorfismos rs3761548 (C>A) e rs3761549 (C>T) no gene *FOXP3* podem ser um fator de susceptibilidade ao desenvolvimento de condições autoimunes/inflamatórias em indivíduos com ST e se existem diferenças no padrão de expressão deste gene em indivíduos ST e saudáveis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SÍNDROME DE TURNER

A síndrome de Turner (ST) caracteriza-se pela ausência, parcial ou total, de um segundo cromossomo sexual. É considerada uma das cromossomopatias mais frequentes, afetando cerca de 1:2500 nascidos-vivos do sexo feminino (Collett-Solberg *et al.*, 2011; Pinske, 2012).

O número de recém-nascidas corresponde a uma pequena fração dos conceptos com ST. Embora 1,5% de todas as concepções femininas na espécie humana tenham a constituição cromossômica 45,X, aproximadamente 99% destas são espontaneamente abortadas, levantando-se 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 (Hook e Warburton, 2014).

Urbach e Benvenitsy (2009) demonstraram a necessidade obrigatória do gene *PSF2RA* localizado na região pseudoautossômica dos cromossomos X e Y, para a viabilidade da placenta. Adicionalmente, Hook e Warburton (2014) reforçaram que todos os indivíduos com ST são na verdade mosaicos cripticos, sendo a monossomia do cromossomo X em embriões viáveis causada primariamente pela não disjunção mitótica.

O cariótipo 45,X (Figura 1) ocorre em 50% a 60% dos casos, sendo também observadas alterações estruturais do cromossomo X, como i(Xq), del(Xp), r(X), apresentando-se em aproximadamente 30% dos casos, com cariótipos homogêneos ou mosaicos que incluem uma linhagem celular 45,X (Carvalho *et al.*, 2010; Bispo *et al.*, 2013a; Freriks *et al.*, 2013). Cariótipos complexos que incluem a formação de cromossomos X derivativos são encontrados em poucos casos (Burégio-Frota *et al.*, 2010). Uma segunda linhagem celular, que pode incluir o cromossomo Y normal ou estruturalmente alterado, tem sido observado em 5 a 12% dos casos de ST (Bispo *et al.*, 2013b; Freriks *et al.*, 2013).

Dessa forma, análises citogenéticas clássicas podem não detectar cromossomos estruturalmente anormais, se os mesmos são muito pequenos ou raros, levando a um mosaicismo oculto e podendo envolver parte do cromossomo Y (Bianco *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2008). Dependendo da abordagem metodológica, alguns estudos têm demonstrado uma frequência de material derivado do

cromossomo Y em pacientes com ST variando de 0 a 61% (Sallai *et al.*, 2010; Bispo *et al.*, 2013b).

A expressão clínica da ST pode ser atenuada pela baixa contagem de células 45,X na presença de mosaicismo e / ou alterações estruturais dos cromossomos sexuais, caracterizando poucos estigmas para as pacientes (Bispo *et al.*, 2013a).

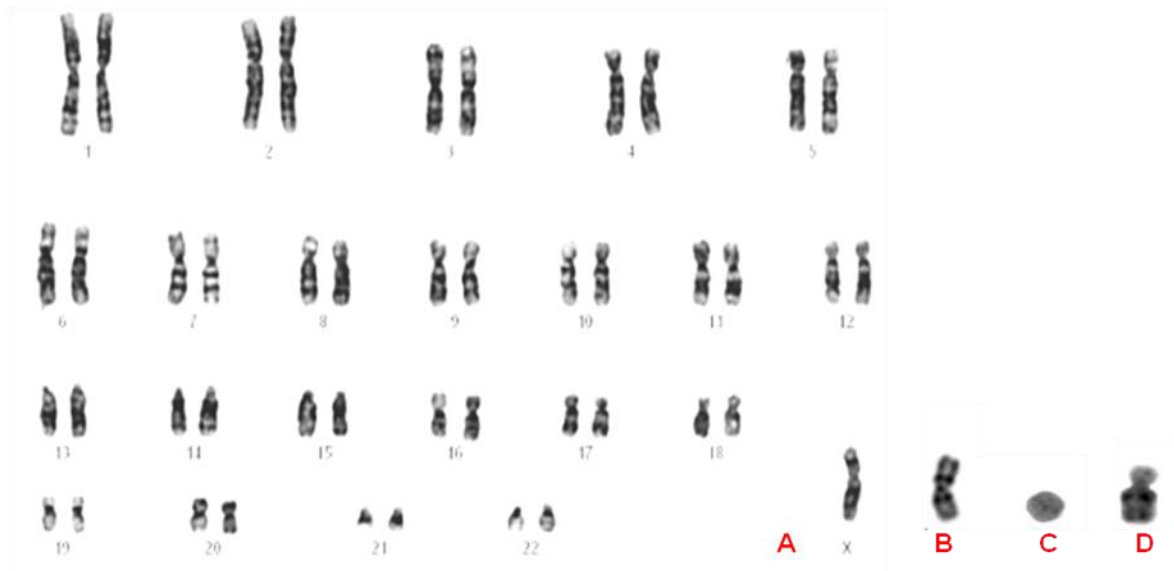


Figura 1. Cariótipos encontrados na ST. A) Cariótipo mais comum na ST - 45,X. B) Isocromossomo - i(Xq). C) Cromossomo em anel - r(X). D) Deleção no braço curto do cromossomo X – Del(Xq). (Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana – LGCAH, UFPE).

A ST possui uma variedade de características fenotípicas, sendo a maioria causada por haploinsuficiência de genes normalmente expressos por ambos os cromossomos X (Davenport, 2010), onde uma única cópia do material genético é incapaz de efetuar as funções que normalmente são 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 (Urbach e Benvenisty, 2009). Neste caso, a perda do cromossomo X não “imprintado” resultaria na ausência total de expressão de genes específicos em algumas células (Lepage *et al.*, 2012).

As características clínicas da ST mais frequentes são: baixa estatura, disgenesia gonadal (que resulta em atraso no desenvolvimento puberal, acompanhada da ausência de estrogênio ao longo da vida), amenorreia primária e esterilidade (Carvalho *et al.*, 2010; Gonzalez e Witchel, 2012; Bispo *et al.*, 2013a).

Além disso, podem ser encontrados uma grande variedade de sinais dismórficos, tais como pescoço curto e / ou alado, tórax largo e em escudo, *cubitus valgus*, baixa implantação dos cabelos, orelhas proeminentes (Figura 2) (Araujo *et al.*, 2010; Collett-Solberg *et al.*, 2011; Bispo *et al.*, 2013a).

Esta síndrome pode envolver algumas malformações, especialmente no coração (mais comumente dissecção da aorta e doença arterial coronariana) (Mortensen, 2012) e rins, além de aterosclerose, osteoporose, doença da tireoide, obesidade, distúrbios endócrinos e metabólicos, os quais são contribuintes reconhecidos para morbidade, mortalidade e diminuição da expectativa de vida (Schoemaker *et al.*, 2008; Davenport, 2010).

Um risco aumentado de desenvolvimento de doenças autoimunes (DAIs) tem sido observado em mulheres portadoras da ST quando comparadas às mulheres em geral (Jorgensen *et al.*, 2010). Embora a literatura demonstre esses dados, os mecanismos fisiopatológicos e etiológicos relacionados à imunidade permanecem não definidos (Mortensen *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2009).

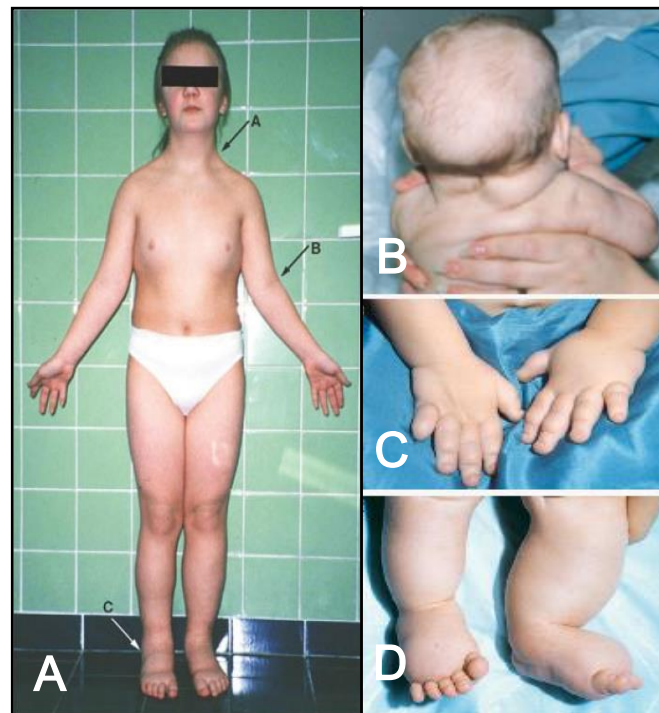


Figura 2. Principais achados fenotípicos em pacientes portadoras de ST. A) Paciente portadora de ST; (B) Redundância de pele; (C e D) Linfendema nas mãos e pés. (Fonte: Sybert & McCauley, 2004; Nat clin pract endocrinol metab, Nature 2008).

Doenças autoimunes ocorrem com maior prevalência em mulheres, embora as causas não sejam esclarecidas (Bianchi *et al.*, 2012). Hormônios sexuais, fatores reprodutivos, fatores ambientais, padrão de inativação do cromossomo X e a dosagem de genes ligados ao cromossomo X podem estar envolvidos na etiologia dessas doenças (Jorgensen *et al.*, 2010).

2.2 MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS CONDIÇÕES AUTOIMUNES/INFLAMATÓRIAS

Doenças autoimunes (DAIs) são um grupo heterogêneo de doenças complexas de caráter inflamatório, caracterizadas pela perda da tolerância aos autoantígenos, levando à diminuição da capacidade do sistema imunológico do indivíduo em distinguir o que é próprio daquilo que não é próprio (Jonuleit e Schmitt, 2003). Essa capacidade, denominada autotolerância, é mantida nas células imunocompetentes B e T, tanto por mecanismos centrais (induzida nos órgãos linfoides primários, em consequência ao reconhecimento dos antígenos próprios pelos linfócitos T imaturos), quanto por mecanismos periféricos (as células T maduras reconhecem especificamente os antígenos (Ag) próprios presentes nos tecidos periféricos, tornando-se assim incapazes de responder a estes) (Giardi, 2007).

Na primeira fase do desenvolvimento das DAIs, a imunidade é normal no contexto de susceptibilidade genética; na segunda fase, inicia-se uma resposta imune anormal, mas sem manifestações clínicas (imunidade pré-clínica), nos quais auto anticorpos ou anormalidades celulares podem ser evidenciados. Essas alterações podem, eventualmente, aumentar nos meses ou anos seguintes, levando os sintomas clínicos iniciais e ao diagnóstico (Bianchi *et al.*, 2012; Tobón *et al.*, 2012).

As células T regulatórias (Tregs) representam uma subpopulação de linfócitos T caracterizados pela expressão da molécula CD25+ e do fator nuclear FOXP3 (*forkhead box P3*) (Figura 3) (Campbell, 2007). O FOXP3 tem como função induzir a supressão das células T efectoras, bloqueando a ativação e a função destes linfócitos, sendo assim importantes no controle da resposta imunológica a Ags próprios e não-próprios (Sojka, 2008).

Pelo menos dois tipos de células Tregs foram descritas: naturais e adaptativas (Bacchetta, 2007). As células Tregs naturais expressam constitutivamente o receptor de cadeia α da IL-2 (CD25), sendo denominadas CD4⁺CD25⁺. São produzidas naturalmente nos corpúsculos de Hassal (no timo), como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras, representando 5 a 10% das células T CD4⁺ periféricas (Yagi, 2004; Sakaguchi, 2005).

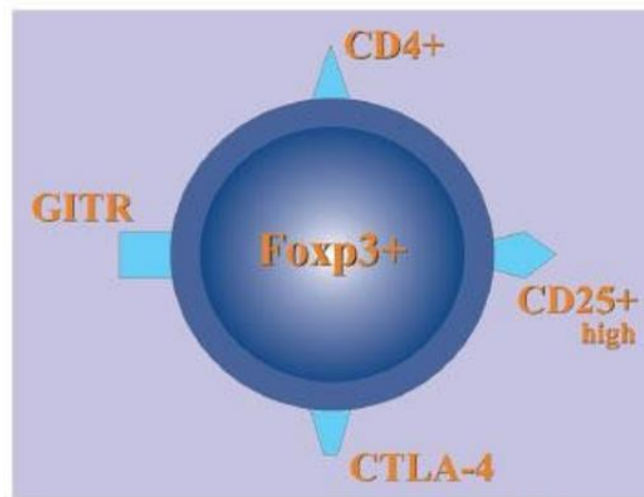


Figura 3: Expressão fenotípica da célula T reguladora. Células Tregs naturais expressam CD4⁺, CD25⁺, GITR e CTLA-4 na membrana e FOXP3 no núcleo. (Fonte: Hermênio, 2006).

