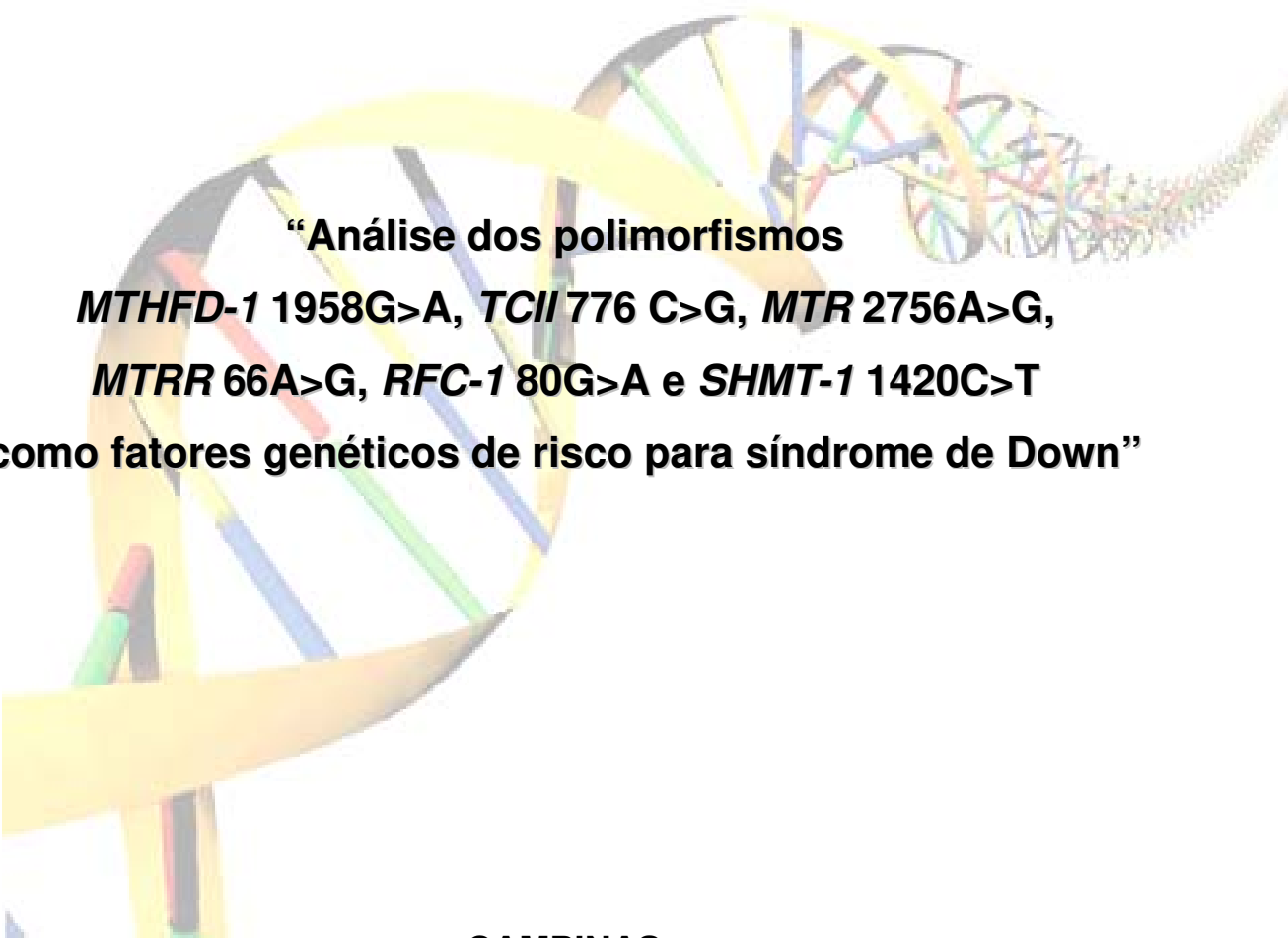


CINTIA MARQUES RIBEIRO



**“Análise dos polimorfismos
MTHFD-1 1958G>A, *TCII* 776 C>G, *MTR* 2756A>G,
MTRR 66A>G, *RFC-1* 80G>A e *SHMT-1* 1420C>T
como fatores genéticos de risco para síndrome de Down”**

CAMPINAS

Unicamp

2008

CINTIA MARQUES RIBEIRO

**“Análise dos polimorfismos
MTHFD-1 1958G>A, *TCII* 776 C>G, *MTR* 2756A>G,
MTRR 66A>G, *RFC-1* 80G>A e *SHMT-1* 1420C>T
como fatores genéticos de risco para síndrome de Down”**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carmen Sílvia Bertuzzo

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

R354a Ribeiro, Cíntia Marques
 “Análise dos polimorfismos *MTHFD-1* 1958 >A, *TCHI776* C> G,
MTR 2756 A >G, *MTRR* 66 A>G, *RFC-1* 80G>A e *SHMT-1* 1420C>T
como fatores genéticos de risco para síndrome de Down”/ Cíntia
Marques Ribeiro. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo
Dissertação(Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Metabolismo . 2. Folatos. 3. Metilação de DNA. I.
Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês : “Analysis of the polymorphism *MTHFD-1* 1958G>A, *TCCI*
776 C>G, *MTR* 2756>G, *MTRR* 66 A>G, *RFC-1* 80G>A e *SHMT-1* 1420C>T as
risk factors for Down syndrome”**

Keywords: • Metabolism
 • Folates
 • DNA Methylation

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

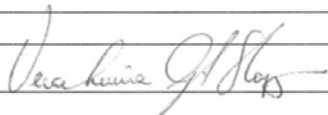
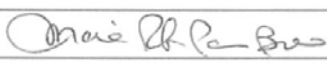
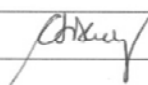
Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
Profa. Dra. Maria Rita Passos-Bueno
Profa. Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes

Data da defesa: 03-02-2009

Banca examinadora de Dissertação de Mestrado

Cintia Marques Ribeiro

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Bertuzzo

Membros:	
Professor (a) Doutor (a) Vera Lucia Gil da Silva Lopes -	
Professor (a) Doutor (a) Maria Rita Passos-Bueno -	
Professor (a) Doutor (a) Carmen Silvia Bertuzzo -	

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03/02/2009

	PÁG.
RESUMO	<i>xxxi</i>
ABSTRACT	<i>xxxv</i>
1- INTRODUÇÃO	39
1.1- Aneuploidia	41
1.2- Síndrome de Down	41
1.3- Etiologia da Síndrome de Down	43
1.3.1-Trissomia livre presente em todas as células.....	43
1.3.2- Mosaicismo.....	44
1.3.3- Rearranjos cromossômicos.....	44
1.4- Efeito do desequilíbrio gênico	46
1.5- Etiologia da não-disjunção	48
1.6- Folato	51
1.7- Aspectos genéticos	55
1.7.1- <i>MTHFD-1</i>	55
1.7.2- <i>SHMT –1</i>	56
1.7.3- <i>RFC-1</i>	56
1.7.4- <i>MTRR</i>	56
1.7.5- <i>MTR</i>	57
1.7.6- <i>TCII</i>	57

2- OBJETIVOS.....	59
2.1- Objetivo geral.....	61
2.2- Objetivos específicos.....	61
3- JUSTIFICATIVA.....	63
4- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	67
4.1- Aspectos éticos da pesquisa.....	69
4.2- Desenho do estudo.....	69
4.3- Casuística.....	69
4.4- Métodos.....	69
4.4.1- <i>PCR</i>	70
4.4.2- Digestão enzimática.....	72
4.5- Análise dos dados.....	76
5- RESULTADOS.....	79
5.1- Caracterização da amostra.....	81
5.2- Análise <i>MTHFD-1 1958G>A</i>.....	81
5.2- Análise <i>SHMT-1 1420C>T</i>.....	82
5.3- Análise <i>RFC-1 80G>A</i>.....	83
5.4- Análise <i>MTR 2756A>G</i>.....	85
5.5- Análise <i>MTRR 66A>G</i>.....	86
5.6- Análise <i>TCII 776C>G</i>.....	87
5.7- Análise de regressão logística univariada.....	89
5.8- Análise de regressão logística múltipla.....	90

5.9- Interação entre o polimorfismo <i>TCII 776 C>G</i> e os demais polimorfismos estudados.....	91
5.10- Estudo do efeito da presença de um ou dois Alelos alterados para ambos os genes <i>MTHFD-1</i> e <i>SHMT-1</i>	92
5.11- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes <i>MTHFD-1</i> e <i>MTR</i>	93
5.12- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes <i>MTHFD-1</i> e <i>MTRR</i>	94
5.13- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes <i>SHMT-1</i> e <i>MTR</i>	94
5.14- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes <i>SHMT-1</i> e <i>MTRR</i>	95
5.15- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes <i>RFC-1</i> e <i>MTHFD-1</i>	96
5.16- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes <i>RFC-1</i> e <i>SHMT-1</i>	97
5.17- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes <i>RFC-1</i> e <i>MTR</i>	98
5.18- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes <i>RFC-1</i> e <i>MTRR</i>	99
5.19- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes <i>MTRR</i> e <i>MTR</i>	100
6- DISCUSSÃO.....	103
6.1- Aspectos gerais.....	105
6.2- <i>MTHFD-1</i>	105

6.3- <i>SHMT-1</i>.....	107
6.4- <i>RFC-1</i>.....	108
6.5- <i>MTR</i>.....	109
6.6- <i>MTRR</i>.....	109
6.7- <i>TCII</i>.....	111
6.8- Interação entre os genótipos.....	111
6.9- Considerações finais.....	112
7- CONCLUSÃO.....	113
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117
Referências on-line.....	134

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>AML-1</i>	Oncogene da leucemia mielóide aguda 1
<i>APP</i>	Proteína precursora amilóide
<i>CBS</i>	Cistationina betasintase
<i>CD18</i>	Gene integrina beta 2
<i>cSHMT-1</i>	Serina hidroximetiltransferase citoplasmática
<i>DHF</i>	Dihidrofolato
<i>DNA</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>dTMP</i>	Desoxitimina monofosfato
<i>dUMP</i>	Desoxiuracila monofosfato
<i>DTN</i>	Defeito do tubo neural
<i>dUTP</i>	Desoxiuridina trifosfato
<i>EST</i>	“Expressed Sequence Tag”
<i>FL</i>	Linfoma folicular
<i>IC</i>	Intervalo de confiança
<i>Mb</i>	Megabase
<i>MeCP2</i>	“Methylated Cpg binding protein 2”
<i>MTHFD-1</i>	Metilenotetrahidrofolato dehidrogenase (NADP dependente) 1/meteniltetrahidrofolato ciclohidrolase/formiltetrahidrofolato sintetase
<i>MTHFR</i>	Metilenotetrahidrofolato redutase
<i>MTR</i>	5-metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferase
<i>MTRR</i>	5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase redutase

