



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Avaliação de alterações genéticas e epigenéticas envolvidas na susceptibilidade a Cancro na Síndrome de Down

Patrícia Isabel Silva Guarino

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Avaliação de alterações genéticas e epigenéticas envolvidas na susceptibilidade a Cancro na Síndrome de Down

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro, Professora Doutora Isabel Marques Carreira e da Professora Doutora Maria Paula Marques (Universidade de Coimbra)

Patrícia Isabel Silva Guarino

2012

Agradecimentos

Ao longo do meu percurso académico, eis que chega ao fim mais uma etapa, que não seria conseguida de igual forma se não fosse a presença e apoio de diversas pessoas, às quais gostaria de deixar o meu agradecimento:

À Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro pela orientação neste projecto, pela dedicação e disponibilidade, pelo apoio incondicional, pela partilha de conhecimentos científicos, pela amizade, conselhos e confiança demonstrada.

À Professora Doutora Isabel Marques Carreira, directora do Laboratório de Citogenética e Genómica (FMUC), pela orientação neste projecto, pelo apoio e disponibilidade, pela partilha de conhecimentos científicos e pela confiança.

À Professora Doutora Maria Paula Marques pela orientação e disponibilidade prestada.

À Professora Doutora Maria da Graça Vale pelos conselhos, apoio e disponibilidade ao longo deste meu percurso académico.

À Mestre Ana Cristina Gonçalves pela disponibilidade, pela dedicação e empenho diários ao longo do desenvolvimento deste projecto, pela partilha de conhecimentos e experiência científica, e acima de tudo, por todo o apoio e amizade.

À Mestre Raquel Alves pela disponibilidade prestada, pela dedicação e conselhos, pelo apoio incondicional, pela amizade e confiança.

À Cátia, Joana e Mariana, assim como a todos os investigadores e colaboradores, que foram passando pelo Laboratório de Biologia Molecular Aplicada da FMUC, um obrigada pela ajuda e bom ambiente proporcionado.

À Cláudia Pais, ao José Ferrão e aos restantes investigadores do laboratório e Citogenética e Genómica (FMUC) pela disponibilidade prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos de curso e de mestrado que me foram acompanhando ao longo deste percurso por Coimbra.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pelos conselhos e incentivos, e acima de tudo por me ajudarem a concretizar mais uma etapa na minha vida.

À Filipinha, minha irmã, pelo apoio e dedicação, pela ajuda prestada e acima de tudo por toda a amizade e boa disposição.

Ao Zé, meu namorado, pelo apoio e incentivo, pela presença ao longo do meu percurso académico, e acima de tudo pela amizade.

Finalmente, a toda a minha família que me incentivou e apoiou.

Resumo

A Síndrome de Down (SD) é a forma mais comum de aneuploidia constitucional, afectando cerca de 1 em cada 700 nascimentos.

As crianças com SD apresentam um risco aumentado de desenvolver cancro 10 a 20 vezes, relativamente a crianças sem SD, em particular leucemias agudas, nomeadamente Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA), mais especificamente o subtipo Leucemia Aguda Megacarioblástica (LAMeg). Pelo contrário, verifica-se baixa incidência de tumores sólidos nas crianças com SD (Rabin and Whitlock, 2009).

Alguns genes localizados na banda 21q22 estão associados ao aumento da incidência de leucemia na SD, nomeadamente os genes *ERG*, *ETS2* e *RUNX1*. Estes genes codificam factores de transcrição que estão envolvidos quer na hematopoiese, quer na megacariopoiese (Fonatsch, 2010; Stankiewicz *et al.*, 2009).

Por outro lado, o folato desempenha um papel chave na manutenção da estabilidade genómica, na metilação do ADN de diversos genes, em particular genes envolvidos na regulação do ciclo celular e genes que codificam enzimas reparadoras do ADN (*p16*, *p15*, *DAPK* e *MGMT*, respectivamente). O metabolismo do folato pode ser influenciado pelos hábitos alimentares e por polimorfismos no transportador de folato reduzido (RFC), e nas enzimas metiltetrahydrofolato redutase (MTHFR) e cistationina beta-sintetase (CBS), desempenhando um papel importante na susceptibilidade a aneuploidias e no desenvolvimento de eventos iniciais na carcinogénese.

Este estudo teve como objectivos o estudo dos níveis de expressão dos genes *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1* do cromossoma 21, assim como a análise da prevalência de variantes polimórficas em genes envolvidos no metabolismo do folato, da enzima antioxidante Cu/Zn SOD1 e o padrão de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK* e *MGMT* de forma a identificar o seu papel na ocorrência de aneuploidias, nomeadamente em doentes com SD.

Para tal, nós analisámos as variantes polimórficas 844ins68 e T833C (co-segregadas em *cis*) do gene *CBS*, A251G do gene *SOD1*, A80G do gene *RFC1* e A1298C do gene *MTHFR* por técnicas de PCR-RFLP em 31 amostras de fibroblastos de fetos com SD e em 30 amostras de sangue periférico de controlos saudáveis. O perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK* e *MGMT* foram

analisados a partir do ADN convertido com bissulfito através da técnica de MSP. Por outro lado, os níveis de expressão dos genes *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1* foram analisados por RT-PCR em tempo real.

Os nossos resultados mostram que o alelo 844ins68 *wild type* apresenta uma frequência alélica na SD e nos controlos de 90%. Nos controlos, foram observados cerca de 3% de homozigóticos para 844ins68 do gene *CBS*, 13% de heterozigóticos e 84% sem inserção, enquanto na SD observou-se uma frequência de 0%, 19% e 81%, respectivamente.

Para além disto, observámos que as frequências alélicas da forma *wild type* dos polimorfismos de *SOD1*, *RFC1* e *MTHFR* (alelo A) são semelhantes nos controlos e na SD (*SOD1*: 92% e 90%; *RFC1*: 52% e 50%; *MTHFR*: 70% e 69%, respectivamente para os controlos e para a SD). Resultados semelhantes foram observados nos genótipos de *SOD1* e *MTHFR* analisados (*SOD1*: 83% e 80% AA, 17% e 20% AG, e 0% GG; *MTHFR*: 13% e 10% AA, 33% e 42% AC, e 53% e 48% CC, respectivamente para os controlos e para a SD). Por outro lado, o genótipo AA do *RFC1* apareceu com menor frequência na SD (19%) comparado com os controlos (27%). As frequências genótípicas observadas não apresentam um desvio ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg, excepto no caso dos controlos no gene *CBS*.

A força de associação entre os polimorfismos e o risco para a SD foi medida através da avaliação do risco associado (Odd's ratio) com um intervalo de confiança de 95% (IC95%), não tendo sido observada relação significativa entre estes polimorfismos e a SD. Contudo, a forma *wild type* para 844ins68 do gene *CBS* (OR=0.833; CI_{95%} 0.2248-3.089), o genótipo AA de *SOD1* (OR=0,8333; CI_{95%} 0.2248-3.089) e o genótipo AA de *RFC1* (OR=0,6600; CI_{95%} 0.1980-2.200) podem ter um efeito protector. Por outro lado, a variante 844ins68 do gene *CBS* (OR=1.560; CI_{95%} 0.3927-6.198), o genótipo AG de *SOD1* (OR=1.20; CI_{95%} 0.3237-4.448) e genótipo AC de *MTHFR* (OR=1.444; CI_{95%} 0.5095-4.095) podem ser factores de risco para esta patologia. Além disso, a metilação do ADN mostra que os genes *p15*, *p16*, *DAPK* e *MGMT* estão todos desmetilado nos fetos com SD.

Finalmente, o estudo da expressão génica de genes localizados no cromossoma 21 não revelou diferenças significativas na variação dos níveis de expressão dos genes, apesar da existência de três cópias dos genes estudados. Este facto pode dever-se a mecanismos reguladores dos genes durante o desenvolvimento embrionário.

Além disso, não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre os polimorfismos ou o perfil de metilação e os fetos com SD. O aumento do número de amostras de doentes e de controlos poderá contribuir para uma melhor análise do risco destes polimorfismos no desenvolvimento de SD.

Palavras-Chave: Síndrome de Down, Metabolismo do folato, Variabilidade genética, Epigenética

Abstract

Down Syndrome (DS) is the most common constitutional aneuploidy with an incidence of 1 in 700 births.

Children with DS have a 10- to 20-fold higher relative risk for leukemia than children without DS, in particular acute leukemia, including acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML), more specifically the subtype acute megakaryoblastic leukemia (AMKL). In contrast, the risk of developing solid tumors is lower in children with DS (Rabin and Whitlock, 2009).

Some genes located on region 21q22 are associated with increased risk of incidence of leukemia in children with DS, including genes *ERG*, *EST2* and *RUNX1*. These genes encode transcription factors that are involved in hematopoiesis and megakaryopoiesis (Fonatsch, 2010; Stankiewicz et al., 2009).

On the other hand, folic acid plays a key role in the maintenance of genomic stability, DNA methylation of several genes, particularly those involved in cell cycle regulation and DNA repair enzymes (*p15*, *p16*, *DAPK* and *MGMT*, respectively). Folic acid metabolism may be influenced by dietary habits and genetic polymorphism of Folate Carrier Transporter (RFC), Methyl Tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) and cystathionine beta-synthase (CBS) enzymes, playing an important role in susceptibility to aneuploidy and to the development of early events in carcinogenesis.

The aims of this study are to analyze expression levels at gene localized in chromosome 21, namely *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1*, as well as to analyse the prevalence of polymorphic of genes involved in folate metabolism, in Cu/ZnSOD antioxidant enzyme and the methylation pattern of *p15*, *p16*, *DAPK* and *MGMT* genes, in order to identify its role in the occurrence of aneuploidies such Down Syndrome and its association with neoplasias development.

For this purpose, we analyzed polymorphic variants *CBS* 844ins68 and T833C (co-segregate in *cis*), *SOD1* A251G, *RFC1* A80G and *MTHFR* A1298C by PCR-RFLP assay in 31 fibroblasts samples of children with DS and in 30 peripheral blood samples of healthy controls. Methylation pattern of *p15*, *p16*, *DAPK* and *MGMT* genes were analyzed in bisulfite converted DNA by MSP assay. On the other hand, levels expression of *ETS2*, *CBS*, *SOD1* and *RUNX1* genes expression levels were analysed by real time PCR.

Our results show that *wt* 844ins68 *CBS* allelic frequency in DS and in controls was 90%. In controls, about 3% of 844ins68 homozygous, 13% of 844ins68 heterozygous and 84% without this insertion were observed for *CBS* gene, while in DS it was 0%, 19% and 81% respectively.

Moreover, we observed that wild type allelic frequency of *SOD1*, *RFC1* and *MTHFR* polymorphisms (A allele) were similar in controls and DS (*SOD1*: 92% and 90%; *RFC1*: 52% and 50%; *MTHFR*: 70% and 69%, respectively for controls and DS). Similar results were observed in *SOD1* and *MTHFR* genotype analysis (*SOD1*: 83% and 80% AA, 17% and 20% AG and 0% GG genotypes; *MTHFR*: 13% and 10% AA, 33% and 42% AC and 53% and 48% CC genotypes, respectively for controls and DS). On the other hand, *RFC1* AA genotype was decrease in DS (19%) compared to controls (27%). The genotypic frequencies observed did not show deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, except in *CBS* gene.

The strength of association between polymorphisms and DS risk was assessed by odds ratio (OR) with the corresponding 95% confidence interval (CI_{95%}). No significant relation was observed between these polymorphisms and DS. However, *CBS* wild type 844ins68 (OR=0.833; CI_{95%} 0.2248-3.089), *SOD1* AA (OR=0,8333; CI_{95%} 0.2248-3.089) and *RFC1* AA genotypes (OR=0,6600; CI_{95%} 0.1980-2.200) could have a protective effect. On the other hand, *CBS* variant 844ins68 (OR=1.560; CI_{95%} 0.3927-6.198), *SOD1* AG genotype (OR=1.20; CI_{95%} 0.3237-4.448) and *MTHFR* AC (OR=1.444; CI_{95%} 0.5095-4.095) genotypes might be risk factors for this pathology. Furthermore, DNA methylation analysis reveals that *p15*, *p16*, *DAPK* and *MGMT* genes were all unmethylated in fetus with DS, suggesting that these genes will not be inactivated by methylation of promoter, a mechanism often found in tumors.

Finally, the study of gene expression of genes located on chromosome 21 showed no significant differences on levels of gene expression despite the existence of three copies of genes studied. This may be caused by regulatory mechanisms of genes during fetal development.

Besides, no statistical association was detected between these polymorphisms or the methylation status in fetus with DS. The increase in patients and controls samples could contribute to a better risk analysis of the influence of these polymorphisms in DS development and its association with a higher incidence of cancer in these patients.

Keywords: Down syndrome, Folate Metabolism, Genetic variability, Epigenetic/Methylation

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	III
Abstract	VII
Índice de Figuras	XV
Índice de Tabelas	XVII
Lista de Abreviaturas.....	XIX

Capítulo 1. Introdução..... 1

1. Introdução.....	3
1.1 Aneuploidias	4
1.2 Síndrome de Down	6
1.2.1 Epidemiologia	6
1.2.2 Características Clínicas	6
1.2.3 Características Moleculares	8
1.2.3.1 O Cromossoma 21 humano.....	8
1.2.3.1.1 Gene <i>RUNX1</i>	10
1.2.3.1.2 Gene <i>ERG</i>	10
1.2.3.1.3 Gene <i>ETS2</i>	11
1.2.3.1.4 Gene <i>CBS</i>	11
1.2.3.1.5 Gene <i>SOD1</i>	12
1.2.3.1.6 Gene <i>RFC1</i>	13
1.2.4 Predisposição para desenvolver cancro	13
1.2.4.1 Metabolismo do folato.....	14
1.2.4.1.1 Variabilidade genética	16
1.3 Incidência de cancro na Síndrome de Down	18
1.3.1 Cancros sólidos	18
1.3.1.1 Epidemiologia	18
1.3.1.2 Características moleculares	18
1.3.2 Leucemias	19
1.3.2.1 Doença Mieloproliferativa Transitória.....	20
1.3.2.1.1 Epidemiologia	20

1.3.2.1.2 Característica Clínicas	20
1.3.2.1.3 Característica Moleculares	21
1.3.2.1.4 Diagnóstico e Prognóstico	21
1.3.2.2 Leucemia Aguda Megacarioblástica	22
1.3.2.2.1 Epidemiologia	22
1.3.2.2.2 Características Clínicas	22
1.3.2.2.3 Características Citogenéticas e Moleculares	23
1.3.2.2.4 Aspectos Epigenéticos	27
1.3.2.2.5 Diagnóstico e Prognóstico	28
1.3.2.3 Leucemia Linfoblástica Aguda	29
1.3.2.3.1 Epidemiologia	29
1.3.2.3.2 Características Clínicas	29
1.3.2.3.3 Características Citogenéticas e Moleculares	29
1.3.2.3.4 Aspectos Epigenéticos	33
1.3.2.3.5 Diagnóstico e Prognóstico	33
1.4 Objectivos do projecto	34
Capítulo 2. Material e Métodos	35
2.1 Recolha de amostras: células de fetos com Síndrome de Down e sangue periférico de indivíduos controlo	37
2.2 Análise citogenética em fibroblastos de fetos com Síndrome de Down	37
2.3 Extracção e quantificação de ácidos nucleicos	38
2.3.1 Extracção de ADN genómico de fibroblastos de fetos com Síndrome de Down e de sangue periférico de controlos.....	38
2.3.2 Extracção de ARN de fibroblastos de fetos com Síndrome de Down e de células de sangue periférico de indivíduos controlo	40
2.3.3 Quantificação de ácidos nucleicos	41
2.4 Análise genótipica de variantes polimórficas em genes do cromossoma 21	41
2.5 Estudo do perfil de metilação de genes envolvidos no desenvolvimento de lecemias, nomeadamente dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> e <i>MGMT</i>	44
2.6 Análise dos níveis de expressão de genes do cromossoma 21, nomeadamente dos genes <i>ETS2</i> , <i>CBS</i> , <i>SOD1</i> e <i>RUNX1</i>	46
2.7 Análise estatística dos resultados	49

Capítulo 3. Resultados	51
3.1 Confirmação da trissomia 21 nos fetos.....	53
3.2 Caracterização genotípica das variantes polimórficas dos genes <i>CBS</i> , <i>SOD1</i> , <i>RFC1</i> e <i>MTHFR</i> em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo	53
3.2.1 Caracterização genotípica das variantes polimórficas 844ins68 e T833C no gene <i>CBS</i> em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo	54
3.2.2 Caracterização genotípica da variantes polimórfica A251G no gene <i>SOD1</i> em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo.....	58
3.2.3 Caracterização genotípica da variante polimórfica A80G no gene <i>RFC1</i> em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo.....	61
3.2.4 Caracterização genotípica da variante polimórfica A1298C no gene <i>MTHFR</i> em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo.....	64
3.3 Avaliação do perfil de metilação de genes que codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e na reparação de ADN, nomeadamente dos genes <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>p15</i> e <i>MGMT</i>	67
3.4 Avaliação dos níveis de expressão dos genes <i>ETS2</i> , <i>CBS</i> , <i>SOD1</i> e <i>RUNX1</i>	69
Capítulo 4. Discussão	71
4.1 Prevalência de variantes polimórficas na Síndrome de Down.....	73
4.2 Perfil de metilação de genes envolvidos na regulação do ciclo celular e na reparação do ADN em fetos com Síndrome de Down.....	80
4.3 Expressão génica de <i>ETS2</i> , <i>CBS</i> , <i>SOD1</i> e <i>RUNX1</i> em fetos com Síndrome de Down	83
Capítulo 5. Conclusão	89
Capítulo 6. Referências	93

Índice de Figuras

Figura 1 - Aneuploidia constitucional e predisposição para cancro	5
Figura 2 - Características fenotípicas das crianças com Síndrome de Down.....	7
Figura 3 - Representação esquemática dos genes localizados na região 2 da banda 2 do braço longo do cromossoma 21	9
Figura 4 – Interacção das vias metabólicas envolvendo a cistationina beta sintase	12
Figura 5 - Metabolismo do folato em humanos.....	16
Figura 6 - Blastos e plaquetas gigantes no sangue periférico de uma criança com leucemia aguda megacarioblástica associada à Síndrome de Down	23
Figura 7 - Modelo proposto para o desenvolvimento de leucemia aguda megacarioblástica na Síndrome de Down	24
Figura 8 - Esquema ilustrativo do papel das mutações em <i>GATA1</i> na leucemogénese associada à Síndrome de Down	26
Figura 9 - Relação entre o metabolismo do folato, o stresse oxidativo e as alterações genéticas e/ou epigenéticas na doença mieloproliferativa transitória/leucemia aguda megacarioblástica.....	28
Figura 10 - Modelo explicativo da patogénese de leucemia linfoblástica aguda associada à Síndrome de Down.....	30
Figura 11 - Modelo explicativo do efeito do receptor de citocinas para o factor 2 na leucemia linfoblástica aguda associada à Síndrome de Down	32
Figura 12 – Cariótipo normal (A) e cariótipo com trissomia 21 (B) em feto com Síndrome de Down	53
Figura 13 – Identificação da variante polimórfica 844ins68 do gene <i>CBS</i> em indivíduos controlo (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) por PCR-RFLP.	54
Figura 14 – Identificação da variante polimórfica T833C do gene <i>CBS</i> em indivíduos controlo (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) através de PCR-RFLP.....	56
Figura 15 – Identificação da variante polimórfica A251G do gene <i>SOD1</i> em indivíduos controlo (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) através de PCR-RFLP.	59
Figura 16 – Identificação da variante polimórfica A80G do gene <i>RFC1</i> em indivíduos controlo (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) através de PCR-RFLP.....	62

Figura 17 – Identificação da variante polimórfica A1298C do gene *MTHFR* em indivíduos controlo (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) através de PCR-RFLP 65

Figura 18 – Perfil de metilação do gene *p16* por Methylation Specific PCR..... 68

Figura 19 – Perfil de metilação do gene *DAPK* por Methylation Specific PCR..... 68

Figura 20 – Perfil de metilação dos genes *p15* (A) e *MGMT* (B) por Methylation Specific PCR 69

Figura 21 – Variação dos níveis de expressão dos genes *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1* em fetos com Síndrome de Down 70

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Análise dos polimorfismos dos genes <i>SOD1</i> , <i>RFC1</i> , <i>CBS</i> e <i>MTHFR</i> , respectivos <i>primers</i> , temperaturas de emparelhamento e enzimas de restrição.....	42
Tabela 2.1 – Representação dos possíveis padrões de bandas observados para o gene <i>CBS</i> , antes e após a digestão enzimática, permitindo a determinação do genótipo.....	43
Tabela 2.2 – Representação dos possíveis padrões de bandas observados após a digestão enzimática para os genes <i>SOD1</i> , <i>RFC1</i> e <i>MTHFR</i> permitindo a determinação do genótipo	44
Tabela 3 – <i>Primers</i> , temperaturas de emparelhamento e tamanho dos produtos de PCR dos genes <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>p15</i> e <i>MGMT</i>	46
Tabela 4 – Genes e respectivos <i>primers</i> usados na RT-PCR em tempo real	48
Tabela 5 – Caracterização das variantes polimórficas 844ins68 e T833C (co-segregada em <i>cis</i>) no gene <i>CBS</i> através do padrão de bandas obtido após digestão enzimática com a enzima <i>BrsI</i>	55
Tabela 6 – Distribuição da frequência genotípica e da frequência alélica dos polimorfismos 844ins68 e T833C do gene <i>CBS</i> em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo.....	57
Tabela 7 – Avaliação do risco associado ao polimorfismo 844ins68 (co-segregado em <i>cis</i> com T833C) no gene <i>CBS</i> na Síndrome de Down.....	58
Tabela 8 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo A251G do gene <i>SOD1</i> em fetos com Síndrome de Down e em controlos saudáveis.....	60
Tabela 9 – Avaliação do risco associado ao polimorfismo A251G do gene <i>SOD1</i> na Síndrome de Down.....	61
Tabela 10 – Distribuição das frequências alélica e genotípica do polimorfismo A80G do gene <i>RFC1</i> em fetos com Síndrome de Down e em controlos saudáveis.....	63
Tabela 11 – Avaliação do risco associado ao polimorfismo A80G do gene <i>RFC1</i> na Síndrome de Down.....	64
Tabela 12 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo A1298C da <i>MTHFR</i> na população de fetos com Síndrome de Down e de controlos saudáveis	66
Tabela 13 – Avaliação do risco associado ao polimorfismo A1298C do gene <i>MTHFR</i> na Síndrome de Down.....	67

Lista de Abreviaturas

- 5 – MTHF – 5-metiltetrahidrofolato
5,10 – MTHF – 5,10 - metiltetrahidrofolato
8 –OhdG – 8-hidroxiguanosida
21q – braço longo do cromossoma 21
21p – braço pequeno do cromossoma 21
21q22 – região 22 do braço longo do cromossoma 21
Abs - absorvância
ADN – ácido desoxirribonucleico
AP-1 – activador da proteína 1
AP-2 – activador da proteína 2
AKT - *protein kinase B*
Ara-C – citosina arabinosida
Ara-CTP – citosina arabinosida trifonfòsforo
ARN – ácido ribonucleico
ATP – adenosina trifosfato
b – altura da coluna criada no espectrofotómetro
B12 – vitamina B12 ou cobalamina
Bandagem GTG – bandagem giemsa – tripsina – giemsa
BER – reparação de ADN por excisão de bases
BTG3 – *BTG family, member 3*
C – concentração
cADN – ADN complementar
CBF β – extenso no texto
CBS – cistationina- β -sintetase
CDK – cinase dependente de ciclinas
CDKI – inibidor de cinase dependente de ciclinas
COL18A1 – *collagen, type XVIII, alpha 1*
CpG – ilhas ricas em citosinas e guaninas
CRLF2 – receptor de citocinas para o factor 2
 C_T – *threshold cycle*
Cu/Zn SOD – cobre/zinco superóxido dismutase
CVS – vilosidades coriónicas

DAPK – proteína cinase associada à morte
dCTP – deoxicitidina trifosfato
DHF – dihidrofolato
DMT – doença mieloproliferativa transitória
DNTP's – desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina, timidina
DSCR1 – *down syndrome critical region 1*
DSCR2 - *down syndrome critical region 2*
dTMP – deoxitimidina monofosfato
dUMP – deoxiuridina monofosfato
e – coeficiente de extinção molar
E - eficiência
ERG – *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog (avian)*
ETS2 - *v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)*
ETS – factores de transcrição *E - Twenty Six*
F –*primer forward*
GAPDH – giceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GATA1 – *GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)*
GATA1s – forma truncada de *GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)*
GART – fosforibosilglicinamida transformilase
GSH – glutationa
GSSG – glutationa oxidada
GUS – beta glucuronidase
H⁺ - ião hidrogénio
H₂O₂ – peróxido de hidrogénio
IC_{95%} - intervalo de confiança de 95%
ICAM-1 – *intercellular adhesion molecule 1*
Ile - isoleucina
JAK – *Just Another Kinase*
JAK2 - *Cinase Janus 2*
JAK3 – *Cinase Janus 3*
LA – líquidos amnióticos
LLA – leucemia linfoblástica aguda
LLC – leucemia linfocítica crónica

LLA-SD – leucemia linfoblástica aguda associada à síndrome de down
LAMeg – leucemia aguda megacarioblástica
LAMeg-SD – leucemia aguda megacarioblástica à síndrome de down
LMA – leucemia mielóide aguda
M - metilado
MAT – metionina adenosiltransferase
MDB – *membrane desalting buffer*
MgCl – cloreto de manganésio
MGMT – O⁶-metilguanossina metiltransferase
MnSOD – superóxido dismutase de manganésio
MSP – *Methylation-Specific polymerase chain reaction*
MTHFD1 – metiltetrahidrofolato desidrogenase
MTHFR – metiltetrahidrofolato redutase
MTR – metionina sintetase
MTRR – metionina sintetase redutase
NF – κ B - *nuclear factor kappa B*
NF-Y - *nuclear transcription factor Y*
O²⁻ - íão óxido
O₂ – oxigénio
OD – Odd's ratio
p15 - *cyclin-dependent kinase inhibitor 2B*
p16 – *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*
p53 - *tumor protein p53*
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
Pb – pares de bases
PBS – tampão fosfato
PI3K - fosfatidilinositol-3-cinase
PLA₂P - *phospholipase A2 activating protein*
PLP – *piridoxal L-fosfato*
QI – quociente de inteligência
R – *primer reverse*
RCAN – “Regulador da Calcineurina”
RCSD – Região Crítica para a Síndrome de Down
RFC1 – *replication factor C (activator 1) 1*

RFC – receptor de folato reduzido
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
ROS – espécies reativas de oxigénio
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*
RT-PCR – *reverse transcriptase- polymerase chain reaction*
RUNX1 – *runt-related transcription factor 1*
RUNX3 - *runt-related transcription factor 3*
SAH – S-adenosil homocisteína
SAM – S-adenosilmetionina
SD – Síndrome de Down
SIM2 - *single-minded homolog 2*
SOD1 – *superoxide dismutase 1, soluble*
SP1 – *SP1 transcription factor*
SP3 - *SP3 transcription factor*
STAT – *Signal Transducer and Activator of Transcription*
TC – transcobalamina
THF – tetrahydrofolato
Thr - tirosina
TYMS – timidilato sintetase
THF – tetrahydrofolato
U – não metilado
VEGF- factor de crescimento endotelial
 β - APP – proteína beta amilóide

Capítulo 1. Introdução

1. Introdução

A Síndrome de Down (SD) é a forma mais comum de aneuploidia constitucional, afectando cerca de 1 em 700 nascimentos. Está associada à presença de uma cópia adicional, total ou parcial, do cromossoma 21, sendo por isso também denominada de trissomia 21. As crianças com esta síndrome apresentam características morfológicas típicas que parecem resultar da dosagem anormal de certos genes presentes na cópia adicional do cromossoma 21 (Brice, 2009).