Além do marcador CD25, as células Tregs naturais também expressam outros marcadores de superfície que não são específicos, mas auxiliam na identificação destas células, entre os quais estão: CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), GITR (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor), TNFR-2 (tumor necrosis factor receptor-2) e HLA-DR (human leucocyte antigen). Dentre estes marcadores o CTLA-4, que é expresso constitutivamente nos linfócitos T CD4⁺CD25⁺, é um dos mais estudados e acredita-se que o bloqueio desta molécula possa afetar a função das Tregs (Read, 2006).

Outros receptores de superfície descritos nas células Tregs naturais são CD27, Fas, CD62L e os receptores de quimiocina CCR6, CCR7, CCR8 e CD103, o que permite a migração das Tregs até o local de inflamação (Bacchetta, 2007; Gupta, 2008). Porém, nenhum destes marcadores é exclusivo desta subpopulação celular, uma vez que também refletem o estado de ativação do linfócito T. A descoberta do fator de transcrição FOXP3, foi crucial no entendimento do

desenvolvimento e função das Tregs, permitiu caracterizar melhor estas células (Yagi, 2004).

Sendo o FOXP3 um marcador nuclear, o receptor de IL-7 (CD127), que é regulado negativamente pelo FOXP3, foi descrito como um marcador de superfície fidedigno para selecionar as Tregs dentre a subpopulação de linfócitos T, além de caracterizar aquelas com maior função supressora (Liu, 2006; Ndhlovu, 2008).

As células Tregs adaptativas, por sua vez são geradas na periferia após uma variedade de estímulos antigênicos ou em condições ditas tolerogênicas (Taams, 2006; Bacchetta, 2007). Estas células exercem sua função através da liberação de citocinas inibitórias como IL-10 e TGF- β (Jonuleit, 2003; Sakaguchi, 2006). Vários tipos de células Tregs adaptativas têm sido descritos, incluindo TR1, que produzem IL-10 e cuja função supressiva está bem documentada nas doenças alérgicas, autoimunes e transplante alogênico (Bacchetta, 2007).

2.2.1 Mecanismos de ação das células Tregs

Definir os mecanismos de função das células Tregs é de importância crucial, não somente proporcionando uma visão dos processos de controle da tolerância periférica, como também fornecendo uma série de alvos terapêuticos potencialmente importantes (Dario, 2008; van der Net, 2016).

Em geral, células Treg FOXP3 + exercem funções supressoras através de uma série de mecanismos bem estabelecidos (Vignali, 2008). Por exemplo, elas secretam citocinas anti-inflamatórias, moléculas co-inibitórias expressas (como o CTLA4) e podem modular a atividade das células apresentadoras de antígeno (APCs). As células Tregs também podem esgotar fatores de crescimento cruciais do microambiente e potencialmente morrer em anergia ou apoptose (Shevach, 2009).

Do ponto de vista funcional, os mecanismos de supressão potencial das células Tregs podem ser classificados em quatro "modos de ação" básicos: supressão por citocinas inibitórias, supressão por citólise, supressão por interrupção metabólica e supressão por modulação da maturação ou função de células dendríticas (Figura 4).

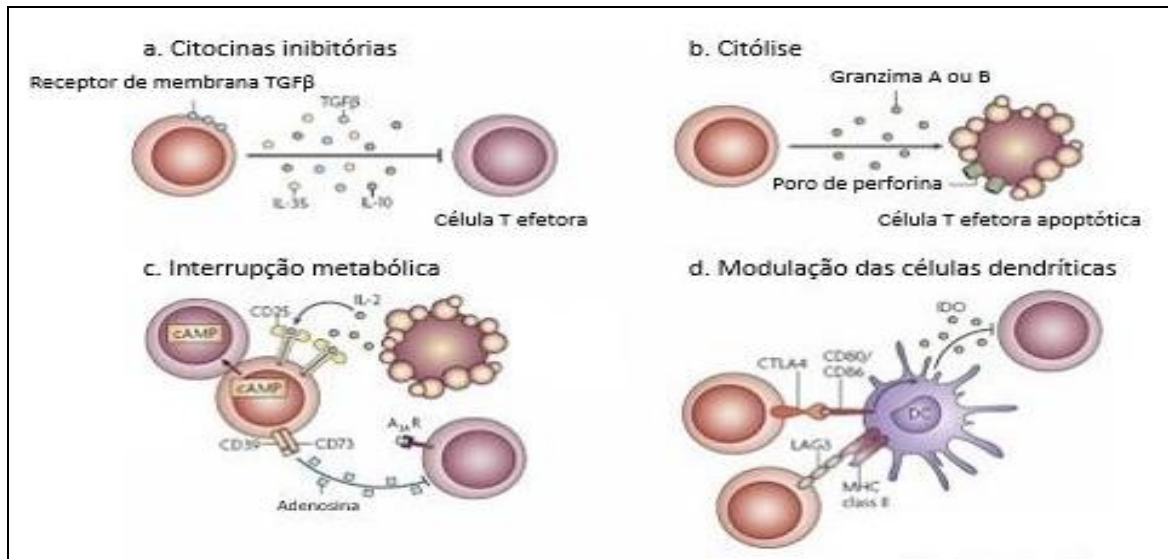


Figura 4. Mecanismos de ação das células Tregs: a) supressão por citocinas inibitórias; b) supressão por citólise; c) interrupção metabólica; d) supressão por modulação da maturação ou função de células dendríticas. (Fonte: Nature Reviews, Immunology)

No primeiro mecanismo (Figura 4a), citocinas inibitórias tais como IL-10 (interleucina-10) e TGFβ, têm sido o foco de atenção considerável como mecanismo de supressão mediada por células Tregs. Também há um interesse significativo em sua capacidade de gerar populações de células Tregs induzidas (também conhecidas como adaptáveis), naturalmente *in vivo* ou experimentalmente, como uma modalidade terapêutica potencial (Dario, 2008; Monteiro *et al.*, 2010).

Níveis elevados de IL-10 sugerem um potencial regulatório para essas células, uma vez que tal citocina é crucial para limitar as respostas pró-inflamatórias e autoimunes (Shevach, 2006; Xystrakis, 2006). Coombes *et al.* (2005) demonstrou que camundongos com deficiência de IL-10 desenvolvem colite grave, acompanhada de dano tecidual e inflamação excessiva. Suri-Payer (2001) demonstraram que a produção de IL-10 pelas células T reguladoras é necessária para supressão de certas formas de inflamação autoimune intestinal. Em indivíduos com asma grave há relatos de alterações na sinalização de quimiocinas relacionadas às Tregs, além de secreção diminuída de IL-10 (Bacchetta, 2007; Nguyen, 2009). Também foi observado que as Tregs de indivíduos com asma intermitente a moderada, tinham uma diminuição na expressão da proteína FOXP3 (Provoost *et al.*, 2009).

O segundo mecanismo (Figura 4b), demonstrado pela supressão por citólise mediada pela secreção de granzimas (enzimas que rompem proteínas armazenadas

em grânulos citoplasmáticos), foi há muito tempo considerado o papel das células Natural Killers (NK) e dos linfócitos T CD8+ citotóxicos. No entanto, muitas células T CD4+ humanas exibem atividade citotóxica (Lieberman, 2003). Em concordância com isto, as células Tregs naturais ativadas demonstraram expressar a granzima A, mediando a morte celular e a perfuração através da adesão de CD18 (Grossman, 2004).

Gondek *et al.* (2005) foram os primeiros a relatar que as células Tregs murinas, deficientes em granzima-B, tinham atividade de supressão reduzida *in vitro*, mas essa apoptose induzida por células Tregs, pareceu ser independente de perfuração.

A noção de que as células Tregs podem possuir atividade citolítica, baseia-se em estudos que mostraram morte de células B de uma maneira dependente de granzima B, parcialmente dependente de perfuração, resultando na supressão da função das células B (Zhao, 2006).

Em relação ao terceiro mecanismo (Figura 4c), alguns modos de supressão foram descritos e podem responder como mecanismos que medeiam "distúrbios metabólicos" das células T efetoras alvo, induzindo a liberação intracelular ou extracelular de nucleotídeos de adenosina (Deaglio, 2007).

A expressão das ectoenzimas (enzima extracelular) CD39 e CD73 pode gerar adenosina pericelular, funcionando como supressoras de células T efetoras, através da ativação do receptor A2A da adenosina (Kobie, 2006; Borsellino, 2007). Contudo, a ligação de adenosina A ao receptor A2A parece não apenas inibir as funções das células T efetoras, mas aumentar a geração de células Tregs adaptativas inibindo a expressão de IL-6, enquanto promove a secreção de TGF β (Zarek, 2008). Embora o TGF β induza a diferenciação de células Treg FOXP3 +, a IL-6 inibe ao desenvolvimento de células Tregs, gerando células Th17 pró-inflamatórias (Oukka, 2007).

Além de afetar diretamente a função das células T efetoras, as células Tregs podem modular a maturação e / ou função das células dendríticas (CDs) (necessárias para a ativação de células T efetoras), como demonstra o quarto mecanismo (Figura 4d). A microscopia intravital revelou interações diretas entre células Tregs e CDs *in vivo*, que pode atenuar a ativação de células T efetoras por CDs (Tang *et al.*, 2006)

O CTLA-4 mostrou-se constitutivamente expresso por células Tregs (Shevach, 2009). Ao utilizar anticorpos bloqueadores específicos ou células Tregs deficientes em CTLA-4, foi observado que na ausência de CTLA-4 funcional, a supressão mediada por células Tregs de células T efectoras através de CDs foi reduzida (Serra, 2003; Oderup, 2006). Também foi demonstrado que estas células poderiam condicionar CDs, através de um mecanismo dependente das interações entre CTLA-4 e CD80 e / ou CD86, para expressar indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), uma potente molécula reguladora que induz o catabolismo do triptofano em metabólitos pró-apoptóticos resultando na supressão de células T efectoras (Fallarino *et al.*, 2003; Mellor, 2004).

2.3 Condições autoimunes e inflamatórias na síndrome de Turner

Alguns fatores podem explicar a predominância de doenças autoimunes em mulheres, incluindo ausência de estrogênio e / ou inativação do cromossomo X (Bakalov, 2012). Aproximadamente 15% dos genes ligados ao cromossomo X escapam da inativação, sugerindo que existe um grau notável de heterogeneidade de expressão entre as mulheres (Berletch, 2011).

A maioria dos genes que escapam da inativação do cromossomo X são genes pseudoautosômicos localizados em Xp, os quais possuem genes homólogos no cromossomo Y. Sendo a maioria das anormalidades observadas em ST ocasionada pela falta de eficiência de genes que normalmente são expressos por ambos os cromossomos X (Carrel, 2005). Na ST isso pode ser exemplificado pela haploinsuficiência do gene *SHOX* (Xp22.3) envolvida na baixa estatura (Mortensen, 2012), além da deficiência auditiva e malformações esqueléticas (Binder, 2011).

O elevado risco de desenvolvimento de DAIs em pacientes com ST parece ser devido, em parte à haploinsuficiência de genes ligados ao cromossomo X, uma vez que a quantidade desse cromossomo sexual é crítica para a manutenção ou perda da tolerância imune (Jorgensen *et al.*, 2010).

Entre os distúrbios autoimunes associados à ST, estima-se que a tireoidite de Hashimoto afeta cerca de 50% dos portadores (Larizza, 2009; Bakalov *et al.*, 2012). Outros distúrbios autoimunes associados incluem psoríase, vitiligo, alopecia e doenças inflamatórias do intestino (doença celíaca, colite ulcerativa e doença de

Crohn) (Oiso, 2007; McCarthy e Bondy, 2008; Davenport, 2010; Dias *et al.*, 2010; Bakalov *et al.*, 2012).

Células T auto reativas, mas também células B e outras células relacionadas à imunidade, podem não se tornar tolerantes por auto antígenos gerados por um dos dois cromossomos X, e assim, desencadear uma resposta autoimune em tecidos alvos (Bianchi *et al.*, 2012). Além disso, algumas alterações imunológicas têm sido descritas nestes indivíduos, incluindo baixos níveis de imunoglobulinas G e M, fraca quimiotaxia e resposta diminuída a mitógenos das células T (Stenberg *et al.*, 2004; Larizza *et al.*, 2009).

Alguns relatos têm sugerido que a ocorrência do i(Xq) pode induzir ao hipotireoidismo ou diabetes autoimune devido à presença aumentada de auto-anticorpos (Elsheikh *et al.*, 2001; El-Mansoury *et al.*, 2005). Bakalov (2009) demonstrou que o cromossomo i(Xq) está associado com a maior prevalência de diabetes mellitus do tipo 2, o que foi explicado pelo aumento dos transcritos de genes pró-inflamatórios. Um mecanismo semelhante pode ser responsável pelo maior risco de hipotireoidismo em mulheres com ST e i(Xq). Entretanto, pesquisas posteriores não encontraram associação entre cariótipos específicos e o risco de doenças autoimunes na ST (Elleuch *et al.*, 2010; Jorgensen *et al.*, 2010).

A patogênese das DAIs é multifatorial, evidências têm demonstrado que além da genética, outros mecanismos complementares estão envolvidos na patogênese da autoimunidade, em particular, a epigenética (Bird, 2007).