<i>mSHMT-1</i>	Serina hidroximetiltransferase mitocondrial
<i>NADPH</i>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<i>OR</i>	<i>Odds ratio</i>
<i>PCR</i>	Reação em cadeia da polimerase
<i>RFC-1</i>	Transportadora de folato reduzido 1
<i>RNA</i>	Ácido ribonucleico
<i>SAM</i>	S-adenosilmetionina
<i>SAS</i>	<i>“Statistical Analysis System”</i>
<i>SD</i>	Síndrome de Down
<i>SHMT-1</i>	Serina hidroximetiltransferase 1
<i>SNP</i>	Polimorfismo em um único nucleotídeo
<i>TCII</i>	Transcobalamina II
<i>THF</i>	Tetrahidrofolato

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Concentração dos reagentes utilizados e condições das PCRs.....	71
Tabela 2- Descrição dos iniciadores utilizados em cada reação e dos tamanhos dos fragmentos obtidos em pares de base.....	72
Tabela 3- Condições das reações de digestão enzimática.....	73
Tabela 4- Tamanho dos fragmentos esperados, para cada genótipo, após digestão enzimática específica.....	73
Tabela 5- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação a distribuição genotípica do gene <i>MTHFD-1</i>	81
Tabela 6- Distribuição genotípica do polimorfismo 1958G>A , do gene <i>MTHFD-1</i> , nos grupos MSD e controle.....	81
Tabela 7- Freqüência dos alelos G e A, do gene <i>MTHFD-1</i> , em 200 MSD e 340 controles.....	82
Tabela 8- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação a distribuição genotípica do gene <i>SHMT-1</i>	82
Tabela 9- Distribuição genotípica do polimorfismo 1420C>T, do gene <i>SHMT-1</i> , nos grupos MSD e controle.....	83
Tabela 10- Freqüência dos alelos C e T, do gene <i>SHMT-1</i> , em 200 MSD e 340 controles.....	83
Tabela 11- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação a distribuição genotípica do gene <i>RFC-1</i>	84
Tabela 12- Distribuição genotípica do polimorfismo 80G>A, do gene <i>RFC-1</i> , nos grupos MSD e controle.....	84
Tabela 13- Freqüência dos alelos G e A, do gene <i>RFC-1</i> , em 200 MSD e 340 controles.....	84
Tabela 14- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação a distribuição genotípica do gene <i>MTR</i>	85

Tabela 15-	Distribuição genotípica do polimorfismo 2756A>G, do gene <i>MTR</i> , nos grupos MSD e controle.....	85
Tabela 16-	Freqüência dos alelos A e G, do gene <i>MTR</i> , em 200 MSD e 340 controles.....	86
Tabela 17-	Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação a distribuição genotípica do gene <i>MTRR</i>	86
Tabela 18-	Distribuição genotípica do polimorfismo 66A>G, do gene <i>MTR</i> , nos grupos MSD e controle.....	87
Tabela 19-	Freqüência dos alelos A e G, do gene <i>MTRR</i> , em 200 MSD e 340 controles.....	87
Tabela 20-	Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação a distribuição genotípica do gene <i>TCII</i>	88
Tabela 21-	Distribuição genotípica do polimorfismo 776C>G, do gene <i>TCII</i> , nos grupos MSD e controle.....	88
Tabela 22-	Freqüência dos alelos C e G, do gene <i>TCII</i> , em 200 MSD e 340 controles.....	88
Tabela 23-	Comparação da soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/CT) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/CT, GA/TT) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/TT) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle.....	92
Tabela 24-	Comparação da soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/AG, GA/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle.....	93

Tabela 25-	Comparação da soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/AG, GA/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle.....	94
Tabela 26-	Comparação da soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (CT/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (TT/AG, CT/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (TT/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle.....	95
Tabela 27-	Comparação a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (CT/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (TT/AG, CT/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (TT/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle.....	96
Tabela 28-	Comparação da soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/GA) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/GA, GA/AA) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/AA) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle.....	97
Tabela 29-	Comparação da soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/CT) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/CT, GA/TT) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/TT) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle.....	98

Tabela 30-	Comparação da soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/AG, GA/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle.....	99
Tabela 31-	Comparação da soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/AG, GA/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle.....	100
Tabela 32-	Comparação da soma do número de mães que possuem pelo menos um alelo variante para <i>MTRR</i> e/ou <i>MTR</i> e a soma do número de mães sem nenhum alelo alterado, com relação aos polimorfismos MTRR 66A>G e MTR 2756A>G, entre os grupos MSD e controle.....	101

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Características fenotípicas dos portadores de SD.....	41
Figura 2- Presença de prega de flexão palmar transversal única.....	42
Figura 3- Cariótipo constituído por 47 cromossomos, onde há três cópias do cromossomo 21 (47,XY,+21).....	44
Figura 4- Translocação Robertsoniana entre os cromossomos 14 e 21.....	45
Figura 5- A:Isocromossomo 21q;21q, B: Esquema ilustrando um isocromossomo 21q;21q.....	46
Figura 6- Mapa esquemático do cromossomo 21 mostrando regiões definidas como críticas da síndrome de Down. Fonte: Rahmani et al., 1989.....	48
Figura 7- Figura esquemática demonstrando o metabolismo do folato.....	54
Figura 8- Exemplo de eletroforese em gel de acrilamida 12%, corado com brometo de etídio, após análise dos genes <i>MTHFD-1</i> e <i>SHMT-1</i>	74
Figura 9- Exemplo de eletroforese em gel de acrilamida 12%, corado com brometo de etídio, após análise dos genes <i>MTR</i> e <i>RFC-1</i>	75
Figura 10- Exemplo de eletroforese em gel de acrilamida 12%, corado com brometo de etídio, após análise dos genes <i>MTRR</i> e <i>TCII</i>	76

LISTA DE QUADROS

	PÁG.
Quadro 1- Resultados das regressões logísticas univariadas para o estudo do risco de gestações com SD.....	89
Quadro 2- Resultados das regressões logísticas múltiplas.....	90
Quadro 3- Estudo da interação entre o polimorfismo <i>TCII</i> 776C>G e os outros polimorfismos enfocados nesse estudo.....	91

RESUMO

A síndrome de Down (SD) é uma aberração cromossômica atribuída à presença de três cópias dos genes localizados no cromossomo 21. Ocorre com uma frequência estimada de um indivíduo em 600 nascidos vivos e de uma em 150 concepções. Os mecanismos relacionados com a não-disjunção do cromossomo 21 não foram ainda elucidados e embora a idade materna avançada seja um fator de risco, a maioria das crianças com SD nasce de mães com menos de 30 anos. Um mecanismo proposto para explicar a não-disjunção cromossômica consiste na hipometilação do centrômero levando à formação anormal do cinetócoro e ligação anormal dos microtúbulos. Tal mecanismo teria uma etiologia multifatorial e entre os fatores genéticos estariam as variantes polimórficas de enzimas envolvidas no metabolismo do folato. A via bioquímica do folato pode influenciar a estabilidade do DNA de dois modos: o primeiro está relacionado com a função que o folato desempenha na transferência de unidades de 1-carbono para a biosíntese *de novo* de nucleotídeos. Baixa concentração intracelular de 5, 10-metilenoTHF leva a uma diminuição da síntese de timidilato e a incorporação errônea de dUTP durante a replicação do DNA; o segundo modo envolve a produção de S-adenosilmetionina (SAM), o principal doador de grupos metil para a maioria das reações de metilação, incluindo a metilação CpG. Baixa concentração intracelular de 5,10-metilenoTHF é associado com baixa produção de SAM e conseqüentemente com a hipometilação do DNA. Diante disso, o objetivo do trabalho foi determinar se os polimorfismos *MTHFD-1* 1958G>A, *TCII* 776C>G, *MTR* 2756A>G, *MTRR* 66 A>G, *RFC-1* 80G>A e *SHMT-1* 1420C>T representam fatores de risco para gestações com SD. Para isso foi realizada a técnica de PCR utilizando 200 amostras de DNAs de mães de portadores de SD (MSD) e 340 amostras de DNAs controles seguida por digestão enzimática dos produtos obtidos e análise estatística dos resultados. Comparando a distribuição genotípica no grupo MSD e controle foi observado que o polimorfismo *TCII* 776C>G apresentou uma diferença estatisticamente significativa: $\chi^2_{(2)} = 13,10$ e $p=0,0014$. Nossos resultados indicam que mulheres com genótipo heterozigoto para o polimorfismo *TCII* 776C>G possuem um risco duas vezes maior de gerarem crianças com SD.

ABSTRACT

Down syndrome is a chromosome abnormality caused by the presence of three copies of genes located in the chromosome 21. It occurs in an estimated frequency of one out of 600 liveborns and one out of 150 conceptions. The mechanism related to the non-disjunction of the chromosome 21 has not been totally understood and even though the mother's age is a risk factor, most DS children are born to mothers aged less than 30. One mechanism proposed to explain the chromosome non-disjunction is the centromeric hypomethylation that causes abnormal formation of kinetochore and abnormal links of the microtubules. Such a mechanism is thought to have a multifactorial etiology and among the genetic factors are polymorphic variants of enzymes involved in folate metabolism. The biochemical pathway of the folate influences the DNA stability in two ways: the first is related to the role of folate in one carbon unit transfer during "de novo" synthesis of nucleotides. Low levels of 5, 10-methylenetetrahydrofolate (5, 10-methyleneTHF) lead to a decrease in thymidylate synthesis and the misincorporation of the dUTP during replication of DNA; the second way involves the production of S-adenosyl methionine (SAM), the main donor of methyl to most methylation processes, including CpG methylation. Low intracellular 5,10-methyleneTHF is associated with low SAM production and consequently with DNA hypomethylation. Therefore, the purpose of the study was determining if the polymorphisms *MTHFD-1* 1958G>A, *TCII* 776C>G, *MTR* 2756A>G, *MTRR* 66A>G, *RFC-1* 80G>A e *SHMT-1* 1420C>T represent risk factors for DS pregnancies. So we used techniques of PCR followed by restriction enzyme analysis of 200 DNAs of mothers of DS children (MSD) and 340 DNAs of control mothers with statistic analyses of the results. Comparing the genotypic distribution in the groups MSD and control it has been observed that polymorphism *TCII* 776C>G showed a statistically remarkable difference: $\chi^2_{(2)} = 13,10$ e $p=0,0014$. Our results show that women that have heterozygote genotype for polymorphism *TCII* 776C>G have two times higher risk of generating DS children.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Aneuploidia

Aneuploidia é uma aberração cromossômica na qual o número de cromossomos não é múltiplo exato do número haplóide característico da espécie. As aneuploidias consistem em monossomias (presença de apenas uma cópia de um cromossomo em uma célula) e trissomia (três cópias de um cromossomo em uma célula) (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004). Ocorre em aproximadamente 0,3% dos nascidos vivos, 4% dos natimortos e em mais de 35% de todos os abortos espontâneos (Fritz et al., 2001; Hassold e Hunt, 2001).