Além disso, as crianças com SD têm um risco de desenvolver cancro, 10 a 20 vezes mais elevado, relativamente a crianças sem SD, em particular leucemias agudas, nomeadamente Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA), mais especificamente o subtipo Leucemia Megacarioblástica Aguda (LMCA). Pelo contrário, verifica-se baixa incidência de tumores sólidos nas crianças com SD (Rabin and Whitlock, 2009).

Alguns genes localizados na banda 21q22 estão associados ao aumento da incidência de leucemia na SD, nomeadamente os genes *ERG*, *ETS2* e *RUNX1*. Estes genes codificam factores de transcrição que estão envolvidos quer na hematopoiese, quer na megacariopoiese (Fonatsch, 2010; Stankiewicz *et al.*, 2009).

Em crianças com SD, a LMCA pode ser precedida por uma Doença Mieloproliferativa Transitória (DMT), e em alguns dos casos esta pode desaparecer espontaneamente sem intervenção terapêutica. Tanto a DMT como a LMCA, associadas à SD, são caracterizadas por uma mutação que ocorre *in útero*, e que atinge um factor de transcrição localizado no cromossoma X. Esta alteração genética conduz à expressão da isoforma pequena de GATA1, a GATA1s, uma proteína que promove a proliferação incontrolada dos megacariócitos. A proteína GATA1s pode cooperar com oncogenes localizados no cromossoma 21, como *RUNX1*, *ERG*, *ETS2* e *miR-125*, levando ao desenvolvimento de LMCA na SD (Ganmore *et al.*, 2009).

Por outro lado, foi identificado num quinto dos doentes com LLA associada à SD, uma mutação no gene que codifica a Cinase Janus 2 (JAK2). Além disso, a deficiência em folato *in útero*, que ocorre durante a gravidez,

pode ser um factor de risco tanto para a SD como para o desenvolvimento de LLA (Rabin and Whitlock, 2009).

De facto, o folato é um dador de unidades de um carbono necessárias para a síntese de timidilato e para os mecanismos de regulação epigenética envolvendo a metilação de várias moléculas, incluindo o ADN. Deste modo, a deficiência em folato pode levar à hipometilação do ADN, expressão génica aberrante e instabilidade cromossómica, sugerindo uma relação entre a deficiência desta vitamina e algumas doenças, em particular doenças congénitas como a síndrome de Down. Além disso, foram recentemente identificados alguns polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas nas vias de metilação, para além do papel do folato, vitamina B12 e metionina, sugerindo que vários e complexos mecanismos envolvendo interações entre genes e ambiente podem afectar a metilação do ADN e a expressão de genes, o que pode contribuir para o desenvolvimento de várias doenças (Shannon *et al.*, 2002).

Em suma, tanto os genes *GATA1* como *JAK2* mutados e/ou alterados epigeneticamente, podem cooperar com a trissomia 21, levando ao desenvolvimento da LMCA e/ou de LLA, respectivamente.

Por outro lado, a SD é causada por uma falha na separação dos cromossomas durante a meiose, designada não-disjunção cromossómica. Cerca de 90% dos casos de não-disjunção do cromossoma 21 devem-se a erros meióticos maternos que ocorrem maioritariamente durante a Meiose I (MI), o que é mais frequente na idade materna avançada. A não-disjunção paterna do cromossoma 21 ocorre apenas em 5-10% dos casos com SD, não sendo a idade paterna um factor de risco para a não-disjunção. Neste caso, a maioria dos erros ocorrem durante a Meiose II (MII) (Dey, S. *et al.*, 2011).

1.1 Aneuploidias

Uma célula que possui um cromossoma a mais ou a menos designa-se aneuplóide. A aneuploidia é reconhecida como um mecanismo comum em doenças genéticas humanas, levando frequentemente à diminuição ou aumento da expressão de genes específicos (Dierssen *et al.*, 2009). A causa

mais comum de aneuploidia deve-se à não disjunção de um par cromossómico durante uma das duas divisões meióticas. A aneuploidia mais comum é a trissomia (três cromossomas em vez de dois).

Existem dois tipos de aneuploidia, a aneuploidia constitucional e a adquirida. A diferença fundamental entre estes dois tipos de aneuploidia reside no facto da primeira existir em muitos tecidos em estádios iniciais de desenvolvimento embrionário, enquanto a última é adquirida, e existe apenas em células transformadas. Assim, a aneuploidia constitucional pode predispor a cancro de diversas formas como representado na Figura 1. Contudo, a existência isolada de uma aneuploidia não é suficiente para levar ao desenvolvimento de cancro (Ganmore *et al.*, 2009).

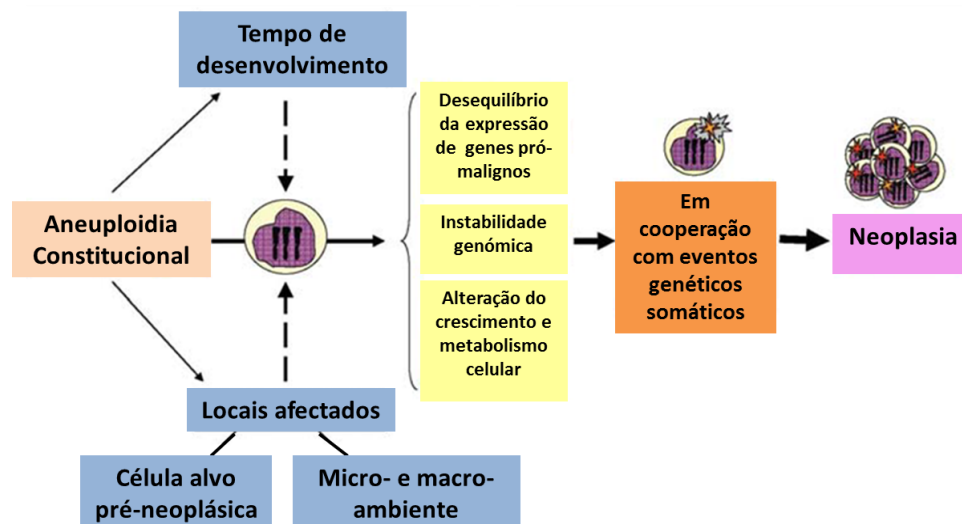


Figura 1 - Aneuploidia constitucional e predisposição para cancro. A instabilidade genómica, o desequilíbrio na expressão de genes pró-cancerígenos (proto-oncogenes) e as alterações do crescimento e metabolismo celular, em cooperação com eventos genéticos específicos adquiridos são os principais mecanismos que sustentam a predisposição neoplásica da aneuploidia constitucional (Adaptado Ganmore *et al.*, 2009).

Alguns estudos sugerem que a instabilidade cromossómica e as aneuploidias observadas em tumores humanos estão relacionadas com a hipometilação do ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico, pois esta

hipometilação pode interferir com a segregação cromossômica, como mencionado. Contudo, tendo em conta uma das aneuploidias mais comuns, a trissomia 21, verificou-se que em muitas crianças com esta trissomia, a presença de aneuploidias não é suficiente para o desenvolvimento de cancro, sendo a prevalência de cancro nestes casos inferior a 50% (Acácio *et al.*, 2005; Ganmore *et al.*, 2009).

A trissomia 21, também designada de Síndrome de Down (SD) pode ser causada por três tipos de anomalias cromossômicas: a trissomia livre, translocação ou mosaicismo (Dey, S., 2011).

O mosaicismo corresponde à minoria dos casos com SD (cerca de 1%) e é caracterizado pelo facto de algumas células terem 46 cromossomas e outras terem 47. As translocações são atribuídas a 3-4% dos casos de SD, sendo a translocação Robertsoniana, que envolve os cromossomas 14 e 21, a mais comum. A trissomia livre, a principal anomalia cromossômica que leva à SD, é causada por uma falha na segregação normal do cromossoma 21 durante a meiose (não-disjunção meiótica). O cromossoma 21 extra é, em cerca de 80% dos casos, de origem materna, e está muitas vezes associada à idade materna avançada (superior a 35 anos). A não disjunção, na maioria dos casos (cerca de 77%) ocorre durante a primeira divisão meiótica, na maturação do oócito antes da concepção (Dey, S., 2011).

1.2 Síndrome de Down (SD)

A SD ou trissomia 21 é a forma mais comum de aneuploidia constitucional que afecta crianças, e está associada à presença de uma cópia adicional, total ou parcial, do cromossoma 21.

1.2.1 Epidemiologia

A SD é a causa genética mais comum de défice cognitivo, afetando cerca de 1 em 700 nascimentos (Malinge *et al.*, 2009). Contudo, a prevalência varia de acordo com a raça e a idade materna, aumentando nas mulheres grávidas acima dos 35 anos à data do nascimento (Wiseman *et al.*, 2009).

1.2.2 Características Clínicas

As crianças com SD têm atraso mental e um fenótipo característico amplamente conhecido. Normalmente têm baixa estatura e um *fácies* típico (fendas palpebrais oblíquas, epicanto, nariz achatado, orelhas e boca pequena com protusão da língua com sulcos) (Figura 2). A cabeça pode ser menor do que o normal (braquicefalia), possuindo uma área plana na parte posterior (achatamento do occipital). Para além disto, podem também apresentar alargamento das suturas cranianas, uma prega única na palma da mão e ainda mãos curtas com dedos curtos (Figura 2) (Antonakaris and Epstein, 2006; Sureshbabu *et al.*, 2011).

Estas crianças apresentam normalmente diminuição do tónus muscular à nascença, um excesso de pele na nuca e o desenvolvimento físico é mais lento do que o normal, podendo não atingir a sua altura média adulta (Levanon *et al.*, 1985). A nível do desenvolvimento mental e social, estas crianças podem também ter um atraso. Os problemas mais comuns incluem, comportamento impulsivo, falta de atenção e dificuldades na aprendizagem.



Figura 2 – Características fenotípicas das crianças com Síndrome de Down (Adaptado de Sureshbabu *et al.*, 2011).

A nível clínico, verificou-se que as crianças com SD possuem maior incidência de defeitos congénitos, normalmente cardíacos, como o defeito do septo auricular e/ou ventricular (Lyle *et al.*, 2009). Podem existir ainda casos de demência e sinais de obstrução gastrointestinal, tais como atresia do esófago e duodenal (Antonakaris and Epstein, 2006). Verificam-se também problemas oculares, como cataratas, e auditivos, provavelmente causados por infecções nos ouvidos. Como a boca, garganta e as vias respiratórias são de calibre mais reduzido, estas crianças podem ter apneia do sono. Além disso, podem apresentar problemas a nível da articulação coxo-femural. Nas crianças com SD os dentes aparecem mais tarde do que o normal e, por vezes implantados

em locais que podem causar problemas na mastigação. Estas crianças apresentam ainda hipoactividade da tiróide (hipotiroidismo) (Pogribna *et al.*, 2001).

A maturação anómala do timo e a falha de função dos linfócitos T estão associadas à susceptibilidade destas crianças para infecções (Antonakaris and Epstein, 2006).

As características clínicas da SD parecem resultar da dosagem anormal de certos genes presentes na cópia adicional do cromossoma 21. Da mesma forma, pensa-se que a expressão anormalmente elevada dos genes do cromossoma 21 possa estar envolvida no risco de desenvolver doenças específicas associadas à SD, como por exemplo, um elevado risco para desenvolver precocemente leucemias e um tipo de demência associada à doença de Alzheimer. Por outro lado, apresentam um risco substancialmente reduzido para desenvolver outros cancros, nomeadamente cancros sólidos (Brice, 2009).

1.2.3 Características Moleculares

1.2.3.1 O Cromossoma 21 humano

O cromossoma 21 humano possui cerca de 364 genes conhecidos e 5 microRNAs diferentes (Malinge *et al.*, 2009).

O comprimento do braço longo do cromossoma 21 humano (21q) é de 33.5Mb e, aproximadamente 3% da sua sequência codifica proteínas. As proteínas codificadas pelos genes presentes neste braço incluem-se em muitas categorias funcionais como factores de transcrição, proteases e inibidores de proteases, cinases, proteínas envolvidas na via da ubiquitina-proteasoma, na resposta imunitária e ainda no metabolismo energético. Cerca de 1% do cromossoma 21 humano corresponde a sequências genéticas não conservadas (Sommer *et al.*, 2008).

A identificação e caracterização dos genes do cromossoma 21 humano ajudam a perceber as bases moleculares da doença. Existe uma “Região Crítica para a Síndrome de Down” (RCSD), que corresponde a um pequeno segmento do cromossoma 21 que contém genes responsáveis por muitas das

características da SD, nomeadamente o gene *DSCR1* e *DSCR2*. A proteína *DSCR1*, agora chamada de *RCAN1* (Regulador da Calcineurina 1), está sobre-expressa no cérebro de fetos com SD e interage física e funcionalmente com a calcineurina A. A *RCAN1* está também sobre-expressa a nível do coração na SD. Isto sugere que a sua sobre-expressão pode estar envolvida na patogénese da SD, particularmente na deficiência cognitiva e/ou nos defeitos cardíacos. Por outro lado, o gene *DSCR2* está sobre-expresso em os todos tecidos e células com capacidade proliferativa, como os tecidos fetais, os testículos adultos e as linhas celulares cancerígenas. O produto deste gene está envolvido na correcta montagem da subunidade 20S do proteasoma (Sommer *et al.*, 2008).

Outros genes localizados no cromossoma 21 humano (Figura 3), incluindo os genes da cistationina β -sintetase (*CBS*) e da Cu/Zn superóxido dismutase (*SOD1*), estão relacionados com o anormal metabolismo do folato, com a acumulação de uracilos e com o aumento do stresse oxidativo, levando a danos no ADN (Xavier, 2010). Além disso, alguns genes localizados na região 21q22 estão associados ao aumento da incidência de leucemia na SD, nomeadamente os genes *ERG*, *ETS2* e *RUNX1* (Fonatsch, 2010; Stankiewicz *et al.*, 2009).

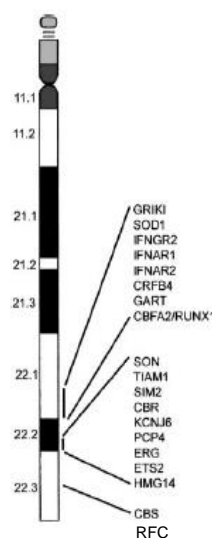


Figura 3 - Representação esquemática dos genes localizados na região 2 da banda 2 do braço longo do cromossoma 21 (Adaptado de Gurbuxani *et al.*, 2004).

1.2.3.1.1 Gene *RUNX1*

O gene *RUNX1* está localizado no cromossoma 21, na RCSD. Este gene codifica uma subunidade de um factor de transcrição heterodimérico, que é expresso em células estaminais hematopoiéticas, bem como nas células mielóides e linfóides em diferenciação (Fonatsch, 2010). Tem um papel importante no início da granulocitopoiese e é necessário para a maturação dos megacariócitos (Langebrake *et al.*, 2006).

O gene *RUNX1* é essencial para a hematopoiese normal, sendo frequentemente afectado por translocações nas leucemias agudas. Os exões 5 e 6 de *RUNX1* estão envolvidos em muitos rearranjos associados à Leucemia Mielóide Aguda (LMA), enquanto o exão 1 é afectado pela t(12;21) associada à Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) da criança (Fonatsch, 2010; Gurbuxani *et al.*, 2004).

A haplo-insuficiência do gene *RUNX1* causa trombocitopenia, enquanto o aumento da sua expressão facilita a diferenciação megacariocítica (Xu *et al.*, 2006). Assim, o aumento da dosagem de *RUNX1* pode desempenhar um papel importante nas leucemias relacionadas com a SD, pois a presença de 3 cópias nestes indivíduos pode ser um pré-requisito para uma hematopoiese alterada em condições de stresse (Langebrake *et al.*, 2006).

1.2.3.1.2 Gene *ERG*

O gene *ERG* é um gene que pertence à família dos factores de transcrição E-Twenty Six (ETS). Este é essencial para a hematopoiese normal, em particular para a megacariopoiese, bem como para a manutenção das células estaminais hematopoiéticas. O gene *ERG* é um oncogene envolvido em vários tipos de cancro, incluindo cancro da próstata e da mama, bem como leucemias (Stankiewicz *et al.*, 2009). Este gene desempenha um papel importante no desenvolvimento ou progressão/manutenção da leucemia em humanos. Pelo facto de se localizar no cromossoma 21, as crianças com trissomia 21 têm um maior risco para desenvolver Leucemia Aguda Megacarioblástica (LAMeg) (Tsuzuki *et al.*, 2011).

1.2.3.1.3 Gene *ETS2*

O gene *EST2* codifica um factor de transcrição também da família ETS. Este gene codifica proteínas que promovem a megacariopoiese, funcionando como oncogene em vários tipos de cancro, incluindo as leucemias (Stankiewicz *et al.*, 2009). Pelo facto de se localizar no cromossoma 21, o seu efeito de dosagem pode estar envolvido no desenvolvimento de leucemias em crianças com SD.

1.2.3.1.4 Gene *CBS*

O gene *CBS* codifica a enzima cistationina β -sintetase (CBS) uma enzima que possui como co-factor o fosfato de piridoxal (Taub, 2002). De uma maneira geral, a CBS promove a reacção de condensação da homocisteína com uma serina, de forma a remover a homocisteína do ciclo da metionina. Esta reacção culmina na via de transsulfuração da cisteína e na síntese de glutathiona. O aumento da via de transsulfuração através da sobre-expressão indirecta do gene *CBS* priva a metionina sintetase de um dos seus precursores, a homocisteína. Isto conduz à diminuição da formação de S-adenosilmetionina, um neurotransmissor que funciona como dador endógeno de grupos metilo. Além disso, ocorre ao mesmo tempo, acumulação de 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF), outro dos precursores da metionina. Por outro lado, a diminuição da actividade da metionina sintetase reduz a conversão da 5-MTHF em tetrahydrofolato (THF), forma metabolicamente activa do folato, composto necessário à síntese de novos nucleótidos, assim como para a síntese de ARN (ácido ribonucleico) e ADN (Figura 4) (Pogribna *et al.*, 2001).

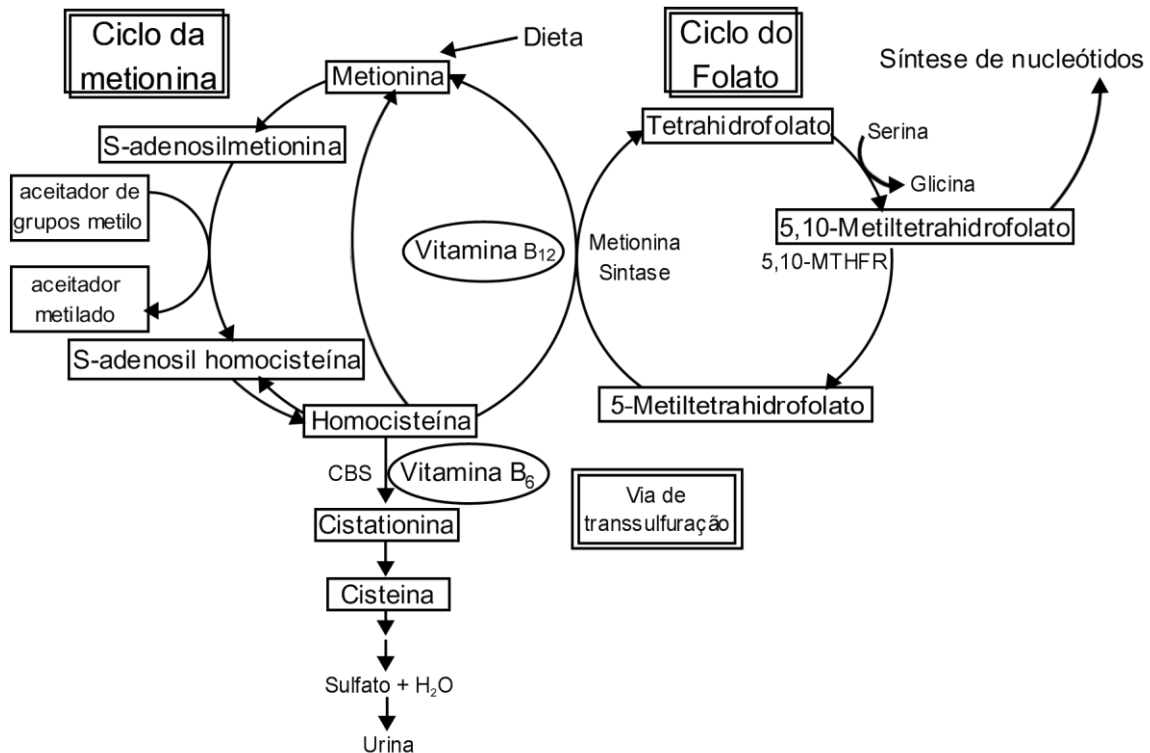


Figura 4 – Interação das vias metabólicas envolvendo a cistationina β-sintetase. A normal transsulfuração necessita da cistationina β-sintetase com a vitamina B6 como co-factor, enquanto a remetilação depende das enzimas 5-metiltetrahidrofolato redutase e metionina sintase, necessitando esta última de folato/vitamina B12 como co-factor. CBS: Cistationina β-sintetase; 5,10- MTHFR: 5,10-metiltetrahidrofolato redutase (Adaptado de Robinson, 2000).

1.2.3.1.5 Gene *SOD1*

As superóxido dismutases estão presentes na maioria dos organismos aeróbios, e catalisam a dismutação do superóxido: $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$. As células eucarióticas contêm três formas distintas de SOD: a enzima mitocondrial que contém manganésio (MnSOD), a enzima citoplasmática que contém cobre e zinco (Cu/ZnSOD) e a SOD extracelular. A Cu/ZnSOD humana é um dímero de 32 kd composto por 2 subunidades idênticas ligadas não covalentemente com sequências de aminoácidos conhecidas e é codificada pelo gene *SOD1* (Levanon *et al.*, 1985).

A Cu/ZnSOD está ligada ao metabolismo anómalo do folato intracelular, à acumulação de uracilos e ao aumento do stresse oxidativo, levando a lesões no ADN (Xavier and Taub, 2010).

A redução da glutathiona no plasma, observada em crianças com SD reflecte uma resposta antioxidante adaptativa ao stresse oxidativo crónico, resultado da sobre-expressão do gene *SOD1* (Pogribna *et al.*, 2001).

1.2.3.1.6 Gene *RFC1*

O transportador de folato reduzido (RFC) é um transportador membranar bidireccional de aniões que medeia a libertação de folato numa variedade de células de diferentes origens (De Marco *et al.*, 2003). Este transportador apresenta maior afinidade para folatos reduzidos, como o substrato fisiológico 5-MTHF, do que para o ácido fólico oxidado (De Marco *et al.*, 2003).

1.2.4 Predisposição para desenvolver cancro

O cancro é designado como uma doença de genes, cuja modificação – estimulação e/ou desrepressão – confere características exclusivas e vantajosas à célula neoplásica, nomeadamente divisão celular excessiva ou resistência à apoptose. Estas alterações podem resultar da acção de vários agentes carcinogénicos, como factores exógenos – agentes químicos, físicos e biológicos, e/ou factores endógenos – inflamação, alteração do sistema imunitário. Estes agentes carcinogénicos induzem alterações a nível do material genético como mutações, translocações, deleções e/ou amplificações (Lodish *et al.* 2008). Assim, o desenvolvimento de cancro é um processo multifactorial que resulta da aquisição, passo a passo, de alterações somáticas, as quais podem envolver a activação de oncogenes e/ou a inactivação de genes supressores tumorais (Lee, S. W. *et al.*, 1998).

A instabilidade genómica é normalmente manifestada através de alterações cromossómicas estruturais ou numéricas. As alterações genómicas estruturais levam à activação de oncogenes ou à eliminação de genes supressores tumorais, enquanto as alterações cromossómicas numéricas,

como as aneuploidias, são as alterações mais comuns no cancro (Ganmore *et al.*, 2009).

Existe uma elevada predisposição para o desenvolvimento de leucemias em crianças com SD, contudo o mecanismo pelo qual o cromossoma 21 adicional contribui para o processo de leucemogénese ainda não é muito claro, apesar de já se conhecerem diversos oncogenes relacionados com leucemias que são codificados pelo cromossoma 21, como referido (Zen *et al.*, 2009).

Por outro lado, a metilação do ADN é também um mecanismo importante na manutenção da estabilidade genómica (Dey, S., 2011). No cancro, a hipometilação global do genoma é frequentemente observada, juntamente com a hipermetilação de genes específicos, como por exemplo genes supressores tumorais (Patterson, 2007). A literatura fornece inúmeros exemplos de que a hipometilação do ADN do genoma aumenta a ocorrência de aneuploidias e de rearranjos cromossómicos, perda de heterozigotia e anomalias na segregação dos cromossomas (Dey, S., 2011). Assim, a metilação de promotores de genes que codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e na reparação do ADN, como como os genes *p15*, *p16*, *DAPK* e *MGMT*, pode levar ao desenvolvimento de neoplasias.

Tem-se colocado a hipótese de que uma dieta deficiente em folato pode afectar a metilação do ADN e pode levar a correlações entre a deficiência em folato e o aumento do risco para muitos tipos de cancro (Patterson, 2007). Sendo assim, o folato e a vitamina B12 (B12) são dois micronutrientes mais importantes para a manutenção e prevenção da lesão do ADN, podendo esta lesão ser induzida pela inadequada ingestão destas vitaminas com propriedades antimutagénicas (Dey, S., 2011). Nas células humanas, a deficiência em folato está associada à hipometilação do ADN e à sua instabilidade (quebras nas cadeias e incorporação de uracilos), aneuploidias dos cromossomas 17 e 21, apoptose e necrose (Dey, S., 2011).

1.2.4.1 Metabolismo do folato

O folato é um componente essencial na dieta humana, e está envolvido em muitas vias metabólicas, principalmente no metabolismo do folato, onde é responsável pela transferência de um carbono simples de uma molécula para a

outra através de uma série de reacções bioquímicas interligadas (Dey, S., 2011).

O metabolismo do folato regula uma complexa rede de vias biológicas básicas, vitais para o crescimento, diferenciação e proliferação das células (Narasimhan, K. L., 2011). Assim, o metabolismo do folato está envolvido na síntese de nucleótidos (purinas e pirimidinas), na síntese de aminoácidos (serina, glicina, metionina, cisteína), na síntese de S-adenosilmetionina (SAM) e na metilação de lípidos e ADN (Figuras 4 e 5) (Narasimhan, K. L., 2011; Locke, A. E. *et al.*, 2010).

Apesar dos mecanismos que ligam os baixos níveis de folato ao cancro ainda estarem pouco esclarecidos, uma das hipóteses é de que estes podem levar à alteração da via de metilação do ADN (Shannon *et al.*, 2002). Isto porque a deficiência em folato leva a uma redução dos doadores de grupos metilo, a SAM, resultando em hipometilação do ADN, mecanismo conhecido como um evento inicial e consistente na carcinogénese (Shannon *et al.*, 2002).

Por outro lado, a variabilidade genética é conferida principalmente por polimorfismos genéticos, que correspondem a alterações genéticas que não causam doença, e que se apresentam na população com uma frequência superior a 1%. Polimorfismos em genes que codificam enzimas do metabolismo do folato desempenham um papel importante na susceptibilidade às aneuploidias (Dey, S., 2011). Por outro lado, polimorfismos em genes relacionados com o metabolismo da homocisteína também interferem com o metabolismo dos aminoácidos e dos ácidos nucleicos, com a metilação e a biossíntese de nucleótidos (Sukla and Raman, 2012).