Modificações epigenéticas desempenham papéis fundamentais em uma variedade de processos biológicos incluindo a remodelação da cromatina, inativação do cromossomo X, a regulação do desenvolvimento e diferenciação de células, e alteração de respostas imunes (Lu, 2006).

Dentre os genes localizados no cromossomo X, que são conhecidos e possivelmente envolvidos no processo de imunoregulação, está o gene *FOXP3*, o qual desempenha um papel importante na homeostase imune (Walker *et al.*, 2003). Deleção nesse gene causa imunodesregulação, poliendocrinopatia e enteropatia ligada ao cromossomo X (Bakalov, 2012). Os polimorfismos deste gene estão associados a DAIs em caucasianos, sugerindo assim que haploinsuficiência no gene *FOXP3* poderia ser responsável pelo aumento do risco de doenças autoimunes/inflamatórias em pacientes ST (Ban *et al.*, 2007).

Polimorfismos no gene *FOXP3* foram encontrados na síndrome denominada IPEX (Desregulação imune, Poliendocrinopatia, Enteropatia, Síndrome ligada ao X), um distúrbio autoimune que afeta múltiplos órgãos com desenvolvimento de alergia, doença inflamatória intestinal (van der Vliet e Nieuwenhuis, 2007), diabetes mellitus tipo 1 (Bassuny *et al.* 2003) e doença autoimune da tireoide (Ban *et al.* 2007). Aparentemente esses pacientes têm comprometimento no desenvolvimento das células Tregs e consequente defeito na função supressora, levando a um estado de hiperativação de linfócitos T (Ban *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2011).

Os polimorfismos neste gene podem alterar FOXP3 (fator de transcrição), de forma funcional ou quantitativa, modificando a especificidade de ligação dos fatores de transcrição para os seus locais de ligação e modificando a cinética da iniciação da transcrição (Hanel *et al.*, 2011).

Portanto, polimorfismos neste gene podem levar à diminuição de células Tregs CD4⁺ CD25⁺ e posteriormente células T CD4⁺ cronicamente ativadas que expressam níveis aumentados de vários marcadores de ativação e citocinas, resultando em doenças autoimunes (Wildin *et al.*, 2002, Bjornvold *et al.*, 2006).

2.4.1 Estrutura e função do FOXP3

O FOXP3 é membro da subfamília P das proteínas FOX e assim como os demais fatores de transcrição é composto por três domínios (repressor, central e ligante de DNA ou *forkhead* (Coffer, 2004; Campbell, 2007) (Figura 6).

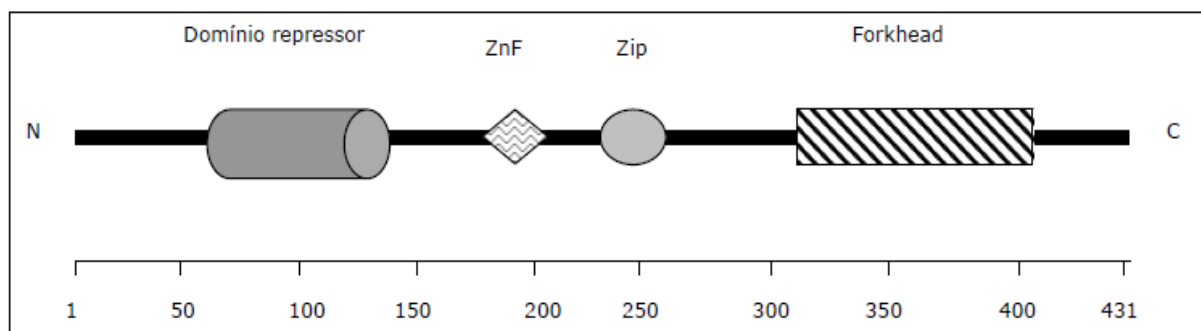


Figura 6: Estrutura da proteína FOXP3, com o domínio repressor, central composto por dedos de zinco (ZnF) e zíper de leucina (Zip), e o domínio *forkhead*. A régua representa o número de aminoácidos de 1 a 431. (Fonte: Adaptado de Torgerson, 2007).

No domínio *forkhead* é onde ocorrem as interações FOXP3-NFAT, homodimerização de moléculas FOXP3 e é responsável pela repressão transcricional de uma série de genes alvo imuno-relacionados (Xie, 2015). Nesta região foi identificada a maioria das mutações que afetam o gene *FOXP3*, as quais são do tipo *missenses* (as que levam à substituição de um aminoácido por outro diferente) (Ozkaynak, 2009).

O domínio N-terminal também confere a capacidade de reprimir a transcrição de genes alvo, mas não se liga ao DNA (Lopes *et al.*, 2006). Além disso, um complexo de remodelação de cromatina que inclui HDAC7 ou HDAC9 e TIP60 pode interagir com essa região, sugerindo um papel na facilitação entre o complexo de FOXP3 e outras moléculas de co-regulação, o qual pode colaborar na promoção da regulação de genes induzidos por *FOXP3* (Hori, 2012).

O domínio central, que contém um dedo de zinco (ZnF) e um zíper de leucina está envolvido na interação proteína-proteína e o domínio *forkhead* se liga ao DNA (Torgerson, 2007), sendo importante para a homodimerização do FOXP3 (Lopes, 2006; Li, 2007), que é indispensável para sua função (Deng *et al.*, 2012; Ramsdell e Ziegler, 2014).

Os membros da família FOXP (FOXP1, FOXP2, FOXP3 E FOXP4) podem formar dímeros e ativar a transcrição. FOXP1, FOXP2 e FOXP4 são expressos no intestino, cérebro e pulmão e parecem ter um papel na embriogênese que é mantida em adultos (Li, 2004). O FOXP1 está presente tanto nas células T CD4⁺ CD25⁺ quanto em T CD4⁺ CD25⁻, enquanto que o FOXP3 é expresso apenas em células T CD4⁺ CD25⁺ (Li *et al.*, 2007).

A expressão do fator de transcrição FOXP3 em células Tregs é necessária e suficiente para suprimir a função efetora das células T convencionais (Tconv) e em cooperação com outros fatores de transcrição, incluindo NFAT e Runx1, FOXP3 estabelece o programa das Tregs reprimindo ou trans ativando genes definidos (McMurchy, 2009; Josefowicz, 2012). Os mecanismos moleculares da regulação mediada por FOXP3 na transcrição gênica não estão claramente definidos, mas a repressão envolve interações com a histona acetil-transferase TIP60, a histona desacetilase HDAC7 e histona de ligação H1.5. (Li, 2007; Mackey-Cushman, 2011).

Tanto a iniciação como a manutenção da transcrição de FOXP3 são altamente dependentes de CNS (sequências não codificantes conservadas) (Figura 7), que servem como regiões de ligação para vários fatores de transcrição (Ling,

2017). A região do potencializador CNS1 está situado intronicamente e é particularmente importante para a indução da expressão extra tímica de FOXP3 em células T. Entretanto, é exclusivamente indispensável para ativar a expressão de FOXP3 em resposta à sinalização de SMAD induzida por TGF β (Tone *et al.*, 2008; Schlenner, 2012).

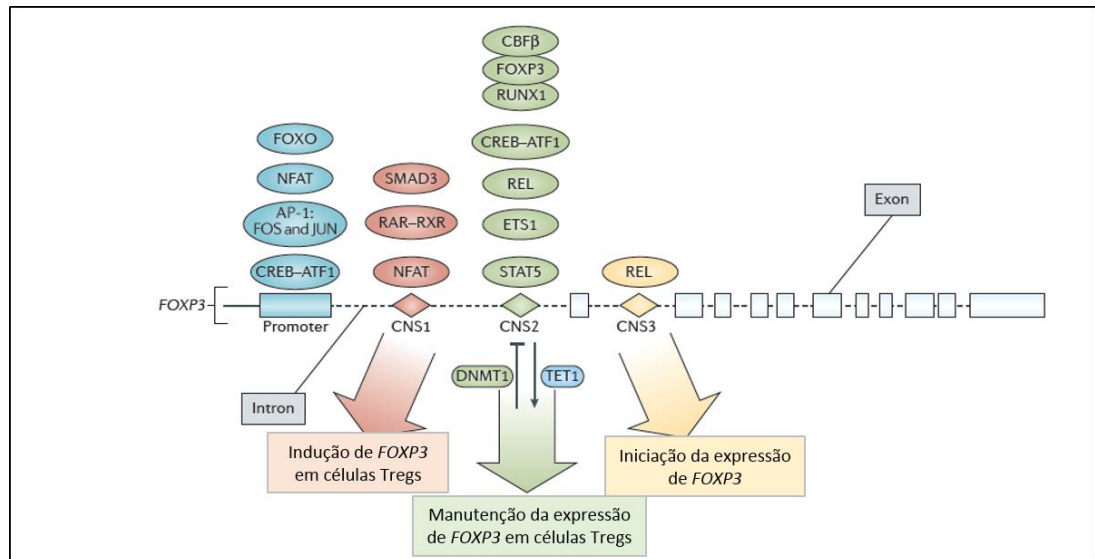


Figura 7. O controle da expressão da proteína FOXP3 por fatores de transcrição e elementos reguladores dentro do locus do gene *FOXP3*. A figura descreve os elementos codificantes e não codificantes caracterizados do gene que codifica a proteína FOXP3 juntamente com os fatores de transcrição que são relatados para ativar a transcrição do gene e seus locais de interação.

O CNS2 (também conhecido como região específica de desmetilação em células Treg) é importante para manter a expressão de FOXP3 em células Treg derivadas do timo (tTreg) (Povoleri *et al.*, 2013). A região CNS2 está localizada no primeiro íntron de *FOXP3*, e os elementos CpG no CNS2 se tornam hipometilados durante o desenvolvimento de células tTreg (Toker *et al.*, 2013). Os elementos de CpG desmetilados e outros elementos reguladores no gene *FOXP3* permitem a ligação de vários fatores de transcrição, incluindo REL, CREB-ATF1, RUNX1, subunidade do fator de ligação do núcleo- β (CBF β), ETS1, transdutor de sinal e ativador da transcrição 5 (STAT5), bem como o próprio FOXP3 (Zheng *et al.*, 2010; Josefowicz, 2012).

O CNS3 é encontrado entre o éxon 1 e o éxon 2 de *FOXP3*, e esta região promove o acúmulo de modificações de histonas permissivas no promotor do gene,

deixando-o em um estado epigeneticamente equilibrado em células FOXP3+ estabelecidas e precursores de células Treg FOXP3- (Zheng *et al.*, 2010). Assim, o CNS3 tem um papel crucial como um interruptor epigenético que controla a transcrição de *FOXP3* nessas células em resposta à ligação por REL, que é um regulador importante do desenvolvimento de células Treg no timo (Ruan *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2014).

No contexto da inflamação, a manutenção da expressão da proteína FOXP3 é crucial para a tolerância sustentada, por exemplo, nas articulações afetadas por Artrite Idiopática Juvenil (AIJ), Tregs apresentam-se com alta expressão de CD25, desmetilação em região específica, bem como função supressiva (*in vitro*), contudo tais células expressam níveis baixos de *FOXP3* (Bending *et al.*, 2014). Foi relatado que os baixos níveis de *FOXP3* prejudicaram a sinalização de IL-2R (receptor de IL-2), através do baixo pSTAT5 (STAT5 fosforilada), que é conhecido por reduzir o mRNA de *FOXP3* e com isso, prejudica a renovação necessária de proteínas FOXP3 (Goldstein, 2016).

Em contraste com STAT5, STAT3 regula negativamente a transcrição de *FOXP3* ligando-se a um elemento silenciador, reduzindo a ligação de SMAD3 (Xu *et al.*, 2010). Na psoríase, por exemplo, Treg parece aumentar níveis de STAT3 fosforilado e diminuir a função supressiva, possivelmente relacionada a altos níveis de IL-6, IL-21 e / ou IL-23 (Yang, 2016). Por outro lado, a regulação negativa *in vitro* da proteína FOXP3 em Tregs na AIJ pode ser resgatada pela ativação STAT3 estimulada por IL-6R (Bending, 2015)

Dada a função da expressão do gene *FOXP3* na regulação do sistema imune e na manutenção da homeostase celular, é importante investigar se os níveis de expressão deste gene podem estar alterados e consequentemente modulando a resposta imune/inflamatória em pacientes ST.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se há associação de polimorfismos no gene *FOXP3* e seu perfil de expressão com a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças autoimunes/inflamatórias na síndrome de Turner.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir o cariótipo das pacientes encaminhadas com suspeita clínica de ST;
2. Verificar se existe associação entre os polimorfismos rs3761548 (C>A) e rs3761549 (C>T) do gene *FOXP3* com a susceptibilidade em desenvolver doenças autoimunes/inflamatórias na síndrome de Turner;
3. Avaliar se os níveis de expressão do gene *FOXP3* apresentam-se alterados em pacientes portadoras de síndrome de Turner quando comparadas ao grupo controle.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

O estudo é do tipo transversal de caráter analítico, com o objetivo de promover a caracterização citogenética e molecular em pacientes com suspeita clínica da síndrome de Turner (ST) atendidas no Serviço de Genética Médica do Instituto de Medicina Integral (IMIP) e do Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE).