A condição aneuplóide mais comum compatível com a sobrevivência a termo é a síndrome de Down (SD), descrita por John Langdon Down em 1866 (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

1.2- Síndrome de Down

A SD pode ser diagnosticada ao nascimento ou logo após por suas características dismórficas que variam entre os pacientes mas sempre produzem um fenótipo característico: ponte nasal baixa, fissuras palpebrais oblíquas para cima, orelhas pequenas e algumas vezes com aspecto dobrado peculiar, uma região malar e maxilar achatada, bochechas arredondadas, cantos da boca voltados para baixo, pescoço curto, occipital achatado e mãos e pés mais largos e curtos (*Figura 1*).



Figura 1- Características fenotípicas dos portadores de SD

Aproximadamente 50% dos indivíduos com SD possuem uma prega de flexão palmar transversal única (*Figura 2*).



Figura 2- Presença de prega de flexão palmar transversal única.

O tônus muscular diminuído (hipotonia) é uma característica altamente consistente, que ajuda a fazer o diagnóstico (Cooleu e Graham, 1991; Opitz e Gilbert-Barness, 1991; Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

Vários problemas médicos significativos ocorrem com frequência entre bebês e crianças com SD: obstrução do duodeno ou atresia do esôfago, duodeno ou ânus, perda de audição condutiva e algumas vezes neural, hipotireoidismo e anomalias nos olhos. Infecções respiratórias são muito comuns e o risco de desenvolver leucemia é 10 a 15 vezes maior quando comparado à população em geral. Aproximadamente 40% desses indivíduos nascem com defeitos estruturais do coração. O mais comum é um canal átrio-ventricular, um defeito no qual os septos interatrial e interventricular não se fundem normalmente durante o desenvolvimento fetal. O resultado é o fluxo de sangue do lado esquerdo do coração para o lado direito e, então, para a circulação pulmonar, produzindo

hipertensão pulmonar. Defeitos no septo ventricular também são comuns. (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

A SD é a mais importante causa genética de retardo mental ocorrendo com uma frequência estimada de um indivíduo em 600 nascidos vivos e uma em 150 concepções (Hassold et al., 2001).

1.3- Etiologia da Síndrome de Down

A SD é decorrente do excesso de material genético proveniente do cromossomo 21. Isto pode ocorrer por trissomia livre em todas as células do indivíduo, trissomia livre em parte das células do indivíduo (mosaicismo) e translocação cromossômica (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

1.3.1- Trissomia livre presente em todas as células

Em aproximadamente 95% dos portadores da SD observa-se um cromossomo 21 extra em todas as células, resultando num cariótipo constituído por 47 cromossomos (47, XY, +21 ou 47, XX, +21) (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004) (*FIG. 3*). O mecanismo genético que leva à trissomia livre é a não-disjunção, durante a meiose, do par de cromossomos homólogos (anáfase I), ou de cromátides irmãs (anáfase II) resultando na formação de um gameta com 24 cromossomos (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

A origem do cromossomo extra é materna em 93% dos casos e cerca de 75% dessas não-disjunções maternas ocorrem durante a meiose I (Lemaire-Adkins et al., 1997; Hunt & Lemaire-Adkins, 1998; Picton et al., 1998; Hobbs et al., 2000; Jorde et al., 2004).

O risco de recorrência é estimado em 1%. Irmãos de portadores não apresentam risco aumentado de terem crianças afetadas (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

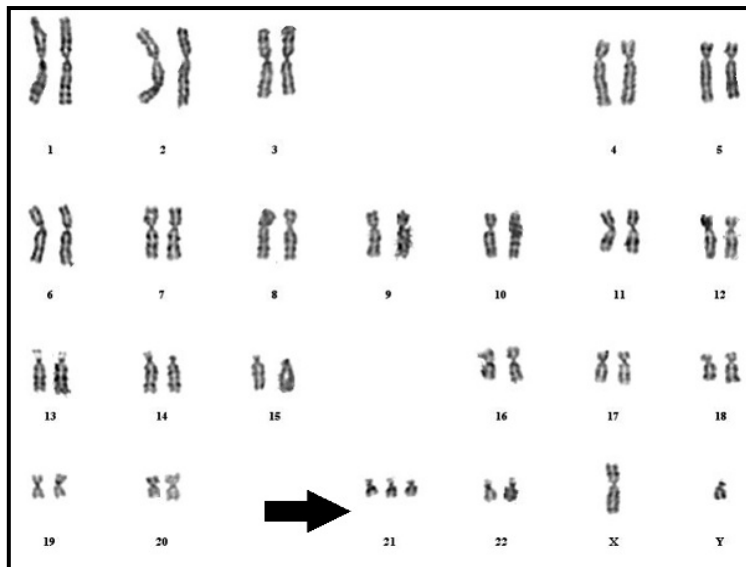


Figura 3- Cariótipo constituído por 47 cromossomos, onde há três cópias do cromossomos 21 (47, XY, +21).

1.3.2- Mosaicismo

O mosaicismo é visto em aproximadamente 2% a 4% dos nativos com SD. Esses indivíduos possuem algumas células somáticas normais e algumas células com trissomia do 21. O fenótipo pode ser mais brando, mas há uma ampla variabilidade de fenótipos entre os pacientes o que possivelmente reflete a proporção variável de células com três cópias do cromossomo 21 (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

1.3.3 - Rearranjos cromossômicos

Cerca de 4% dos pacientes com SD têm 46 cromossomos, um dos quais tem uma translocação robertsoniana entre o cromossomo 21q e o braço longo de um dos outros cromossomos acrocêntricos (em geral o cromossomo 14 ou 22) (*Figura 4*). Quando a mãe é a portadora da translocação, há um risco

estimado de 12% da mesma ter outra criança com SD e, quando o pai é portador da translocação o risco estimado é de 3%. A razão desse fato ainda não está esclarecida (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

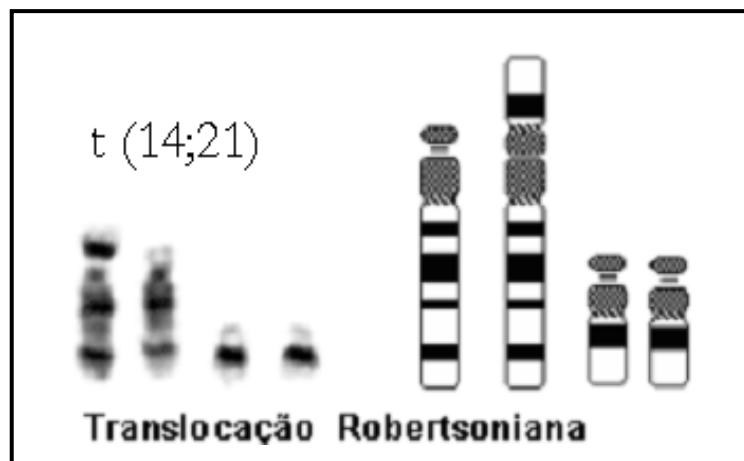


Figura 4- Translocação Robertsoniana entre os cromossomos 14 e 21.

Em cerca de 3/4 dos pacientes, essa translocação não está presente num dos genitores, mas é decorrente de um erro durante a gametogênese de um deles, originando um óvulo ou um espermatozóide portador de translocação. Nesses casos o risco de recorrência para nascimento de outros filhos afetados é de 2 a 3% (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

Em uma pequena proporção dos pacientes com SD é visto um cromossomo constituído de dois braços longos do cromossomo 21 (21q;21q) (*Figura 5*). Embora esta seja uma anomalia rara, ela é importante porque todos os gametas de um portador de tal cromossomo devem conter ou o cromossomo 21q;21q, com sua dose dupla de material genético, ou não apresentar nenhum representante do cromossomo 21. A prole, portanto, ou tem SD ou monossomia do 21 que raramente é viável (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

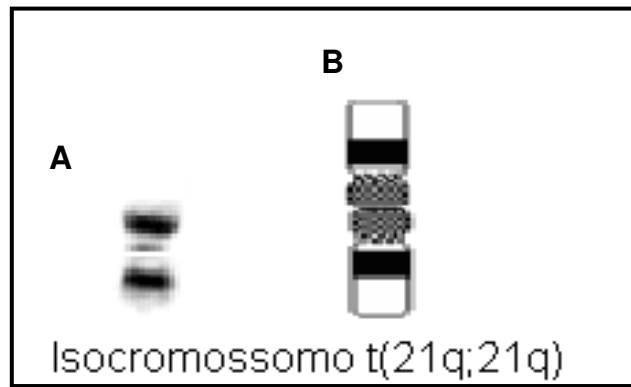


Figura 5- A: Isocromossomo 21q;21q. B: Esquema ilustrando um isocromossomo 21q;21q

Muito raramente a SD é diagnosticada em pacientes nos quais apenas uma parte do braço longo do cromossomo 21 está presente em triplicata. Estes pacientes são de particular interesse porque podem mostrar qual região do cromossomo 21 provavelmente é responsável por componentes específicos do fenótipo (Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

1.4- Efeito do desequilíbrio gênico

O cromossomo 21 representa cerca de 1 a 1,5% do genoma humano, sendo o menor cromossomo do complemento autossômico. O braço longo (21q) possui aproximadamente 37Mb. O braço curto (21p) consiste basicamente de uma região organizadora de nucléolo contendo múltiplas cópias de genes que codificam RNA ribossômico e uma região composta de seqüências de DNA altamente repetitivas (Antonarakis, 1998). Os genes localizados no braço curto parecem não ser essenciais para o desenvolvimento normal, já que a sua duplicação ou deleção geralmente resulta em poucas manifestações fenotípicas observáveis (Caponi, 2001).