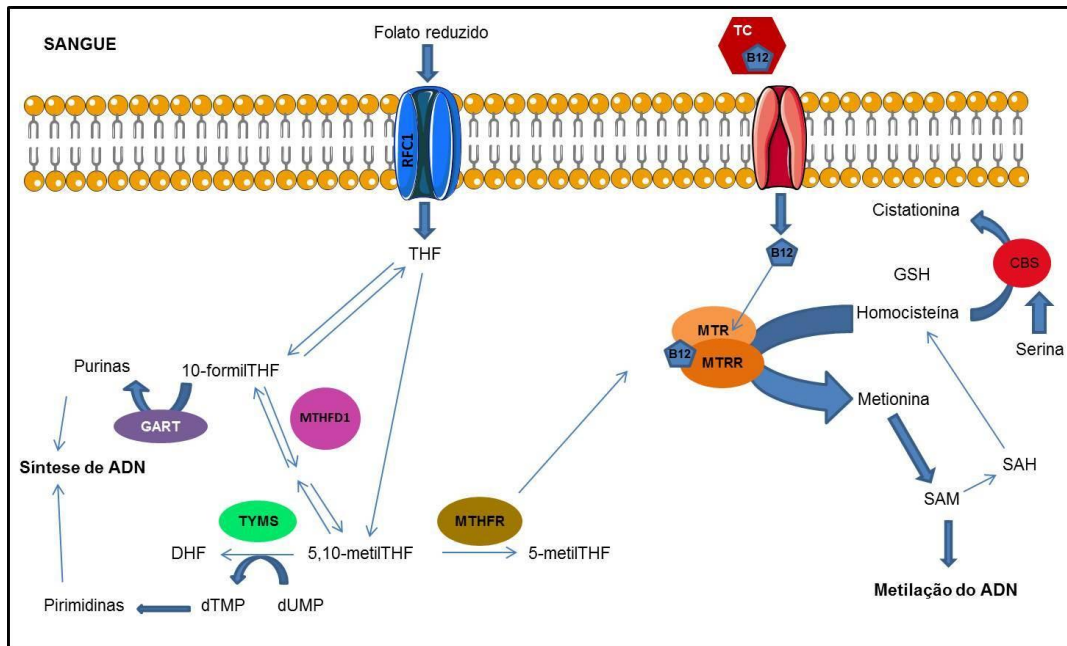


Figura 5 - Metabolismo do folato em humanos. Tanto a síntese como a metilação do ADN são afectadas negativamente pela ingestão insuficiente de folato ou vitamina B12 e/ou por mutações em genes que codificam proteínas destas vias. Note-se que o aumento da homocisteína induz reversão da reacção da S- adenosilhomocisteína (SAH) hidrolase e provoca aumento da SAH, um inibidor potente do produto de reacção do ADN metiltransferase. Enzimas: CBS: cistationina- β -sintetase; GART: fosforibosilglicinamida transformilase; MTHFD1: metilene tetrahydrofolato desidrogenase; MAT: metionina adenosiltransferase; MTHFR: metiltetrahydrofolato redutase; MTR: metionina sintetase; MTRR: metionina sintetase redutase; RFC: transportador de folato reduzido; TC: transcobalamina; TYMS: timidilato sintetase. Metabolitos: DHF: dihydrofolato; GSH: glutathione; THF: tetrahydrofolato; dTMP: deoxitimidina monofosfato; dUMP: deoxiuridina monofosfato; SAH: S-adenosil homocisteína; SAM: S-adenosilmetionina. Cofactores: B12: vitamina B12 ou cobalamina (Adaptado de Coppède, 2009).

1.2.4.1.1 Variabilidade genética

A presença de polimorfismos individuais nos genes envolvidos no metabolismo do folato pode não levar ao aumento do risco para o desenvolvimento de crianças com SD, mas o efeito combinado de génotipos de risco pode modificar o seu efeito individual e aumentar o risco para a SD (Dey, S., 2011).

As variantes polimórficas das enzimas chave envolvidas no metabolismo do folato e dos grupos metilo têm despertado interesse na comunidade científica devido ao envolvimento do folato em inúmeras doenças (Shannon *et al.*, 2002). Em particular, a enzima metiltetrahydrofolato redutase (MTHFR), desempenha um papel central no metabolismo do folato, regulando o fluxo de grupos de folato entre duas importantes vias de biossíntese de SAM e nucleótidos, como mencionado. A MTHFR actua como uma junção metabólica na regulação de reacções celulares de metilação, catalisando a conversão de 5,10-metiltetrahydrofolato (5,10-MTHF) em 5-MTHF, o dador de grupos metilo para a remetilação da homocisteína em metionina (James *et al.*, 1999). O produto da actividade da MTHFR, o 5-MTHF, é a principal forma de folato em circulação no plasma e fornece grupos metilo para a síntese de metionina e para a metilação de ADN (Figura 5) (Shannon *et al.*, 2002).

O gene da MTHFR possui um polimorfismo comum que envolve a substituição de uma timina por uma citosina no nucleótido 677 (C677T), convertendo a alanina em valina na sequência aminoacídica e resultando numa diminuição da actividade desta enzima (Shannon *et al.*, 2002). Outro polimorfismo comum no gene da MTHFR envolve a substituição de uma adenina por uma citosina no nucleótido 1298 (A1298C) (Mtiraoui *et al.*, 2007).

Existem estudos que mostram que a inserção de 68 pb no nucleótido 844 (844ins68) no gene *CBS* não é uma mutação que causa doença, mas um polimorfismo comum na população em geral, apresentando uma frequência na população caucasiana entre 5% e 10%. Esta variante polimórfica está ausente na população asiática e possui uma elevada frequência na população africana (Romano *et al.*, 2002). No entanto não foram encontradas evidências científicas que esta variante polimórfica desempenhe algum papel importante no desenvolvimento de SD de forma independente (Dey, S., 2011). Por outro lado, este polimorfismo está associado à redução da concentração de homocisteína na presença da inserção, estando a variante com inserção relacionada com o aumento da actividade da enzima (Dey, S., 2011). A variante com inserção encontra-se associada em *cis* a outro polimorfismo no gene *CBS*, uma transição de uma timina por uma citosina no nucleótido 833 (T833C), o que conduz à substituição de uma treonina por uma isoleucina (Dey, S., 2011).

O transporte de folato e dos seus análogos nas células de mamíferos ocorre por transporte mediado por transportadores (De Marco *et al.*, 2003). Um dos transportadores melhor caracterizados é o receptor de folato reduzido (RFC), uma proteína localizada nas membranas celulares do intestino, que faz o transporte de 5-MTHF para o interior de diversas células diferentes, sendo determinante na concentração intracelular de folato (Dey, S., 2011). Um polimorfismo na posição 80 do exão 2 do gene *RFC1* (RFC1 A80G), que consiste na troca de uma adenina por uma guanina, introduz um resíduo de arginina no lugar da histidina (De Marco *et al.*, 2003). Vários estudos têm demonstrado que a variante polimórfica apresenta diferenças na sua afinidade para substratos e/ou na eficiência de transporte em comparação com a forma *wild type* da enzima (Dey, S., 2011).

Muitos estudos sugerem que existe uma relação entre a deficiência em folato e alguns tipos de cancro, nomeadamente cancro do colon, leucemias, neoplasias mieloproliferativas e doenças crónicas debilitantes (Acácio *et al.*, 2005). Assim, polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do folato poderão desempenhar um papel importante na susceptibilidade a aneuploidias e no desenvolvimento de eventos iniciais na carcinogénese, uma vez que poderão interferir com a metilação do ADN.

1.3 Incidência de cancro na Síndrome de Down

1.3.1 Cancros sólidos

1.3.1.1 Epidemiologia

Os tumores sólidos são menos frequentes em indivíduos com SD em todos os grupos etários, sendo o retinoblastoma e os tumores das células germinativas a exceção.

1.3.1.2 Características Moleculares

A incidência de tumores intestinais nos doentes com SD é bastante reduzida devido em parte à sobre-dosagem do gene *ETS2* nestes indivíduos. A

maioria destes tumores está associada a baixos níveis de expressão do gene *EST2*. Assim, a sobre-expressão deste gene poderá ser responsável pela diminuição da incidência destes tumores sólidos na SD (Rabin and Whitlock, 2009).

Outro gene que tem sido estudado é o gene *SIM2*, que codifica um factor de transcrição que apresenta actividade supressora no cancro da mama. Este gene encontra-se também localizado no cromossoma 21 que, podendo estar relacionado com a diminuição de incidência de cancro da mama em indivíduos com SD. Um outro candidato a gene supressor de cancro da mama é o gene *BTG3*, também localizado no cromossoma 21, que leva à perda de heterozigotia em alguns cancros da mama (Fonatsch, 2010).

Uma das proteínas envolvidas no desenvolvimento de tumores sólidos é a endostatina. Esta proteína é produto da clivagem do colagénio XVIII, codificado pelo gene *COL18A1* que se encontra localizado no cromossoma 21. A expressão do gene *COL18A1* é elevada nos indivíduos com SD. Como a endostatina é um potente inibidor da angiogénese em muitos tumores sólidos, os elevados níveis de endostatina em indivíduos com SD podem ser responsáveis pela baixa incidência de tumores sólidos nestes indivíduos (Rabin and Whitlock, 2009). A diminuição da incidência dos tumores sólidos nestes doentes deve-se ao facto do crescimento de novos vasos sanguíneos estar comprometida, influenciando a formação e progressão tumoral. Estas crianças apresentam também baixa incidência de outras doenças relacionadas com a angiogénese, nomeadamente aterosclerose. Isto resulta do facto do cromossoma 21 codificar um inibidor do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) que medeia a sinalização envolvida na angiogénese através da via da calcineurina (Rabin and Whitlock, 2009).

Além disso, tem sido proposto que existam outros genes no cromossoma 21 que estejam envolvidos na inibição da formação de tumores sólidos por mecanismos semelhantes.

1.3.2 Leucemias

O primeiro relato de leucemia num doente com SD data de 1930, e o primeiro estudo sistemático ocorreu em 1957. Estudos consecutivos indicaram

que doentes com SD apresentam um risco 10 a 20 vezes mais elevado para desenvolver leucemia, com um risco cumulativo de 2% nos indivíduos com 5 anos de idade e de 2,7% para a idade de 30 anos (Rabin and Whitlock, 2009).

Deste modo, as crianças com SD têm um risco elevado para desenvolver LLA e LMA, mais especificamente o subtipo Leucemia Aguda Megacarioblástica (LAMEg), em relação a crianças sem SD.

As leucemias associadas à SD são dependentes tanto do tempo (iniciam-se no feto e em recém-nascidos), como do espaço (provavelmente originadas de precursores do fígado fetal). A evolução da LLA associada à SD (LLA-SD) e da LAMEg associada à SD (LAMEg-SD) estão relacionadas com uma cooperação de mutações. Assim, para além dos factores genéticos, a exposição ambiental é também importante no desenvolvimento de leucemia na SD (Rabin and Whitlock, 2009).

1.3.2.1 Doença Mieloproliferativa Transitória (DMT)

1.3.2.1.1 Epidemiologia

Estima-se que aproximadamente 10% das crianças com SD nascem com Doença Mieloproliferativa Transitória (DMT) e que, aproximadamente 20% das crianças diagnosticadas com DMT desenvolvem LAMEg-SD por volta dos 5 anos (Rabin and Whitlock, 2009).

1.3.2.1.2 Características Clínicas

A DMT pode aparecer durante o desenvolvimento fetal, normalmente com hidrósia fetal. Assim, a hidrósia fetal em conjunto com a trissomia 21 pode ser um indicativo de DMT (Roy *et al.*, 2009).

A DMT é uma doença clonal caracterizada por megacarioblastos imaturos no fígado fetal e no sangue periférico, e por displasia marcada dos eritrócitos e da linhagem megacariocítica (Roy *et al.*, 2009).

Uma pequena parte das crianças que nascem, é assintomática e apresenta apenas blastos em circulação, com ou sem leucocitose. Outras características clínicas incluem hepatomegalia e esplenomegalia em mais de

10% dos doentes, ocorre fibrose no fígado devido à infiltração de blastos, que raramente causam falência hepática fulminante. A leucocitose e a trombocitopenia são comuns nestes indivíduos, embora a trombocitopenia seja mais rara (Roy *et al.*, 2009).

1.3.2.1.3 Características Moleculares

Os blastos de DMT possuem '*blebbing*' característico dos megacarioblastos e expressam CD33, CD38, CD117, CD34, CD7, CD56, CD36, CD71, CD42b, receptor da trombopoietina, receptor da eritropoietina e receptor- α da interleucina 3 (Roy *et al.*, 2009). Estes não se distinguem morfológicamente dos observados em LAMeg, o que contribui para a hipótese de que a LAMeg deriva de DMT (Mundschau *et al.*, 2003).

Além disso, tanto a DMT como a LAMeg-SD são caracterizadas pela mutação no factor de transcrição GATA1 localizado no cromossoma X. Esta mutação ocorre *in útero* e resulta na expressão da isoforma pequena de GATA1 (GATA1s). O GATA1 regula o normal desenvolvimento dos eritrócitos, megacariócitos e basófilos/mastócitos, e promove a proliferação e o bloqueio da diferenciação dos megacarioblastos embrionários imaturos (Ganmore *et al.*, 2009).

Nos indivíduos com SD observam-se anomalias nos progenitores mielóides do fígado fetal, que normalmente precedem a aquisição de mutações em GATA1 (Tunstall-Pedoe *et al.*, 2008).

1.3.2.1.4 Diagnóstico e Prognóstico

A DMT desaparece espontaneamente sem intervenção terapêutica em muitos dos casos, sendo vista como uma síndrome pré-leucémica. A regressão espontânea da DMT ocorre 3 a 6 meses após o nascimento e pode ser explicada pela perda do ambiente hematopoiético fetal (Gurbuxani *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2009).

Não é claro se todas as LAMeg-SD são precedidas por DMT porque muitos dos casos com DMT não são diagnosticados. Assim, a verdadeira frequência de DMT não é totalmente conhecida. Alternativamente, a própria

DMT causa directamente a morte como resultado de fibrose hepática secundária, que resulta da infiltração de megacarioblastos, sendo no entanto uma situação rara (Ahmed *et al.*, 2003).

Os bebés com DMT assintomática, especialmente os que têm muitos blastos ou disfunção no fígado, podem beneficiar de tratamento com citosina arabinosida (Ara-C) (citarabina) em baixa dose, pois os megacarioblastos da DMT são muito sensíveis à citarabina (Roy *et al.*, 2009).

1.3.2.2 Leucemia Aguda Megacarioblástica (LAMeg)

1.3.2.2.1 Epidemiologia

A LAMeg é uma leucemia com elevada incidência em crianças com SD, sendo aproximadamente 500 vezes superior à da população em geral. A idade de início da LAMeg é em média por volta dos 1-8 anos de idade (Roy *et al.*, 2009).

1.3.2.2.2 Características Clínicas

A LAMeg é precedida em cerca de 70% dos casos por uma pré-fase, caracterizada por trombocitopenia e por mudanças displásicas na medula óssea, muitas vezes acompanhada por fibrose medular, a qual pode durar vários meses ou mesmo anos antes de progredir para LAMeg, e pode ou não ser precedida por um diagnóstico de DMT. Algumas características apresentadas pela LAMeg são distintas das que aparecem na LMA esporádica. Ou seja, as crianças com leucemia mielóide associada à SD desenvolvem esta leucemia mais cedo, e apresentam diminuição do número de glóbulos brancos no sangue (Fonatsch, 2010).

Para além disto, esta LAMeg também se caracteriza pela presença de blastos e plaquetas gigantes no sangue periférico (Figura 6) (Roy *et al.*, 2009).

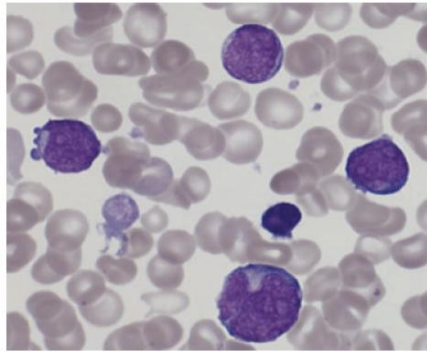


Figura 6 - Blastos e plaquetas gigantes no sangue periférico de uma criança com leucemia aguda megacarioblástica associada à Síndrome de Down (Retirado de Roy *et al.*, 2009).

1.3.2.2.3 Características Citogenéticas e Moleculares

Os blastos de LAMeg co-expressam marcadores de células progenitoras/células estaminais (CD34, CD33, CD117), marcadores mielóides (CD33), marcadores megacariocíticos (CD42b e CD41) e marcadores eritróides (CD36 e glicoforina A), bem como marcadores de células T, como o CD7 (Roy *et al.*, 2009).

Na figura 7 está representado um modelo actual que procura explicar os múltiplos passos do desenvolvimento da LAMeg na SD. Este modelo sugere que a trissomia 21 leva à proliferação e à auto-renovação das células estaminais precursoras dos megacariócitos. Assim, esta pressão positiva no sentido do desenvolvimento da linha megacario-eritrocítica coopera com as mutações somáticas em *GATA1* promovendo uma proliferação clonal dos megacarioblastos diagnosticados ao nascimento na DMT. Contudo, mutações em *GATA1* são necessárias mas não são suficientes para o desenvolvimento de LAMeg-SD (Ganmore *et al.*, 2009).

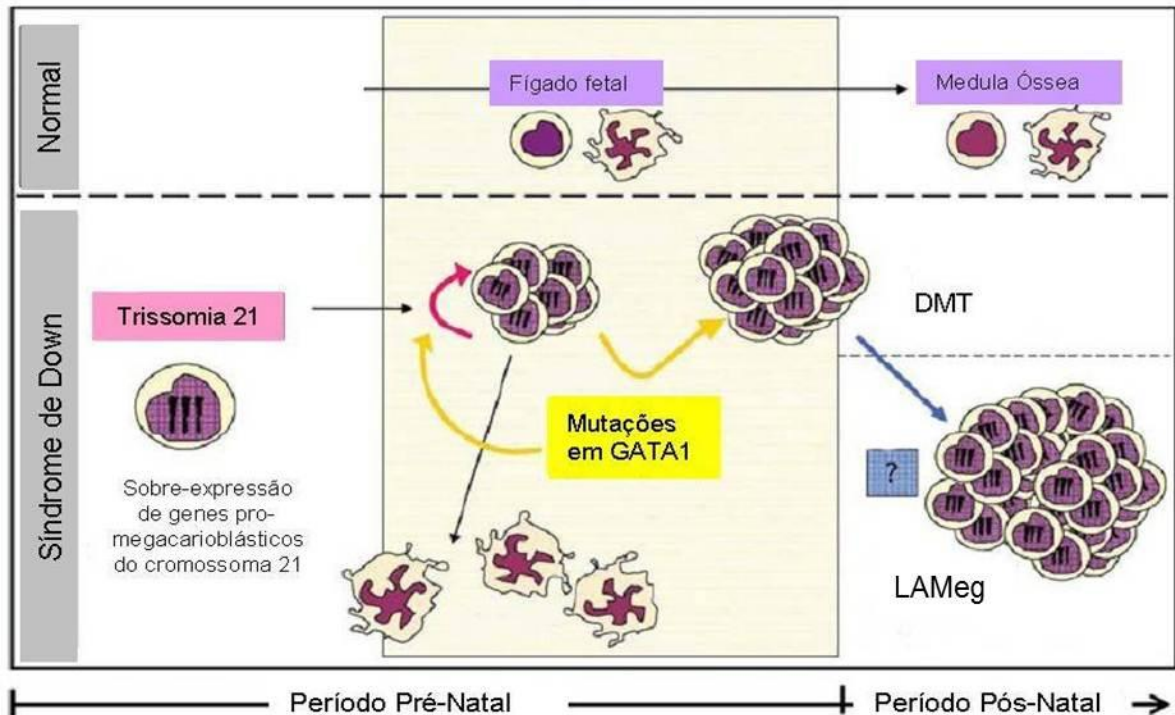


Figura 7 - Modelo proposto para o desenvolvimento de leucemia aguda megacarioblástica na Síndrome de Down. O aumento da expressão dos genes do cromossoma 21 em células estaminais hematopoiéticas do fígado fetal leva ao aumento da produção de progenitores de megacariócitos. A mutação somática GATA1s bloqueia a diferenciação megacarioblástica e aumenta a proliferação de progenitores de megacariócitos, o que pode levar a DMT em 5% dos nascimentos com SD. A aquisição de outros eventos genéticos ou epigenéticos durante a infância levarão ao desenvolvimento de LAMeg num quinto dos doentes com DMT (Adaptado de Ganmore *et al.*, 2009).

De salientar que as alterações citogenéticas que caracterizam a LMA esporádica, como a t(8;21), t(15;17), t(9;11) e inv(16), e as que caracterizam a LAMeg, como a t(1;22) e t(1;3), não ocorrem em LAMeg-SD (Roy *et al.*, 2009).

Por outro lado, a activação de mutações na Cinase Janus 3 (JAK3), ou a trissomia 8, têm sido vistas como responsáveis por mediar a progressão de DMT para LAMeg-SD. Além disso, as crianças com SD e com DMT ou LAMeg possuem células leucémicas com mutações em GATA1 (Fonatsch, 2010).

Mutações em *GATA1*

O gene *GATA1* está localizado no cromossoma Xp11.23 e mutações que envolvem este gene têm sido encontradas em doenças humanas ligadas ao cromossoma X, que causam vários graus de anemia e trombocitopenia. Contudo, estas condições hereditárias não estão associadas ao desenvolvimento de leucemias.

A proteína *GATA1* é um factor de transcrição essencial para a normal diferenciação eritróide e megacariocítica, e possui três domínios funcionais, mais especificamente um domínio de transactivação no terminal amínico ou N-terminal e dois domínios *zinc fingers*. O domínio *zinc finger* do terminal carboxílico ou C-terminal é necessário para a ligação de *GATA1* ao ADN, enquanto o domínio *zinc finger* do N-terminal estabiliza a ligação a diversos locais (Gurbuxani *et al.*, 2004).

Em doentes com SD, as mutações somáticas em *GATA1* incluem deleções, mutações missense, mutações nonsense e mutações por *splicing* no exão 2/fronteira do intrão, levando à introdução de um codão stop precoce e à síntese de uma proteína *GATA1* truncada, designada *GATA1s* (40KDa), traduzida a partir de um local a jusante do local de iniciação, e distinta da proteína *GATA1* completa de 50KDa (Malinge *et al.*, 2009; Rabin e Whitlock, 2009).

A proteína *GATA1s* não possui o domínio de activação N-terminal, o que vai reduzir o seu potencial de transactivação, contribuindo potencialmente para a proliferação incontrolada dos megacariócitos (Figura 8). As mutações somáticas que envolvem o factor de transcrição do gene *GATA1* estão presentes em quase todos os casos de DMT e LAMeg-SD (Roy *et al.*, 2009).

Existem vários estudos que confirmam a origem fetal das mutações em *GATA1*, e pensa-se que a presença de trissomia 21 constitucional altere a hematopoiese fetal, levando à aquisição de mutações (Xavier *et al.*, 2009).

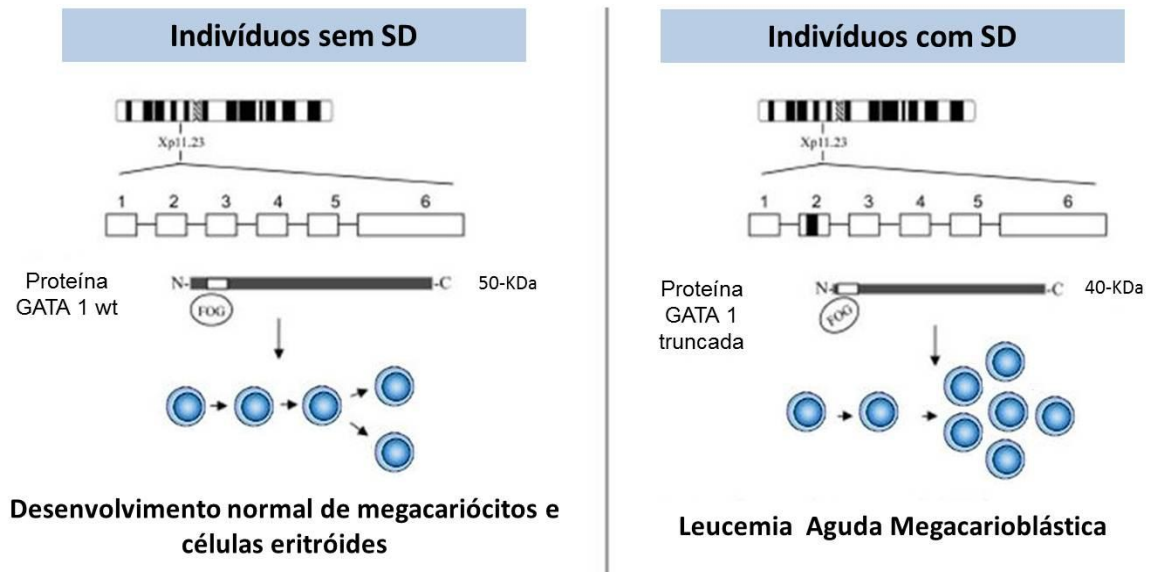


Figura 8 - Esquema ilustrativo do papel das mutações no gene *GATA1* na leucemogénese associada à Síndrome de Down (Adaptado de Xavier *et al.*, 2009).

Existem muitos oncogenes codificados pelo cromossoma 21 humano, como os genes *RUNX1*, *EST2*, *ERG* e *miR-125b-2*, que cooperam com as mutações em *GATA1* (Ganmore *et al.*, 2009).

A sobre-expressão do *miR-125b-2* leva a hiperproliferação específica e a maior capacidade de auto-renovação dos progenitores megacariocíticos, assim como dos progenitores megacariocíticos-eritróides, bloqueando a diferenciação das outras linhagens celulares. Este efeito é agravado pela cooperação com a mutação oncogénica *GATA1s* (Klusmann *et al.*, 2010).

Além disso, os factores de transcrição *ERG* e *EST2* cooperam com as proteínas mutadas *GATA1s* da leucemia mielóide na SD, immortalizando os progenitores megacariocíticos fetais (Fonatsch, 2010).

A combinação da diminuição das funções devido a *GATA1s* e o aumento dos níveis de *RUNX1* pode ter um papel importante na predisposição dos doentes com SD para o desenvolvimento de LAMeg. As proteínas mutadas especificamente em *GATA1*, têm um domínio de activação N-terminal defeituoso, contudo mantém a sua capacidade para se associar a *RUNX1*. Como *GATA1* interage com *RUNX1* através do seu domínio *zinc-finger*, o domínio N-terminal de *GATA1* é dispensável para a interacção com *RUNX1* (Xu *et al.*, 2006).

1.3.2.2.4. Aspectos Epigenéticos

A sobre-expressão de genes presentes no cromossoma 21 pode alterar a expressão de outros genes, presentes noutros cromossomas, e consequentemente afectar a hematopoiese (Gurbuxani *et al.*, 2004).

O gene que codifica a CBS, localizado no cromossoma 21q22.3, é 12,5 vezes mais expresso nas células de LAMeg-SD do que em células de LAMeg que não estão associadas à SD. Assim, o aumento da actividade de CBS na SD resulta numa diminuição significativa dos níveis de homocisteína, metionina, SAM e SAH no plasma dos indivíduos com SD (Gurbuxani *et al.*, 2004).

A alteração nos níveis de SAM e SAH pode alterar a metilação das regiões ricas em citosinas e guaninas (ilhas CpG), afectando assim a expressão de genes. Para além disso, baixos níveis de homocisteína perturbam o metabolismo do folato, resultando na sua deficiência. Isto pode levar ao aumento da frequência de mutações no ADN, predispondo as crianças com SD para a leucemia (Figura 9) (Gurbuxani *et al.*, 2004).

Um modelo que procura explicar a leucemogénese em crianças com SD propõe que as mutações em *GATA1* se devem à sobre-expressão de CBS e à alteração da homeostase do folato. Isto porque a capacidade para reparar lesão no ADN fica comprometida (Cabelof *et al.*, 2009).

Por outro lado, o stresse oxidativo pode danificar as bases do ADN e oxidar os nucleótidos promovendo mutações através de trocas de G:C>T:A. Isto pode também conduzir ao aumento da produção de glutatona, desviando os intermediários metabólicos do metabolismo do folato, criando assim uma deficiência em folato que pode conduzir à acumulação de uracilos no ADN (Figura 9) (Cabelof *et al.*, 2009).