A seleção das pacientes, com as condições clínicas em estudo, foi realizada por análise dos prontuários médicos, e quando necessário as pacientes foram convocadas. A cada convocação ou durante as visitas de rotina, cerca de 5 ml de sangue periférico foi coletado em tubos contendo heparina como anticoagulante (para a cultura de linfócitos) e em tubos de EDTA (para a extração de DNA e RNA). Posteriormente, as amostras foram conduzidas para o Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana, do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco para análise citogenética e para a realização dos experimentos de biologia molecular, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami.

O estudo foi dividido em três etapas de análise: 1) Na primeira etapa foi realizada a confirmação dos cariótipos das pacientes encaminhadas com suspeita clínica de ST; 2) Na segunda etapa foi determinada a frequência dos polimorfismos rs3761548 (C>A) e rs3761549 (C>T) do gene *FOXP3*.

A amostra foi composta por 97 pacientes com média de idade de 11,48 anos (0.1-33 anos), todas oriundas do Estado de Pernambuco, na qual foi dividida nos seguintes grupos de análise: (1) Grupo controle - pacientes portadoras de ST que não apresentaram condições clínicas sugestivas de doenças autoimunes e inflamatórias; (2) Grupo caso - pacientes portadoras de ST que desenvolveram algum tipo de doença autoimune e/ou inflamatórias;

3) A terceira etapa correspondeu a análise da expressão do gene *FOXP3*, constituído por dois grupos: (1) Grupo caso - 17 pacientes portadoras de ST com média de idade de 14 anos (06 - 23 anos) e (2) Grupo controle - formado por 15 mulheres, não portadoras de ST, com média de idade de 34 anos (08 - 72 anos), sem histórico relatado de doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, oriundas de um banco de RNA cedido pelo grupo de Patologia Molecular e Medicina Genômica do Laboratório LIKA.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

O presente trabalho foi realizado após a apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde- CCS/UFPE, Nº do CAAE 71353717.8.0000.5208 (Anexo 1), desenvolvido obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Todos os indivíduos envolvidos foram orientados sobre a proposta do estudo e assinaram, quando em concordância, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2).

4.3 ANÁLISE CITOGENÉTICA

4.3.1 Cultura de linfócitos

As preparações cromossômicas foram obtidas a partir da cultura de linfócitos, onde foram adicionados 0,5 ml de sangue total nos frascos de cultura contendo 4 ml do meio RPMI 1690 (GIBCO) suplementado com 1ml de soro bovino fetal (CULTILAB) e 0,2 ml de fitohemaglutinina (GIBCO). Em seguida, os frascos foram mantidos na estufa a 37 °C. Após 70 horas foi adicionado 0,1 ml de colchicina 0,0016% (SIGMA) e ao completar 72 horas de cultivo, foi realizado o choque hipotônico com KCl previamente aquecido a 37 °C. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 20 minutos, centrifugados e o material foi fixado com metanol/ácido acético (3:1).

4.3.2 Bandeamento G

Para a realização do bandeamento G as lâminas foram envelhecidas por cinco dias, em temperatura ambiente, e mergulhadas numa solução de tripsina a 37 °C (0.10 g de tripsina para 100ml de tampão Dulbeco) por um período entre 6 a 10 segundos. Posteriormente, foram lavadas com solução salina e coradas com 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 2016. A análise cromossômica foi realizada em microscopia óptica utilizando no mínimo 25 células com o bandeamento G.

4.4 ANÁLISE MOLECULAR

4.4.1 Extração de DNA e ensaios de genotipagem

A extração do DNA das pacientes com cariótipos compatíveis com a ST foi realizada através do Kit para purificação de DNA Illustra blood genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare).

Para a determinação dos polimorfismos, os SNPs selecionados no gene *FOXP3* foram: rs3761548 C>A e rs3761549 C>T, os quais estão localizados em regiões intrônicas. A seleção dos SNPs foi baseada de acordo com a frequência alélica mínima (MAF) de 10% para os dois principais grupos étnicos encontrados em Pernambuco (YRI – Yoruba e CEU – caucasóide).

Para os ensaios de genotipagem foi usada o sistema Taqman®, no qual há a utilização de sondas fluorescentes específicas para os polimorfismos analisados. As reações de genotipagem foram realizadas usando o equipamento ABI 7500 (Applied Biosystems, 2014).

4.4.2 Ensaios de Expressão Gênica

O ácido ribonucleico (RNA) foi obtido a partir de leucócitos totais das amostras de sangue periférico e extraído utilizando-se o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA) (o qual consiste numa solução monofásica à base de fenol e isotiocianato de guanidina), que deriva de uma modificação do método desenvolvido por Chomczynsky e Sacchi (1987).

Após o isolamento do RNA total foi avaliada a sua integridade através de eletroforese em gel de agarose. Após esta etapa o RNA total foi quantificado usando a espectrofotometria para avaliar a concentração total do RNA e a presença de contaminantes.

Para a síntese de cDNA, a concentração de RNA total foi padronizada em 500ng em todas as reações usando o kit comercial ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Para os ensaios de expressão foram usadas as sondas: gene alvo *FOXP3* (Hs.247700) e gene de referência *GUSB* Forward primer: CACTGTGGCTGTCACCAAGA e reverse: TCCGCATCCTCATGCTTGTT. Os ensaios foram realizados no equipamento ABI7500 (Applied biosystems) e o método de análise foi o $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a quantificação relativa da expressão gênica.

4.4.3 Análise dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando o SNPStats (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web) e pelo programa R (<https://www.r-project.org/>). As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta por meio do equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizando o teste do qui-quadrado (χ^2). Razão de Odds (OR) e os intervalos de Confiança de 95% (IC) foram calculados e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A análise do poder amostral, através do *post-hoc* foi realizada com o programa G* Power (versão 3.1.9.2, disponível em <http://www.gpower.hhu.de/>), com uma probabilidade de erro de 0,05.

Na análise da expressão gênica, para avaliar amostras de distribuição normal foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Por fim, as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), a partir do programa Excel.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA

A análise citogenética confirmou cariótipos compatíveis com a ST em 97 pacientes (0.1-33 anos) (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização citogenética das pacientes com síndrome de Turner.

Cariótipos	Número de pacientes
45,X	50
46,X,i(Xq)/45,X	16*
46,X,i(Xq)	5
45,X/46,XY	4*
46,X,r(X)/45,X	6*
45,X/46,X,+mar	2*
45,X/46,XX	2*
46,X,del(Xp)/45,X	1*
46,X,del(Xq)/45,X	2*
46,X,dup(Xq)/45,X	2*
45,X,inv(9)(p11q13)	1
45,X,t(11;12)(q22q22)	1
45,X,9qh+/46,X,r(X),9qh+	1*
46,X,der(X)add(Xp)/45,X	1*
45,X,16qh+	1
45,X,16qh+/46,X,+mar,16qh+	1*
45,X/47,XXX	1*
Total	97

* Casos com mosaïcismo

Entre as 97 pacientes portadoras da ST, cerca de 78,3% (76 pacientes) apresentaram baixa estatura, sendo esse fenótipo significativamente observado dentre os casos de mosaïcismos, estando presente em 25 dos 28 casos. A condição de amenorreia primária foi encontrada em 36% (35 pacientes) da amostra total, enquanto nas pacientes com mosaïcismo essa frequência foi de 64,3% (18 pacientes). Outros fenótipos como pescoço curto e / ou alado e infantilismo sexual

também foram relevantemente encontrados no geral, como se pode observar na tabela 2.

Tabela 2. Características clínicas das 97 pacientes com síndrome de Turner

Características clínicas	n
Baixa estatura	76
Anormalidades esqueléticas	58 ^a
Osteopenia/osteoporose	10
Infantilismo sexual	100 ^B
Amenorreia primária	35
Sobrepeso/obesidade	14
Dislipidemia	6
Doença autoimune da tireoide	16
Alopecia	2
Doença inflamatória crônica (com sobrepeso/obesidade)	21
Doenças infecciosas	6
Doença neurológica	23
Doença cardiovascular	18
Malformação renal	10
Doenças de pele	17
Edema	36
Hipertelorismo mamário	25
Deficiência auditiva	10
Malformação de orelhas	25
Hipotonia muscular	3
Palato arqueado	7
Malformação nas unhas	33
Alteração anatômica dos olhos	13
Pescoço curto e alado	39
Baixa implantação do cabelo	27
Redundância de pele no pescoço	19

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

O cariótipo 45,X foi o mais prevalente, sendo encontrado em 51,4% da amostra (50 pacientes), seguido de pacientes portadoras de mosaicismos, os quais foram detectados em 40,2% dos casos (39 pacientes). Além disso, outras alterações como inversões do cromossomo 9, adição de heterocromatina nos cromossomos 9 e 16, duplicações e até mesmo translocações, também foram observadas nas pacientes.

Entre as pacientes portadoras de mosaicismos, o cariótipo 46,X,i(Xq)/45,X foi o mais prevalente, representando 41% (16 pacientes) da amostra. Linhagens celulares contendo cromossomo em anel (46,X,r(X)/45,X) e o cromossomo Y (45,X/46,XY) também foram detectadas em mosaicismos (Tabela 1). As figuras 8 a 10 mostram cariótipos observados em mosaicismos com a linhagem celular 45,X.

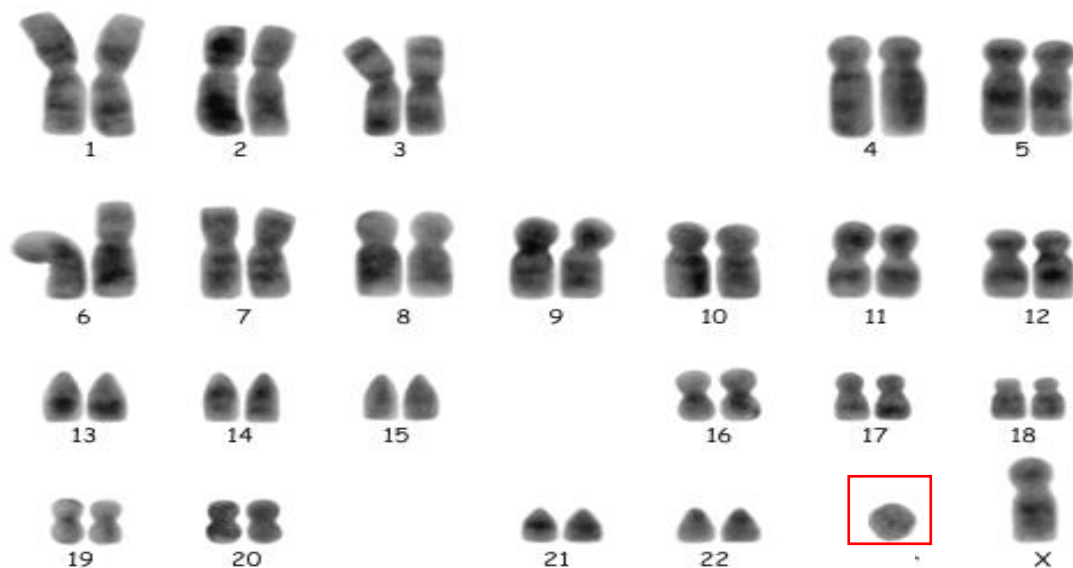


Figura 8. Cariótipo de uma paciente portadora de mosaicismos cromossômico com a linhagem 46,X,r(X). (Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana – LGCAH, UFPE).

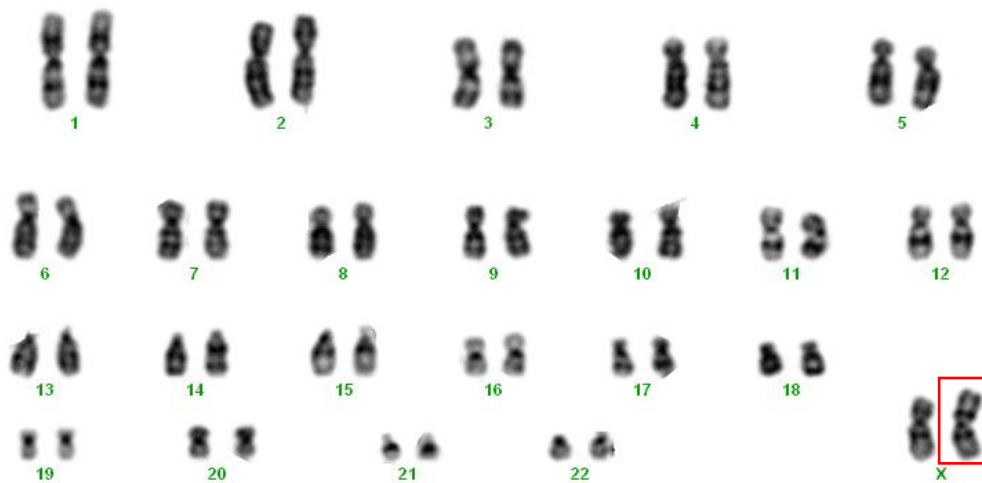


Figura 9. Cariótipo de uma paciente portadora de mosaicismo cromossômico com a linhagem 46,X,i(Xq). (Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana – LGCAH, UFPE).