Hattori et al. (2000) verificaram, após o seqüenciamento total do cromossomo 21, a existência de 225 genes e 59 pseudogenes, entretanto em um estudo mais recente Roizen e Patterson (2003) estimaram o conteúdo gênico em 329 genes, incluindo 165 genes confirmados experimentalmente, 150 modelos de genes baseados em bancos EST (“Expressed Sequence Tag”) e 14 predições computacionais.

Várias pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de delimitar uma região mínima responsável pela maioria das características da síndrome, entretanto ainda não há um consenso entre os pesquisadores. A princípio toda a região 21q22 foi considerada a região crítica. Dos genes mapeados no referido segmento cromossômico destacam-se: gene *APP* que codifica a proteína precursora amilóide; gene *CBS* (cistationina betasintase), relacionado a homocistinúria; gene *CD18*, associado à síndrome autossômica recessiva de baixa resistência a infecções bacterianas; e o gene *AML 1*, envolvido no subtipo M2 da leucemia mielóide aguda (Petreson, 1994) (*Figura 6*).

Korenberg et al. (1994) consideraram a região abaixo do *locus* D21S55 (21q22.3) como responsável pelas características da SD. Fuentes et al. (1995), entretanto, sugerem que a região localizada cerca de 3Mb ao redor do marcador D21S55 (21q22.3) seja a região que determina as manifestações clínicas.

Posteriormente Antonarakis (1998) definiu uma região de 4Mb entre os marcadores D21S17 (21q22.2) e ETS2 (21q22.3|21q22.2) como a região crítica. Os genes localizados nesse segmento cromossômico estariam relacionados com o retardo mental, hipotonia muscular, retardo de crescimento, frouxidão ligamentar, além de oito características dermatológicas e faciais.

Analisando pacientes com trissomia parcial Vidal-Taboada et al. (1998) mapearam uma segunda região entre os marcadores D21S55 (21q22.3) e MX1 (21q22.3) que inclui genes responsáveis por características dermatológicas e faciais (ponte nasal achatada, boca aberta, fendas palpebrais elevadas, pregas

epicânticas, língua protusa e perfil facial achatado) e, em alguns casos, demonstra estar associada à cardiopatia, retardamento mental e estenose duodenal.

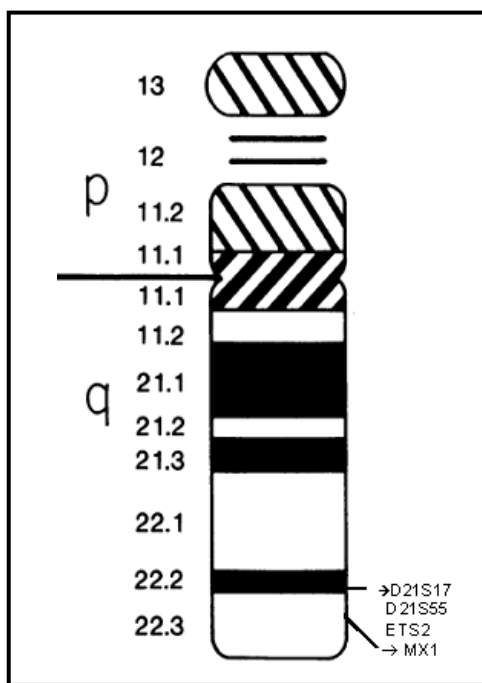


Figura 6- Mapa esquemático do cromossomo 21 mostrando regiões definidas como críticas da SD. Fonte: Rahmani et al., 1989.

1.5- Etiologia da não-disjunção

O motivo da não-disjunção cromossômica ainda é pouco compreendido. A alta porcentagem dos casos nos quais os gametas anormais se originam durante a meiose I materna sugere associação entre idade materna avançada e aumento na incidência da progênie com SD (Lamb et al., 1996; Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

Algumas hipóteses foram formuladas para tentar explicar as possíveis causas da interferência da idade materna, dentre elas a de que o longo período de suspensão da divisão celular na fase prófase I danificaria os componentes do fuso meiótico. Isso ocorreria devido a fatores intrínsecos ou ao acúmulo de danos

ambientais. Irradiação e íons de metais pesados, por exemplo, poderiam afetar os ovócitos através da produção intracelular de radicais livres ou efeitos oxidativos (Polani et al., 1960; Tease e Fisher, 1991; Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

Apesar da idade materna ser um fator de risco conhecido a maioria das crianças com SD nasce de mães com menos de trinta anos (James et al., 1999; Eskes, 2006). No estudo realizado por Gusmão et al. (2003) estimou-se em 43,6% o percentual de casos de SD dependentes da idade materna.

Um mecanismo proposto para explicar a não-disjunção cromossômica consiste em alterações no padrão de metilação do centrômero e da região pericentromérica. O centrômero é necessário para assegurar a distribuição eqüitativa dos cromossomos replicados às células filhas (Karpen e Allshire, 1997). A estrutura secundária da heterocromatina pericentromérica, nas seqüências-satélites repetitivas, está envolvida na ligação de proteínas ao DNA e na coesão entre cromátides irmãs (Renauld e Gasser, 1997; Clarke 1998; Cobb et al., 1999), portanto é uma estrutura de fundamental importância durante a divisão celular. Essas regiões são geralmente metiladas e proteínas como a MeCP2 se ligam a esses grupos metil num complexo com histonas-desacetilases, resultando numa desacetilação local e conseqüente condensação da cromatina requerida para uma segregação cromossômica normal. A hipometilação do DNA causaria uma instabilidade da cromatina centromérica e pericentromérica com conseqüente formação anormal do cinetócoro e ligação anormal dos microtúbulos levando a não-disjunção cromossômica (Adams, et al., 1990; Foss et al., 1993; Karpen e Allshire, 1997; Ji et al., 1997; James et al., 2003; Sciandrello et al., 2004; Wang et al., 2004; Bonadia et al., 2005; Martinez-Frias et al., 2006).

Estudos clínicos e experimentais dão suporte a uma associação entre a hipometilação do DNA e a instabilidade cromossômica, como por exemplo, estudos realizados com 5-azactidina, um potente agente desmetilante. Culturas de células tratadas com esse agente mostram uma descondensação pericentromérica e erros de segregação durante a divisão celular

(Leyton et al., 1995; Vig & Hallet, 2000). Os resultados obtidos por Lengauer et al. (1997) e Qu et al. (1998) também relatam uma associação entre instabilidade cromossômica e aneuploidias, observadas em tumores humanos, e hipometilação do DNA genômico.

A hipometilação ocorreria devido a múltiplos fatores e entre os fatores genéticos estariam as variantes polimórficas de enzimas envolvidas no metabolismo do Folato (Balaghi e Wagner, 1993; Pogribny et al., 1995; Fowler et al., 1998; Jacob et al., 1998; James, et al., 1999; Hobbs, et al., 2000; Barkai et al., 2003; Beetstra et al., 2005; Bonadia et al., 2005; Martinez-Frias et al., 2006).

Estudos sugerem que deficiência de folato resulta em quebra na fita de DNA (Blount et al., 1997; Pogribny et al., 1997; Duthie, 1999), recombinação cromossômica alterada (Knnutila et al., 1978; MacGregor et al., 1997) e segregação cromossômica aberrante (Libbus et al., 1990; Leyton et al., 1995; Chen et al., 1998; Titenko-Holland et al., 1998; James et al., 1999; Xu et al., 1999).

James et al. (1999) avaliaram 41 mães de portadores de SD e constataram uma concentração de folato no plasma significativamente menor do que a concentração encontrada no grupo controle.

Hobbs et al. (2000) relataram uma redução de 53% na frequência de micronúcleos (pequenos núcleos de cromatina presentes no citoplasma da célula decorrentes de quebra cromossômica ou segregação anormal) em mulheres que receberam 10mg de folato por dia, durante dois meses.

A principal função do folato é fornecer unidades de 1-carbono para a síntese de guanina, adenina, timina e para a síntese de metionina. A metionina reage com adenosina trifosfato para formar S-adenosilmetionina (SAM), essencial para reações de metilação, incluindo a metilação do DNA (Scholl e Jonhson, 2000; Eskes, 2006).

1.6- Folato

Folato é uma vitamina do complexo B. Caracteriza-se por ser um composto hidrossolúvel, amarelo e cristalino encontrado nos alimentos: espinafre, feijão branco, aspargos, verduras de folhas escuras, couve-de-bruxelas, soja e derivados, laranja, melão, maçã, brócolis, gema de ovo, fígado, peixes, gérmen de trigo, salsinha, beterraba crua e amendoim (Beetstra et al., 2005). Ácido fólico é a forma sintética do folato, encontrada em suplementos vitamínicos e alimentos fortificados (Beetstra et al., 2005).

Suprimento insuficiente de folato durante a gravidez está associado com acréscimo do risco de aborto espontâneo, nascimento prematuro, retardo do crescimento fetal, malformações nefrourológicas, cardiopatias congênitas e defeitos do tubo neural (DTN) (Castañer, 2003; El-Khairi et al., 2003; Marco et al., 2006).

O papel do ácido fólico no sistema nervoso central não se limita a sua formação e desenvolvimento como também se estende a sua preservação anatômica e funcional nas diferentes etapas da vida (Castañer, 2003).

Na infância os diferentes erros congênitos de absorção e de metabolismo do folato causam uma grande variedade de sintomas que incluem convulsões, atraso psicomotor e alterações de comportamento (Castañer, 2003).

A predisposição ao câncer mediada por folato se atribui a hipometilação do DNA, fragilidade cromossômica e incorporação de uridilato ao DNA ao invés de timidilato (Sutherland, 1979; Heath, 1996; Mason e Levesque, 1996; Kim, et al., 1997; Duthie, 1999).