O espectro de mutações em *GATA1* sugere que a acumulação de uracilos, o stresse oxidativo e a reduzida capacidade de reparação de ADN por excisão de bases (BER) resultem em mutações iniciadoras na leucemia, levando assim ao desenvolvimento de leucemia nas crianças com SD (Cabelof *et al.*, 2009).

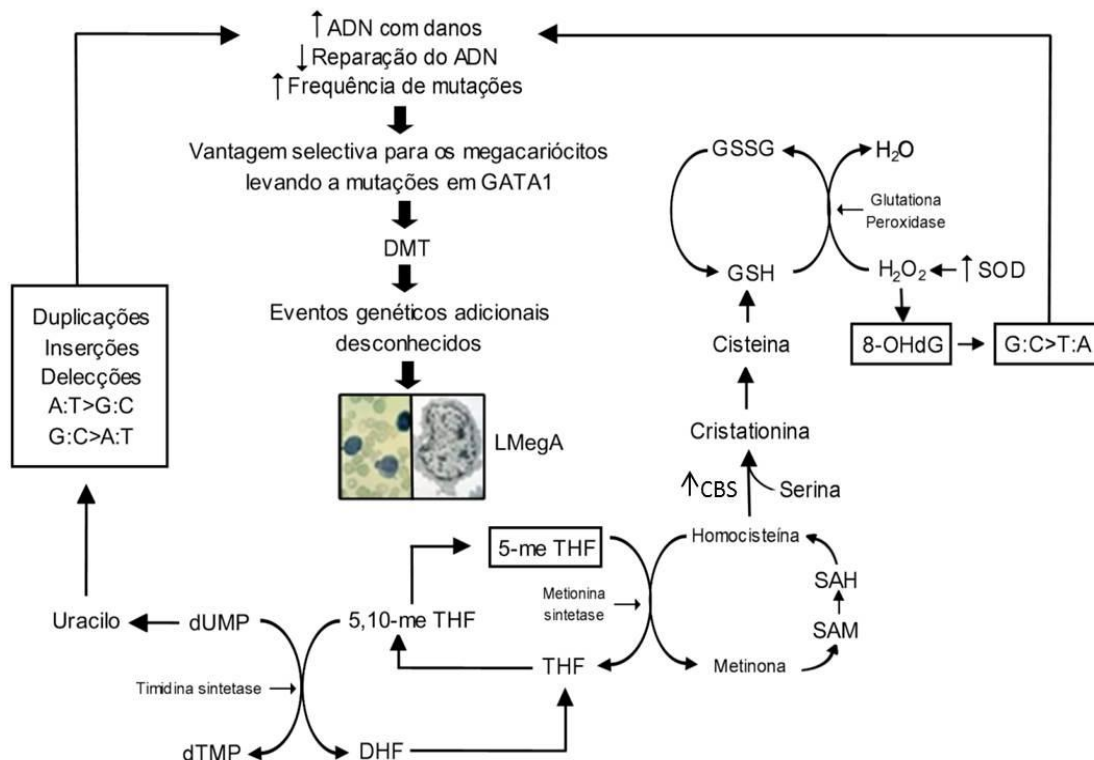


Figura 9 - Relação entre o metabolismo do folato, o stresse oxidativo e as alterações genéticas e/ou epigenéticas na doença mieloproliferativa transitória/leucemia aguda megacarioblástica. O modelo representado na figura procura explicar o facto da trissomia 21 aumentar a expressão do gene *CBS* e conduzir à mutagénese de *GATA1* seguida da DMT/LAMeg. *CBS*: Cistationina-β-sintetase; *DHF*: dihidrofolato; *dTMP*: deoxitimidina monofosfato; *dUMP*: deoxiuridina monofosfato; *GSH*: glutaciona reduzida; *GSSG*: glutaciona oxidada; *8-OHdG*: 8-hidroxi-guanosina; *PLP*: piridoxal-L-fosfato; *SAM*: S-adenosilmetionina; *SAH*: S-adenosil homocisteína; *SOD*: Cu/Zn superóxido dismutase; *5-meTHF*: 5-metil-tetra-hidrofolato; *5,10-meTHF*: 5,10-metil-tetra-hidrofolato; *THF*: tetra-hidrofolato (Adaptado de Cabelof *et al.*, 2009).

1.3.2.2.5. Diagnóstico e Prognóstico

As crianças com LAMeg-SD têm melhor prognóstico do que crianças com LMA esporádica (Roy *et al.*, 2009). Este prognóstico favorável da LAMeg-SD pode ser em parte atribuído à maior sensibilidade dos blastos de LAMeg-SD para os agentes anti-leucémicos, incluindo Ara-C e antraciclinas (Malinge *et al.*, 2009).

A elevada sensibilidade destes blastos à Ara-C pensa-se resultar da elevada dosagem de dois genes localizados no cromossoma 21: o *CBS* e *SOD1*. A deficiência em folato resultante da actividade da CBS leva a maior sensibilidade para Ara-C, pois a sua administração poderá resultar no aumento da formação de Ara-C trifosfato (ara-CTP), com menor capacidade de competição pela deoxicidina trifosfato (dCTP) na ligação ao ADN e à polimerase de ARN (Rabin and Whitlock, 2009).

Outro factor que leva ao aumento da quimiosensibilidade em doentes com LAMeg-SD poderá estar relacionado com a elevada dosagem do gene *SOD1*. Um aumento da expressão do gene *SOD1* aumenta a formação de radicais livres de hidroxilo, causando maior susceptibilidade das células com SD para apoptose, aumentando assim a quimiosensibilidade, particularmente para antraciclinas (Rabin and Whitlock, 2009).

1.3.2.3. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

1.3.2.3.1. Epidemiologia

A LLA é o cancro mais frequente em crianças, e é a leucemia mais comum na SD compreendendo acerca de 1-3% do total de crianças com SD (Ganmore *et al.*, 2009).

1.3.2.3.2. Características Clínicas

A LLA-SD é uma doença heterogénea, com origem exclusiva em células B (Bercovich *et al.*, 2008; Fonatsh, 2010).

Nas crianças com LLA-SD existe habitualmente diminuição do número de plaquetas, e baixa incidência de esplenomegalia, linfadenopatia e massa mediastínica, comparativamente a crianças com LLA esporádica (Whitlock, 2005).

1.3.2.3.3. Características Citogenéticas e Moleculares

Na forma esporádica desta leucemia infantil a trissomia 21 ou tetrassomia 21 são as alterações mais comuns nos precursores de células B

(Bercovich *et al.*, 2008). No entanto, alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento de LLA-SD ainda não são conhecidas (Chauffaille, 2009).

As alterações citogenéticas normalmente detectadas na LLA esporádica infantil, não são frequentes na LLA-SD (Bercovich *et al.*, 2008). Os aspectos citogenéticos observados com grande frequência na LLA-SD incluem +X, t(8;14)(q11;q32) e del(9p) (Rabin and Whitlock, 2009).

Em vários estudos foram observados casos de LLA-SD com alterações cromossómicas clonais, mutações resultantes em ganho de função na Cinase Janus 2 (JAK2) e deleções submicroscópicas de genes, tais como *TEL* (*ETV6*), *CDKN2A* e *PAX5* (Chauffaille, 2009).

Como genes candidatos para activar mutações na LLA-SD têm sido descritos os genes *FLT3* e *RAS*, ambos também mutados e com elevadas hiperdiploidias associadas à LLA. Os genes *PTPN11* e *BRAF*, também se podem encontrar mutados em precursores de células B na LLA (Izraeli, 2010).

As crianças com LLA-SD apresentam uma frequência significativamente mais baixa de *ETV6/RUNX1* do que as crianças com LLA sem SD. Mutações por ganho de função em JAK2 estão presentes em aproximadamente 30% dos casos de LLA-SD, e as alterações que envolvem o gene do Receptor de citocinas para o factor 2 (*CRLF2*), o qual está associado à activação de mutações em *JAK2*, estão também presentes neste grupo de doentes (Xavier and Taub, 2010). O facto de uma mutação em *JAK2* ou de um cromossoma X extranumerário poder cooperar com a trissomia 21 na indução de leucemia, é um modelo que tem vindo a ser proposto, semelhante à cooperação entre a mutação em *GATA1* e a doença mieloproliferativa na SD (Figura 10) (Chauffaille, 2009).

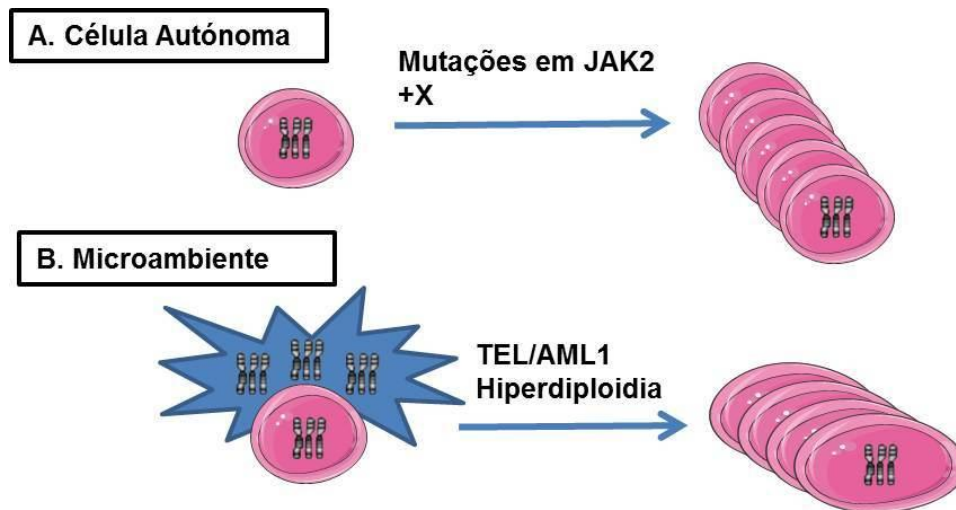


Figura 10 - Modelo explicativo da patogênese de leucemia linfoblástica aguda associada à Síndrome de Down. (A) Trissomia 21 constitucional pode aumentar a proliferação ou a sobrevivência de progenitores linfóides pré-leucêmicos. (B) O microambiente característico, causado pela presença da trissomia 21 em todas as células do corpo, resulta no aumento do risco para eventos genéticos leucemogênicos (Adaptado de Malinge *et al.*, 2009).

Mutações em JAK2

As mutações no gene *JAK2*, localizado no cromossoma 9p24, que activam constitutivamente a actividade de tirosina cinase, têm sido identificadas em muitas doenças mieloproliferativas (Bercovich *et al.*, 2008). Estas mutações podem cooperar com o gene *CRLF2*, que apresenta uma expressão aumentada na LLA-SD (Izraeli, 2010).

Uma mutação no domínio de pseudocinase de *JAK2*, a *JAK2ΔIREED*, foi observada em apenas um caso de LLA-SD. Contudo, uma mutação diferente no domínio pseudocinase de *JAK2*, a *JAK2V617F*, é frequentemente encontrada em doenças mieloproliferativas e acredita-se que leve ao desenvolvimento da leucemia (Hertzberg *et al.*, 2010).

Receptor de citocinas para o factor 2 (CRLF2)

CRLF2 é um receptor de citocinas de origem epitelial que desempenha um papel importante na inflamação e no desenvolvimento linfóide. Este receptor dimeriza com *IL7RA* para formar o receptor de linfopietina derivado

do estroma do timo. A expressão de *IL7RA* nos blastos leucémicos sugere que expressão anómala de *CRLF2* pode interagir com *IL7RA* para formar o receptor. Foi também demonstrado que *CRLF2* coopera com *JAK2*, sugerindo que, *CRLF2* pode actuar independentemente de *IL7RA*, possivelmente através de homodimerização semelhante a outros receptores de citocinas do tipo 1 (Hertzberg *et al.*, 2010).

O *CRLF2* é um receptor de citocinas do tipo 1 atípico que contém apenas uma das duas “boxes” que medeiam a ligação às enzimas *JAK* e apenas a uma tirosina no seu domínio C-terminal. Portanto, ele é um fraco activador de *JAK2*. Isto pode explicar a necessidade de elevados níveis de *JAK2* para activar a via *JAK/STAT*, podendo *JAK2* cooperar com *CRLF2* quando há aumento da expressão de *CRLF2*. Este aumento da expressão de *CRLF2* deve-se a dois eventos. O evento mais comum é a activação da mutação somática em *JAK2*, enquanto o segundo evento, e menos comum, corresponde à activação da mutação em *CRLF2* (Figura 11) (Hertzberg *et al.*, 2010). Assim, a sobre-expressão de *CRLF2* está associada à activação da via *JAK/STAT* e à manutenção da proliferação dos progenitores de células B (Izraeli, 2010).

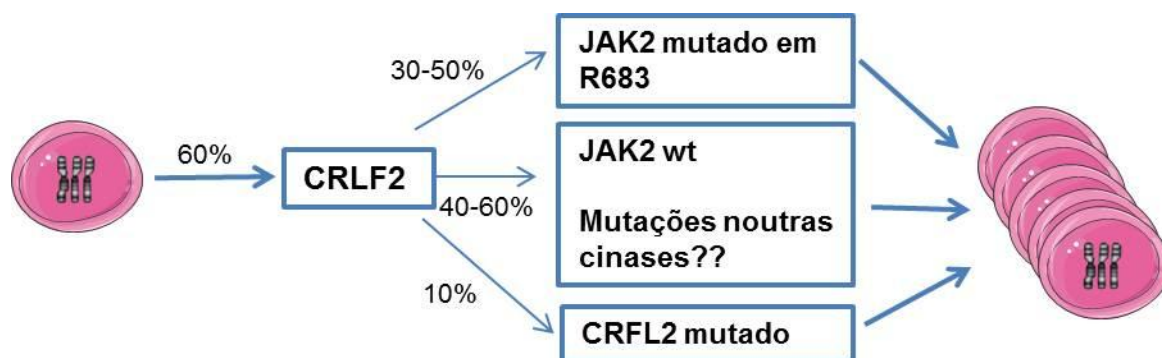


Figura 11 - Modelo explicativo do efeito do receptor de citocinas para o factor 2 na leucemia linfoblástica aguda associada à Síndrome de Down. O aumento da expressão de *CRLF2* é causado por uma alteração genómica, seguida pela progressão da activação de mutações em *CRLF2*, em *JAK2*, ou outras alterações em cinases ainda não identificadas (Adaptado de Hertzberg *et al.*, 2010).

Foram identificadas alterações genéticas que conduzem à expressão de receptores de citocinas em aproximadamente 60% dos casos com LLA-SD, contudo ocorrem em apenas 10% ou menos dos casos de LLA esporádicos (Izraeli, 2010).

1.3.2.3.4. Aspectos Epigenéticos

O folato é um dador de unidades de carbono necessárias para a síntese de purinas e de timidilato, e para a metilação de uma enorme variedade de substâncias biológicas essenciais, nomeadamente de fosfolípidos, proteínas, ADN e neurotransmissores, como mencionado (Jacob, 2000).

A alteração do metabolismo do folato em doentes com SD pode contribuir para a leucemogénese através das mudanças na metilação e nas taxas de mutação do ADN (Rabin and Whitlock, 2009).

Por outro lado, a deficiência em folato *in útero* que ocorre durante a gravidez em mulheres com os polimorfismos referidos anteriormente pode ser um factor de risco tanto para a SD como para o desenvolvimento de LLA (Rabin and Whitlock, 2009).

1.3.2.3.5. Diagnóstico e Prognóstico

As crianças com LLA-SD apresentam menor sobrevivência relativamente a crianças com LLA sem SD (Maloney *et al.*, 2010). Os factores que contribuem para isto incluem o elevado risco de recaída, devido ao desenvolvimento de infecções fatais e à elevada mortalidade resultante dos efeitos tóxicos da terapia, uma vez que a cópia extra do cromossoma 21 nas células com trissomia 21 resulta no aumento da entrada de metotrexato em muitos tecidos, o que leva ao aumento da toxicidade (Maloney *et al.*, 2010; Xavier and Taub, 2010). Contudo, pensa-se que a maior causa para pior prognóstico nestas crianças reside na baixa prevalência da fusão *ETV6-RUNX1*, assim como das trissomias 4 e 10 (Maloney *et al.*, 2010).

O metotrexato é utilizado no tratamento da LLA, a neoplasia mais frequente na população infantil, contudo as crianças com LLA-SD são muito sensíveis aos efeitos tóxicos do metotrexato (Laverdière *et al.*, 2002; Ganmore *et al.*, 2009).

1.4 Objectivos do projecto

Este projecto tem como objectivos estudar os níveis de expressão e o perfil de metilação de determinados genes relacionados com o desenvolvimento de neoplasias hematológicas e localizados no cromossoma 21 e a sua relação com a maior susceptibilidade para cancro/leucemias em doentes com Síndrome de Down. Além disso, pretende-se analisar a prevalência de variantes polimórficas em determinados genes do cromossoma 21, assim como avaliar o seu papel no desenvolvimento de neoplasias nestes doentes.

Assim, espera-se contribuir para o aumento do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de leucemia em doentes com SD.

Capítulo 2. Material e Métodos

2.1 Recolha de amostras de células de fetos com Síndrome de Down e sangue periférico de indivíduos controlo

Neste estudo utilizaram-se 31 amostras de células de vilosidades coriônicas (CVS) e de líquidos amnióticos (LA) (19 CVS e 12 LA), obtidas através de amniocenteses e fornecidas pelo Laboratório de Citogenética e Genómica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra (LCG-FMUC/CIMAGO). Foram também utilizadas amostras de sangue periférico de indivíduos controlo saudáveis.

2.2 Análise citogenética em fibroblastos de fetos com Síndrome de Down

As células de LA e CVS são células aderentes, propagadas e mantidas em cultura em meio RPMI, numa incubadora a 37°C com humidade controlada e atmosfera com 5% de CO₂. A sua manipulação foi efectuada numa câmara de fluxo laminar vertical, em condições de esterilidade de forma a evitar possíveis contaminações.

Para obter o cariótipo de cada uma das amostras, as células de LA e CVS foram incubadas com colcemida durante 3 horas a 37°C. Este composto impede a polimerização dos microtúbulos, e permite bloquear o ciclo celular em metáfase possibilitando a visualização dos cromossomas ao microscópio óptico. Após incubação, as células sofreram um tratamento hipotónico seguido de uma pré-fixação e posterior fixação das mesmas com metanol e ácido acético. Seguiu-se o espalhamento dos cromossomas, que consistiu na projecção de uma gota de células fixadas numa lâmina histológica, tendo como objectivo o rementamento das células e o espalhamento dos cromossomas. O espalhamento depende de algumas variáveis, nomeadamente da força com que se deixa cair a gota na lâmina, da altura a que se encontra a pipeta da mesma, da temperatura e da humidade. De forma a contornar estas duas últimas variáveis, fez-se o espalhamento numa câmara com a temperatura e a humidade controladas.

Por fim, procedeu-se à coloração dos cromossomas por bandagem, utilizando a Banda GTG (Giemsa-Tripsina-Giemsa). Esta coloração permitiu corar os cromossomas obtendo-se um padrão de bandas resultante da acção

da tripsina, que não actua ao nível da heterocromatina, originado assim as bandas escuras. O padrão de bandas obtido permitiu a identificação dos diferentes cromossomas ao microscópio óptico. Assim, obteve-se o cariótipo de cada amostra e verificou-se se o feto possuía ou não trissomia 21, e qual o tipo de trissomia 21 (Shaffer, L. G. and Tommerup, N., 2005).

2.3 Extracção e quantificação de ácidos nucleicos

Para analisar a presença das variantes polimórficas 844ins68/T833C do gene *CBS*, A251 do gene *SOD1*, A80G do gene *RFC1* e A1298C do gene *MTHFR*, assim como para a análise do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK* e *MGMT* procedeu-se à extracção de ADN. Por outro lado, com a finalidade de analisar os níveis de expressão dos genes *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1* procedeu-se à extracção de ARN.

A extracção de ácidos nucleicos foi realizada em ambos os tipos de amostras (fibroblastos de LA e CVS de fetos com SD e sangue periférico de indivíduos controlo).

No caso dos fibroblastos, procedeu-se à raspagem das mesmas células do fundo do frasco de cultura utilizando um raspador. De seguida, lavou-se com tampão fosfato (PBS) por centrifugação durante 1 minuto a 2.300 xg. Em relação às amostras de sangue periférico, utilizou-se um volume de 200 µl de sangue periférico de cada amostra.

Para todas as extracções de ácidos nucleicos foi seguido o mesmo procedimento.

2.3.1 Extracção de ADN genómico de fibroblastos de fetos com Síndrome de Down e de sangue periférico de controlos

A extracção de ADN genómico de fibroblastos e de sangue periférico foi realizada através do uso dos kits *Illustra™* tissue and cells genomicPrep Mini Spin e *Illustra™* blood genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare), respectivamente. Estas técnicas de extracção possuem os mesmos princípios para os dois tipos de amostras, e consistem na capacidade de adsorção dos ácidos nucleicos a membranas de sílica de modo dependente do pH e da

concentração salina, permitindo a obtenção de amostras de ADN de elevada pureza e integridade física.

A extracção de ADN iniciou-se pela lise celular. Para tal, no caso dos fibroblastos, ressuspendeu-se o sedimento de células, previamente lavado em PBS, em 100 µl de tampão de lise tipo 1 (kit *Illustra*TM), homogeneizou-se bem e adicionou-se 10 µl de proteinase K (kit *Illustra*TM). Voltou a homogeneizar-se bem, incubou-se 15 minutos a 56°C, e de seguida, mais 2 minutos a 70°C. No caso das células do sangue periférico, adicionou-se 20 µl de proteinase K (kit *Illustra*TM) e 400 µl de tampão de lise (kit *Illustra*TM), homogeneizou-se bem e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente.

Na extracção de ADN dos fibroblastos, houve um passo adicional designado purificação. Neste caso, adicionou-se 500 µl de tampão de lise tipo 4 (kit *Illustra*TM) e incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente.

De seguida, para ambos os tipos de amostras, procedeu-se à transferência dos lisados celulares para as respectivas colunas de purificação, nas quais o ADN se liga à membrana de sílica. Centrifugaram-se as colunas durante 1 minuto a 11.000 xg de forma a eluir os contaminantes (proteínas, lípidos, entre outros).

O passo seguinte consistiu em duas lavagens consecutivas. Assim, a cada coluna adicionou-se 500 µl de tampão de lise (kit *Illustra*TM) numa primeira lavagem e repetiu-se a lavagem com 500 µl de tampão de lavagem (kit *Illustra*TM). Em cada uma das lavagens centrifugaram-se as colunas durante 1 e 3 minutos, respectivamente, a 11.000 xg.

Por fim, procedeu-se à eluição. Neste passo, adicionou-se 200 µl de tampão de eluição (kit *Illustra*TM), previamente aquecido a 70°C, à membrana de sílica de cada coluna e incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugou-se durante 1 minuto a 11.000 xg e guardou-se o ADN a -20°C em tubos de rosca específicos para guardar ADN.

2.3.2 Extracção de ARN de fibroblastos de fetos com Síndrome de Down e de células de sangue periférico de indivíduos controlo

A extracção de ARN de fibroblastos e de células de sangue periférico foi realizada através do uso do kit *Illustra™* RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare).

A extracção de ARN, tal como a de ADN, iniciou-se com a lise celular. De forma a efectuar a lise das células, adicionou-se 350 µl do tampão de lise RA1 (kit *Illustra™*) e 3,5 µl de beta – mercaptoetanol a cada amostra. Misturou-se bem e transferiu-se todo o conteúdo lisado para uma coluna de filtração. Centrifugou-se durante 1 minuto a 5.000 xg de forma a remover todas as impurezas. O conteúdo que passou através da coluna foi recolhido para um tubo de 1,5 ml.

De seguida, de forma a ajustar as condições de ligação do ARN à membrana de sílica, adicionou-se 350 µl de etanol a 70%, misturou-se bem e transferiu-se todo o conteúdo para uma coluna de purificação. Centrifugou-se durante 30 segundos a 8.000 xg.

Após ligação do ARN à membrana, adicionou-se a cada coluna 350 µl do tampão MDB (*Membrane Desalting Buffer*) (kit *Illustra™*) e centrifugou-se durante 1 minuto a 11.000 xg. Este passo permitiu a remoção dos sais possibilitando uma digestão mais eficaz com a DNase. Seguidamente adicionou-se 95 µl de solução com DNase (kit *Illustra™*) a cada uma das amostras e incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. Este passo permitiu a eliminação do ADN residual, evitando a contaminação das amostras de ARN com ADN.

Após a incubação procedeu-se à lavagem da membrana de sílica. Numa primeira lavagem adicionou-se 200 µl de tampão de lavagem RA2 (kit *Illustra™*), de seguida, numa segunda lavagem, adicionou-se 600 µl de tampão de lavagem RA3 (kit *Illustra™*), e por fim adicionou-se 250 µl deste mesmo tampão de lavagem RA3 (kit *Illustra™*) a cada coluna. Entre cada uma das lavagens as colunas foram centrifugadas durante 1 minuto a 11.000 xg, excepto na última lavagem que o tempo de centrifugação foi de 3 minutos de forma a remover todo o líquido residual.

Por fim, adicionou-se a cada coluna 100 µl de água (kit *Illustra™*) para eluir o ARN, e centrifugou-se durante 1 minuto a 11.000 xg. Todo o conteúdo recolhido foi guardado a -20°C num tubo de rosca próprio para guardar ácidos nucleicos.

2.3.3 Quantificação de ácidos nucleicos

Posteriormente, as amostras de ADN e ARN genómico foram quantificadas, para saber qual a concentração e grau de pureza do material genético de cada uma delas. Estes parâmetros são determinados por ensaio espectrofotométrico, utilizando um espectrofotómetro (**NanoDrop® ND-1000**) no qual a concentração de ADN é determinada de acordo com a Lei de Lambert-Beer [$C = (Abs \times e) / b$], onde C corresponde à concentração de ADN em ng/µl, Abs a absorvância (260 nm e 280 nm que correspondem ao pico de absorção de ultravioleta para o ADN e ARN, respectivamente), e o coeficiente de extinção molar, e b a altura da coluna criada no espectrofotómetro]. Por outro lado, o grau de pureza é determinado através da razão entre as densidades ópticas avaliadas no comprimento de onda de 260 nm e de 280 nm, sendo que o grau de pureza ideal para o ADN é de 1,8, enquanto para o ARN é de 2,0.

Assim, a quantificação das amostras de ADN e de ARN foi medida na zona dos ultravioletas a 260 nm e 280 nm, respectivamente. Para tal, utilizou-se um volume de 2 µl de amostra para a medição e ainda o respectivo tampão de eluição para fazer a medição do branco, que nos serviu de referência.

2.4 Análise genotípica de variantes polimórficas em genes do cromossoma 21

A genotipagem das variantes polimórficas 844ins68/T833C do gene *CBS*, A251G do gene *SOD1*, A80G do gene *RFC1* e A1298C do gene *MTHFR* foi realizada pelo método de *Restriction Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction* (RFLP-PCR), descrito por Weisberg *et al.* (1998).

Para o gene *SOD1*, que codifica a enzima Cu/Zn Superóxido Dismutase (Cu/Zn SOD), foi analisada a variante polimórfica A251G, enquanto para o gene *CBS*, que codifica a enzima Cistationina-β-Sintetase (CBS), foram

analisadas a variante polimórfica 844ins68 e a mutação T833C. Em relação ao gene *RFC1*, que codifica um receptor do folato reduzido (RFC), a variante polimórfica analisada foi A80G. Para o gene *MTHFR*, que codifica uma enzima chave envolvida no metabolismo do folato, foi analisado o polimorfismo A1298C.