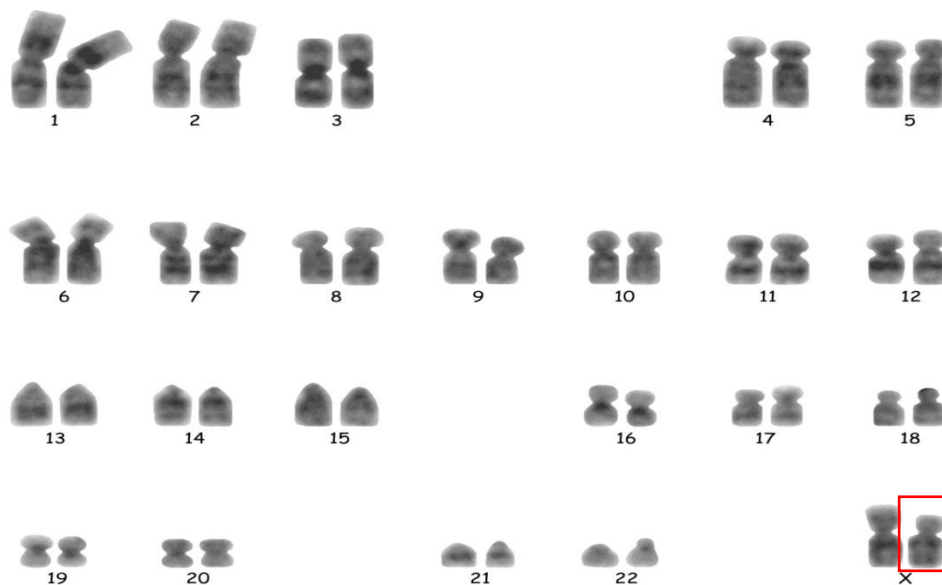


Figura 10. Cariótipo de uma paciente portadora de mosaicismo cromossômico com a linhagem 46,X,del(Xp). (Fonte: Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana – LGCAH, UFPE).

Entre as 97 pacientes portadoras de ST, cerca de 17,52% apresentaram doenças autoimunes/inflamatórias, sendo um total de 17 pacientes portadoras de DAIs (incluindo tireoidite de Hashimoto, hipotireoidismo e alopecia), na qual uma

delas apresentou tanto alopecia quanto DAI da tireoide e 21,64% possuem algum tipo de doença inflamatória crônica (Tabela 3).

Tabela 3. Portadoras de síndrome de Turner que desenvolveram doenças autoimunes e/ou inflamatórias.

Cariótipos	Alopecia	DAIs da tireoide	Doenças inflamatórias
45,X	-	7	13
46,X,i(Xq)/45,X	2	6	2
Demais cariótipos	-	3	6
Total	2	16	21

5.2 ANÁLISE DOS POLIMORFISMOS DO GENE *FOXP3*

A análise dos polimorfismos do gene *FOXP3* rs3761548 (C>A), rs3761549 (C>T) foi realizada nas 97 pacientes ST, analisando cada SNP com o grupo de pacientes que desenvolveram doenças autoimunes (Tabela 4) e com o grupo de pacientes que possuíam doenças inflamatórias (Tabela 5).

Na tabela 4, após análise do polimorfismo do SNP rs3761548 (C>A) com pacientes ST foi encontrado no grupo controle (ST sem DAI) 65% do genótipo CC (selvagem), 5% AC (heterozigoto para o polimorfismo) e 30% AA (variante). Enquanto que no grupo de casos (ST com DAIs) foi observado 82,3% do genótipo CC, 2% CA e 5,9% AA. Após análise estatística, o *p-value* encontrado foi 0,05 não mostrando significância estatística quanto à presença do polimorfismo para o desenvolvimento das DAIs nestas pacientes, porém talvez como um fator protetor. Foi encontrado um poder estatístico de 99% (com 5% de confiança) comparando genótipos de pacientes casos com controles.

Na análise do SNP (rs3761549) foi observado no grupo controle que 90% possuíam o genótipo CC (selvagem), 3,8% CT (heterozigoto para o polimorfismo) e 6,2% TT (variante). Enquanto que no grupo de casos, foi observado 88,2% do genótipo CC, nenhum heterozigoto e 11,8% TT. O *p value* encontrado foi 0,3 não mostrando significância estatística quanto à presença do polimorfismo para o desenvolvimento das DAIs nestas pacientes. Foi encontrado um poder estatístico de

75% (com 5% de confiança) comparando genótipos de pacientes casos com controles.

Tabela 4. Análise dos polimorfismos do gene *FOXP3* com pacientes ST (Controles) e portadoras de doenças autoimunes (Casos).

Polimorfismos	Controles N (%) (80)	Casos N (%) (17)	Odds ratio (95% CI)	p-value
rs3761548				
Alelos				
C	108 (0,68)	30 (0,88)		
A	52 (0,32)	4 (0,12)	0,27 (0,06-0,85)	0,02
Genótipos				
CC	52 (65)	14 (82,3)		
CA	4 (5)	2 (11,8)	1,83 (0,15-14,43)	0,6
AA	24 (30)	1 (5,9)	0,15 (0,003-1,14)	0,05
rs3761549				
Alelos				
C	147 (0,02)	30 (0,88)		
T	13 (0,08)	4 (0,12)	1,5 (0,33-5,32)	0,5
Genótipos				
CC	72 (90)	15 (88,2)		
CT	3 (3,8)	0 (0)	1,9 (0,16-13,06)	0,6
TT	5 (6,2)	2 (11,8)	2,21 (0,18-17,68)	0,3

Resultados expressos em: valor absoluto (valor relativo)

A tabela 5 mostra a análise de associação dos SNPs com o desenvolvimento de doenças inflamatórias nas pacientes com ST, nos quais foram observados no SNP (rs3761548) que no grupo controle (ST sem doenças inflamatórias) 71% possuíam o genótipo selvagem (CC), 5,3% CA (heterozigoto para o polimorfismo) e 23,7% AA (variante). No grupo de casos 57,1% possuem o genótipo selvagem, 9,5% CA e 33,3% AA. O *p-value* encontrado foi de 0,38, mostrando que não houve significância estatística. Um poder estatístico de 80% (com 5% de confiança) foi observado comparando genótipos de pacientes casos com controles.

Tabela 5. Análise dos polimorfismos do gene *FOXP3* com pacientes ST(Controles) e portadoras de doenças inflamatórias (Casos).

Polimorfismos	Controles N (%) (76)	Casos N (%) (21)	Odds ratio (95% CI)	p-value
rs3761548				
Alelos				
C	112 (0,74)	26 (0,62)		
A	40 (0,26)	16 (0,38)	1,71 (0,77-3,72)	0,17
Genótipos				
CC	54 (71)	12 (57,1)		
CA	4 (5,3)	2 (9,5)	2,21 (0,18-17,68)	0,33
AA	18 (23,7)	7 (33,3)	0,38 (0,49-5,71)	0,38
rs3761549				
Alelos				
C	137 (0,9)	40 (0,95)		
T	15 (0,1)	2 (0,05)	0,12 (0,01-0,59)	0,002
Genótipos				
CC	67 (88,2)	20 (95,2)		
CT	3 (4)	0 (0)	0,00 (0,00-8,62)	1,0
TT	6 (7,9)	1 (4,8)	0,56 (0,01-5,06)	1,0

Resultados expressos em: valor absoluto (valor relativo)

Na análise do SNP (rs3761549) foi observado no grupo controle (ST sem doenças inflamatórias) que 88,2% possuíam o genótipo CC (selvagem), 4% CT (heterozigoto para o polimorfismo) e 7,9% TT (variante). Enquanto que no grupo de casos 95,2% possuíam o genótipo selvagem e 4,8% TT. O *p value* encontrado foi 1,0 não mostrando significância estatística quanto à presença do polimorfismo para o desenvolvimento das DAIs nestas pacientes. Contudo, um *p value* de 0,002 foi observado na frequência do alelo T, sugerindo um fator protetor para essas pacientes. Foi encontrado um poder estatístico de 55% (com 5% de confiança) comparando genótipos de pacientes casos com controles.

5.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENE *FOXP3*

Para avaliar os níveis de mRNA de *FOXP3* em pacientes com ST em comparação com o grupo controle, foi realizado um teste de expressão gênica relativa. Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *FOXP3* nas pacientes em relação aos indivíduos saudáveis ($p = 1,533e-6$) como observado na figura 11, indicando que o gene *FOXP3* apresenta-se 9,21 vezes mais expresso em indivíduos ST quando comparados ao grupo controle.

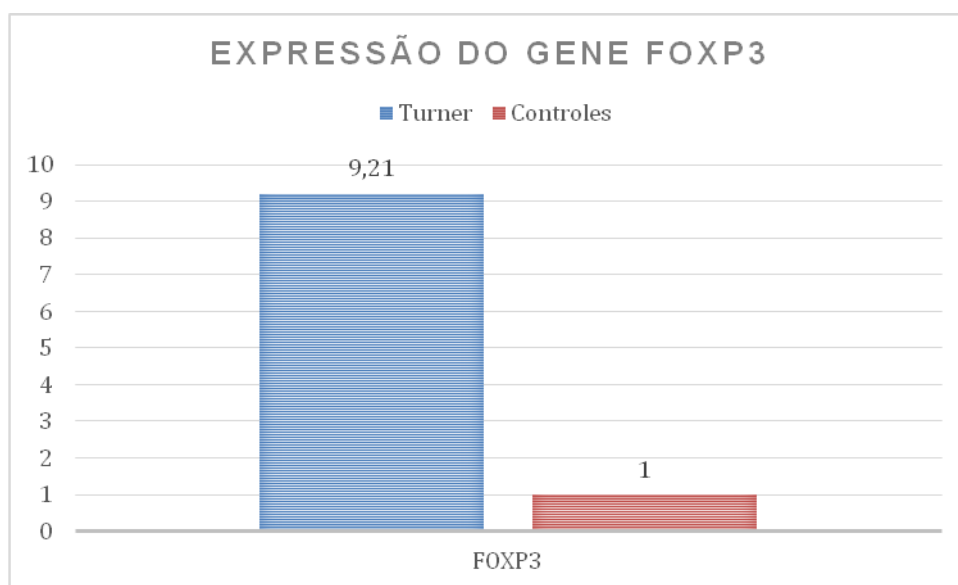


Figura 11. Níveis de mRNA de *FOXP3* em pacientes ST e controles saudáveis. Uma maior expressão do gene *FOXP3* foi observada em pacientes com ST em comparação com o grupo controle ($n = 15$; $p < 0,001$).

A tabela 6 mostra a caracterização do grupo de 17 pacientes portadoras de ST que foram selecionadas para a análise de expressão gênica do *FOXP3*, composto por diferentes cariótipos (sem estratificação), independente da presença ou não de doenças autoimunes/inflamatórias, e em 15 indivíduos do grupo controle.

PACIENTES ST	CARIÓTIPOS	DOENÇAS AUTOIMUNES / INFLAMATÓRIAS
1	45,X[25]	AUSENTE
2	45,X [25]	PRESENTE (DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS)
3	45,X [25]	AUSENTE
4	45,X[25]	PRESENTE (DOENÇAS INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS)
5	45,X[20]	AUSENTE
6	45,X[31]/46,X,i(Xq)[4]	AUSENTE
7	45,X[14]/46,X,i(Xq)[11]	PRESENTE (DAIs da TIREOIDE E INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS)
8	45,X[10]/46,X,i(Xq)[12]	PRESENTE (DAIs da TIREOIDE)
9	45,X[5]/46,X,i(Xq)[20]	AUSENTE
10	45,X[11]/46,X,i(Xq)[9]	PRESENTE (DAIs da TIREOIDE)
11	45,X[25]/46,X,i(Xq)[5]	AUSENTE
12	45,X[9]/46,X,r(X)[16]	AUSENTE
13	46,X,i(Xq)[31]	AUSENTE
14	46,X,i(Xq) [25]	AUSENTE
15	45,X[20]/ 46,X,+mar[10]	PRESENTE (DAIs da TIREOIDE)
16	46,X,del(Xq)[46]/45,X[4]	AUSENTE
17	46,X,del(Xq)[27]/45,X[3]	PRESENTE (DAIs da TIREOIDE E INFLAMATÓRIAS CRÔNICAS)

Tabela 6. Caracterização cariotípica e clínica das pacientes portadoras de ST incluídas nos ensaios de expressão gênica.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, as preparações cromossômicas em linfócitos de sangue periférico permitiram confirmar o cariótipo compatível com a ST em 97 pacientes com média de idade de 11,48 anos (0.1-33 anos). O cariótipo mais frequente foi o 45,X, perfazendo 51,4% das pacientes, seguidos de 40,2% portadores de mosaicismo, sendo o cariótipo 46,X,i(Xq)/45,X o mais prevalente (41%). Os resultados se assemelham aos obtidos por Jung *et al.* (2010), onde o i(Xq) foi observado em 57,1% dos casos de mosaicismo confirmados.