O folato pode ser absorvido ao longo de todo o intestino delgado, preferencialmente no jejuno. Antes de sua absorção o folato da dieta necessita ser hidrolisado a monoglutamato pela enzima intestinal pteroilpoliglutamato hidrolase ou glutamil hidrolase, uma hexopeptidase zinco-dependente, que cliva a cadeia de poliglutamatos no primeiro resíduo (Hayashi et al., 2007) (*Figura 7*).

A etapa hidrolítica é seguida pelo transporte através da membrana celular realizado pela enzima **transportadora de folato reduzido 1 (RFC-1)** e por receptores membranares de folato. No interior da célula, é rapidamente reduzido para dar origem primeiro ao ácido 7,8-dihidrofólico (DHF) e em seguida ao ácido tetraidrofólico (THF) (Chango et al., 2000; Hishida et al., 2003; Hayashi et al., 2007) (*Figura 7*).

Metilenotetraidrofolato dehidrogenase (NADP dependente) 1 / meteniltetraidrofolato ciclohidrolase / formiltetraidrofolato sintetase (MTHFD1) cataliza a conversão do tetraidrofolato para o correspondente 10-formilTHF, 5,10-metenilTHF e 5,10-metilenTHF. 10-Formiltetraidrofolato e 5,10-metilenotetraidrofolato são doadores de cofatores para biosíntese *de novo* de purina e pirimidina e então para a biosíntese de DNA. MTHFD1 também desenvolve um papel no metabolismo de homocisteína fornecendo 5,10-metilenotetraidrofolato que é reduzido a 5-metiltehidrofolato (5-metilTHF) pela enzima metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR). 5-metilTHF fornece grupo metil para a conversão de homocisteína a metionina, assegurando desse modo o abastecimento de S-adenosilmetionina (SAM), principal doador de metil para a maioria das reações biológicas de metilação, incluindo a metilação do DNA (Zijno et al., 2003; Beetstra, et al., 2005; Hayashi et al., 2007; Biselli et al., 2008) (*Figura 7*).

A remetilação da homocisteína a metionina é catalizada pela **5-metiltetraidrofolato homocisteína metiltransferase (MTR)**, uma enzima vitamina B₁₂-dependente.

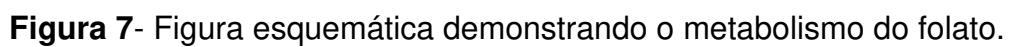
O aumento de homocisteína no plasma e nas células, decorrente da deficiência de folato ou vitamina B₁₂, é associada com complicações durante a gravidez tais como hipertensão, pré-eclampsia, restrição do crescimento intrauterino, rompimento da placenta, morte fetal, além de ser considerado um fator de risco para arteriosclerose, trombose e doenças cardíacas (Nelen et al., 2000; El-Khairi et al., 2003; Konrad et al., 2004; Meyer et al., 2004).

O transporte de vitamina B₁₂ para os tecidos é realizado pela **Transcobalamina II (TCII)**. A enzima **5-metiltetrahidrofolato-homocisteína metiltransferase redutase (MTRR)** mantém a MTR no estado ativo e por isso é de grande importância no metabolismo (Hayashi et al., 2007) (*Figura 7*).

Após ter doado o grupo metil, 5-metilTHF é convertido em tetrahidrofolato (THF). Subseqüentemente a enzima **serina hidroximetiltransferase citoplasmática (cSHMT-1)** cataliza a transferência reversível de um grupo hidroximetil da serina para o THF formando glicina e 5,10-metilenotetrahidrofolato (Brody et al., 2002; Herbig, et al., 2002; Hayashi et al., 2007) (*Figura 7*).

O substrato 5,10 metilenotetrahidrofolato é doador de radical monocarbonado para metilação irreversível de desoxiuracila monofosfato (dUMP) a desoxitimina monofosfato (dTMP). A síntese de dTMP resulta na oxidação do 5,10 metilenotetrahidrofolato para DHF que é posteriormente convertido a THF (Herbig, et al., 2002; Hishida, et al., 2003) (*Figura 7*).

Desse modo, o presente estudo sugere que metabolismo anormal do folato, devido a polimorfismos que prejudicam o funcionamento das enzimas MTHFD-1, TCII, MTR, MTRR, RFC-1 e SHMT-1, afetaria a metilação e a síntese de DNA tendo como conseqüência a não-disjunção do cromossomo 21.



1.7- Aspectos genéticos

1.7.1- *MTHFD-1*

O gene *MTHFD-1* codifica uma proteína citoplasmática que possui três atividades enzimáticas distintas: 5,10-metilenotetrahidrofolato dehidrogenase, 5,10-meteniltetrahidrofolato ciclohidrolase e 10-formiltetrahidrofolato sintetase. Cada uma dessas atividades catalisa uma de três reações sequenciais na conversão de unidades de 1-carbono derivados do tetrahidrofolato. As atividades enzimáticas são conferidas por dois domínios principais: uma porção aminoterminal que contém as atividades de dehidrogenase e ciclohidrolase e um domínio maior que contém a atividade de sintetase (Wang et al., 2007).

Esse gene localiza-se no cromossomo 14 na região 14q24, consiste em 28 *exons* e a proteína possui 935 aminoácidos (Howard et al., 2003, Marco, et al., 2006).

O SNP (polimorfismo em um único nucleotídeo) *MTHFD1* 1958G>A leva a troca do aminoácido arginina pelo aminoácido glutamina e está associada ao aumento no risco de nascimento de crianças com DTN, câncer gástrico, desordem bipolar e esquizofrenia (Brody et al., 2002; Parle-McDermott et al., 2006; Kempisty et al., 2007; Wang et. al, 2007).

O polimorfismo G1958A encontra-se no domínio 10-formiltetrahidrofolato sintetase. Cheng et al. (2005), Li et al. (2005) e Wang et al. (2007) sugerem que essa alteração pode ter uma consequência funcional para a enzima, uma vez que essa substituição de aminoácidos foi também associada a alterações no nível de folato sérico e homocisteína em famílias com doença cardíaca congênita.

1.7.2- *SHMT-1*

O gene *SHMT-1* localiza-se no cromossomo 17 na região 17p11.2, consiste em 12 *exons* e a proteína possui 125 aminoácidos. O *splicing* alternativo desse gene resulta em dois transcritos diferentes: *SHMT-1* e *SHMT-2* que codificam, respectivamente, as isoformas presentes no citoplasma e na mitocôndria (Stover et al., 1997; Girgis et al., 1998).

O SNP *SHMT-1* 1420C>T foi avaliado quanto a uma possível associação com aumento no risco de gerar crianças com DTNs. O resultado desse estudo relatou que o genótipo TT era mais freqüente no grupo controle (Heil et al., 2001).

Heil et al. (2001) observaram uma redução de folato no plasma e nas células sanguíneas vermelhas em indivíduos com genótipo CC.

1.7.3- *RFC-1*

O gene *RFC-1* localiza-se no cromossomo 21 na região 21q22.3, consiste em 25 *exons* e a proteína tem 1148 aminoácidos (***on-line 1***).

O SNP *RFC-1* 80G>A leva a troca do aminoácido histidina pelo aminoácido arginina (Chango et al., 2000; Marco et al., 2003).

A presença do alelo variante A foi associada com pressão sanguínea alta em populações idosas. Diante disso, Dufficy et al. (2006) sugerem que o polimorfismo G80A causa um dano funcional à enzima.

1.7.4- *MTRR*

O gene *MTRR* localiza-se no cromossomo 5 na região 5p15.3-p15.2, consiste em 15 *exons* e a proteína tem 725 aminoácidos (***on-line 2***).

A vitamina B12, cofator da enzima MTR, torna-se oxidada levando à inatividade da MTR. A regeneração dessa enzima é obtida por um sistema complexo de oxi-redução dependente de NADPH catalisado pela MTRR (Vilaseca et al., 2003).

O polimorfismo *MTRR* 66A>G leva a troca de uma isoleucina por uma metionina (Wilson et al., 1999). O efeito bioquímico dessa substituição é ainda desconhecimento e tem sido associado a hiperhomocisteinemia, DTN e diversos tipos de cânceres (Zijno et al., 2003; Wilson et al., 1999).

1.7.5- *MTR*

O gene *MTR* localiza-se no cromossomo 1 na região 1q43, consiste em 33 *exons* e a proteína tem 1265 aminoácidos (Gos e Szpecht-Potocka, 2002).

O polimorfismo *MTR* 2756A>G leva a troca de um ácido aspártico por uma glicina e está associado com aumento no risco de linfoma maligno, hiperhomocisteinemia, homocistinúria, anemia megaloblástica, DTN e câncer de bexiga (Fenton e Rosenberg, 1995; Rosenblatt, 1995; Christensen et al., 1999; Habib et al., 2005; Ouerhani et al., 2007).

1.7.6- *TCII*

O gene *TCII* localiza-se no cromossomo 22 na região 22q12.2, consiste em 9 *exons* e a proteína tem 427 aminoácidos (***on-line 3***).

Estudos indicam que o SNP *TCII* 776C>G causaria uma perda de afinidade da enzima transcobalamina com a vitamina B₁₂ devido a alterações no sítio de ligação ou a modificações na estrutura secundária da enzima (Afman et al., 2001; Afman et al, 2002) e alterações no nível de transcrição do gene *TCII* (Namour et al., 1998; Namour et al., 2001; Böttiger e Nilsson 2007)

Esse polimorfismo está associado com hiperhomocistemia, fenda labial com ou sem fenda palatina, acréscimo no risco genético de aborto espontâneo e de crianças afetadas por DTN (Afman et al., 2002; Castel-Dunwoody et al., 2005; Martinelli et al., 2006).

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Determinar, através de um estudo de associação, se a presença dos polimorfismos *MTHFD-1* 1958G>A, *TCII* 776C>G, *MTR* 2756A→G, *MTRR* 66A>G, *RFC-1* 80G>A e *SHMT-1* 1420C>T representam fatores genéticos de risco para o nascimento de crianças com SD.

2.2- Objetivos específicos

- Determinar a frequência alélica, na amostra CONTROLE e de mães de portadores de SD (MSD), dos polimorfismos:
- 1958G>A do gene *MTHD-1*;
- 776C>G do gene *TCII*;
- 2756A>G do gene *MTR*;
- 66 A>G do gene *MTRR*;
- 80G>A do gene *RFC-1*;
- 1420C>T do gene *SHMT-1*.
- Verificar se a distribuição genotípica dos polimorfismos estudados difere significativamente entre MSD e controle.