Assim, para a genotipagem das diferentes variantes polimórficas foram utilizadas 100 ng de ADN genómico de cada amostra, obtido através do método referido em 2.3.1. De seguida, procedeu-se à amplificação do ADN, sendo necessário um *primer forward* (F) e um *primer reverse* (R), referenciados na Tabela 1, ambos a uma concentração final de 0,25 µM, DNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) a 0,2 mM, MgCl a 3 mM (5 mM no caso do gene *CBS*), e 1 U de Supreme NZYTaQ DNA polymerase (NZYTech). A *Polimerase Chain Reaction* (PCR) foi realizada num termociclador MyCycler (BioRad) e começou por uma desnaturação inicial de 15 minutos a uma temperatura de 95°C, seguiram-se 35 ciclos que incluem a desnaturação a 95°C durante 1 minuto, o emparelhamento, cuja temperatura para cada gene se encontram referidas na Tabela 1, e a extensão a 72°C durante 1 minuto. Por fim realizou-se uma fase de extensão final a 72°C durante 10 minutos.

Tabela 1- Análise dos polimorfismos dos genes *SOD1*, *RFC1*, *CBS* e *MTHFR*, respectivos *primers*, temperaturas de emparelhamento e enzimas de restrição.

	<i>Primers</i>	Temperatura de emparelhamento	Enzima de restrição
<i>SOD1</i> (A251G)	F: 5'-AGTACTGTCAACCACTAGCA-3' R: 5'-CCAGTGTGCGGCCAATGATG-3'	60°C (50 segundos)	<i>MspI</i> (8h, 37°C)
<i>RFC1</i> (A80G)	F: 5'-AGTGTCACCTTCGTCCCCTC-3' R: 5'-CTCCCGCGTGAAGTTCTT-3'	58°C (30 segundos)	<i>CfoI</i> (8h, 37°C)
<i>CBS</i> (844ins68 e T833C)	F: 5'ATAGAATATCGAGGCATGTCCGGCG-3' R: 5'TGGGGCCAGGGTCAGCCAGGCTCC-3'	65°C (1 minuto)	<i>BsrI</i> (5h, 65°C)
<i>MTHFR</i> (A1298C)	F: 5'-GGGAGGAGCTGACCAGTGCAG-3' R: 5'-GGGGTCAGGCCAGGGGCAG-3'	55°C (30 segundos)	<i>Fnu4HI</i> (8h, 37°C)

F, primer forward e *R*, primer reverse.

Após a amplificação do fragmento de interesse que contém o local polimórfico, procedeu-se à digestão enzimática, utilizando uma endonuclease de restrição específica (Tabela 1). Posteriormente, os produtos digeridos foram observados num gel de agarose a 2% ou a 5% corado com brometo de etídeo e analisados na presença de um marcador de pesos moleculares de 100 pb (NZYTech).

De modo a despistar possíveis contaminações na mistura de reacção, para além das reacções com ADN genómico extraído dos fetos com SD e dos controlos, foi feita uma reacção sem ADN genómico em simultâneo.

Os produtos da digestão foram observados no gel, fotografados e analisados. A identificação do genótipo foi feita através da análise do padrão de bandas observado que se encontra nas Tabelas 2.1 e 2.2.

Tabela 2.1- Representação dos possíveis padrões de bandas observados para o gene CBS, antes e após a digestão enzimática, permitindo a determinação do genótipo.

		PCR antes da digestão enzimática	
		Com inserção (350 pb)	Sem inserção (282 pb)
PCR após digestão enzimática	T833C wt	325 pb 25 pb (não existe naturalmente)	257 pb 25 pb
	T833C var.	248 pb 77 pb 25 pb	180 pb 77 pb 25 pb

Tabela 2.2- Representação dos possíveis padrões de bandas observados após a digestão enzimática para os genes *SOD1*, *RFC1* e *MTHFR* permitindo a determinação do genótipo.

			PCR após digestão enzimática
<i>SOD1</i>	A250G	AA	570 pb
		AG	570 pb + 369 pb + 201 pb
		GG	369 pb + 201 pb
<i>RFC1</i>	A80G	AA	162 pb + 68 pb
		AG	162pb + 125 pb + 68 pb + 37 pb
		GG	125 pb + 68 pb + 37 pb
<i>MTHFR</i>	A1298C	AA	119 pb + 19 pb
		AC	138 pb + 119 pb + 19 pb
		CC	138 pb

2.5 Estudo do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *MGMT* e *DAPK* envolvidos no desenvolvimento de leucemias

Para o estudo do perfil de metilação de determinados genes envolvidos no desenvolvimento de leucemias nomeadamente, dos genes *p15*, *p16*, *MGMT* e *DAPK*, foi utilizada a técnica de *Methylation-Specific PCR* (MSP) descrita por Herman *et al.*, (1996). Este estudo foi realizado através do uso do kit EpiTect® Bisulfite (QIAGEN).

Numa etapa inicial modificou-se o ADN genómico com bissulfito de sódio. Para tal preparou-se uma mistura com 20 µl de ADN, 85 µl da mistura de bissulfito e 35 µl de tampão protector do ADN (kit *EpiTect*®). Este tampão protector do ADN possui um indicador de pH, que confirma o correcto pH para a conversão das citosinas. A incubação do ADN com bissulfito de sódio permite a conversão das citosinas não metiladas em uracilos, deixando as citosinas metiladas inalteradas. Assim, o tratamento com bissulfito resulta em sequências de ADN diferentes, consoante se trate de ADN metilado (M) ou não metilado (U).

A conversão com o bissulfito de sódio foi feita no termociclador MyCycler (BioRad) seguindo um programa que consistiu numa série de incubações necessárias para a desnaturação do ADN e subsequente sulfonação e desaminação das citosinas.

Após a modificação, fez-se a limpeza do ADN de forma a remover o excesso de bissulfito. Começou-se por adicionar a cada amostra 560 µl de tampão BL (kit *EpiTect*®), que permitiu uma melhor ligação do ADN modificado à membrana da coluna de purificação. De seguida, transferiu-se todo o conteúdo de cada amostra para uma coluna de purificação e centrifugou-se durante 1 minuto à velocidade máxima. Adicionou-se 500 µl de tampão de lavagem BW (kit *EpiTect*®) e centrifugou-se durante 1 minuto à velocidade máxima. Após a centrifugação, adicionou-se 500 µl de tampão de dessulfonação BD (kit *EpiTect*®), incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugou-se durante 1 minuto à velocidade máxima. De seguida, fizeram-se duas lavagens consecutivas, nas quais se adicionou 500 µl de tampão de lavagem BW (kit *EpiTect*®) a cada coluna e se centrifugou durante 1 minuto à velocidade máxima. Seguidamente, incubaram-se as colunas durante 5 minutos a 56°C com as tampas abertas de forma a evaporar todos os líquidos residuais. Por fim, adicionou-se 20 µl de tampão de eluição (kit *EpiTect*®), centrifugou-se durante 1 minuto a 15.000 xg e guardou-se o ADN modificado em tubos devidamente identificados.

Numa terceira etapa, utilizou-se o ADN modificado para a realização da MSP. Assim, procedeu-se à amplificação do ADN, sendo necessário *primers* para as regiões metiladas e para as regiões não metiladas, ambos a uma concentração final de 0,25 µM, DNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) a 0,2 mM, MgCl a 5 e 7 mM e 1 U de Supreme NZYTaQ DNA polymerase (NZYTech). A MSP foi realizada num termociclador MyCycler (BioRad). Começou por uma desnaturação inicial de 5 minutos a uma temperatura de 95°C. De seguida, realizaram-se 35 ciclos que incluem a desnaturação a 95°C durante 45 segundos, o emparelhamento, no qual as temperaturas variaram e as quais se encontram referidas na tabela 3, e a extensão a 72°C durante 30 segundos. Por fim, seguiu-se uma fase de extensão final a 72°C durante 5 minutos.

Tabela 3- Primers, temperaturas de emparelhamento e tamanho dos produtos de PCR dos genes *p16*, *DAPK*, *p15* e *MGMT*.

		<i>Primers</i>	Temperatura de emparelhamento	Tamanho do produto
<i>p16</i>	U	F: 5'- TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' R: 5'- CCACCTAAATCAACCTCCAACCA-3'	60°C	234 pb
	M	F: 5'- TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3' R: 5'- CCACCTAAATCGACCTCCGACCG-3'	65°C	234 pb
<i>DAPK</i>	U	F: 5'- GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT-3' R: 5'- CAAATCCCTCCCAAACACCAA-3'	60°C	106 pb
	M	F: 5'- GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3' R: 5'- CCCTCCCAAACGCCGA-3'	60°C	100 pb
<i>p15</i>	M	F: 5'-GCGTTCGTATTTTGC GGTT-3' R: 5'-CGTACAATAACCGAACGACCGA-3'	60°C	148 pb
<i>MGMT</i>	M	F: 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3' R: 5'-GCACTCTCCGAAAACGAAACG-3'	66°C	81 pb

M-metilado;U-não metilado; pb-pares de bases

Por fim, a análise dos resultados foi feita através da visualização dos produtos de PCR num gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, e analisados na presença de um marcador de pesos moleculares 100 pb (NZYTech). De forma a despistar qualquer contaminação utilizaram-se controlos para as zonas metiladas, como controlos para as zonas não metiladas.

Assim, consoante a amplificação das regiões metiladas ou não metiladas foi possível identificar o perfil de metilação de cada um dos genes estudados (controlos universais Epitex).

2.6 Análise dos níveis de expressão dos genes *CBS*, *SOD1*, *RUNX1* e *ETS2*

De forma a avaliar os níveis de expressão dos genes localizados no cromossoma 21, *CBS*, *SOD1*, *RUNX1* e *ETS2*, em fetos com SD, utilizou-se a técnica RT-PCR em tempo real que permite fazer uma análise qualitativa (se há ou não expressão de um gene), assim como quantitativa, permitindo

determinar com elevada precisão e sensibilidade o número de cópias de cada um dos genes.

Numa primeira etapa converteu-se o ARN em cADN. Assim, 100 ng de ARN de cada amostra, extraído como descrito em 2.3.2, foi incubado com DNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) a uma concentração final de 0,5 mM cada, *primers* de oligonucleótidos e hexâmeros aleatórios a uma concentração de 1 μ M, 10 U de inibidores de RNases e 4 U de transcriptase reversa por reacção, de acordo com o Kit Omniscript® Reverse Transcription (QIAGEN). A conversão foi feita num termociclador MyCycler (BioRad) durante 60 minutos a 37°C.

De seguida, o cADN de cada uma das amostras foi amplificado e quantificado através do uso de *primers forward* e *reverse*, referidos na Tabela 4, a uma concentração de 200 nM, juntamente com uma mistura de reacção que incluía os DNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) e o SYBR® Green, um fluoróforo que se incorpora na dupla cadeia de ADN. O SYBR® Green emite pouca fluorescência quando se encontra livre em solução, contudo o sinal fluorescente aumenta bastante quando este se liga à dupla cadeia de ADN, sendo proporcional à quantidade de ADN de cadeia dupla presente. Assim, o sinal aumenta à medida que o gene alvo é amplificado, permitindo a quantificação e registo dos produtos amplificados ao longo da reacção. O número de ciclos da PCR é representado graficamente no eixo do X e a fluorescência no eixo do Y, sendo proporcional à quantidade de produto amplificado. Isto permite obter uma curva com uma primeira fase inicial exponencial, e uma segunda fase em *plateau*. Na fase exponencial, a quantidade de produto amplificado duplica aproximadamente em cada ciclo; na fase final, a carência de reagentes começa a interferir com eficiência da reacção. No início a fluorescência é escassa. O número do ciclo da PCR para o qual a fluorescência ultrapassa a linha base é denominado “*threshold cycle*” (C_T), e, quando avaliado na fase exponencial da curva, é proporcional à quantidade inicial das moléculas alvo. Quanto menor o C_T , maior o número de moléculas alvo inicial.

A RT-PCR em tempo real foi realizada no termociclador *iQ™ 5 Multicolor Real-Time PCR* (BioRad). Num primeiro ciclo temos uma desnaturação inicial a 95°C durante 30 segundos, de seguida, num segundo ciclo, que se repetiu 40 vezes, houve um período de desnaturação a 95°C durante 5 segundos e um período de emparelhamento a 60°C durante 10 segundos. Por fim, seguiu-se um último ciclo, a 55°C durante 10 segundos. Para além dos genes de interesse, foram também quantificados os genes da beta glucuronidase (*GUS*) e do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), que servem de controlos endógenos, e as amostras foram feitas em duplicado de forma a ter duas réplicas de cada uma delas. Por outro lado, é necessário a presença de um branco, que corresponde a uma mistura de reacção sem cADN, permitindo o despiste de contaminações da mistura de reacção. É também elaborada uma recta padrão, que é obtida através de sucessivas diluições de um *standard*, e que permite determinar a eficiência da reacção, sendo esta calculada pelo declive da recta e deverá apresentar valores entre os 90% e os 105%, garantindo assim uma análise fidedigna dos resultados.

Tabela 4- Genes e respectivos *primers* usados na RT-PCR em tempo real.

	<i>Primers</i>
<i>CBS</i>	F: 5' – GTTGGCAAAGTCATCTACAAGCA – 3' R: 5' – GGGCGAAGTGGTCCATCTC – 3'
<i>SOD1</i>	F: 5' – GGCAAAGGTGGAAATGAA – 3' R: 5' – AGCAGGATAACAGATGAGT – 3'
<i>RUNX1</i>	F: 5' – GATACAAGGCAGATCCAACCAT – 3' R: 5' – GCACAGAAGGAGAGGCAATG – 3'
<i>EST2</i>	F: 5' – AATCCTGCCAGTCATTCA – 3' R: 5' – GCTTCTCGTAGTTCATCTTG – 3'
<i>GUS</i>	F: 5' – CAGGTGATGGAAGAAGTG – 3' R: 5' – AAGTAGTAGCCAGCAGAT – 3'

Os resultados da expressão génica são normalmente avaliados por quantificação relativa, através do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ que se baseia na normalização dos resultados por comparação com a quantificação da expressão de um gene constitutivamente expresso (controlo endógeno) e independentemente das condições experimentais (Livak *et al.*, 2001). Contudo este método é apenas válido quando a eficiência de amplificação dos genes alvo e genes de referência são semelhantes. Caso contrário, é usada uma fórmula alternativa

que entra em conta com a eficiência, e que determina a razão da variação da expressão entre o gene alvo e o gene de referência, em relação ao controlo. A fórmula aplicada neste caso é:

$$R = E_{(\text{gene alvo SD})}^{\Delta CT} / E_{(\text{gene alvo controlo})}^{\Delta CT}$$

em que,

$$\Delta C_T = C_{T(\text{gene alvo})} - C_{T(\text{gene referência})}$$

A aplicação desta fórmula permite uma análise fidedigna dos resultados quando as eficiências não são semelhantes.

2.7 Análise estatística dos resultados

Para a análise estatística dos resultados referentes à prevalência das variantes polimórficas utilizou-se o teste do χ^2 na determinação do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o teste exacto de Fisher na análise do risco relativo (Odd's ratio – OD). Em todos os testes utilizados considerou-se um nível de significância estatística a 95% ($p < 0.05$).

Capítulo 3. Resultados

3.1 Confirmação da trissomia 21 nos fetos

Numa primeira etapa foi identificada nas amostras de fibroblastos de fetos, provenientes de LA ou de CVS usados neste estudo, a trissomia 21 através da técnica de Bandagem GTG. Na Figura 12 pode observar-se um cariótipo normal (Figura 12.A) e um cariótipo de um dos fetos com trissomia 21 livre (Figura 12.B).

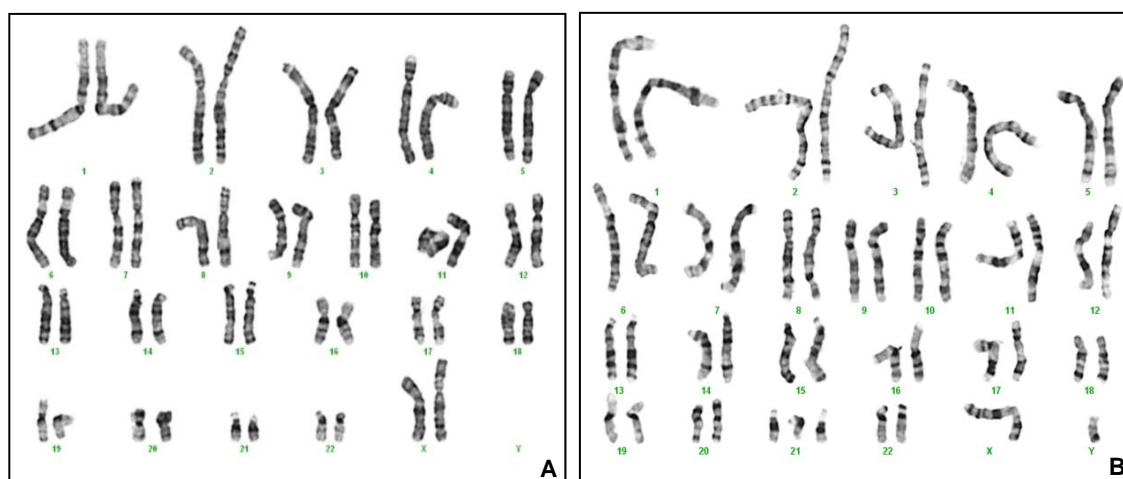


Figura 12 – Cariótipo normal (A) e cariótipo com trissomia 21 (B) em feto com Síndrome de Down.

3.2 Caracterização genotípica das variantes polimórficas dos genes *CBS*, *SOD1*, *RFC1* e *MTHFR* em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo

De forma a verificar se existe alguma relação a nível genético entre as variantes polimórficas de determinados genes do cromossoma 21 envolvidos no metabolismo do folato e habitualmente relacionados na literatura com leucemias, e o desenvolvimento de SD, caracterizou-se genotipicamente 31 amostras de ADN de fibroblastos de fetos com SD e 30 amostras de sangue periférico de indivíduos controlo saudáveis. Assim, foram analisados os polimorfismos 844ins68 e T833C do gene *CBS*, A251G do gene *SOD1*, A80G do gene *RFC1* e A1298C do gene *MTHFR*.

3.2.1 Caracterização genotípica das variantes polimórficas 844ins68 e T833C no gene *CBS* em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controle

A análise genotípica do ADN de fetos com SD e de indivíduos controle saudáveis para o polimorfismo 844ins68 do gene *CBS* foi obtida por PCR, na qual o fragmento de interesse foi amplificado. A Figura 13 representa o gel de agarose corado com brometo de etídeo no qual se observou a presença da inserção representada pela banda de 350 pb. No entanto, como podemos observar nas colunas 7, 8 (Figura 13-A), de indivíduos controle, e 4, 7 (Figura 13-B) de fetos com SD, a inserção está em heterozigotia, uma vez que se identifica um fragmento de 282 pb e outro de 350 pb. Por outro lado, o genótipo com a inserção em homozigotia apenas foi identificada numa amostra de um indivíduo controle, representado pela coluna 9 na Figura 13-A, onde se visualiza apenas um fragmento de 350 pb.

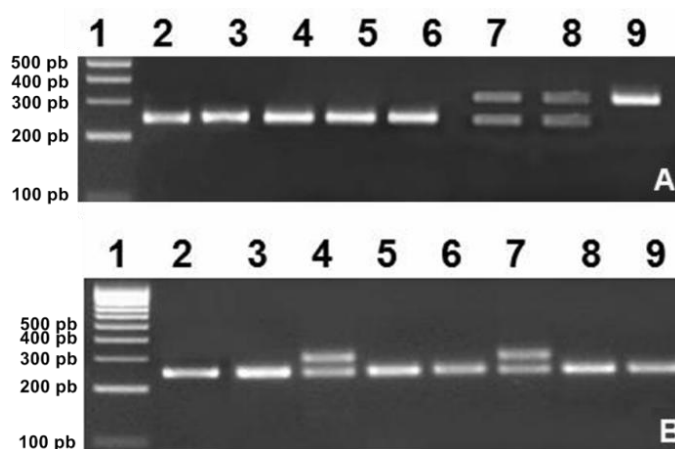


Figura 13 - Identificação da variante polimórfica 844ins68 do gene *CBS* em indivíduos controle (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) por PCR-RFLP. A sequência de interesse do gene *CBS* foi amplificada por PCR e sujeita a electroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, como descrito no material e métodos. A coluna 1 (A) e (B) corresponde ao marcador de pesos moleculares de 100 pb. As colunas 2, 3, 4, 5, 6 (A) e 2, 3, 5, 6, 8, 9 (B) mostram um fragmento de ADN com 282 pb, que representa o genótipo sem inserção enquanto as colunas 7, 8 (A) e 4, 7 (B) mostram um fragmento de 282 pb e outro de 350 pb, que representam o

genótipo com a inserção (heterozigótico). A coluna 9 (A) mostra um fragmento de 350 pb que corresponde ao genótipo com a inserção (homozigótico).

Para a análise genotípica da variante polimórfica T833C do gene *CBS*, nas mesmas amostras, o produto de PCR anterior foi sujeito a digestão enzimática com a enzima de restrição *BsrI*, obtendo-se um padrão de bandas específico (Tabela 5) que foi observado em gel de agarose corado com brometo de etídeo, como representado na Figura 14.

Como podemos observar os indivíduos controlo das colunas 7, 8, 9 (Figura 14-A) assim como os doentes 4, 7 com SD (Figura 14-B) mostram fragmentos de 350 pb, 282 pb, 248 pb, 77 pb e 25 pb, que representam o genótipo com a inserção (844ins68) e a variante T833C.

Tabela 5 - Caracterização das variantes polimórficas 844ins68 e T833C (co-segregada em *cis*) no gene *CBS* através do padrão de bandas obtido após digestão enzimática com a enzima *BsrI*

		PCR digerido	
		T833C wt	T833C var.
PCR não digerido	Com inserção (350 pb)	325 pb 25 pb (não existe naturalmente)	248 pb 77 pb 25 pb
	Sem inserção (282 pb)	257 pb 25 pb	180 pb 77 pb 25 pb

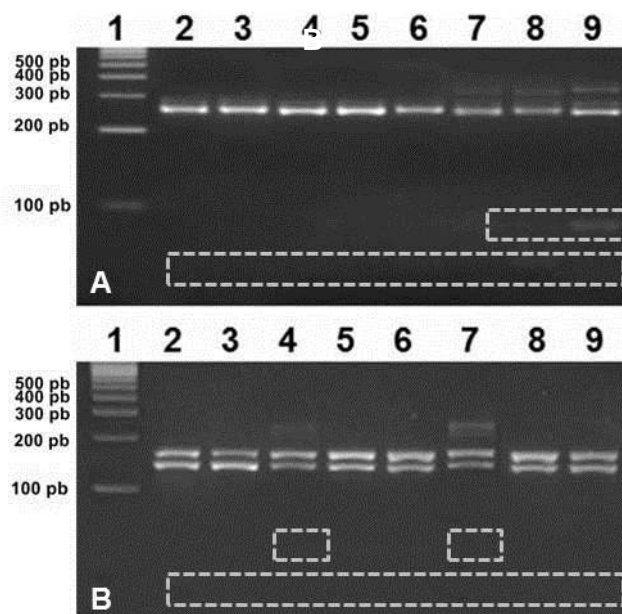


Figura 14 - Identificação da variante polimórfica T833C do gene CBS em indivíduos controlo (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) através de PCR-RFLP. A sequência do gene CBS foi amplificada por PCR, digerida pela enzima de restrição *BsrI* e sujeita a electroforese em gel de agarose a 5% corado com brometo de etídeo, como descrito na secção referente ao material e métodos. A coluna 1 (A) e (B) corresponde ao marcador de pesos moleculares de 100 pb. As colunas 2, 3, 4, 5, 6 (A) e 2, 3, 5, 6, 8, 9 (B) mostram fragmentos de ADN com 282 pb, 257 pb e 25 pb que representa o genótipo sem inserção e *wild type* para T833C. As colunas 7, 8, 9 (A) e 4, 7 (B) mostram fragmentos de 350 pb, 282 pb, 248 pb, 77 pb e 25 pb representando o genótipo com inserção (844ins68) e com a variante T833C.

Para verificar a frequência dos diferentes genótipos na população de fetos com SD relativamente à população saudável, avaliaram-se as frequências alélica e genotípica nas duas populações em estudo. A Tabela 6 representa a distribuição das frequências alélica e genotípica dos polimorfismos 844ins68 e T833C do gene da CBS nos fetos com SD e nos indivíduos saudáveis estudados (controlos).

Da análise da frequência genotípica das variantes polimórficas do gene CBS não se observou a presença do genótipo com inserção e *wild type* para T833C (0%), assim como do genótipo sem inserção e com a variante para T833C (0%), em nenhuma das populações. Por outro lado, observou-se um ligeiro aumento da frequência do genótipo sem inserção e *wild type* para

T833C na população saudável (83%) relativamente à população com SD (81%). Para além disto, em relação ao genótipo com inserção e com a variante T833C observou-se uma frequência de 17% na população saudável e de 19% na população com SD (Tabela 6). Quando se analisou a frequência alélica, observou-se em ambas as populações uma maior frequência do alelo sem inserção, o qual está presente numa frequência de 90%. As frequências genótípicas observadas apresentam desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população controlo.

Tabela 6 - Distribuição da frequência genotípica e alélica dos polimorfismos 844ins68 e T833C do gene CBS em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo

Gene: CBS				
Genótipos				
	Com inserção (844ins68)		Sem inserção	
	wt T833C n (%)	var. T833C n (%)	wt T833C n (%)	var. T833C n (%)
Controlo	0 (0%)	5 (17%)	25 (83%)	0 (0%)
SD	0 (0%)	6 (19%)	25 (81%)	0 (0%)
Alelos				
	844ins68		Sem inserção	
Controlo e SD	6 (10%)		54 (90%)	

Para analisar se a presença da variante polimórfica 844ins68 (co-segregada em *cis* com o polimorfismo T833C) do gene CBS se correlaciona com o risco para desenvolver SD, procedeu-se à avaliação do risco associado (Odd's ratio), utilizando o teste exacto de Fisher.

Como se pode observar na Tabela 7, o genótipo com inserção poderá ser um factor de risco para a SD uma vez que os indivíduos com inserção apresentam um risco aumentado de 1,6x de possuir trissomia 21 relativamente aos indivíduos sem inserção. Por outro lado, o genótipo sem inserção poderá

ser um factor protector no desenvolvimento de SD. Contudo, estes resultados não apresentam significado estatístico ($p > 0.05$).

Tabela 7 - Avaliação do risco associado ao polimorfismo 844ins68 (co-segregado em *cis* com T833C) no gene CBS na Síndrome de Down.

Genótipo	Controlo n (%)	SD n (%)	Odd's ratio (IC 95%)	<i>p</i>
Com inserção	5 (16%)	6 (19%)	1.560 (0.3927 – 6.198)	0.7351
Sem inserção	25 (84%)	25 (81%)	0.8333 (0.2248 – 3.089)	1.0000
Alelo				
Com inserção	6 (10%)	6 (10%)	1.037 (0.3149 – 3.416)	1.0000
Sem inserção	56 (90%)	54 (90%)	0.9643 (0.2928 – 3.176)	1.0000

3.2.2 Caracterização genotípica da variante polimórfica A251G no gene SOD1 em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo

Para a análise genotípica da variante polimórfica A251G do gene *SOD1* no ADN de fetos com SD e de indivíduos controlo, foi feita uma digestão enzimática através da enzima de restrição *MspI*, obtendo-se um padrão de bandas característico para cada genótipo. Assim, após digestão da sequência do gene *SOD1*, foi observado em gel de agarose, corado com brometo de etídeo, o seguinte padrão de bandas: para o genótipo AA (*wild type*) observou-se uma banda com 570 pb; para o genótipo AG (heterozigótico) observaram-se três bandas com 570 pb, 369 pb e 201 pb; para o genótipo GG (homozigótico) observaram-se duas bandas com 369 pb e 201 pb, como representado na Figura 15.