Além dos fenótipos comuns à ST, como amenorreia primária e baixa estatura, as pacientes que possuem i(Xq) têm um risco aumentado de desenvolver distúrbios autoimunes como a tireoidite de Hashimoto e excesso de autoimunidade tireoidiana (Elsheikh, 2001; Rosa *et al.*, 2008). No nosso estudo, 58,82% das pacientes apresentaram DAIs (tireoidite de Hashimoto, hipotireoidismo e alopecia) e mosaicismo com a presença do i(Xq), como também uma paciente portadora de DAI e mosaicismo com a linhagem 46,X,del(Xp).

O cromossomo i(Xq) além de originar um cariótipo com trissomia Xq também leva a um cariótipo com monossomia para Xp (Khandekar *et al.*, 2013). Indivíduos com cariótipo 46,X,del(Xp) geralmente apresentam o fenótipo ST característico devido à haploinsuficiência de genes pseudoautossômicos localizados na região Xp terminal (Bondy e Cheng, 2009), enquanto que a monossomia do braço longo (del(Xq)) está mais relacionada à disgenesia gonadal e menos estigmas físicos (Bonis, 2011). No nosso estudo, a paciente portadora do cariótipo 46,X,del(Xp)/45,X apresentou o fenótipo característico da ST que inclui a baixa estatura, redundância de pele no pescoço, cúbito valgo, amenorreia primária, além de DAI da tireoide.

O mecanismo pelo qual i(Xq) aumenta o risco de doenças autoimunes, especialmente tireoidite de Hashimoto (HT), é desconhecido. A associação do cromossomo i(Xq) e a maior prevalência de DM de tipo 2 foi descrito por Bakalov, (2009), sendo explicado pelo aumento dos transcritos de genes pró-inflamatórios. Um mecanismo semelhante pode ser responsável pelo maior risco de hipotireoidismo de Hashimoto em mulheres com ST e i(Xq). Podemos hipotetizar que a monossomia Xp, nos cariótipos 45,X ou 46,X,i(Xq) ou 46,X,del(Xp), poderá predispor a autoimunidade tireoidiana (tireoidite linfocítica), possivelmente através de haploinsuficiência do gene *FOXP3*. Como também, poderá aumentar as

respostas pró-inflamatórias e apoptóticas, levando a uma maior prevalência de falência do órgão alvo clinicamente evidente, isto é, hipotireoidismo.

Polimorfismos do gene *FOXP3* estão associados à autoimunidade da tireoide em homens e mulheres caucasianos, sugerindo que a haploinsuficiência deste gene poderia explicar o aumento do risco de autoimunidade tireoidiana na população (Ban *et al.*, 2007). Contudo, não há relatos sobre a associação de polimorfismos deste gene com as condições clínicas na ST.

O gene *FOXP3* é uma molécula central na função das células Tregs, na manutenção e regulação da tolerância imune. Portanto, esse fator de transcrição é muito importante para desempenhar um papel crucial na geração do fenótipo Treg. Nas doenças autoimunes e câncer, *FOXP3* pode desempenhar um papel na imunopatologia, devido à ativação potente de células T supressoras e função efetora (Watanabe *et al.*, 2010).

Em nosso estudo utilizamos 97 pacientes portadoras de ST, dentre estas, apenas cerca de 30% possuíam doenças autoimunes/inflamatórias, não corroborando com a alta prevalência encontrada em estudos anteriores (Su *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2015).

O polimorfismo rs3761548 (C>A) tem sido estudado e algumas associações com doenças foram descritas. Um risco aumentado de psoríase, associado ao genótipo AC e também aos genótipos AC + AA combinados em comparação com o genótipo CC selvagem (Gao *et al.*, 2010), bem como ao aborto espontâneo recorrente inexplicável (URSA) (Wu *et al.*, 2012) e a rinite alérgica (AR) em forma heterozigótica (Zhang *et al.*, 2009) foram observados para a população chinesa. Além disso, foi encontrada associação deste SNP com o risco no desenvolvimento e intratabilidade da doença de Graves (GD) (Inoue *et al.*, 2010), e com níveis mais baixos de dsDNA em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico feminino (Lin *et al.*, 2011).

Quanto ao polimorfismo rs3761549 (C>T) no gene *FOXP3* foi encontrada associação com a gravidade da tireoidite de Hashimoto (Inoue *et al.*, 2010). Este SNP também apresentou associação significativa com a endometriose, independentemente do estágio da doença (Andre *et al.*, 2011), no entanto, não foi associado à susceptibilidade à doença de Graves ou à doença de Addison (Owen *et al.*, 2006).

Após a análise dos polimorfismos do gene *FOXP3*, não encontramos associação estatística com as condições clínicas estudadas em nossas pacientes, tendo em vista que o tamanho da amostra pode não ter sido suficiente para o estudo, como também o fato de, até o momento, estas pacientes não terem desenvolvido algum tipo de doença autoimune, visto que esta pode surgir em qualquer fase da vida.

Com relação à expressão do gene *FOXP3*, há poucos relatos se a frequência ou função supressora de células Tregs encontram-se alterada em pacientes portadoras de ST (Su *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2015).

Jorgensen *et al.* (2010) encontraram um risco aumentado de doenças autoimunes em um grupo de 798 mulheres com ST independente do cariótipo que originaram a síndrome. Uma alta prevalência (40%) de doenças autoimunes em pacientes com ST, as quais possuíam doenças da tireoide e outras doenças autoimunes, incluindo psoríase, púrpura trombocitopênica idiopática e doença de Crohn foi relatada por Su *et al.* (2009). Contudo, os autores observaram que a frequência e a função supressiva de células Tregs em pacientes com ST não parecem ser alteradas, apesar de uma maior predisposição à autoimunidade.

Em nosso estudo avaliamos o perfil de expressão quantitativa do gene *FOXP3* em 17 pacientes portadoras de ST, considerando a heterogeneidade cariotípica desses indivíduos, quando comparado a um grupo controle (n=15). Uma expressão de 9,21 vezes maior no grupo de pacientes ST em relação ao grupo controle ($p = 1,533e-6$) foi observada, independente da presença de doenças autoimunes/inflamatórias. O resultado da análise foi considerado significativamente estatístico e a hipótese de haploinsuficiência do gene *FOXP3* nessas pacientes pode ser descartada no presente estudo.

Uma frequência de Treg *FOXP3* + entre células T CD4 + significativamente maior nos pacientes com ST do que no grupo controle, independentemente da presença de autoimunidade tireoidiana, foi encontrada por Young *et al.* (2015). Os autores sugeriram que o aumento de Treg *FOXP3* + entre células T CD4 + em pacientes com ST é uma resposta compensatória para reprimir as respostas de células T CD4 + efetoras produtoras de citocinas ativadas e inflamatórias, o que pode ser explicado em nossos resultados de expressão gênica.

Embora o *FOXP3* (fator de transcrição) tenha sido considerado como um potente regulador de células Tregs, no qual controla a expressão de múltiplos genes

que medeiam sua atividade regulatória (Ramsdell, 2003; Rudensky, 2005), este fato tem aumentado a possibilidade de que outros eventos transcricionais possam estar operando a montante e / ou simultaneamente com *FOXP3* no controle do desenvolvimento e função de células Treg (Hill, 2007).

Nossos resultados mostraram uma maior expressão do gene *FOXP3* em pacientes ST, embora não tenham sido analisados isoladamente como outros marcadores de células Treg e os demais fatores de transcrição estão modulando a expressão deste gene. Com isso, não podemos inferir que o gene *FOXP3* seja um fator de susceptibilidade às doenças autoimunes/inflamatórias na ST, mas podemos sugerir que este gene possa estar atuando de forma diferente no contexto imunológico nessas pacientes.

7 CONCLUSÕES

1. A cariotipagem permitiu a confirmação diagnóstica de ST, com o cariótipo 45,X mais prevalente, seguido de mosaicismo com a linhagem i(Xq);
2. Não foi possível associar os polimorfismos do gene *FOXP3* rs3761548 (C>A) e rs3761549 (C>T) com a susceptibilidade em desenvolver doenças autoimunes/inflamatórias nas pacientes portadoras de ST;
3. A expressão do gene *FOXP3* encontra-se alterada em pacientes portadoras de ST, sugerindo que este gene possa estar envolvido na imunopatologia dessas pacientes.

REFERÊNCIAS

- Andre G.M., Barbosa C.P., Teles J.S., Vilarino F.L., Christofolini D.M., Bianco B. **Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis.** Fertil. Steril. 95:2223-2227. 2011.
- Araújo C., Galera M.F., Galera B.B., et al. **Molecular identification of chromosome Y sequences in Brazilian patients with Turner syndrome.** Gynecological endocrinology 24:713-717. 2008.
- Aversa T., Lombardo F., Corrias A., Salerno M., De Luca F., and Wasniewska M. **In young patients with Turner or Down syndrome, Graves' disease presentation is often preceded by Hashimoto's thyroiditis.** Thyroid 24:744-747. 2014.
- Bacchetta R., Gambineri E., Roncarolo M.G. **Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases.** J Allergy Clin Immunol.120:227-235. 2007.
- Bakalov V.K., Cheng C., Zhou J., and Bondy C.A. **X-chromosome gene dosage and the risk of diabetes in Turner syndrome.** J Clin Endocrinol Metab. 94:3289-3296. 2009.
- Bakalov V.K., Gutin L., Cheng C.M., Zhou J., Sheth P., Shah K., et al. **Autoimmune disorders in women with turner syndrome and women with karyotypically normal primary ovarian insufficiency.** J Autoimmun 38:315-21. 2012.
- Ban Y., Tozaki T., Tobe T., Ban Y., Jacobson E.M., Concepcion E.S., et al. **The regulatory T cell gene FOXP3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts.** J Autoimmun 28:201-7. 2007.
- Bassuny W.M., Ihara K., Sasaki Y., Kuromaru R., Kohno H., Matsuura N., and Hara T. **A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes.** Immunogenetics 55:149-156. 2003.
- Bending D., Pesenacker A.M., Ursu S., Wu Q., Lom H., Thirugnanabalan B., Wedderburn L.R. **Hypomethylation at the regulatory T cell-specific demethylated region in CD25hi T cells is decoupled from FOXP3 expression at the inflamed site in childhood arthritis.** J Immunol 193:2699-2708. 2014.
- Bianchi I., Lleo A., Gershwin M.E., Invernizzi P. **The X chromosome and immune associated genes.** Journal of Autoimmunity 38:J187-J192. 2012.

- Bianco B., Lipay M.V., Melaragno M.I., Guedes A.D., Verreschi IT. **Detection of hidden Y mosaicism in Turner's syndrome: importance in the prevention of gonadoblastoma.** J Pediatr Endocrinol Metab 19(9):1113-7. 2006.
- Binder G. **Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy.** Horm Res Paediatr 75:81-89. 2011.
- Bird A. **Perceptions of epigenetics.** Nature 447: 396e8. 2007.
- Bispo A.V.S., Dos Santos L.O., Burégio-Frota P. et al. **Effect of chromosome constitution variations on the expression of Turner phenotype.** Genet Mol Res 12:4243-50. 2013a
- Bispo A.V.S., Burégio-Frota P., Santos L.O., et al. **Y chromosome in Turner syndrome: detection of hidden mosaicism and the report of a rare X;Y translocation case.** Reproduction, Fertility and Development. CSIRO, p A-G. 2013b.
- Bjornvold M., Amundsen S.S., Stene L.C., Joner G., Dahl-Jorgensen K., Njolstad P.R., et al. **FOXP3 polymorphisms in type 1 diabetes and coeliac disease.** J. Autoimmun 27:140-144. 2006.
- Bondy C.A. **Turner syndrome.** Horm Res 71 Suppl 8. 1:52-6. 2008
- Bondy C., Cheng C. **Monosomy for the X chromosome.** Chromosome research 17(5):649-658. 2009
- Bonis A.C.B. **Síndrome de turner.** Servicio de Endocrinología Pediátrica. Hospital Universitario La Paz, Madrid,1:218-27. 2011.
- Borsellino G. **Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression.** Blood 110:1225-1232. 2007.
- Brunkow M.E., Jeffery E.W., Hjerrild K.A., Paeper B., Clark L.B., Yasayko S.A., et al. **Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse.** Nat. Genet 27:68-73. 2001
- Burégio-Frota P., Valença L., Leal G.F., Duarte A.R., Bispo-Brito A.V.S., Soares-Ventura E.M., Marques-Salles T.J., Nogueira M.T.M.C., Muniz M.T.C., Silva M.L.M., Hunsting F., Liehr T., and Santos N. **Identification of a de novo inv dup(X)(pter-> q22) by multicolor banding in a girl with Turner syndrome.** Genet Mol Res 9:780-784. 2010.