3- JUSTIFICATIVA

A trissomia do cromossomo 21 ocorre com uma alta frequência na população mundial, em todas as raças e em ambos os sexos. Embora a idade materna avançada seja um fator de risco, estudos relatam que a maioria dos portadores de SD nasce de mães com menos de trinta anos. Diante desses fatos e da importância clínica dessa síndrome, esforços consideráveis têm sido dedicados para definir a causa da não-disjunção do cromossomo 21.

Trabalhos recentes dão suporte a uma associação entre a hipometilação do DNA, instabilidade cromossômica e segregação anormal. Assim sendo, com a finalidade de contribuir para a descoberta de mecanismos genéticos que aumentam o risco de SD, foram escolhidas como foco deste estudo variantes polimórficas de enzimas envolvidas no metabolismo do folato, uma via bioquímica importante na síntese e metilação do DNA.

A escolha dos polimorfismos foi baseada no suposto dano funcional que esses causam nas enzimas, visto que dados da literatura os associam com outras manifestações clínicas.

4- CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1- Aspectos éticos da pesquisa

O presente estudo foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM-UNICAMP e teve início após aprovação (Anexo 1).

4.2- Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de associação, ou seja, do tipo caso-controle. O estudo de associação é eficaz para detectar fatores de predisposição associados a doenças complexas (Strachan e Reado, 2002b).

4.3- Casuística

Foram analisados 200 MSD, com idade menor que 35 anos.

O grupo controle foi constituído de 340 mães, também com idade menor que 35 anos, que não tiveram filhos com aberrações cromossômicas, defeito de tubo neural e também não relataram terem sofrido aborto.

Todos os casos de síndrome de Down incluídos no estudo foram originados por trissomia livre (47,XX,+21 ou 47,XY,+21).

O poder estatístico da amostra, calculado através do programa computacional G*Power3, versão 3.0.5, foi de 99% (Faul et al., 2007).

4.4- Métodos

Os DNAs utilizados na pesquisa fazem parte do Banco de DNAs do Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP.

A análise do polimorfismo 1958G>A do gene *MTHFD-1* foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguido por digestão enzimática conforme descrito por Konrad et al. (2004). A substituição leva à perda de um sítio de restrição para a endonuclease *MspI*.

A análise do polimorfismo 1420C>T do gene *SHMT-1* foi realizada por PCR seguido por digestão enzimática conforme descrito por Heil et. al. (2001). A substituição leva à perda de um sítio de restrição para a endonuclease *Eam* 1104I.

A análise do polimorfismo 80G>A do gene *RFC-1* foi realizada por PCR seguido por digestão enzimática conforme descrito por Chango et al. (2000). A substituição leva à perda de um sítio de restrição para a endonuclease *CfoI*.

A análise do polimorfismo 2756A>G do gene *MTR* foi realizada por PCR seguido por digestão enzimática conforme descrito por Leclerc et al. (1996). A substituição cria um sítio de restrição para a endonuclease *HaeIII*.

A análise do polimorfismo 66A>G do gene *MTRR* foi realizada por PCR seguido por digestão enzimática conforme descrito por Wilson et al. (1999). A substituição leva à perda de um sítio de restrição para a endonuclease *NdeI*.

A análise do polimorfismo 776C>G do gene *TCII* foi realizada por PCR seguido por digestão enzimática conforme descrito por Miller et al. (2002). A substituição leva à perda de um sítio de restrição para a endonuclease *MvaI*.

4.4.1- PCR

A técnica de PCR, descrita por Saiki et al (1989), possibilita a amplificação de uma pequena sequência de DNA.

A dupla fita de DNA genômico é primeiramente aquecida a uma temperatura relativamente alta e então ocorre a quebra das pontes de hidrogênio e separação das fitas (desnaturação). Duas seqüências de oligonucleotídeos,

denominados iniciadores, hibridizam, em fitas opostas, às bases complementares flangeadoras do segmento a ser copiado (anelamento). A partir do iniciador uma DNA polimerase adiciona nucleotídeos complementares a fita molde produzindo uma nova molécula (extensão).

As etapas de desnaturação, anelamento e extensão se repetem várias vezes levando ao acúmulo exponencial do fragmento de DNA alvo.

O procedimento utilizado em cada uma das reações está resumido na Tabela 1. Os iniciadores e os tamanhos dos fragmentos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1- Concentração dos reagentes utilizados e condições das PCRs na investigação dos polimorfismos gênicos.

Reagentes	<i>MTHFD-1</i> 1958G>A	<i>SHMT-1</i> 1420C>T	<i>RFC-1</i> 80G>A	<i>MTR</i> 2756A>G	<i>MTRR</i> 66A>G	<i>TCII</i> 776C>G
DNA	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng	50ng
Tris-HCl (pH 8,8 à 25°C)	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM	10mM
KCl	50mM	50mM	50mM	--	--	50mM
MgCl ₂	1,5mM	1,5mM	1,5mM	2,5mM	2,5mM	1.5mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	--	--	--	20mM	20mM	--
dNTP	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
Iniciadores(μM-cada)	2μM	2μM	2μM	2μM	2μM	2μM
<i>Taq</i> DNA polimerase (unidades)	1U	1U	1U	1U	1U	1U
Volume final da reação	25μL	25μL	25μL	25μL	25μL	25μL
Condições	94°C/2'	94°C/2'	94°C/2'	94°C/2'	94°C/2'	94°C/2'
(35 ciclos)	94 °C/1'	94 °C/1'	94 °C/1'	94 °C/1'	94 °C/1'	94 °C/1'
	<u>57 °C/1'</u>	<u>64 °C/1'</u>	<u>64 °C/1'</u>	<u>54 °C/1'</u>	<u>60 °C/1'</u>	<u>64 °C/1'</u>
	72 °C/2'	72 °C/2'	72 °C/2'	72 °C/2'	72 °C/2'	72 °C/2'
	72 °C/7'	72 °C/7'	72 °C/7'	72 °C/7'	72 °C/7'	72 °C/7'
Nº Ciclos	35	35	35	35	35	35

Tabela 2- Descrição dos iniciadores utilizados em cada reação e dos tamanhos dos fragmentos obtidos em pares de base.

Polimorfismo		Seqüência	Tamanho do fragmento
<i>MTHFD-1</i> 1958G>A	Senso	5'CCCACTTTGAAGCAGGATTG 3'	232 pb
	Anti-senso	5'CATCCCAATTCCCCTGATG 3'	
<i>SHMT-1</i> 1420C>T	Senso	5'AGAGTTCAAGGAGAGACTGGCAG 3'	217 pb
	Anti-senso	5'GTCAACAGTTCCCCTTTGGAGC 3'	
<i>RFC-1</i> 80G>A	Senso	5'AGTGTCACCTTCGTCCCCTC 3'	230 pb
	Anti-senso	5'CTCCCGCGTGAAGTTCTT 3'	
<i>MTR</i> 2756A>G	Senso	5'CATGGAAGAATATGAAGATATTAGAC 3'	189 pb
	Anti-senso	5'GAACTAGAAGACAGAAATTCTCTA 3'	
<i>MTRR</i> 66A>G	Senso	5'CAGGCAAAGGCCATCGCAGAAGACAT 3'	151 pb
	Anti-senso	5'CACTTCCCAACCAAAATTCTTCAAAG 3'	
<i>TCII</i> 776C>G	Senso	5'GTCAGGTGCTGGAACACCTAG 3'	218 pb
	Anti-senso	5'TAGGTCTTGTGGTTCAGAACG 3'	

4.4.2- Digestão enzimática

Após a PCR, cada produto obtido foi submetido à digestão com enzima de restrição específica. Todas as reações foram realizadas com incubação de 16 horas. As concentrações das enzimas, temperaturas de reação, bem como os tamanhos dos fragmentos esperados após análise de cada polimorfismo, estão resumidos nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3- Condições das reações de digestão enzimática

Enzima de restrição	Quantidade (U)/15µL de PCR	Temperatura °C
<i>MspI</i>	3	37
<i>MvaI</i>	3	37
<i>HaeIII</i>	3	37
<i>NdeI</i>	5	37
<i>CfoI</i>	5	37
<i>Eam 1104I</i>	5	37

Tabela 4- Tamanho dos fragmentos esperados, para cada genótipo, após digestão enzimática específica.

Polimorfismo	Genótipos		
	Tamanho dos fragmentos em pares de base		
<i>MTHFD-1</i> 1958G>A	GG	GA	AA
	125 e 107	232, 125 e 127	232
<i>TCII</i> 776C>G	CC	CG	GG
	128 e 90	218, 128 e 90	218
<i>MTR</i> 2756A>G	AA	AG	GG
	189	189;159 e 30	159 e 30
<i>MTRR</i> 66 A>G	AA	AG	GG
	126 e 25	151, 126 e 25	151
<i>RFC-1</i> 80G>A	GG	GA	AA
	125, 68 e 37	162, 125, 68 e 37	162 e 68
<i>SHMT-1</i> 1420C>T	CC	CT	TT
	131 e 86	217, 131 e 86	217

As figuras 8, 9 e 10 ilustram as eletroforeses, após digestão com enzima de restrição específica para análise de cada um dos polimorfismos analisados neste estudo.