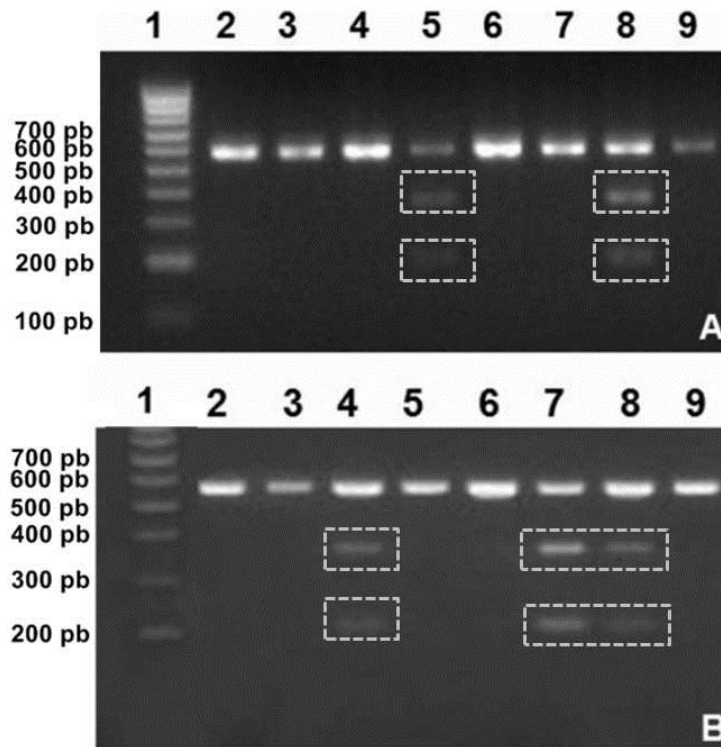


Figura 15 - Identificação da variante polimórfica A251G do gene *SOD1* em indivíduos controlo (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) através de PCR-RFLP. A sequência do gene *SOD1* foi amplificada por PCR, digerida pela enzima de restrição *MspI* e sujeita a electroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, como referido na secção material e métodos. A coluna 1 (A) e (B) corresponde ao marcador de pesos moleculares de 100 pb. As colunas 2, 3, 4, 6, 7, 9 (A) e 2, 3, 5, 6, 9 (B) exibem um fragmento de ADN com 570 pb, que representa o genótipo AA e as colunas 5, 8 (A) e 4, 7, 8 (B) exibem fragmentos de 570 pb, 369 pb e 201 pb representando o genótipo AG.

De forma a verificar a frequência dos alelos A e G, assim como a dos diferentes genótipos na população de fetos com SD relativamente à população saudável, avaliaram-se as frequências alélicas e genotípicas das duas populações. A Tabela 8 representa a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo A251G do gene *SOD1* nos fetos com SD e nos controlos saudáveis estudados.

Da análise da frequência genotípica observou-se ausência do genótipo GG (0%) tanto na população de fetos com SD como na população saudável. Por outro lado, verificou-se que 17% da população controlo é portadora do genótipo AG e 83% do genótipo AA, enquanto 20% da população de fetos com SD é portadora do genótipo AG e 80% do genótipo AA (Tabela 8).

Da análise da frequência alélica observou-se, tanto na população de fetos com SD como na população saudável, uma maior frequência do alelo A, sendo a frequência na população saudável de 92% e na população de fetos com SD de 90%. O alelo G apresenta apenas uma frequência de 8% na população saudável e de 10% na população de fetos com SD (Tabela 8).

As frequências genóticas observadas não apresentam desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 8 - Distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos A251G do gene SOD1 em fetos com Síndrome de Down e em controlos saudáveis.

	Gene: SOD1				
	Alelos		Genótipos		
	A n (%)	G n (%)	AA n (%)	AG n (%)	GG n (%)
Controlo	55 (92%)	5 (8%)	25 (83%)	5 (17%)	0 (0%)
SD	56 (90%)	6 (10%)	25 (80%)	6 (20%)	0 (0%)

Para analisar se a presença da variante polimórfica de A251G do gene SOD1 se correlaciona com o risco para desenvolver SD, procedeu-se à avaliação do risco associado (Odd's ratio), utilizando o teste exacto de Fisher.

Como se pode observar na Tabela 9, o genótipo AA e o alelo A poderão ser factores protectores para o desenvolvimento de SD uma vez que apresentam um risco relativo de 0,833 e 0,8485, respectivamente. Por outro lado, o genótipo AG e o alelo G poderão ser factores de risco uma vez que os indivíduos com este genótipo apresentam 1,2x maior probabilidade de ocorrência de trissomia 21.

O genótipo GG não foi analisado porque este genótipo não foi observado em nenhuma das populações. Contudo, estes resultados não apresentam significado estatístico ($p > 0.05$).

Tabela 9 - Avaliação do risco associado ao polimorfismo A251G do gene *SOD1* na Síndrome de Down.

Genótipo	Controlo n (%)	SD n (%)	Odd's ratio (IC 95%)	<i>p</i>
AA	25 (85%)	25 (80%)	0.833 (0.2248 - 3.089)	1.0000
AG	5 (17%)	6 (20%)	1.20 (0.3237 - 4.448)	1.0000
GG	0 (0%)	0 (0%)	-	-
Alelo				
A	55 (92%)	56 (90%)	0.8485 (0.2445 - 2.944)	1.0000
G	5 (8%)	6 (10%)	1.179 (0.3397 - 4.089)	1.0000

3.2.3 Caracterização genotípica da variante polimórfica A80G no gene *RFC1* em fetos com Síndrome de Down e em indivíduos controlo

Neste estudo foi também efectuada a análise de frequência genotípica e alélica da variante polimórfica A80G do gene *RFC1* com recurso a digestão enzimática com a *CfoI*, obtendo-se um padrão de bandas que permite identificar os diferentes genótipos. Após a digestão da sequência de interesse do gene *RFC1*, observou-se num gel de agarose corado com brometo de etídeo, o seguinte padrão de bandas: para o genótipo AA (*wild type*) observaram-se duas bandas com 162 pb e 68 pb; para o genótipo AG (heterozigótico) observaram-se quatro bandas com 162 pb, 125 pb, 68 pb e 37 pb; para o genótipo GG (homozigótico) observaram-se três bandas com 125 pb, 68 pb e 37 pb (Figura 16).

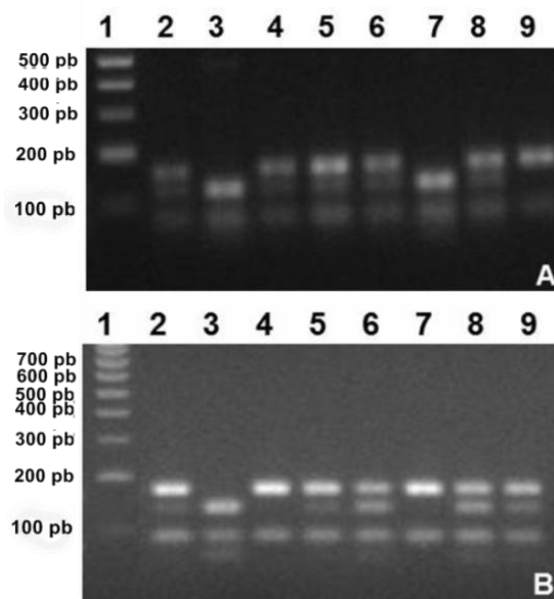


Figura 16 - Identificação da variante polimórfica A80G do gene *RFC1* em indivíduos controlo (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) através de PCR-RFLP. A sequência do gene do *RFC* foi amplificada por PCR, digerida pela enzima de restrição *CfoI* e sujeita a electroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, como descrito na secção de material e métodos. A coluna 1 (A) e (B) corresponde ao marcador de pesos moleculares de 100 pb. As colunas 9 (A) e 4, 7 (B) exibem fragmentos de ADN com 162 pb e 68 pb, que representa o genótipo AA; as colunas 2, 4, 5, 6, 8 (A) e 2, 5, 6, 8, 9 (B) mostram fragmentos de 162 pb, 125 pb, 68 pb e 37 pb representando o genótipo AG; as colunas 3, 7 (A) e 3 (B) exibem fragmentos de 125 pb, 68 pb e 37 pb representando o genótipo GG.

Para verificar a frequência dos alelos A e G na população de fetos com SD e na população saudável, avaliaram-se as frequências alélicas e genotípicas das duas populações. A Tabela 10 representa a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo A80G do gene *RFC1* nos fetos com SD e nos controlos saudáveis estudados

Da análise da frequência genotípica observou-se que 50% da população controlo é portadora do genótipo AG, 27% do genótipo AA e 23% do genótipo GG. Por outro lado, na população de fetos com SD, 52% da população é portadora do genótipo AG, 19% do genótipo AA e 29% do genótipo GG (Tabela 10).

Da análise da frequência alélica observou-se uma maior frequência do alelo A na população saudável (52%) e uma maior frequência do alelo G na

população de fetos com SD (55%). Na população saudável, o alelo G apresenta uma frequência de 48% enquanto na população de fetos com SD o alelo A apresenta uma frequência de 45% (Tabela 10).

As frequências genóticas observadas não apresentam desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 10 - Distribuição das frequências alélica e genotípica do polimorfismo A80G do RFC em fetos com Síndrome de Down e em controlos saudáveis.

Gene: <i>RFC1</i>					
	Alelos		Genótipos		
	A n (%)	G n (%)	AA n (%)	AG n (%)	GG n (%)
Controlo	31 (52%)	22 (48%)	8 (27%)	15 (50%)	7 (23%)
SD	28 (45%)	34 (55%)	6 (19%)	16 (52%)	9 (29%)

Para analisar se a presença da variante polimórfica A80G do gene *RFC1* se correlaciona com o risco de desenvolver SD, procedeu-se à avaliação do risco associado (Odd's ratio), utilizando o teste exacto de Fisher.

Como se pode observar na Tabela 11, a presença do genótipo AA e alelo A poderão ser factores protectores para o desenvolvimento de SD, uma vez que os indivíduos portadores deste genótipo ou alelo apresentam tendência para menor risco de ocorrência desta aneuploidia (AA: Odd's ratio = 0,6600; alelo A: Odd's ratio = 0,5844).

Por outro lado, o genótipo GG e alelo G poderão ser factores de risco para a ocorrência de trissomia 21 uma vez que apresentam um risco aumentado de aproximadamente 1,3x e 1,7x, respectivamente.

A presença do genótipo AG não parece estar associada ao desenvolvimento de SD (Odd's ratio de 1,067; IC95% 0,3907- 2,912). No entanto, os resultados não apresentam significado estatístico ($p > 0.05$).

Tabela 11 - Avaliação do risco associado ao polimorfismo A80G do gene *RFC1* na Síndrome de Down.

Genótipo	Controlo n (%)	SD n (%)	Odd's ratio (IC 95%)	<i>p</i>
AA	8 (27%)	6 (19%)	0.6600 (0.1980 – 2.200)	0.5541
AG	15 (50%)	16 (52%)	1.067 (0.3907 – 2.912)	1.0000
GG	7 (23%)	9 (29%)	1.344 (0.4265 – 4.237)	0.7723
Alelo				
A	31 (52%)	28 (45%)	0.5844 (0.2786 – 1.226)	0.1911
G	22 (48%)	34 (55%)	1.711 (0.8156 – 3.590)	0.1911

3.2.4 Caracterização genotípica da variante polimórfica A1298C no gene *MTHFR* em fetos com Síndrome de Down e indivíduos controlo

De forma a realizar a análise genotípica do ADN de fetos com SD e de indivíduos controlo para a variante polimórfica A1298C do gene *MTHFR* foi feita uma digestão através da enzima de restrição *Fnu4HI*, obtendo-se um padrão de bandas característico de cada genótipo. Após a digestão da sequência de interesse do gene *MTHFR*, observou-se em gel de agarose corado com brometo de etídeo, o seguinte padrão de bandas: para o genótipo AA (*wild type*) observaram-se duas bandas com 119 pb e 19 pb; para o genótipo AC (heterozigótico) observaram-se três bandas com 138 pb, 119 pb e 19 pb; para o genótipo CC (homozigótico) observou-se uma banda com 138 pb (Figura 17).

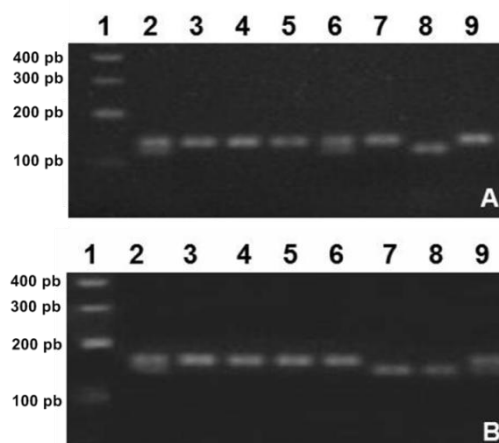


Figura 17 - Identificação da variante polimórfica A1298C do gene *MTHFR* em indivíduo controlo (A) e em fetos com Síndrome de Down (B) através de PCR-RFLP. A sequência de interesse do gene da *MTHFR* foi amplificada por PCR, digerida pela enzima de restrição *Fnu4HI* e sujeita a electroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, como descrito no material e métodos. A coluna 1 (A) e (B) corresponde ao marcador de pesos moleculares de 100 pb. As colunas 8 (A) e 7, 8 (B) mostram fragmentos de ADN com 119 pb e 19 pb, que representa o genótipo AA; as colunas 2, 6 (A) e 2, 9 (B) mostram fragmentos de 138 pb, 119 pb e 19 pb representando o genótipo AC; as colunas 3, 4, 5, 7, 9 (A) e 3, 4, 5, 6 (B) exibem um fragmento de 138 pb representando o genótipo CC.

De forma a analisar a frequência dos alelos A e C no gene da *MTHFR* na população de fetos com SD relativamente à população controlo saudável, avaliaram-se as frequências alélicas e genótípicas nas duas populações. A Tabela 12 representa a distribuição alélica e genotípica do polimorfismo A1298C do gene da *MTHFR* nos fetos com SD e nos controlos saudáveis estudados.

Da análise da frequência genotípica observou-se que 33% da população saudável é portadora do genótipo AC, 13% do genótipo AA e 53% do genótipo CC. Por outro lado, na população de fetos com SD, 42% da população é portadora do genótipo AC, 10% do genótipo AA e 48% do genótipo CC (Tabela 12). Assim, observa-se que os fetos com SD apresentam maior frequência do genótipo AC (42%) e menor frequência do genótipo CC (48%) relativamente aos controlos (AC: 33%; CC: 53%).

Da análise da frequência alélica observou-se tanto na população saudável como na população de fetos com SD uma maior frequência do alelo C, sendo de 70% na população saudável e de 69% na população com SD (Tabela 12).

As frequências genóticas observadas não apresentam desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 12 - Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo A1298 da MTHFR na população de fetos com Síndrome de Down e de controlos saudáveis.

	Gene: <i>MTHFR</i>				
	Alelos		Genótipos		
	A n (%)	C n (%)	AA n (%)	AC n (%)	CC n (%)
Controlo	18 (30%)	42 (70%)	4 (13%)	10 (33%)	16 (53%)
SD	19 (31%)	43 (69%)	3 (10%)	13 (42%)	15 (48%)

Para analisar se a presença da variante polimórfica A1298C do gene *MTHFR* se correlaciona com o risco para desenvolver SD, procedeu-se à avaliação do risco associado (Odd's ratio), utilizando o teste exacto de Fisher.

Da observação da Tabela 13 constatou-se que a presença dos genótipos AA e CC poderão ser factores protectores para o desenvolvimento da SD uma vez que apresentam risco relativo inferior a 1 (Odd's ratio: 0.6964 (0.1421 – 3.414); 0.8203 (0.3001 – 2.242), respectivamente). Por outro lado, o risco de ocorrência de trissomia 21 é de 1,4x superior nos indivíduos portadores do genótipo AC. Contudo, estes resultados não apresentam significado estatístico ($p > 0.05$), não havendo assim associação entre esta variante polimórfica e o desenvolvimento de SD, nesta população do estudo.

Tabela 13 - Avaliação do risco associado ao polimorfismo A1298C do gene da MTHFR na Síndrome de Down.

Genótipo	Controlo n (%)	SD n (%)	Odd's ratio (IC 95%)	<i>p</i>
AA	4 (13%)	3 (10%)	0.6964 (0.1421 – 3.414)	0.7072
AC	10 (33%)	13 (42%)	1.444 (0.5095 – 4.095)	0.5996
CC	16 (53%)	15 (48%)	0.8203 (0.3001 – 2.242)	0.7997
Alelo				
A	18 (30%)	19 (31%)	1.031 (0.4762 – 2.232)	1.0000
C	42 (70%)	43 (69%)	0.9699 (0.4480 – 2.100)	1.0000

3.3 Avaliação do perfil de metilação de genes *p16*, *DAPK*, *p15* e *MGMT* envolvidos na regulação do ciclo celular e na reparação do ADN,

Os genes *p16*, *DAPK*, *p15* e *MGMT* são genes supressores tumorais que codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular e na reparação do ADN, respectivamente. Estes genes estão frequentemente silenciados por hipermetilação em várias neoplasas hematológicas.

Assim, e uma vez que o perfil de metilação de um gene altera a sua expressão, avaliou-se o perfil de metilação dos genes *p16*, *DAPK*, *p15* e *MGMT* nos fetos com SD (Figuras 18 a 20) de modo a verificar se há alguma relação entre o perfil de metilação destes genes e a SD, que possa contribuir para a maior incidência de leucemias nestas crianças.

Este estudo apenas foi feito no ADN de fetos com SD, assumindo-se que, de acordo com o que está descrito na literatura, a população de indivíduos controlo saudáveis possui todos estes genes desmetilados.

Na Figura 18, observam-se resultados de uma amostra representativa de todas as amostras analisadas para o gene *p16* metilado (M) e não metilado (U) nos fetos com SD. Como podemos verificar todos os fetos com SD (100%) apresentam o gene *p16* desmetilado.

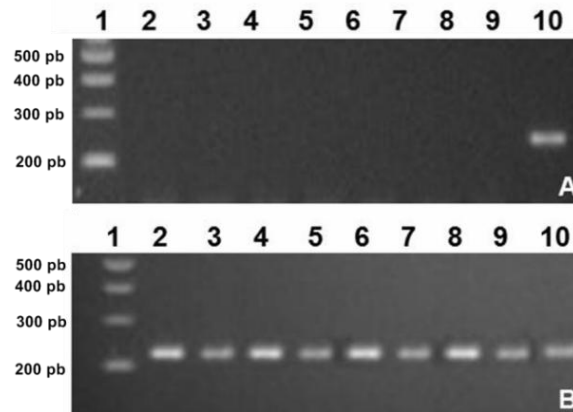


Figura 18 - Perfil de metilação do gene *p16* por *Methylation-Specific PCR*. Em (A) temos o gene *p16* metilado (M) e em (B) temos o gene *p16* desmetilado (U). A coluna 1 (A) e (B) corresponde ao marcador de pesos moleculares de 100 pb. Nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (A) observamos os resultados referentes à metilação do gene *p16* (sem bandas) e nas colunas 2,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (B) observamos uma banda de 234 pb correspondente ao gene *p16* não metilado. Na coluna 10 (A) e (B) observa-se uma banda de 234 pb que corresponde aos controlos metilado e não metilado em cada um dos casos (controlos positivos).

De igual modo, a análise do perfil de metilação do gene *DAPK* mostra que todos os fetos com SD (100%) apresentam este gene desmetilado (Figura 19).

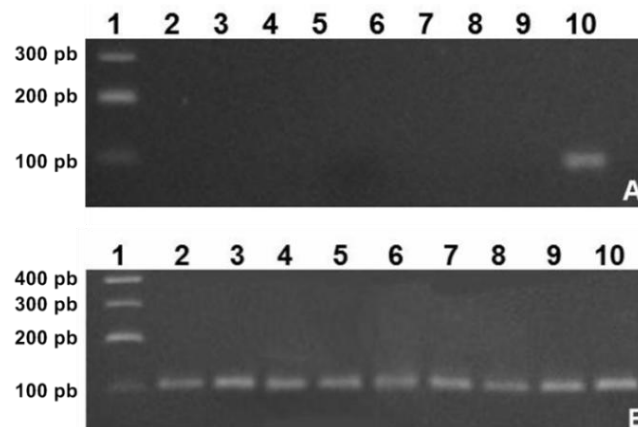


Figura 19 - Perfil de metilação do gene *DAPK* por *Methylation-Specific PCR*. Em (A) temos o gene *DAPK* M e em (B) *DAPK* U. A coluna 1 (A) e (B) corresponde ao marcador de pesos moleculares de 100 pb. Nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (A) observamos os resultados referentes à metilação do gene *DAPK* (sem bandas) e nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 (B) observamos uma banda de 106 pb correspondente ao

gene *DAPK U*. Na coluna 10 (A) e (B) observa-se uma banda de 100 pb e uma de 106 pb que corresponde aos controlos metilado e não metilado, respectivamente.

Tal como observado para os genes anteriores, os genes *p15* e *MGMT* encontram-se desmetilados em todos fetos com SD analisados (Figura 20).

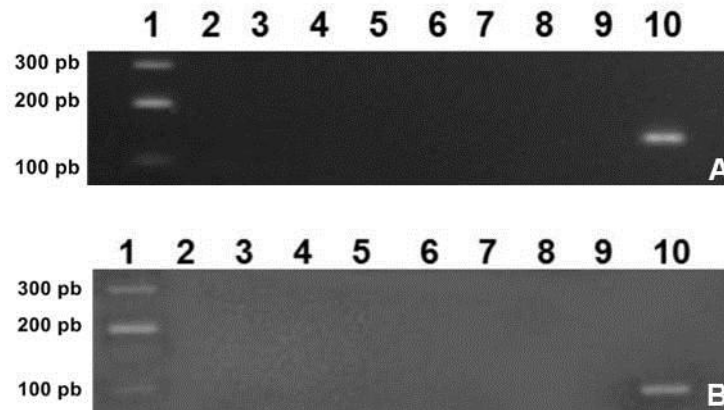


Figura 20 - Perfil de metilação do gene *p15* (A) e do gene *MGMT* (B) por *Methylation-Specific PCR*. Em (A) temos representado resultados referentes ao gene *p15* M. A coluna 1 corresponde ao marcador de pesos moleculares de 100 pb. Nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 observamos os resultados referentes à metilação do gene *p15* (sem bandas) e na coluna 10 observa-se uma banda de 148 pb referente ao controlo metilado. Em (B) temos representado resultados referentes ao gene *MGMT* M. A coluna 1 corresponde ao marcador de pesos moleculares de 100 pb. Nas colunas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 observamos os resultados referentes à metilação do gene *MGMT* (sem bandas) e na coluna 10 observa-se uma banda de 81 pb referente ao controlo metilado.

3.4 Avaliação dos níveis de expressão dos genes *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1* do cromossoma 21 por RT-PCR em tempo real

Os fetos com SD apresentam uma cópia extra do cromossoma 21, podendo esta ser responsável pela sobre-expressão de determinados genes presentes neste cromossoma, e que têm sido relacionados com o desenvolvimento de neoplasias hematológicas. Assim, foram analisados os

níveis de expressão dos genes presentes no cromossoma 21, *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1*, por RT-PCR em tempo real (q-RT-PCR) (Figura 21), e analisada a sua relação com o desenvolvimento de características fenotípicas e genotípicas na SD e a maior incidência de leucemias nestes doentes..

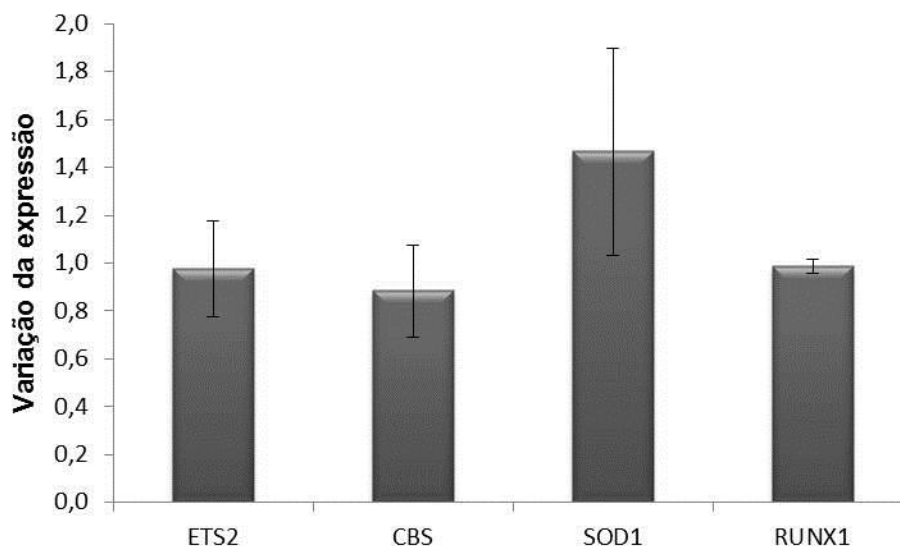


Figura 21 - Variação dos níveis de expressão dos genes *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1* em fetos com Síndrome de Down.

Da análise do gráfico da Figura 21, observa-se que o gene *SOD1* foi o que apresentou uma maior variação dos níveis de expressão em relação ao controlo, apresentando níveis de expressão cerca de 1,5x superior. Por sua vez, os genes *ETS2*, *CBS* e *RUNX1* apresentaram níveis de expressão próximos aos observados nos indivíduos controlo.

Capítulo 4. Discussão

4.1 Prevalência de variantes polimórficas na Síndrome de Down

O folato é uma vitamina que contribui para o crescimento e divisão celular, tendo uma particular importância durante a infância e a gravidez (Patterson, D., 2008). Nas células humanas, a deficiência em folato está associada à hipometilação do ADN, à sua instabilidade (quebras nas cadeias e incorporação de uracilos), a aneuploidias dos cromossomas 17 e 21, assim como à morte celular por apoptose e necrose. Deste modo, polimorfismos em genes que metabolizam o folato desempenham um papel importante na susceptibilidade a aneuploidias e, por conseguinte, a cancro, uma vez que podem levar ao aumento dos níveis de homocisteína e à diminuição dos níveis de folato, o que por sua vez pode afectar a meiose e a metilação do ADN (Pavarino *et al.*, 2011; Patterson, D., 2008).

Este estudo permitiu analisar a incidência de variantes polimórficas em genes envolvidos no metabolismo do folato, nomeadamente dos genes *CBS*, *SOD1*, *RFC1* e *MTHFR*, em fetos com SD, comparativamente a indivíduos controlo saudáveis, de forma a verificar a sua relação com o desenvolvimento de SD e sua eventual implicação na maior susceptibilidade a cancro nestes doentes.

A CBS participa no metabolismo da homocisteína, através da conversão da homocisteína em cistationina, tendo como co-factor o fosfato piridoxal (Figura 4) (Franco, R.F. *et al.*, 1998). Está também envolvida no metabolismo do folato onde promove a condensação de uma homocisteína com uma serina de forma a remover a homocisteína do ciclo da metionina (Pogribna *et al.*, 2001). Alterações no gene *CBS* podem levar a uma diminuição da actividade da enzima, resultando em hiperhomocisteínemia, a qual é reconhecida como um factor de risco para trombose venosa, doença vascular prematura aterosclerótica e defeitos no tubo neural. Por outro lado, estas alterações podem também levar a uma total inactivação desta enzima, que está associada à homocistinúria, uma doença metabólica recessiva adquirida à nascença (Franco, R.F. *et al.*, 1998; Coppedè, F., 2009).

O polimorfismo 844ins68 consiste numa inserção de 68 pb na região codificante do exão 8 do gene *CBS* e diz respeito a uma exacta duplicação da fronteira intrão/exão do exão 8. Esta variante polimórfica é co-segregada em

cis com um outro polimorfismo do gene *CBS*, T833C, que corresponde a uma transição de um T por um C no nucleótido 833, causando uma troca de aminoácidos, na qual uma tirosina (Thr) é substituída por uma isoleucina (Ile) (Franco, R.F. *et al.*, 1998).

Assim, o estudo de variantes polimórficas do gene *CBS*, em particular do polimorfismo 844ins68, pode permitir identificar relações com os aspectos fenotípicos da SD, incluindo o atraso mental, o aumento do risco para o desenvolvimento de leucemias agudas e o aumento da sensibilidade para a quimioterapia em doentes com SD e LMA (Taub, J.W., 2002).