- Campbell D.J., Ziegler S.F. **FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells.** Nat Rev Immunol 7(4):305-10. 2007
- Carvalho A.B., Guerra J.G., Baptista M., de Farla A., Marini S., & Guerra, A. **Cardiovascular and renal anomalies in Turner syndrome.** Revista da Associação Médica Brasileira 56:655-659. 2010
- Coffer P.J., Burgering B.M. **Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system.** Nat Rev Immunol 4(11):889-99. 2004.
- Collett-Solberg P., Gallicchio C., Coelho S., Siqueira R., Alves S., Guimarães M. **Endocrine diseases, perspectives and care in Turner syndrome.** Arq Bras Endocrinol Metab 55:550-8. 2011.
- Coombes J.L., Robinson N.J., Maloy K.J., Uhlig H.H., Powrie F. **Regulatory T cells and intestinal homeostasis.** Immunol Rev 204:184-194. 2005.
- D'Amico F., Skarmoutsou E., Marchini M., et al. **Genetic polymorphisms of FOXP3 in Italian patients with systemic sclerosis.** Immunol Lett 152:109-13. 2013.
- Dario A.A., Vignali Lauren W., Collison., and Creg J. Workman. **How regulatory T cells work.** Nat Rev Immunol 8(7): 523-532. 2008.
- Davenport M. **Approach to the patient with Turner syndrome.** J Clin Endocrinol Metab 95:1487-95. 2010.
- Deaglio S. **Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression.** J Exp. Med 204:1257-1265. 2007.
- De Luca F., Corrias A., Salerno M., Wasniewska M., Gastaldi R., Cassio A., et al. **Peculiarities of Graves' disease in children and adolescents with Down's syndrome.** Eur J Endocrinol 162:591–5. 2010.
- Deng G., Xiao Y., Zhou Z., Nagai Y., Zhang H., Li B., Greene MI. **Molecular and biological role of the FOXP3 N-terminal domain in immune regulation by T regulatory/suppressor cells.** Exp. Mol. Pathol 93, 334-338. 2012.
- Dias M.C., Castro L.C., Gandolfi L., Almeida R.C., Córdoba M.S., Pratesi R. **Screening for celiac disease among patients with Turner syndrome in Brasília, DF, midwest region of Brazil.** Archives of Gastroenterology 47:246-249. 2010.
- Elleuch M., Feki M., Kammoun M., et al. **Descriptive analyses of Turner syndrome: 49 cases in Tunisia.** Ann Endocrinol 71:111-6. 2010.

- El-Mansoury M., Bryman I., Berntorp K., Hanson C., Wilhelmsen L., Landin-Wilhelmsen K. **Hypothyroidism is common in turner syndrome: results of a five-year follow-up.** J Clin Endocrinol Metab 90:2131-5. 2005.
- Elsheikh M., Wass J.A., Conway G.S. **Autoimmune thyroid syndrome in women with Turner's syndrome - the association with karyotype.** Clin Endocrinol (Oxf) 55(2):223-226. 2001.
- Fallarino F., et al. **Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.** Nat Immunol 4:1206-1212. 2003.
- Feng Y., et al. **A mechanism for expansion of regulatory T-cell repertoire and its role in self-tolerance.** Nature 528:132-136. 2015.
- Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Williams L.M., Dooley J.L., Farr A.G., Rudensky A.Y. **Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3.** Immunity 22:329-341. 2005.
- Freriks K., Timmers H.J., Netea-Maier R.T., et al. **Buccal cell fish and blood pcr-y detect high rates of X chromosomal mosaicism and y chromosome derivatives in patients with turner syndrome.** Eur J Med Genet 56:497-501. 2013.
- Gambineri E., Torgerson T.R., and Ochs H.D. **Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis.** Curr. Opin. Rheumatol 15:430-435. 2003.
- Gao L., Li K., Li F., Li H., Liu L., Wang L., et al. **Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients.** J. Dermatol. Sci 57:51-56. 2010.
- Goldstein J.D., Burlion A., Zaragoza B., Sendeyo K., Polansky J.K., Huehn J., Piaggio E., Salomon B.L., Marodon G. **Inhibition of the JAK/STAT signaling pathway in regulatory T cells reveals a very dynamic regulation of Foxp3 expression.** PLoS One 11:e0153682. 2016.
- Giardi M. **Cutaneous perspectives on adaptive immunity.** Clinic Rev Allerg Immunol 33:4-14. 2007.
- Gondek D.C., Lu L.F., Quezada S.A., Sakaguchi S., Noelle R.J. **Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism.** J Immunol 174:1783-1786. 2005.

- Gonzalez L., Witchel S.F. **The patient with Turner syndrome: puberty and medical management concerns.** Fertil Steril 98: 780-6. 2012.
- Grossman W.J., Verbsky J.W., Tollefsen B.L., Kemper C., Atkinson J.P., Ley T.J. **Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells.** Blood 104:2840–2848. 2004.
- Gupta S., Shang W., Sun Z. **Mechanisms regulating the development and function of natural regulatory T cells.** Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 56(2):85-102. 2008.
- Ozkaynak E. **Three distinct domains contribute to nuclear transport of murine FOXP3.** PLoS One 4,e7890. 2009.
- Hanel S.A., Velavan T.P., Kremsner P.G. and Kun J.F. **Novel and functional regulatory SNPs in the promoter region of FOXP3 gene in a Gabonese population.** Immunogenetics 63:409–415. 2011.
- Hermênio C.L. **Role of regulatory T cells in the development of skin diseases.** An. Bras. Dermatol. vol.81 no.3 Rio de Janeiro. 2006.
- Hill J.A., Feuerer M., Tash K., Haxhinasto S., Perez J., Melamed R., Mathis D., Benoist C. **Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature.** Immunity 27:786–800. 2007.
- Hook E.B., Warburton D. **Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss.** Hum Genet 133:417-24. 2014.
- Hori S. **The Foxp3 interactome: a network perspective of Treg cells.** Nat. Immunol 13:943-945. 2012.
- Hook E.B., and Warburton D. **Turner syndrome revisited: review of new data supports the hypothesis that all viable 45,X cases are cryptic mosaics with a rescue cell line, implying an origin by mitotic loss.** Hum Genet 133(4):417-24. 2014.
- Inoue N., Watanabe M., Morita M., Tomizawa R., Akamizu T., Tatsumi K., et al. **Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases.** Clin. Exp. Immunol 162:402-406. 2010.

- Jonuleit H., Schmitt E. **The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations.** J Immunol 171(12):6323-7. 2003.
- Jorgensen K.T., Rostgaard K., Bache I., et al. **Autoimmune diseases in women with Turner's syndrome.** Arthritis Rheum 62(3):658-666. 2010.
- Josefowicz S.Z., Lu L.F., & Rudensky A.Y. **Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function.** Annu. Rev. Immunol. 30:531-564. 2012.
- Jung K.H., Seo Y.S., Walia H., Cao P., Fukao T., Canlas P.E., et al. **The Submergence Tolerance Regulator Sub1A Mediates Stress-Responsive Expression of AP2/ERF Transcription Factors.** Plant Physiology 152:1674-169. 2010.
- Khandekar S. et al. **Chromosomal abnormalities - A review.** Journal of Dental Sciences, India, vol. 4 (1). 2013.
- Kobie J.J. **T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine.** J Immunol 177:6780-6786. 2006.
- Larizza D., Calcaterra V., Martinetti M. **Autoimmune stigmata in Turner syndrome: When lacks an X chromosome.** Journal of Autoimmunity 33:25–30. 2003.
- Lieberman J. **The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal.** Nat Rev. Immunol 3:361-370. 2003.
- Lepage J.F., Hong D.S., Hallmayer J., Reiss A.L. **Genomic Imprinting Effects on Cognitive and Social Abilities in Prepubertal Girls with Turner Syndrome.** J Clin Endocrinol Metab 97:E460-4. 2012.
- Li B., Samanta A., Song X. **FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression.** Proc Natl Acad Sci USA 104(11):4571-4576. 2007.
- Li B., Samanta A., Song X., Iacono K.T., Brennan P., Chatila T.A., Roncador G., et al. **FOXP3 is a homo-oligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune disease.** Int. Immunol 19:825-835. 2007.
- Li S., Weidenfeld J., and Morrissey E.E. **Transcriptional and DNA binding activity of the Foxp1/2/4 family is modulated by heterotypic and homotypic protein interactions.** Mol. Cell Biol 24:809-822. 2004.
- Lin Y.C., Lee J.H., Wu A.S., Tsai C.Y., Yu H.H., Wang L.C., et al. **Association of single-nucleotide polymorphisms in FOXP3 gene with systemic lupus**

- erythematosus susceptibility: a case-control study.** *Lupus* 20:137-143. 2011.
- Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z. **CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells.** *J Exp Med* 203(7):1701-11. 2006.
- Lopes J.E., Torgerson T.R., Schubert L.A., Anover S.D., Ocheltree E.L., Ochs H.D., Ziegler S.F. **Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor.** *J. Immunol.* 177:3133-3142. 2006.
- Lu Q. **The critical importance of epigenetics in autoimmunity.** *J Autoimmun* 41:1-5. 2013.
- Mackey-Cushman S.L., Gao J., Holmes D.A. **FoxP3 interacts with linker histone H1.5 to modulate gene expression and program Treg cell activity.** *Genes Immun* 12(7):559-567. 2011.
- McCarthy K., & Bondy C.A. **Turner syndrome in childhood and adolescence.** *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* 3:771-775. 2008.
- McMurchy A.N., Di Nunzio S., Roncarolo M.G., Bacchetta R., Levings M.K. **Molecular regulation of cellular immunity by FOXP3.** *Adv Exp Med Biol* 665:30-46. 2009.
- Mellor A.L., Munn D.H. **IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.** *Nat Rev. Immunol* 4:762-774. 2004.
- Monteiro M., et al. **Identification of regulatory Foxp3+ invariant NKT cells induced by TGF- β .** *J. Immunol* 185:2157-2163. 2010.
- Mortensen K.H., Cleemann L., Hjerrild B.E., et al. **Increased prevalence of autoimmunity in Turner syndrome –influence of age.** *Clinical and Experimental Immunology* 156:205-210. 2009.
- Mortensen K.H., Andersen N.H., & Gravholt C.H. **Cardiovascular phenotype in Turner syndrome–integrating cardiology, genetics, and endocrinology.** *Endocrine reviews* 33:677-714. 2012.
- Ndhlovu L.C., Loo C.P., Spotts G., Nixon D.F., Hecht F.M. **FOXP3 expressing CD127^{lo} CD4+ T cells inversely correlate with CD38+ CD8+ T cell activation levels in primary HIV-1 infection.** *J Leukoc Biol* 83(2):254-62. 2008.

- Nguyen K.D., Vanichsarn C., Fohner A., Nadeau K.C. **Selective deregulation in chemokine signaling pathways of CD4+CD25(hi) CD127(lo)/(-) regulatory T cells in human allergic asthma.** J Allergy Clin Immunol 123(4):933-9 e10. 2009.
- Oderup C., Cederbom L., Makowska A., Cilio C.M., Ivars F. **Cytotoxic T lymphocyte antigen-4- dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression.** Immunology 118:240-249. 2006.
- Oiso N., Ota T., Kawara S., Kawada A. **Pustular psoriasis and vitiligo in a patient with Turner syndrome.** J Dermatol 34:727–9. 2007.
- Oliveira R.M., Verreschi I.T., Lipay M.V., Eça L.P., Guedes A.D., and Bianco B. **Y chromosome in Turner syndrome: review of the literature.** Sao Paulo Med J 127:373–378. 2009.
- Oukka M. **Interplay between pathogenic Th17 and regulatory T cells.** Ann. Rheum. Dis 66 (Suppl 3):iii87–iii90. 2007.
- Owen C.J., Eden J.A., Jennings C.E., Wilson V., Cheetham T.D., and Pearce S.H. **Genetic association studies of the FOXP3 gene in Graves' disease and autoimmune Addison's disease in the United Kingdom population.** J. Mol. Endocrinol. 37:97-104. 2006.
- Pinsker J.E. **Turner Syndrome: Updating the Paradigm of Clinical Care.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 97:E994-E1003. 2012.
- Povoleri G.A., Scotta C., Nova-Lamperti E.A., John S., Lombardi G., Afzali B. **Thymic versus induced regulatory T cells - who regulates the regulators?** Front Immunol 4:169. 2013.
- Ramsdell F. **Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage?** Immunity 19:165-168. 2003.
- Ramsdell, F., & Ziegler S.F. **FOXP3 and scurfy: how it all began.** Nat. Rev. Immunol 14:343-349. 2014.
- Read S., Greenwald R., Izcue A., Robinson N., Mandelbrot D., Francisco L., Sharpe A.H., Powrie F. **Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo.** J Immunol 177(7):4376-83. 2006.
- Rosa R.F.M., Dibi R.P., Picetti J.S., Rosa R.C., Zen P.R., Graziadio C., Paskulin G.A. **Amenorréia e anormalidades do cromossomo X.** Rev Bras Ginecol Obstet 30(10):511-7. 2008.