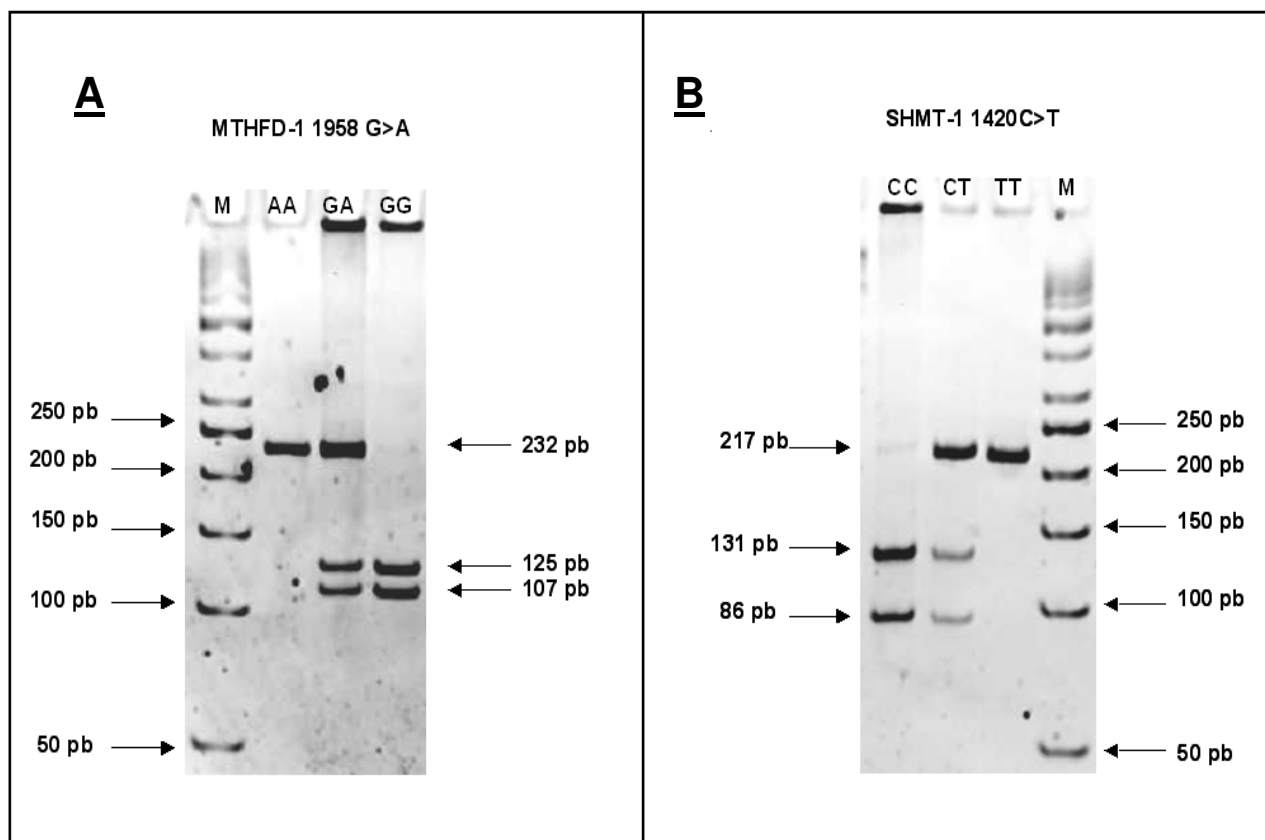


Figura 8- Eletroforese em gel de acrilamida 12%, corado com brometo de etídio. M= marcador de 50 pares de base. **A**: análise do polimorfismo *MTHFD-1* 1958G>A; genótipo AA gera um fragmento de 232 pb, genótipo GA gera fragmentos de 232pb, 125pb e 107pb, genótipo GG gera fragmentos de 125pb e 107 pb. **B**: análise do polimorfismo *SHMT-1* 1420C>T; genótipo CC gera fragmentos de 131pb e 86pb, genótipo CT gera fragmentos de 217pb, 131pb e 86pb, genótipo TT gera um fragmento de 217pb.

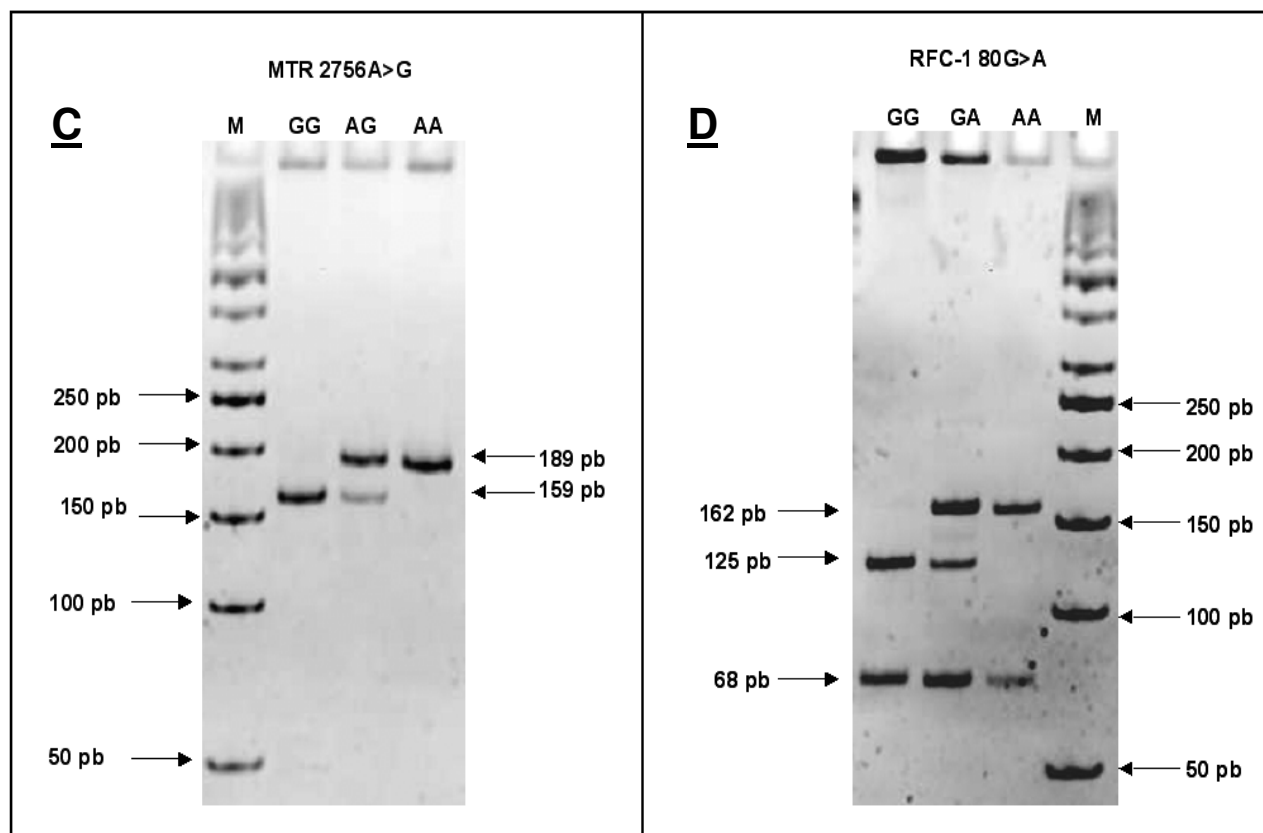


Figura 9- Eletroforese em gel de acrilamida 12%, corado com brometo de etídio. M= marcador de 50 pares de base. **C:** análise do polimorfismo *MTR* 2756A>G; genótipo GG gera um fragmento de 159 pb, genótipo AG gera fragmentos de 189pb e 159pb, genótipo AA gera um fragmento de 189pb. **D:** análise do polimorfismo *RFC-1* 80G>A; genótipo AA gera fragmentos de 162pb e 68pb, genótipo GA gera fragmentos de 162pb, 125pb e 68pb, genótipo GG gera fragmentos de 125pb e 68pb.

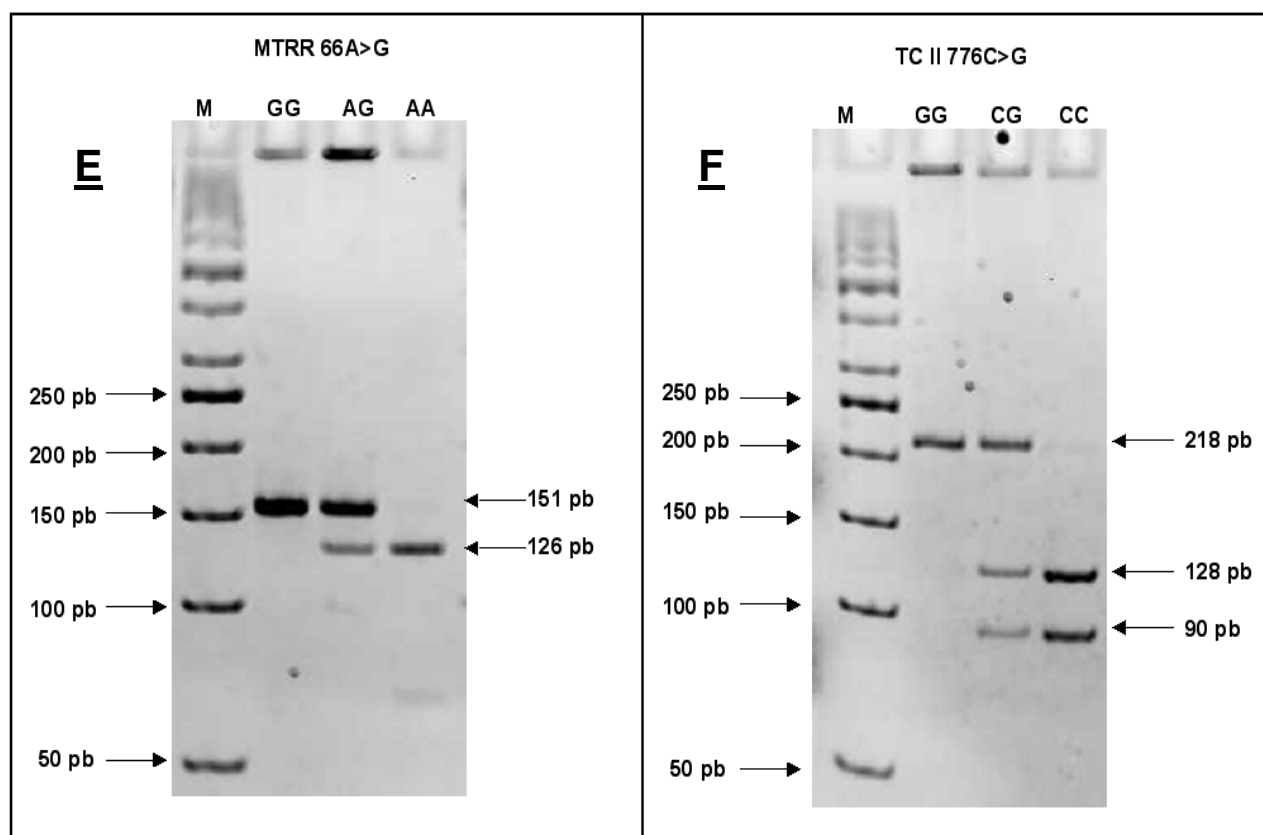


Figura 10- Eletroforese em gel de acrilamida 12%, corado com brometo de etídio. M= marcador de 50 pares de base. **E**: análise do polimorfismo *MTRR* 66A>G; genótipo GG gera um fragmento de 151 pb, genótipo AG gera fragmentos de 151pb e 126pb, genótipo AA gera um fragmento de 126pb. **F**: análise do polimorfismo *TCII* 776C>G; genótipo GG gera um fragmento de 218pb, genótipo CG gera fragmentos de 218pb, 128pb e 90pb, genótipo CC gera fragmentos de 128pb e 90pb.