Neste estudo, e de acordo com os resultados obtidos por outros autores (Taub, J. W., 2002), não se observou em nenhuma das populações controlo ou de fetos com SD, a variante polimórfica 844ins68 ou T833C isoladamente, confirmando que o polimorfismo T833C é co-segregado em *cis* com 844ins68. Por outro lado, tanto na população de indivíduos controlo (83%), como na população de fetos com SD (81%), o genótipo mais frequente foi o *wild type* para ambos os polimorfismos. O genótipo com as variantes 844ins68 e T833C observou-se com uma frequência de 17% e 19% na população controlo e na população de fetos com SD, respectivamente. Este genótipo, de acordo com o que está descrito, resgata a sequência *wild type* do gene da *CBS*, não resultando aparentemente numa falha de actividade da enzima. Isto acontece porque o polimorfismo T833C do gene *CBS* é neutralizado pelo polimorfismo 844ins68 uma vez que esta inserção cria um local de *splicing* alternativo (Franco, R.F. *et al.*, 1998; Romano, M. *et al.*, 2002).

Para além disso, observou-se que o alelo sem inserção apresentava uma frequência de 90% em ambas as populações em estudo, enquanto o alelo com inserção apresentava apenas uma frequência de 10%.

Em diversos estudos que avaliaram o polimorfismo 844ins68, observou-se que a inserção tanto em homozigotia como em heterozigotia, é considerada um factor de risco para a oclusão arterial (Jacob *et al.*, 2011). Por outro lado noutros estudos sugere-se que a inserção 844ins68 em heterozigotia pode ter um papel protector no cancro colo-rectal (Shannon, B. *et al.*, 2002), tendo sido identificada com maior frequência nestes doentes comparativamente aos controlos. Além disso, tem sido referido que também pode apresentar um papel protector para a hiperhomocisteinemia (Yakub, M. *et al.*, 2012). Neste estudo

verificou-se que o alelo com inserção assim como o genótipo com inserção poderão constituir factores de risco para o desenvolvimento de SD. Contudo, estes resultados não apresentam significado estatístico.

Noutro estudo, verificou-se que o alelo com a inserção possui uma baixa frequência em crianças com um quociente de inteligência (QI) elevado, quando comparado com o QI médio (Dutta, S. *et al.*, 2005) e que a presença da inserção no gene *CBS* resulta numa enzima com actividade aumentada, e isto está associada à diminuição dos níveis de homocisteína no plasma (Shannon, B. *et al.*, 2002).

Neste sentido verificamos que existem diversos estudos discordantes em relação aos efeitos bioquímicos do polimorfismo 844ins68 nos níveis de homocisteína (Taub, J.W., 2002). Uns autores demonstraram que os indivíduos portadores da inserção possuem níveis de homocisteína no plasma significativamente mais baixos, concluindo que este polimorfismo está associado a uma elevada actividade da enzima CBS (Taub, J.W., 2002). Por outro lado, outros autores não observaram diferenças nos níveis de homocisteína no plasma em doentes com e sem a inserção (Taub, J.W., 2002). Por sua vez, outros autores colocaram a hipótese de que este polimorfismo 844ins68 poderá estar em ligação de desequilíbrio com outras anomalias genéticas (Taub, J.W., 2002).

As espécies reactivas de oxigénio (ROS), incluindo os radicais livres como o anião superóxido e o peróxido de hidrogénio, são produzidas continuamente em todas as células como parte do normal metabolismo celular (Mohammedi, K. *et al.*, 2011). Alguns estudos sugerem que a patogénese da SD envolve a formação de ROS. O gene *SOD1*, que codifica a enzima Cu/Zn SOD que participa no metabolismo do folato e que se localiza maioritariamente no citoplasma, pertence a uma classe de enzimas que catalisam a dismutação do anião superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio, desempenhando um papel importante no mecanismo antioxidante (Mohammedi, K. *et al.*, 2011).

A presença de polimorfismos nos genes que codificam estas enzimas conduz a alterações nos seus níveis de actividade, o que pode levar a uma redução da protecção contra o stresse oxidativo. Assim, alterações nos mecanismos antioxidantes estão ligadas a diversos tipos de doenças, incluindo diabetes, doenças relacionadas com a idade e cancro (Zhang, Y. *et al.*, 2011).

O gene *SOD1* localizado no cromossoma 21 possui a variante polimórfica A251G que não tem sido muito estudada até à data. Este polimorfismo localiza-se no intrão 3 e consiste na troca de uma adenina por uma guanina no nucleótido 251 (Neves, A. L. *et al.*, 2008).

Neste estudo, o genótipo mais frequente foi o genótipo AA, tanto na população controlo (83%) como na população de fetos com SD (80%), e corresponde à forma *wild type* desta enzima. Por sua vez, o genótipo AG apresentou uma frequência de 17% na população controlo e uma frequência de 20% na população de fetos com SD. Contudo, nenhuma das populações apresentou o genótipo GG. No entanto, esta observação poderá ser devida ao reduzido número fetos com SD e de indivíduos controlo analisados (n=31 e n=30, respectivamente), sendo necessário realizar a caracterização genotípica de um número mais elevado de amostras de modo a confirmar estes resultados.

Em relação à frequência alélica, observou-se a presença do alelo A em 92% da população controlo e em 90% da população de fetos com SD, enquanto o alelo G apresenta baixa frequência.

De acordo com os nossos resultados, estudos realizados em tumores do cérebro e em cancro da próstata, também não verificaram nenhuma associação entre as variantes polimórficas do gene *SOD1* e o desenvolvimento destas neoplasias (Rajaraman, P. *et al.*, 2008). Da mesma forma, neste estudo não se verificou qualquer associação entre a variante polimórfica A251G do gene *SOD1* e o desenvolvimento de SD. O genótipo AG, assim como a presença do alelo G sugerem ser factores de risco para o desenvolvimento da SD, contudo não são apresentados resultados significativamente estatísticos.

Por outro lado, outros autores observaram que o genótipo AA pode ser um factor protector no desenvolvimento de cataratas, enquanto o genótipo GG poderá ser um factor de risco (Zhang, Y. *et al.*, 2011). Num outro estudo, verificou-se que o polimorfismo A251G está associado à neuropatia incipiente (Mohammedi, K., *et al.*, 2011).

A entrada de folato numa variedade de células de diferentes origens é mediada pelo transportador de folato reduzido (RFC) codificado pelo gene *RFC1*, e tem como principais funções a absorção de folato através do epitélio luminal do intestino, o transporte transplacentar de folato, a permissão da

passagem de folato através da barreira hematoencefálica e ainda o transporte através da membrana basolateral dos túbulos renais (Coppedè, F., 2009; De Marco, *et al.*, 2003).

O polimorfismo no gene *RFC1*, A80G, que consiste na substituição de uma histidina por uma arginina na posição 27 do RFC, leva à alteração das propriedades deste transportador (Laverdière, C. *et al.*, 2002). A presença do alelo G deste polimorfismo está relacionada com baixos níveis de folato no plasma e elevados níveis de homocisteína (Laverdière, C. *et al.*, 2002), enquanto a presença do alelo A foi recentemente associada ao aumento de lesões oxidativas no ADN (Pavarino, E. C. *et al.*, 2011).

Neste nosso estudo observou-se uma maior frequência do alelo A na população de indivíduos controlo (52%), enquanto na população de fetos com SD observou-se uma maior frequência do alelo G (55%), contudo não se verificam diferenças estatisticamente significativas. Observou-se ainda uma maior frequência do genótipo AG tanto na população de indivíduos controlo (50%), como na população de fetos com SD (52%). Por outro lado, o genótipo AA foi observado na população controlo com uma frequência de 27% enquanto na população de fetos com SD apresentou uma frequência de 19%. O genótipo GG apresentou uma frequência de 23% e 29% na população controlo e população de fetos com SD, respectivamente.

A maioria dos estudos são concordantes relativamente ao facto do polimorfismo A80G não ser um factor de risco para SD (Coppedè, F., 2009). Apenas um estudo no sul de Itália sugeriu que o alelo G do polimorfismo A80G pode aumentar o risco para a SD em mães com idades superiores a 34 anos (Coppedè, F., 2009). Neste estudo, o alelo G e os genótipos AG e GG sugerem ser factores de risco para o desenvolvimento da SD, enquanto o alelo A e o genótipo AA têm tendência para factores protectores no desenvolvimento desta síndrome. Contudo, os resultados não são significativamente estatísticos, não se verificando assim uma relação concreta entre este polimorfismo e o desenvolvimento de SD.

Noutros tipos de estudos, foram encontradas associações significativas entre o alelo G e o genótipo GG do polimorfismo A80G do RFC e o desenvolvimento da doença de Alzheimer esporádica (Bi, X.-H. *et al.*, 2007), enquanto noutro estudo, verificou-se que este mesmo genótipo pode

comprometer o transporte de folato do sangue materno para o feto, apresentado assim um risco plausível no desenvolvimento de defeitos no tubo neural (Pei, L. *et al.*, 2008).

Uma das enzimas mais importantes no metabolismo do folato é a MTHFR, responsável pela conversão de 5,10-MTHF a 5-MTHF, regulando assim o fluxo intracelular de folato através da conversão de homocisteína a metionina para a síntese de nucleótidos (Brandalize, A. P. C. *et al.*, 2009). Uma deficiência de MTHFR está associada a uma hiperhomocisteinemia, um factor de risco para doenças como aterosclerose e trombose arterial (Mtiraoui, N. *et al.*, 2007).

O polimorfismo A1298C do gene *MTHFR* que se localiza no domínio regulador da enzima (Mtiraoui, N. *et al.*, 2007), consiste numa substituição de um glutamato por uma alanina, o que promove uma redução da actividade desta enzima, e está associado ao aumento da concentração de homocisteína no plasma (Dey, S., 2011 Botto, N. *et al.*, 2003). Neste estudo observou-se uma maior frequência do genótipo CC, tanto na população de indivíduos saudáveis (53%) como na população de fetos com SD (48%). Por outro lado, os genótipos AA e AC, na população controlo, apresentaram uma frequência de 33% e de 13%, respectivamente, enquanto na população de fetos com SD apresentaram uma frequência de 42% e de 10%, respectivamente. Em relação à frequência alélica, verificou-se que o alelo G foi o mais frequente tanto na população controlo (70%), como na população de fetos com SD (69%).

Em relação à avaliação do risco associado ao polimorfismo A1298C na SD, observou-se que o genótipo AC e o alelo A apresentam uma tendência para factores de risco para o desenvolvimento de SD, contudo não existem resultados estatisticamente significativos que o comprovem. Desta forma, não se verificam associações entre o polimorfismo A1298C e o desenvolvimento de SD na população estudada.

Em muitos estudos não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de homocisteína ou nos níveis de folato no soro, na presença dos diferentes genótipos de MTHFR A1298C, sendo que o impacto deste polimorfismo na actividade da enzima é muito menor do que o do polimorfismo C677T (Coppedè, F., 2009). Um estudo realizado por Shen, H. *et al.*, (2001) não observou nenhuma associação entre o polimorfismo A1298C e o

desenvolvimento de cancro gástrico na população chinesa (Shen, H. *et al.*, 2001). Por outro lado, noutros estudos deste polimorfismo verificou-se que o alelo C e o genótipo CC podem ser factores protectores para o desenvolvimento de neuropatia diabética (Mtiraoui, N. *et al.*, 2007), assim como para o desenvolvimento de cancro colo-rectal (Levine, A. J. *et al.*, 2010). Por sua vez, o genótipo AA, assim como a presença do alelo A, estão associadas a um aumento dos níveis de folato no plasma, estando associado ao aumento do risco para a doença da artéria coronária, na população portuguesa.

Apesar de existirem inúmeros estudos que envolvem a MTHFR, não foi encontrado nenhum que evidenciasse a presença do alelo C, assim como do genótipo CC com maior frequência, tal como se observou neste nosso estudo. Assim, para além de uma análise com um número maior de amostras de forma a confirmar estes resultados, tem que se ter em atenção a localização geográfica das populações em estudo.

Vários estudos indicam que um polimorfismo de forma individual pode ser insuficiente para causar um aumento do risco para o desenvolvimento de SD, mas a presença de dois ou mais polimorfismos em diferentes enzimas do metabolismo do folato pode levar ao aumento da incidência de SD (Patterson, D., 2008). Desta forma, diversos estudos colocam a hipótese de que a combinação do alelo T do polimorfismo C677T e do alelo C do polimorfismo A1298C da MTHFR, com o alelo G do polimorfismo A80G do RFC no genoma pode afectar o risco para a SD, contudo não são apresentados resultados significativamente estatísticos (Coppedè, F., 2009). Num estudo feito em Itália, sobre o risco para desenvolver SD verificou-se que a combinação do genótipo GG da variante polimórfica A80G do gene *RFC1* com o alelo T da variante polimórfica C677T do gene *MTHFR* aumenta o risco para a SD, enquanto a combinação dos genótipos AG ou AA da variante polimórfica A80G do gene *RFC1* com o genótipo AA da variante polimórfica A1298C do gene *MTHFR* possui um efeito protector significativo no desenvolvimento de SD (Coppedè, F., 2009). Por outro lado, muitos estudos referem que o polimorfismo 844ins68 sozinho não possui um efeito relevante nas concentrações de homocisteína, contudo em interacção com diversos polimorfismos incluindo C677T e A1298C do gene *MTHFR* e A2756G no gene *MTR* (metionina sintetase), provavelmente influencia os níveis de homocisteína (Coppedè, F., 2009).

Neste estudo foi feita também uma análise da combinação dos diferentes polimorfismos nas duas populações, não se tendo verificado qualquer resultado significativo.

Posteriormente seria importante incluir no estudo o polimorfismo C677T, uma vez que tem grande influência na actividade da enzima e pelo facto de vários estudos indicarem que em conjunto com vários polimorfismos poder ter um papel importante no desenvolvimento de SD podendo constituir factor de risco para cancro.

Por outro lado, de acordo com os objectivos iniciais deste trabalho e uma vez que não houve tempo para o fazer, seria de extrema relevância incluir neste estudo amostras de crianças com SD assim como de crianças com SD e com neoplasia, de forma a analisar o papel destes polimorfismos no desenvolvimento da neoplasia.

4.2 Perfil de metilação de genes envolvidos na regulação do ciclo celular e na reparação do ADN em fetos com Síndrome de Down

A epigenética afecta vários aspectos da biologia celular, incluindo o crescimento e controlo do ciclo celular, a diferenciação, a reparação do ADN, a apoptose e outros tipos de morte celular (Debatin, K.- M., *et al.*, 2007). A regulação epigenética através da metilação do promotor de genes pode levar ao silenciamento de genes supressores tumorais sendo um evento inicial na tumorigénese e na progressão de cancro em humanos (Debatin, K.- M., *et al.*, 2007; Everhard, S. *et al.*, 2009). Assim a metilação de promotores de genes supressores tumorais como *p16*, *p15* e *DAPK*, que codificam enzimas envolvidas na regulação do ciclo celular, e de genes que codificam proteínas reparadoras do ADN, como *MGMT*, pode interferir com a diferenciação hematopoiética levando à formação e progressão tumoral. Por outro lado, a literatura fornece inúmeros exemplos de que a hipometilação do genoma aumenta a ocorrência de aneuploidias, rearranjos cromossómicos, perda de heterozigotia e má segregação dos cromossomas (Dey, S., 2011). Desta forma pretendeu-se determinar o perfil de metilação destes genes nos fetos com SD, e verificar a sua relação com o desenvolvimento desta síndrome e, se possível, com a maior incidência de neoplasias nestes doentes.

O ciclo celular é regulado por cinases dependentes de ciclinas (CDKs), as quais são activadas por uma família de proteínas chamadas ciclinas. Uma falha na regulação do ciclo celular pode causar um crescimento anómalo da célula e levar a uma transformação celular (Hatta, Y. *et al.*, 1995). Inibidores de CDKs (CDKIs) podem actuar como genes supressores tumorais, e a sua inactivação pode contribuir para o desenvolvimento de cancro. Entre os mais conhecidos temos o gene *p15* e *p16* (Hatta, Y. *et al.*, 1995), que codificam proteínas inibidoras de CDK4 e CDK6 (Drexler, H. G., 1998), as quais podem bloquear a progressão do ciclo celular, impedindo a actividade de cinase das CDKs, exercendo um controlo negativo na proliferação celular. Entre os componentes da maquinaria do ciclo celular, o *p16* é o que está mais frequentemente alterado no cancro (Drexler, H. G., 1998).

Os genes *p15* e *p16* podem sofrer mutações pontuais, o que ocorre muito raramente. Além disso, podem também ser inactivados por deleções ou por metilação do ADN (Batova, A. *et al.*, 1997). As metilações do ADN ocorrem habitualmente nas ilhas que são ricas em citosinas e guaninas (CpG) e estão normalmente desmetiladas em tecidos normais (Batova, A. *et al.*, 1997).

A hipermetilação das ilhas CpG nas regiões promotoras dos genes supressores tumorais (incluindo o gene *p15* e *p16*) está relacionada com a diminuição ou perda de transcrição, sugerindo um mecanismo de inactivação alternativo a mutações pontuais ou a deleções (Drexler, H. G., 1998).

Neste estudo, verificou-se que tanto o gene *p16* como o gene *p15* não se encontram metilados nos fetos com SD, sugerindo-se que estes genes não se encontram silenciados por metilação dos seus promotores. Existem vários estudos que indicam que a hipermetilação destes genes supressores tumorais aparece como evento selectivo, dependendo tipo de tumor. Esta hipermetilação foi estudada num grande número de casos de leucemias e linfomas, tendo-se verificado que a hipermetilação do gene *p15* é universalmente encontrada em LMA e Síndrome Mielodisplásica (SMD), em alguns tipos de gliomas e também pode ocorrer muito frequentemente em ALL. Por outro lado, a metilação de *p16* em LMA e em ALL é um evento muito raro (Batova, A. *et al.*, 1997; Drexler, H. G., 1998; Chim, C.S. *et al.*, 2001), podendo ser mais frequente em doentes com SMD (Cortês, E. *et al.*, 2009). Assim, a elevada frequência da metilação do gene *p15* encontrada, implica que este pode desempenhar um papel

importante na leucemogénese (Chim, C.S. *et al.*, 2001). Noutros tipos de neoplasias, como em cancro de pulmão, o gene *p16* encontra-se metilado (Zöchbauer, S. *et al.*, 2001).

Outro gene, também envolvido na regulação do ciclo celular, é o gene *DAPK*, que se encontra localizado no cromossoma 9 e codifica uma cinase serina/treonina regulada por Ca^{2+} /calmodulina (Liu, Y. *et al.*, 2007; Liu, X.- F. *et al.*, 2007). A proteína cinase associada à morte (DAPK) apresenta uma larga distribuição pelos tecidos e está envolvida na morte celular por apoptose e por autofagia, na supressão tumoral e na supressão de metástases (Gozuacik, D. and Kimchi, A., 2006; Liu, X.- F. *et al.*, 2007). A hipermetilação das ilhas CpG existentes no promotor do gene *DAPK* pode levar a uma diminuição ou perda da sua expressão, o que pode constituir um importante mecanismo para a carcinogénese (Liu, X.- F. *et al.*, 2007), ocorrendo com elevada frequência em tumores (Gozuacik, D. and Kimchi, A., 2006).

Neste estudo, o gene *DAPK* não foi encontrado metilado em nenhum dos fetos com SD estudados, o que indica que este gene não se encontra inactivo, pelo menos devido a metilação do seu promotor.

O gene *DAPK* é um gene candidato a estar silenciado em casos de leucemia linfocítica crónica (LLC), e encontra-se metilado em cancro da tiróide, em cancro do pulmão e em cancro cervical (Debatin, K.- M., *et al.*, 2007; Hu, S. *et al.*, 2006; Zöchbauer, S. *et al.*, 2001; Narayan, G. *et al.*, 2003). Outros estudos têm verificado que o silenciamento do gene *DAPK* por metilação do seu promotor noutros tumores apresenta uma frequência que vai desde os 15% no cancro colo-rectal até aos 58% no cancro da bexiga (Christoph, F. *et al.*, 2006).

Por outro lado, foi também estudado um dos genes envolvidos na reparação do ADN, o gene *MGMT*, localizado no cromossoma 10. Este gene desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade genómica através da codificação de uma proteína reparadora do ADN, a MGMT (Dunn, J. *et al.*, 2009). A O^6 - metilguanina metiltransferase (MGMT) é uma proteína reguladora do ADN da célula, que remove especificamente o grupo alquilo da posição O^6 da guanina, restaurando o nucleótido para a sua forma nativa sem causar quebras nas cadeias de ADN (Hegi, M. E. *et al.*, 2008). Quando é transferido um grupo alquilo para um resíduo de cisteína interno, a enzima

MGMT fica irreversivelmente inactiva, sendo necessária síntese de novas proteínas para manter a actividade enzimática (Hegi, M. E. *et al.*, 2008). A capacidade de uma célula reparar as lesões depende do número de moléculas de MGMT existentes, assim como da taxa de síntese de MGMT (Esteller, M. *et al.*, 1999). A MGMT encontra-se expressa de forma ubíqua em tecidos humanos normais (Hegi, M. E. *et al.*, 2008). O silenciamento epigenético do gene *MGMT*, através da metilação do seu promotor, resulta numa diminuição da expressão de *MGMT* nas células tumorais (Hegi, M. E. *et al.*, 2008).

Neste estudo, verificamos que nenhum dos fetos com SD possuía o gene *MGMT* metilado, o que sugere que este não se encontra inactivo devido à metilação do seu promotor.

Por outro lado, o promotor do gene *MGMT* tem sido encontrado hipermetilado em vários tipos de cancro nomeadamente em cancro do pulmão (25%), sendo que é nos gliomas (40%), no cancro colo-rectal (40%) e nos linfomas onde se verifica maior frequência de hipermetilação de *MGMT* (Möllemann, M. *et al.*, 2005; Zöchbauer, S. *et al.*, 2001; Esteller, M. *et al.*, 1999; Shen L. *et al.*, 2005; Nakamura M. *et al.*, 2001). Existem estudos que verificaram a hipermetilação do promotor do gene *MGMT* noutros tipos de cancro, mas com menor frequência, nomeadamente em carcinomas de cabeça e pescoço, e muito raramente em tumores do cérebro não gliais, cancro da mama, cancro do endométrio e em leucemias (Nakamura M. *et al.*, 2001).

Futuramente, seria importante estudar o perfil de metilação destes genes em crianças com SD e ao mesmo tempo em crianças com SD e neoplasia, de forma a verificar a sua relação com o desenvolvimento de neoplasia.

4.3 Expressão génica de *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1* em fetos com Síndrome de Down

A SD, causada por uma cópia extra do cromossoma 21, afecta diversos sistemas de órgãos incluindo o osso, o sistema imunitário, sistema nervoso central e o sistema cardiovascular (Wolvetang, E. J. *et al.*, 2003a). Assim, sugere-se que existe uma sobre-expressão de genes do cromossoma 21 em células e em tecidos humanos com três cópias deste cromossoma (Li, C.-M., *et al.*, 2006).

Existe a hipótese do efeito de dosagem do gene no desenvolvimento da SD, a qual propõe que o aumento da expressão dos genes do cromossoma 21 em conjunto contribui para o desenvolvimento de SD (Haan, J. B. *et al.*, 2003).

Neste estudo, apenas foi observado um aumento de 0,9x, na variação dos níveis de expressão do gene *CBS* em relação ao controlo. Por sua vez, para os genes *ETS2* e *RUNX1* foi observado sensivelmente o mesmo nível de expressão, enquanto o gene *SOD1* apresenta aumento de 1,4x em relação ao controlo. Isto sugere que apesar dos fetos com SD possuírem três cópias deste gene, este não se encontra significativamente mais expresso em relação ao controlo. A análise dos resultados foi feita tendo em conta a variação dos níveis de expressão de dois genes de controlo endógenos, os genes *GUS* e *GADPH*, e em duas populações diferentes, a população de fetos com SD e a população de indivíduos adultos controlo.

De forma a compreender estes resultados, é necessário ter em conta os mecanismos de regulação da expressão destes genes, uma vez que poderão constituir uma hipótese para explicar a ausência de diferenças significativas na variação de expressão génica, além de ser necessário aumentar a nossa amostra.

O factor de transcrição *ETS2* é codificado pelo gene *ETS2*, localizado no cromossoma 21q22.3 humano e é sobre-expresso no cérebro e nos fibroblastos de indivíduos com SD (Wolvetang, E. J. *et al.*, 2003a), sugerindo-se que esta sobre-expressão pode contribuir para características fenotípicas da SD (Wolvetang, E. J. *et al.*, 2003b). Estudos indicam que a sobre-expressão do gene *ETS2* leva a um aumento do precursor da proteína beta amiloide (β -APP), uma vez que se liga ao promotor de β -APP, activando-o. Este gene pode também cooperar com o activador da proteína 1 (AP-1), assim como pode ser regulado por outros genes, nomeadamente pelos genes *ICAM-1*, *PLA₂P*, *p53* e pelo gene da ciclina D1, sugerindo assim que o factor de transcrição *ETS2* pode actuar na regulação do ciclo celular, na sobrevivência celular e na remodelação de tecidos (Wolvetang, E. J. *et al.*, 2003b). Sabe-se que a proteína *ETS2* reconhece a sequência GGAA/T nos promotores de genes alvo, e que elevados níveis de *ETS2* levam a um aumento da apoptose por desregulação da *p53*, facto este observado em tecidos de indivíduos com SD (Wolvetang, E. J. *et al.*, 2003b).

Assim, tem sido proposto que a indução prematura da apoptose contribuiu para o progressivo atraso mental na SD (Sanij, E. *et al.*, 2001). Constatamos assim que vários estudos sugerem que existe uma sobre-expressão do gene *ETS2* em indivíduos com SD. Contudo, neste estudo isso não se verificou nos fibroblastos de fetos com SD, podendo-se colocar a hipótese de que a expressão deste gene poderá estar a ser regulada por factores de transcrição, que se ligam ao seu promotor e impedem a sua expressão a nível fetal. Para confirmar esta hipótese, futuramente realizar-se-à a avaliação da expressão destes genes em crianças com SD, de modo a verificar as diferenças de expressão entre as diferentes fases do desenvolvimento.

A sobre-expressão do gene *CBS*, localizado no cromossoma 21, tem sido associada a determinadas características fenotípicas da SD (Ge, Y. *et al.*, 2001b). A *CBS* humana possui 5 isoformas de mRNA, designadas de -1a, -1b, -1c, -1d, -1e. As isoformas -1a e -1b correspondem à maioria dos transcriptos, enquanto as restantes isoformas são relativamente raras (Maclean, K. N. *et al.*, 2004). Por outro lado, os transcriptos que contêm os exões -1a e -1b são muito abundantes e podem ser encontrados numa variedade de tecidos adultos e fetais (Ge, Y. *et al.*, 2001a). Foram identificadas duas regiões promotoras a montante de -1a e -1b, constituindo um interessante paradoxo uma vez que possuem múltiplos locais de iniciação da transcrição, são ricos em citosinas e guaninas e não possuem a sequência *TATA box*. O promotor -1b é activado por interacção sinérgica entre NF-Y e SP1 ou SP3 (Maclean, K. N. *et al.*, 2004) e diferenças nos níveis de expressão do gene *CBS* estão directamente relacionadas com alterações nos níveis de SP1/SP3, que se ligam ao promotor -1b do gene *CBS*, em consequência da fosforilação pela proteína cinase A (Maclean, K. N. *et al.*, 2004). Este mecanismo foi proposto como um possível mecanismo para a regulação da expressão deste gene em tecidos específicos, podendo surgir como uma das hipóteses para explicar os resultados obtidos neste estudo, sugerindo-se que nos fetos com SD poderá haver uma inibição da expressão do gene *CBS* por parte de factores de transcrição SP1/SP3.

Num outro estudo, e de acordo com os nossos resultados, não foram encontradas diferenças nos níveis de expressão do gene *CBS*, no fígado e no córtex cerebral de fetos com SD em comparação com fetos sem SD (Janel, N. *et al.*, 2006).