- Rudensky A. **Foxp3 and dominant tolerance.** Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci 360:1645-1646. 2005.
- Ruan Q., Kameswaran V., Tone Y., Li L., Liou H.C., Greene M.I., Tone M., Chen Y.H. **Development of Foxp3+ regulatory T cells is driven by the c-Rel enhanceosome.** Immunity 31:932-940. 2009.
- Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. **Immunologic self tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.** J Immunol 155:1151-1164. 1995.
- Sakaguchi S. **Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself.** Nat Immunol (4):345-52. 2005.
- Sakaguchi S. **Regulatory T cells.** Springer Semin Immunopathol 28(1):1-2. 2006.
- Sallai A., Sólyom J., Dobos M., et al. **Y-chromosome markers in Turner syndrome: Screening of 130 patients.** J Endocrinol Invest 33:222-227. 2010.
- Schlenner S.M., Weigmann B., Ruan Q., Chen Y., & von Boehmer H. **Smad3 binding to the Foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut.** J. Exp. Med. 209:1529–1535. 2012.
- Schoemaker M.J., Swerdlow A.J., Higgins C.D., Wright A.F., Jacobs P.A. **Mortality in women with turner syndrome in Great Britain: a national cohort study.** J Clin Endocrinol Metab 93(12):4735–4742. 2008.
- Serra P., Amrani A., Yamanouchi J., Han B., Thiessen S., Utsugi T., Verdaguer J., Santamaria P. **CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells.** Immunity 19:877–889. 2003.
- Shevach E.M., DiPaolo R.A., Andersson J., Zhao D.M., Stephens G.L., Thornton A.M. **The lifestyle of naturally occurring CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells.** Immunol 212:60–73. 2006.
- Shevach E.M. **Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cellmediated suppression.** Immunity 30:636–645. 2009.
- Sojka D.K., Huang Y.H., Fowell D.J. **Mechanisms of regulatory Tcell suppression a diverse arsenal for a moving target.** Immunology 124(1):13-22. 2008.

- Stenberg A.E., Sylven L., Magnusson C.G., Hultcrantz M. **Immunological parameters in girls with Turner syndrome.** J Negat Results Biomed 25(3):6. 2004.
- Stochholm K., Juul S., Juel K., Naeraa R.W., Gravholt C.H. **Prevalence, 7. incidence, diagnostic delay, and mortality in Turner Syndrome.** J Clin Endocrinol Metab 91(10):3897-902. 2006.
- Su M.A., Stenerson M., Liu W., Putnam A., Conte F., Bluestone J.A., et al. **The role of X-linked FOXP3 in the autoimmune susceptibility of Turner Syndrome patients.** Clin Immunol 131:139–44. 2009.
- Suri-Payer E., Cantor H. **Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells.** J Autoimmun 16:115-23. 2001.
- Taams L.S., Palmer D.B., Akbar A.N., Robinson D.S., Brown Z., Hawrylowicz C.M. **Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation.** Immunology 118(1):1-9. 2006.
- Tang Q., Adams J.Y., Tooley A.J., Bi M., Fife B.T., Serra P., Santamaria P., Locksley R.M., et al. **Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice.** Nat Immunol 7:83–92. 2006.
- Tobón G.J., Pers J.O., Cañas C.A., Rojas-Villarraga A., Youinou P., Anaya J.M. **Are autoimmune diseases predictable?** Autoimmunity Reviews 11:259–266. 2012.
- Toker A., Engelbert D., Garg G., Polansky J.K., Floess S., Miyao T., Baron U., et al. **Active demethylation of the Foxp3 locus leads to the generation of stable regulatory T cells within the thymus.** J. Immunol. 190, 3180-3188. 2013.
- Tone Y., Furuuchi K., Kojima Y., Tykocinski M.L., Greene M.I., Tone M. **Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer.** Nat Immunol. 9(2):194-202. 2008.
- Urbach A., Benvenitsy B. **Studying Early Lethality of 45,XO (Turner's Syndrome) Embryos Using Human Embryonic Stem Cells.** PLoS One 4:e4175. 2009.
- Van der Vliet H.J., and Nieuwenhuis E.E. **IPEX as a result of mutations in FOXP3.** Clin. Dev. Immunol 89017. 2007.
- Vignali D.A., Collison L.W., & Workman C.J. **How regulatory T cells work.** Nat. Rev. Immunol 8:523-532. 2008.

- Walker M.R., Kasproicz D.J., Gersuk V.H., Benard A., Van Landeghen M., et al. **Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4₊CD25⁺ T cells.** J Clin Invest 112(9):1437-1443. 2003.
- Watanabe M.A., Oda J.M., Amarante M.K., and Cesar Voltarelli J. **Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis.** Cancer Metastasis. Rev 29:569-579. 2010.
- Wildin R.S., Ramsdell F., Peake J., Faravelli F., Casanova J.L., Buist N., Levy-Lahad E., et al. **X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy.** Nat. Genet 27:18-20. 2001.
- Wu Z., You Z., Zhang C., Li Z., Su X., Zhang X., and Li Y. **Association between functional polymorphisms of Foxp3 gene and the occurrence of unexplained recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population.** Clin. Dev. Immunol 896458. 2012.
- Xie X., Stubbington M.J., Nissen J.K., Andersen K.G., Hebenstreit D., Teichmann S.A., Betz A.G. **The regulatory T cell lineage factor Foxp3 regulates gene expression through several distinct mechanisms mostly independent of direct DNA binding.** PLoS Genet 11, e1005251. 2015.
- Xu L., Kitani A., Stuelten C., McGrady G., Fuss I., Strober W. **Positive and negative transcriptional regulation of the Foxp3 gene is mediated by access and binding of the Smad3 protein to enhancer I.** Immunity 33:313-325. 2010.
- Xystrakis E., Boswell S.E., Hawrylowicz C. **T regulatory cells and the control of allergic disease.** Expert. Opin. Biol 6:121–133. 2006.
- Yagi H., Nomura T., Nakamura K., Yamazaki S., Kitawaki T., Hori S., et al. **Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells.** Int Immunol 16(11):1643-56. 2004.
- Yang L., Li B., Dang E., Jin L., Fan X., Wang G. **Impaired function of regulatory T cells in patients with psoriasis is mediated by phosphorylation of STAT3.** J Dermatol Sci 81:85-92. 2016.
- Young A.L., Hang-RK., Jeong S.L., Hae W.J., et al. **CD4⁺FOXP3⁺ Regulatory T Cells Exhibit Impaired Ability to Suppress Effector T Cell Proliferation in Patients with Turner Syndrome.** PLoS ONE 10(12): e0144549. 2015.
- Zarek P.E., Huang C.T., Lutz E.R., Kowalski J., Horton M.R., Linden J., Drake C.G., Powell J.D. **A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by**

inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. Blood 111:251–259. 2008.

Zhang L., Zhang Y., Desrosiers M., Wang C., Zhao Y., and Han D. **Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population.** Hum. Immunol 70:930–934. 2009.

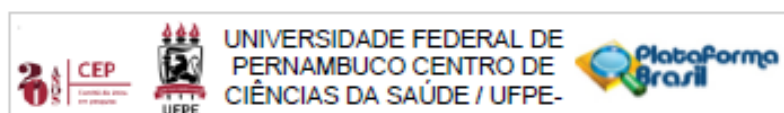
Zhao D.M., Thornton A.M., DiPaolo R.J., Shevach E.M. **Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes.** Blood 107:3925–3932. 2006.

Zheng Y., Josefowicz S., Chaudhry A., Peng X.P., Forbush K., Rudensky A.Y. **Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate.** Nature 463, 808–812. 2010.

ANEXOS

ANEXO A - Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos CCS-UFPE

		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP			
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA			
Título da Pesquisa: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS E EXPRESSÃO DO GENE FOXP3 (FORKHEAD BOX P3) E SUA RELAÇÃO COM DOENÇAS AUTOIMUNES NA SÍNDROME DE			
Pesquisador: Raysa Samanta Moraes Laranjeira			
Área Temática:			
Versão: 2			
CAAE: 71353717.8.0000.5208			
Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE			
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio FUNDACAO DE AMPARO A CIENCIA E TECNOLOGIA - FAPES			
DADOS DO PARECER			
Número do Parecer: 2.330.207			
Apresentação do Projeto:			
Trata-se de um projeto de mestrado da estudante RAYSA SAMANTA MORAES LARANJEIRA sob a orientação da Professora NEIDE SANTOS, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco. O projeto será desenvolvido no Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana do Departamento de Genética, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP), Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE) e no Laboratório de Imunopatologia Kelzo Asami (LIKA). A proposta consiste basicamente na análise da hipótese: polimorfismos que alteram a função ou a expressão do gene FOXP3 podem ser um importante fator genético de predisposição ao risco de doenças autoimunes na síndrome de Turner. Para este fim realizar-se-á um estudo do tipo transversal de caráter analítico, com o objetivo de promover a caracterização citogenética e molecular em pacientes com indicação clínica da síndrome de Turner (ST) atendidas no Serviço de Genética Médica do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) e no Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFPE (HC-UFPE). Serão utilizados dados de prontuários médicos e também a coleta de duas amostras de 10 ml de sangue de 100 pacientes para obtenção de DNA e RNA de células linfocitárias e realização de testes genéticos. As análises estatísticas para estimar as frequências alélicas e distribuição dos fenótipos serão realizadas através de pacotes estatísticos (equilíbrio de Hardy-Weinberg, teste exato de Fisher, X ² , considerando p<0,05), usando o			
Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800 UF: PE Município: RECIFE Telefone: (81)2125-5555 E-mail: cepccs@ufpe.br			



Continuação do Parecer: 2.330.207

Outros	Lattes_Raysa.pdf	16/07/2017 09:42:33	Raysa Samanta Moraes Laranjeira	Aceito
--------	------------------	------------------------	------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 27 de Outubro de 2017

Assinado por:
Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

Endereço: Av. de Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8908 E-mail: cepcca@ufpe.br

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

Solicitamos a sua autorização para convidar o (a) seu/sua filho (a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa “**Análise de polimorfismos e expressão do gene *FOXP3* (*Forkhead Box P3*) e sua relação com doenças autoimunes na síndrome de Turner**”. Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Raysa Samanta Moraes Laranjeira, que encontra-se no endereço: Rua Padre Champagnat, número 139, Várzea, Recife, Pernambuco. CEP: 50740-320. Telefone: (81) 99683-3326, e-mail: raysa.laranjeira@hotmail.com. Também participam desta pesquisa as pesquisadoras: Luana Oliveira dos Santos, Jaqueline Azevedo, Barbara Gomes, Jacqueline Araújo e está sob a orientação de: Neide Santos Telefone: (81) 9145-5405, e-mail: santos_neide@yahoo.com.br.

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

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

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

1. Essa pesquisa tem como objetivos: definir o cariótipo (análise Citogenética para verificar se há algum tipo de alteração) de cada voluntário participante; Verificar se existe associação entre os polimorfismos do gene *FOXP3* com o risco de doenças autoimunes na síndrome de Turner e avaliar o perfil de expressão do gene *FOXP3*. Para a coleta de dados da pesquisa será realizada a coleta de sangue para realização de exame cromossômico (nos cromossomos estão contidos a informação genética) com bandejamento G (técnica de identificação individual dos cromossomos) e análise molecular para pesquisa de polimorfismos no gene (variações no gene, que podem ou não interferir na expressão fenotípica). Os dados clínicos de cada paciente serão obtidos a partir dos prontuários, os quais serão previamente solicitados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística - SAME.
- Em relação ao período de participação de cada voluntário na pesquisa, será necessário o comparecimento ao hospital para que haja a coleta do sangue, onde serão colhidos cerca de 10 ml de sangue (na veia do braço). Caso não sejam obtidos bons resultados, o voluntário poderá ser chamado para uma recoleta de sangue.

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

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

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

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

Assinatura do pesquisador (a)

CONSENTIMENTO DO RESPONSÁVEL PARA A PARTICIPAÇÃO DO/A VOLUNTÁRIO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, responsável por _____, autorizo a sua participação no estudo _____ "Análise de polimorfismos e expressão do gene *FOXP3* (*Forkhead Box P3*) e sua relação com doenças autoimunes na síndrome de Turner", como voluntário(a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação dele (a). Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de seu acompanhamento/ assistência/tratamento) para mim ou para o (a) menor em questão.

Local e data _____

Assinatura do (da) responsável: _____

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO C - TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE

Título do projeto: Análise de polimorfismos e expressão do gene *FOXP3* (*Forkhead Box P3*) e sua relação com doenças autoimunes na síndrome de Turner

Pesquisador responsável: Raysa Samanta Moraes Laranjeira

Instituição/Departamento de origem do pesquisador: Universidade Federal de Pernambuco, departamento de Genética

Telefone para contato: (81) 9.9683-3326

E-mail: raysa.laranjeira@hotmail.com

O(s) pesquisador(es) do projeto acima identificado(s) assume(m) o compromisso de:

- Preservar o sigilo e a privacidade dos voluntários cujos dados dos materiais biológicos serão estudados;
- Assegurar que os materiais biológicos serão utilizados, única e exclusivamente, para a execução do projeto em questão;
- Assegurar que os resultados da pesquisa somente serão divulgados de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o voluntário da pesquisa.

O(s) pesquisador (es) declara(m) que os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em arquivos de computador sob a responsabilidade da orientadora Prof^a. Dr^a. Neide Santos, no 1º andar do Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE), Departamento de Genética, endereço: avenida Professor Moraes Rego, S/N - Cidade Universitária, Recife-PE, pelo período mínimo de 5 anos.

O(s) Pesquisador(es) declara(m), ainda, que a pesquisa só será iniciada após a avaliação e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/CCS/UFPE.

Recife, de de 20..... .

Assinatura Pesquisador Responsável