O gene *SOD1* humano localiza-se no cromossoma 21q22, e o seu promotor consiste numa região rica em citosinas e guaninas. Existem diversos factores de transcrição que se ligam a esta região promotora, nomeadamente NF- κ B, AP-1, AP-2 e SP1 (Miao, L. and Clair, D. K., 2009). A transcrição do gene *SOD1*, que codifica a Cu/Zn SOD, é regulada em resposta a diversos estímulos, incluindo o stresse oxidativo, citocinas pró-inflamatórias e factores de crescimento (Rojo, A. I. *et al.*, 2004). A via PI3K/AKT protege as células do stresse oxidativo, levando a um aumento da expressão do gene *SOD1*, enquanto a SP1 actua como factor de transcrição, podendo activar o gene *SOD1* por ligação directa ao ADN do seu promotor. A sua ligação permite a interacção com outras proteínas que levam ao aumento da expressão do gene *SOD1* (Miao, L. and Clair, D. K., 2009).

Por sua vez, AP-1 actua também como um factor de transcrição, sendo capaz de modular processos de transdução de sinal envolvidos na proliferação e transformação celular. O aumento da capacidade de ligação de AP-1 ao ADN pode causar uma redução na transcrição do gene *SOD1*. A actividade de AP-1 é também sujeita a regulação por mecanismos de oxidação-redução. Assim, alterações na expressão do gene *SOD1* podem também modular a actividade de AP-1 (Miao, L. and Clair, D. K., 2009).

Um estudo sugere que o gene *SOD1* apresenta níveis de expressão aproximadamente 50% superiores ao normal numa variedade de células e tecidos de fetos com SD, incluindo eritrócitos, linfócitos B e T e fibroblastos (Perluigi, M. and Butterfield, A., 2011). Num outro estudo, foi observado um aumento de 1,5x nos níveis de expressão do gene *SOD1* em tecidos do cérebro e pulmões, um aumento de 2,3x em tecidos do coração e ainda um aumento de 3x em tecidos do timo em fetos com SD, comparativamente a indivíduos controlo (Haan, J. B. *et al.*, 2003). Neste nosso estudo, e praticamente de acordo com a literatura, observou-se aumento de 1,4x dos níveis de expressão do gene *SOD1* nos fetos com SD, o que seria mais ou menos de esperar tendo em conta a presença de três cópias deste gene.

Por sua vez, o gene *RUNX1* localiza-se no cromossoma 21q22.12 e codifica um factor de transcrição essencial na hematopoiese, sendo importante na maturação de megacariócitos e na linhagem de células B e T (Spender, L. C. *et al.*, 2005). Este factor de transcrição é frequentemente afectado por

translocações em leucemias e juntamente com o seu co-factor CBF β é capaz de activar ou reprimir a transcrição de reguladores chave das vias de sobrevivência, crescimento e diferenciação (Hombauer, M., 2008). Este gene pode ser regulado por outro factor de transcrição da mesma família, o RUNX3. Assim, RUNX3 reprime a expressão de RUNX1 através da ligação ao seu promotor P1 (Spender, L. C. *et al.*, 2005). Esta regulação da expressão pelo factor de transcrição RUNX3 pode ser uma das hipóteses colocadas para explicar os baixos níveis de expressão do gene *RUNX1* nos fetos com SD, apesar da presença das três cópias deste gene.

Por outro lado, existe um estudo que sugere que a cultura celular dos fibroblastos pode resultar em alterações na expressão de genes, sendo recomendado o uso de células fetais que não foram mantidas em cultura para a obtenção de informação sobre a expressão de genes a nível fetal (Slonim, D. K. *et al.*, 2009).

De forma a confirmar estes resultados seria necessário obter um maior número de amostras, e analisar se a cultura dos fibroblastos fetais induz alterações nos níveis de expressão génica. Para além disso e de forma a elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de neoplasia, e de forma a terminar este trabalho, seria necessário obter amostras de crianças com SD assim como de crianças com SD e neoplasia.

Capítulo 5. Conclusão

A SD ou trissomia 21 é caracterizada por apresentar uma cópia extra do cromossoma 21. O efeito de dosagem de genes presentes na cópia extra deste cromossoma pode estar relacionado com o desenvolvimento de aspectos fenotípicos na SD e com a maior incidência de leucemias nestes doentes. Neste sentido, foi avaliado neste estudo os níveis de expressão dos genes *ETS2*, *CBS*, *SOD1* e *RUNX1*, não se tendo verificadodiferenças significativas na variação dos níveis de expressão de genes do cromossoma 21 em fetos com SD em relação aos controlos saudáveis. Este facto sugere que mecanismos de regulação da transcrição dos genes em estudo poderão estar a inibi-los a nível fetal ou devido à cultura dos fibroblastos.

Por outro lado, o estudo de polimorfismos em genes que codificam enzimas que metabolizam o folato, em particular os polimorfismos 844ins68/C677T do gene *CBS*, A80G do gene *RFC1*, A1298C do gene *MTHFR*, assim como de enzimas antioxidantes como A251G do gene *SOD1*, é também de extrema importância, uma vez que poderão desempenhar um papel importante na susceptibilidade a aneuploidias. Contudo neste estudo não se verificaram associações significativas entre os polimorfismos estudados e o desenvolvimento de SD. No entanto observou-se que o genótipo com inserção do gene *CBS*, o genótipo AG da variante polimórfica A251G do gene *SOD1*, os genótipos AG e GG da variante polimórfica A80G do gene *RFC1* e o genótipo AC da variante polimórfica A1298C do gene *MTHFR* (*CBS*: 1,560±0,3927-6,198; *SOD1*: 1,20±0,3237-4,448; *RFC1*: 1,067±0,3907-2,912 e 1,344±0,4265-4,32, respectivamente; *MTHFR*: 1,444±0,5095-4,095) apresentam tendência para factores de risco no desenvolvimento da SD.

O estudo do perfil de metilação do ADN de diversos genes, em particular de genes envolvidos na regulação do ciclo celular e genes que codificam enzimas reparadoras do ADN (*p15*, *p16*, *DAPK* e *MGMT*, respectivamente), foi realizado de forma a verificar se a metilação está relacionada com o desenvolvimento de SD, uma vez que pode levar à ocorrência de aneuploidias, rearranjos cromossómicos, perda de heterozigotia e má segregação dos cromossomas e, desta forma influenciar o desenvolvimento de leucemias. Neste estudo verificou-se que nenhum dos genes se apresenta metilado na população de fetos com SD, sugerindo que não se encontram inactivos, pelo menos devido à metilação dos seus promotores.

Assim, um maior número de amostras de doentes e de controlos poderá contribuir para uma melhor análise do risco destes polimorfismos para o desenvolvimento de SD, assim como para uma melhor análise da variação dos níveis de expressão de genes do cromossoma 21 na SD.

Em toda esta temática muito ainda fica por esclarecer, nomeadamente em relação à prevalência de polimorfismos e à modulação epigenética de genes, no desenvolvimento de neoplasias na SD.

Capítulo 6. Referências

Acácio, G. L.; Barini, R.; *et al.* (2005). "Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21." *Prenatal Diagnosis*. 25: 1196-1199.

Ahmed, M.; Sternberg, A.; *et al.* (2004). "Natural history of GATA1 mutations in Down Syndrome." *Blood*. 103: 2480-2489.

Antonarakis, S. E. and Epstein, C. J. (2006). "The challenge of Down Syndrome." *TRENDS in Molecular Medicine*. 12(10): 473-479.

Batova, A.; Diccianni, M. B.; *et al.* (1997). "Frequent and Selective Methylation of p15 and Deletion of Both p15 and p16 in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia." *Cancer Research*. 57: 832-836.

Bercovich, D.; Ganmore, I.; *et al.* (2008). "Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's Syndrome." *Lancet*. 372: 1484-1492.

Bi, X.-H.; Zhao, H.-L.; *et al.* (2007). "Association of RFC1 A80G and MTHFR C677T polymorphisms with Alzheimer's disease." *Neurobiology and Aging*. 30(10): 1601-1607.

Botto, N.; Andreassi, M. G.; *et al.* (2003). "Genetic polymorphisms in folate and homocysteine metabolism as risk factors for DNA damage." *European Journal of Human Genetics*. 11: 671-678.

Brandalize, A. P. C. (2009). "Análise dos fatores genéticos e ambientais relacionados ao metabolismo do ácido fólico/homocisteína como fatores de risco para a Síndrome de Down e as suas malformações maiores." PhD, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Brice, P. (2009). "Genetic basis for reduced cancer risk in Down's Syndrome." Research article. 1-2.

Cabelof, D.C.; Patel, H.V.; *et al.* (2009). "Mutational spectrum at GATA1 provides insights into mutagenesis and leukemogenesis in Down Syndrome." *Blood*. 114: 2753-2763.

Chango, A.; Emery-Fillon, N.; *et al.* (2000). "A polymorphism (80G>A) in folate carrier gene and its associations with folate status and homocysteinemia." *Molecular Genetics and Metabolism*. 70: 310-315.

Chauffaille, M.L.L.F. (2009). "LLA em portadores de Síndrome de Down e TEL/AML1 (ETV6/RUNX1)." *Revista Brasileira de Hematologia e Hematoterapia*. 31(5): 305-306.

Chim, C. S.; Liang, R.; *et al.* (2001). "Methylation of p15 and p16 Genes in Acute Promyelocytic Leukemia: Potential Diagnostic and Prognostic Significance." *Journal of Clinical Oncology*. 19(7): 2033-2040.

Christoph, F.; Kempkensteffen, C.; *et al.* (2006). "Methylation of tumour suppressor genes APAF-1 and DAPK-1 and in vitro effects of demethylating agents in bladder and kidney cancer." *British Journal of Cancer*. 95: 1701 – 1707.

Coppedè, F. (2009). "The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down Syndrome". *Mutation Research*. 682: 54-70.

Cortês, E.; Espadana, A.; *et al.* (2009). "Successful treatment with VAD of a myelodysplastic syndrome occurring during the course of a smoldering multiple myeloma." *Leukemia Research*. 33(1): 195-197.

Debatin, K.-M. (2007), "Chronic Lymphocytic Leukemia: Keeping Cell Death at Bay." *Cell*. 129: 853-855.

De Marco, P.; Cavelo, M. G.; *et al.* (2003). "Reduced folate carrier polymorphism (80A>G) and neural tube defects." *European Journal of Human Genetics*. 11: 245-252.

Dey, S. (2011). "Genetics and etiology of Down Syndrome." InTech. Part 1, Chapter 5, 97-107.

Dierssen, M.; Herault, Y.; Estivill, X. (2009). "Aneuploidy: From a physiological mechanism of variance to Down Syndrome." The American Physiological Society. 89: 887-920.

Drexler, H. G. (1998). "Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells." Leukemia. 12: 845-859.

Dunn, J.; Baborie, A.; *et al.* (2009). "Extent of MGMT promoter methylation correlates with outcome in glioblastomas given temozolomide and radiotherapy." British Journal of Cancer. 101(1): 124-131.

Dutta, S.; Sinha, S.; *et al.* (2005). "Cystathionine β -synthase T833C/844ins68 polymorphism: a family-based study on mentally retarded children." Behavioral and Brain Functions. 1(25): 1-6.

Esteller, M.; Hamilton, S. R.; *et al.* (1999). "Inactivation of the DNA Repair Gene O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation is a Common Event in Primary Human Neoplasia." Cancer Research. 59: 793-797.

Everhard, S.; Tost, J.; *et al.* (2009). "Identification of regions correlating MGMT promoter methylation and gene expression in glioblastomas." Neuro-Oncology. 11: 348-356.

Fonatsch, C. (2010). "The role of chromosome 21 in hematology and oncology." Genes, Chromosomes and Cancer. 49: 497-508.

Franco, R. F.; Elion, J.; *et al.* (1998). "Heterogeneous Ethnic Distribution of the 844ins68 in the Cystathionine β -Synthase Gene." Human Heredity. 48: 338-342.

Ganmore, I.; Smootha, J. and Izraeli, S. (2009). "Constitutional aneuploidy and cancer predisposition." *Human Molecular Genetics*. 18(1): 84-93.

Ge, Y.; Konrad, M. A.; Taub, J. W. (2001a). "Transcriptional regulation of the human cystathionine b-synthase -1b basal promoter: synergistic transactivation by transcription factors NF-Y and Sp1/Sp3." *Biochemical Society*. 357: 97-105.

Ge, Y.; Matherly, L. H.; Taub, J. W. (2001b). "Transcriptional Regulation of Cell-specific Expression of the Human Cystathionine β -Synthase Gene by Differential Binding of Sp1/Sp3 to the -1b Promoter." *The Journal of Biological Chemistry*. 276(47): 43570–43579.

Gozuacik, D.; Kimchi, A. (2006). "DAPk Protein Family and Cancer." *Autophagy*. 2(2): 74-79.

Griffioen, P. H.; Jonge, R.; *et al.* (2005). "Detection and allele-frequencies of the 833T>C, 844ins68 and a novel mutation in the cystathionina β -synthase gene." *Clinica Chimica Acta*. 354: 191-194.

Gurbuxani, S.; Vyas, P. and Crispino, J. D. (2004). "Recent insights into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down Syndrome." *Blood*. 103: 399-406.

Haan, J- B.; Susil, B.; *et al.* (2003). "An altered antioxidant balance occurs in Down Syndrome fetal organs: implication for the 'gene dosage effect' hypothesis." *Advances in Down Syndrome Research*.

Hatta, Y.; Hiramata, T.; *et al.* (1995). "Homozygous Deletions of the p15 (MTS2) and p16 (CDKN2/MTS1) Genes in Adult T-cell Leukemia." *Blood*. 85(10): 2699-2704.

Hegi, M. E.; Liu L. *et al.* (2008). "Correlation of O6-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation With Clinical Outcomes in

Glioblastoma and Clinical Strategies to Modulate MGMT Activity.” *Journal Of Clinical Oncology*. 26(25): 4189-4199.

Herman, J. G.; Graff, J. R.; *et al.* (1996). “Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93: 9821-9826.

Hertzberg, L.; Vendramini, E.; *et al.* (2010). “Down Syndrome acute lymphoblastic leucemia, a highly heterogenous disease in wich aberrante expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM study Group.” *Blood*. 115 (5): 1006-1016.

Hobbs, C. A.; Sherman, S. L.; *et al.* (2000). “Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down Syndrome.” *Americal Journal of Human Genetics*. 67: 623-630.

Hombauer, M. (2008). “Molecular studies on the transcriptional regulation of the Cd8ab gene loci during T cell development.” *Msc Universität Wien*.

Hu, S.; Liu, D. *et al* (2006). “Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer.” *International Journal of Cancer*. 119: 2322–2329.

Huica, I.; Botezatu, A.; *et al.* (2011). “Genetic and epigenetic aspects in cardiovascular disease and ageing.” *Romanian Biotechnological Letters*. 16(5): 6488-6496.

Izraeli, S. (2010). “Similar yet different.” *Blood*. 116(7): 1019-1020.

Jacob, M. A.; Bastos, C. C. B.; Bonini-Domingos, C. R. (2011). “The 844ins68 cystathionine beta-synthase and C677T MTHFR gene polymorphism and the vaso-occlusive event risk in sickle cell disease.” *Archives of Medical Science*. 7(1): 97-101.

Jacob, R.A. (2000). "Folate, DNA methylation, and gene expression: factors of nature and nurture." *American Society for Clinical Nutrition*. 72: 903–4.

James, J.S.; Pogribna, M.; *et al.* (1999). "Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down Syndrome." *American Society for Clinical Nutrition*. 70:495–501.

Janel, N.; Christophe, O.; *et al.* (2006). "Paraoxonase-1 expression is up-regulated in Down Syndrome fetal liver." *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 346: 1303–1306.

Klusmann, J.-H.; Godinho, F. J.; *et al.* (2010). "Development stage-specific interplay of GATA1 and IGF signalling in fetal megakaryopoiesis and leukemogenesis." *Genes and Development*. 24: 1659-1672.

Langebrake, C.; Klusmann, J. H; *et al.* (2006). "Concomitant aberrant overexpression of RUNX1 and NCAM in regenerating bone marrow of myeloid leukemia of Down's Syndrome." *The hematology journal*. 91(11): 1473-1480.

Laverdière, C.; Chiasson, S.; *et al.* (2002). "Polymorphism G80A in the reduced folate carrier gene and its acute lymphoblastic leukemia relationship to methotrexate plasma levels and outcome of childhood." *Blood*. 100: 3832-3834.

Lee, S. W.; Reimer, C. L.; *et al.* (1998). "Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells." *Oncogene*. 16: 1391-1397.

Levanon, D.; Lieman-Hurwitz, J.; *et al.* (1985). "Architecture and anatomy of chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase." *The EMBO Journal*. 4(1): 77-84.

Levine, A. J.; Figueiredo, J. C.; *et al.* (2010). "Genetic Variability in the MTHFR Gene and Colorectal Cancer Risk Using the Colorectal Cancer Family Registry." *Cancer Epidemiol Biomarkers*. 19: 89-100.

Li, C.-M.; Guo, M.; *et al.* (2006). "Cell type-specific over-expression of chromosome 21 genes in fibroblasts and fetal hearts with trisomy 21." *BMC Medical Genetics*. 7(24): 1-15.

Liu, Y.; Gao, W.; *et al.* (2007). "Promoter methylation of RASSF1A and DAPK and mutations of K-ras, p53, and EGFR in lung tumors from smokers and never-smokers." *BMC Cancer*. 7: 74.

Liu, X.-F.; Kong, F.-M.; *et al.* (2007). "Promoter hypermethylation of death-associated protein kinase gene in cholangiocarcinoma." *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International*. 6: 407-411.

Livak, J. K. and Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method." *Methods*. 25: 402–408.

Locke, A. E.; Dooley, K. J.; *et al.* (2010). "Variation in Folate Pathway Genes Contributes to Risk of Congenital Heart Defects Among Individuals With Down Syndrome." *Genetic Epidemiology*. 34(6): 613–623.

Lodish, H.; Berk, A.; *et al.* (2008). *Cancer. Molecular cell biology*. New York, WH Freeman and Company: 1107-1150.

Lyle, R.; Béna, F.; *et al.* (2009). "Genotype–phenotype correlations in Down Syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21." *European Journal of Human Genetics*. 17: 454 – 466.

Macleán, K. N.; Kraus, E.; Kraus, J. P.; (2004). "The Dominant Role of Sp1 in Regulating the Cystathionine-Synthase -1a and -1b Promoters Facilitates Potential Tissue-specific Regulation by Kruppel-like Factors." *The Journal of Biological Chemistry*. 279(10): 8558–8566.

Malinge, S.; Izraeli, S.; Crispino, J.D.; (2009). "Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down Syndrome." *Blood*. 113: 2619-2628.

Maloney, K.W.; Carroll, W.L.; *et al.* (2010). "Down Syndrome childhood acute lymphoblastic leukemia has a unique spectrum of sentinel cytogenetic lesions that influences treatment outcome: a report from the Children's Oncology Group." *Blood*. 116: 1045-1050.

Miao, L.; Clair, D. K. (2009). "Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease." *Free Radical Biology & Medicine*. 47: 344–356.

Mohammedi, K.; Maimaitiming, S.; *et al.* (2011). "Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene are associated with increased risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic subjects." *Molecular Genetics and Metabolism*. 104: 654–660.

Möllemann, M.; Wolter, M.; *et al.* (2005). "Frequent Promoter Hypermethylation and Low Expression of the MGMT Gene in Oligodendroglial Tumors." *International Journal of Cancer*. 113: 379–385.

Mtiraoui, N.; Ezzidi, I.; *et al.* (2007). "MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and hyperhomocysteinemia as risk factors of diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients." *Diabetes Research and Clinical Practice*. 75: 99–106.

Mundschau, G.; Gurbuxani, S.; *et al.* (2003). "Mutagenesis of *GATA1* is an initiating event in Down Syndrome leukemogenesis." *Blood*. 101(11): 4298-4300.

Nakamura, M.; Watanabe, T.; *et al.* (2001). "Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C > A:T mutations of the *TP53* tumor suppressor gene." *Carcinogenesis*. 22(10): 1715-1719.

Narasimhan, K. L. (2011). "Neural Tube Defects - Role of Folate, Prevention Strategies and Genetics." InTech. Part 2, Chapter 10, 179-187.

Narayan, G.; Arias-Pulido, H.; *et al.* (2003). "Frequent Promoter Methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 Genes in Carcinoma of Cervix Uteri: Its Relationship to Clinical Outcome." *Molecular Cancer*. 2: 1-12.

Neves, A. L.; Mohammedi, K.; *et al.* (2008). "Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene and renal and cardiovascular morbidity and mortality in type 2 diabetic subjects." *Molecular Genetics and Metabolism*. 106: 359–365.

Patterson, D. (2007). "Genetic Mechanisms involved in the phenotype of Down Syndrome." *Mental retardation and developmental disabilities*. 13: 199 – 206.

Patterson, D. (2008). "Folate metabolism and the risk of Down Syndrome." *Genetics*. 12(2): 93-97.

Pei, L.; Liu, J.; *et al.* (2008). "Association of Reduced Folate Carrier Gene Polymorphism and Maternal Folic Acid Use With Neural Tube Defects." *American Journal of Medical Genetics. Part B*: 874- 878.

Perluigi, M. and Butterfield, A. (2011). "Oxidative Stress and Down Syndrome: A Route toward Alzheimer-Like Dementia." *Current Gerontology and Geriatrics Research*. 2012: 1-10.

Pogribna, M.; Melnyk, S.; *et al.* (2001). "Homocysteine Metabolism in Children with Down Syndrome: in vitro modulation." *American Journal of Human Genetics*. 69: 88-95.

Rabin, K. R. and Whitlock, J.A. (2009). "Malignancy in Children with Trisomy 21" *The Oncologist*. 14:164-173.

Rajaraman, P.; Hutchinson, A.; *et al.* (2008). "Oxidative response gene polymorphisms and risk of adult brain tumors." *Neuro-oncology*. 10: 709-715.

Robinson, K. (2000). "Homocysteine, B vitamins, and risk of cardiovascular disease." 83:127–130.

Rojo, A. I.; Salinas, M.; *et al.* (2004). "Regulation of Cu/Zn-Superoxide Dismutase Expression via the Phosphatidylinositol 3 Kinase/Akt Pathway and Nuclear Factor- κ B." The Journal of Neuroscience. 24(33):7324 –7334.

Romano, M.; Marcucci, R.; *et al.* (2002). "Regulation of 3' splice site selection in the 844ins68 polymorphism of the cystathionine β -synthase gene". The Journal of Biological Chemistry. 277(46): 43821-43829.

Roy, A.; Roberts, I.; *et al.* (2009). "Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) and transient myeloproliferative disorder (TMD) in Down Syndrome: a multi-step model of myeloid leukaemogenesis." British Journal of Haematology. 147: 3–12.

Sanji, E.; Hatzistavrou, T.; *et al.* (2001). "Ets-2 Is Induced by Oxidative Stress and Sensitizes Cells to H₂O₂-Induced Apoptosis: Implications for Down's Syndrome." Biochemical and Biophysical Research Communications. 287: 1003–1008.

Shaffer, L. G. and Tommerup, N. (2005). ISCN 2005: an international system for human cytogenetic nomenclature (2005): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, S Karger Pub.

Shannon, B.; Gnanasampanthan, S.; *et al.* (2002). "A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability." The international journal of gastroenterology and hepatology. 50:520-524.

Shen, H.; XU, Y.; *et al.* (2001). "Polymorphisms of 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a chinese population: a case-control study." International Journal of Cancer. 95: 332–336.

Slonim, D. K.; Koide, K.; *et al.* (2009). "Functional genomic analysis of amniotic fluid cell-free mRNA suggests that oxidative stress is significant in Down Syndrome fetuses." *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(23): 9425–9429.

Sommer, C.A. and Henrique-Silva, F. (2008). "Trisomy 21 and Down Syndrome - A short review." *Brazilian Journal of Biology*. 68(2): 447-452.

Spender, L. C.; Whiteman, H. J.; *et al.* (2005). "Transcriptional cross-regulation of RUNX1 by RUNX3 in human B cells." *Oncogene*. 24: 1873–1881.

Stankiewicz, M. J. and Crispino, J. D. (2009). "ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells". *Blood*. 113(14): 3337- 3347.

Sukla, K. K. and Raman, R. (2012). "Association of MTHFR and RFC1 gene polymorphism with hyperhomocysteinemia and its modulation by vitamin B12 and folic acid in an Indian population". *European Journal of Clinical Nutrition*. 66: 111-118.

Sureshbabu, R.; Kumari, R.; *et al.* (2011). "Phenotypic and dermatological manifestations in Down Syndrome." *Dermatology Journal*. 17(2): 3.

Taub, J. W.; Matherly, L. H.; *et al.* (1996). "Enhanced Metabolism of 1-P-D-Arabinofuranosylcytosine in Down Syndrome Cells: A Contributing Factor to the Superior Event Free Survival of Down Syndrome Children With Acute Myeloid Leukemia." *Blood*. 87(8): 3395-3403.

Taub, J. W. (2002). "High frequency of the 844ins68 cystathionine- β -synthase gene variant in Down Syndrome children with acute myeloid leukemia." *Leukemia*. 16: 2339–2341.

Tsuzuki, S.; Taguchi, O.; Seto, M. (2011). "Promotion and maintenance of leukemia by ERG." *Blood*. 117(14): 3858-3868.

Tunstall-Pedoe, O.; Roy, A. *et al.* (2008). "Abnormalities in myeloid progenitor compartment in Down Syndrome fetal liver precede acquisition of *GATA1* mutations." *Blood*. 112(12): 4507-4511.

Yakub, M.; Moti, N.; *et al.* (2012). " Polymorphisms in *MTHFR*, *MS*, and *CBS* genes and homocysteine levels in a Pakistani population." *PLoS ONE*. 7(3): 1-7.

Weisberg, I.; Tran, P.; *et al.* (1998). "A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) associated with decreased enzyme activity." *Molecular Genetics and Metabolism*. 64(3):169-72.

Whitlock, J. A.; Sather, H. N.; *et al.* (2005). "Clinical characteristics and outcome of children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study." *Blood*. 106 (13): 4043- 4049.

Wiseman, F. K.; Alford, K. A.; *et al.* (2009). "Down Syndrome—recent progress and future prospects." *Human Molecular Genetics*. 18(1): 75-83.

Wolvetang, E. J.; Wilson, T. J.; *et al.* (2003b). "ETS2 overexpression in transgenic models and in Down Syndrome predisposes to apoptosis via the p53 pathway". *Human Molecular Genetics*. 12(3): 247–255.

Wolvetang, E. J.; Bradfield, O. M.; *et al.* (2003a). "Overexpression of the chromosome 21 transcription factor *Ets2* induces neuronal apoptosis." *Neurobiology of Disease*. 14: 349-356.

Xavier, A.C. and Taub, J.W. (2010). "Acute leukemia in children with Down Syndrome." *Haematologica*. 95(7): 1043-1045.

Xavier, A.C.; Ge, Y. and Taub, J.W. (2009). "Down Syndrome and Malignancies: A Unique Clinical Relationship." *Journal of Molecular Diagnostics*. 11(5): 371-380.

Xu, G.; Kanezaki, R.; *et al.* (2006). "Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down Syndrome." *Leukemia*. 1-7.

Zen, P. R.; Daudt, L.E.; *et al.* (2009). "Evolução clínica e fusão TEL/AML1 em pacientes pediátricos com Síndrome de Down e leucemia linfoblástica aguda - Clinical evolution and TEL/AML1 fusion in pediatric patients with Down Syndrome and acute lymphoblastic leukemia". *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 1-5.

Zhang, Y.; Zhang; *et al.* (2011). "Genetic polymorphisms of superoxide dismutases, catalase, and glutathione peroxidase in age-related cataract." *Molecular Vision*. 17: 2325-2332.

Zöchbauer-Müller, S.; Fong, K. M.; *et al.* (2001). "Aberrant Promoter Methylation of Multiple Genes in Non-Small Cell Lung Cancers." *Cancer Research*. 61: 249–255.