4.5- Análise dos dados

Para comparar as variáveis categóricas (polimorfismos) entre os grupos MSD e controle, foram utilizados teste Qui-quadrado e o teste *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95% (Fleiss, 1981). Para verificar se as variantes polimórficas dos genes estudados encontravam em equilíbrio de

Hardy-Weinberg foi utilizado o teste de Qui-quadrado. Esses testes foram realizados no programa computacional EpiInfo 2007 TM, versão 3.4.1.

Para analisar conjuntamente os polimorfismos entre os grupos, foi utilizada a análise de regressão logística (Conover, 1971; Siegel, 1975; Hosmer e Lemesho, 1989). Inicialmente foi realizada a análise univariada e em seguida, a análise multivariada usando o critério “*Stepwise*” de seleção das variáveis. Essa análise foi realizada utilizando o programa *SAS System for Windows (Statistical Analysis System)* versão 9.1.3.

Foram considerados significativos, resultados onde $p < 0,01$. Não foram necessárias correções nos valores de p obtidos nas comparações de frequências alélicas e distribuições genotípicas entre grupo MSD e controle pois o número de análises realizadas foi compatível com o nível de significância ($\alpha = 0,01$) adotado.

As correções dos valores de p obtidos nas análises de regressão logística múltipla e univariada foram realizadas por meio do método de Bonferroni (Agresti, 1990) utilizando a função *p.adjust* em ambiente R (R Development Core Team, 2007).

Na análise de OR, foram considerados significativos os valores nos quais o limite inferior do intervalo de confiança (IC=95%) foi maior que 1.

5- RESULTADOS

5.1- Caracterização da amostra

A idade das mães de crianças portadoras de SD (grupo MSD) variou de 24 a 35 anos (**média**=29,01; **desvio padrão**=2,18). Já no grupo controle a idade das mães variou de 29 a 35 anos (**média**=30,8; **desvio padrão**=1,46). Com relação à origem étnica, 92% das MSD eram caucasóides e 8% negróides, enquanto que 88% dos controles eram caucasóides e 12% negróides.

5.2- Análise *MTHFD-1* 1958G>A

Como ilustra a Tabela 5, em relação às variantes do gene *MTHFD-1*, tanto o grupo MSD quanto o grupo controle estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 5- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação à distribuição genotípica do gene *MTHFD-1*.

MSD			controle		
	Observado	Esperado		Observado	Esperado
GG (p^2)	55	58	$\chi^2_{(2)}=0,36$ $p=0,83$	101	107
GA ($2pq$)	105	99		178	167
AA (q^2)	40	43		61	66
TOTAL	200	200		340	340

A distribuição genotípica e as frequências alélicas do grupo MSD e controle estão descritas, respectivamente, nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6- Distribuição genotípica do polimorfismo 1958G>A, do gene *MTHFD-1*, nos grupos MSD e controle.

<i>Genótipo</i>	<i>MSD</i>	<i>controle</i>	TOTAL
GG	55 (27,5%)	101 (29,7%)	156 (28,9%)
GA	105 (52,5%)	178 (52,3%)	283 (52,4%)
AA	40 (20%)	61 (18%)	101 (18,7%)
TOTAL	200 (100%)	340 (100%)	540 (100%)

Tabela 7- Frequência dos alelos G e A, do gene *MTHFD-1*, em 200 MSD e 340 controles.

	MSD	controle
f(G)	0,54	0,56
f(A)	0,46	0,44

Com relação à distribuição genotípica, não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2_{(2)}=0,5$; $p=0,78$).

A frequência dos alelos G e A também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2=0,08$; $p=0,77$; *Odds Ratio*=0,92<0,51<OR<1,67>).

5.2- Análise *SHMT-1* 1420C>T

Como ilustra a Tabela 8, em relação às variantes do gene *SHMT-1*, tanto o grupo MSD quanto o grupo controle estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 8- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação à distribuição genotípica do gene *SHMT-1*.

	MSD			controle		
	Observado	Esperado		Observado	Esperado	
CC (p^2)	90	92	$\chi^2_{(2)}=0,39$ $p=0,82$	144	157	$\chi^2_{(2)}=4,99$ $p=0,08$
CT ($2pq$)	92	87		173	148	
TT (q^2)	18	21		23	35	
TOTAL	200	200		340	340	

A distribuição genotípica e as frequências alélicas dos grupos MSD e controle estão descritas, respectivamente, nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9- Distribuição genotípica do polimorfismo 1420C>T, do gene *SHTM-1*, nos grupos MSD e controle.

<i>Genótipo</i>	<i>MSD</i>	<i>controle</i>	TOTAL
CC	90 (45%)	144 (42,3%)	234 (43,3%)
CT	92 (46%)	173 (51%)	265 (49,1%)
TT	18 (9%)	23 (6,7%)	41 (7,6%)
TOTAL	200 (100%)	340 (100%)	540 (100%)

Tabela 10- Frequência dos alelos C e T, do gene *SHMT-1*, em 200 MSD e 340 controles.

	<i>MSD</i>	<i>controle</i>
f(C)	0,68	0,68
f(T)	0,32	0,32

Com relação à distribuição genotípica não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2_{(2)} = 1,64$; $p = 0,44$).

A frequência dos alelos C e T foi igual nos grupos MSD e controle ($\chi^2 = 0,00$; $p = 1,00$; *Odds Ratio* = $1,00 < 0,53 < OR < 1,89 >$).

5.3- Análise *RFC-1* 80G>A

Como ilustra a Tabela 11, em relação às variantes do gene *RFC-1*, tanto o grupo MSD quanto o grupo controle estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 11- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação a distribuição genotípica do gene *RFC-1*.

MSD			controle			
	Observado	Esperado		Observado	Esperado	
GG(p ²)	53	56	χ ² ₍₂₎ =0,36 p=0,83	101	99	χ ² ₍₂₎ =0,24 p=0,89
GA(2pq)	106	100		163	169	
AA(q ²)	41	44		76	72	
TOTAL	200	200		340	340	

A distribuição genotípica e as frequências alélicas dos grupos MSD e controle estão descritas, respectivamente, nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12- Distribuição genotípica do polimorfismo 80G>A, do gene *RFC-1*, nos grupos MSD e controle.

<i>Genótipo</i>	<i>MSD</i>	<i>controle</i>	<i>TOTAL</i>
GG	53 (26,5%)	101 (29,7%)	154 (28,5%)
GA	106 (53%)	163 (48%)	269 (49,8%)
AA	41 (20,5%)	76 (22,3%)	117 (21,7%)
TOTAL	200 (100%)	340 (100%)	540 (100%)

Tabela 13- Frequência dos alelos G e A, do gene *RFC-1*, em 200 MSD e 340 controles.

	<i>MSD</i>	<i>controle</i>
f(G)	0,53	0,54
f(A)	0,47	0,46

Com relação à distribuição genotípica não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2_{(2)} = 1,3$; $p = 0,52$).

A frequência dos alelos G e A também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2 = 0,02$; $p = 0,89$; $Odds\ Ratio = 0,96 < 0,53 < OR < 1,74 >$).

5.4- Análise *MTR* 2756A>G

Como ilustra a Tabela 14, em relação às variantes do gene *MTR*, tanto o grupo MSD quanto o grupo controle estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 14- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação à distribuição genotípica do gene *MTR*.

MSD			controle			
	Observado	Esperado		Observado	Esperado	
AA(p²)	115	114	χ² (2) =0,07 p=0,96	218	212	χ² (2) =1,02 p=0,60
AG(2pq)	72	74		103	113	
GG(q²)	13	12		19	15	
TOTAL	200	200		340	340	

A distribuição genotípica e as frequências alélicas dos grupos MSD e controle estão descritas, respectivamente, nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15- Distribuição genotípica do polimorfismo 2756A>G, do gene *MTR*, nos grupos MSD e controle.

<i>Genótipo</i>	<i>MSD</i>	<i>controle</i>	<i>TOTAL</i>
AA	115 (57,5%)	218 (64,1%)	333 (61,6%)
AG	72 (36%)	103 (30,3%)	175 (32,4%)
GG	13 (6,5%)	19 (5,6%)	32 (6%)
<i>TOTAL</i>	200 (100%)	340 (100%)	540 (100%)

Tabela 16- Frequência dos alelos A e G, do gene *MTR*, em 200 MSD e 340 controles.

	<i>MSD</i>	<i>controle</i>
f(A)	0,75	0,79
f(G)	0,25	0,21

Com relação à distribuição genotípica não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2_{(2)}=2,34$; $p=0,31$).

A frequência dos alelos A e G também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2=0,45$; $p=0,50$; *Odds Ratio*=0,80<0,39<OR<1,62>).

5.5- Análise *MTRR* 66A>G

Como ilustra a Tabela 17, em relação às variantes do gene *MTRR*, tanto o grupo MSD quanto o grupo controle **não** estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 17- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação à distribuição genotípica do gene *MTRR*.

	MSD			controle		
	Observado	Esperado		Observado	Esperado	
AA(p^2)	14	39	$\chi^2_{(2)}=37,5$ $p=0,00000001$	34	72	$\chi^2_{(2)}=26,37$ $p=0,000002$
AG($2pq$)	146	98		246	169	
GG(q^2)	40	63		60	99	
TOTAL	200	200		340	340	

A distribuição genotípica e as frequências alélicas dos grupos MSD e controle estão descritas, respectivamente, nas Tabelas 18 e 19.

Tabela 18- Distribuição genotípica do polimorfismo 66A>G, do gene *MTRR*, nos grupos MSD e controle.

<i>Genótipo</i>	<i>MSD</i>	<i>controle</i>	TOTAL
AA	14 (7%)	34 (10%)	48 (8,9%)
AG	146 (73%)	246 (72,4%)	392 (72,6%)
GG	40 (20%)	60 (17,6%)	100 (18,5%)
TOTAL	200 (100%)	340 (100%)	540 (100%)

Tabela 19- Frequência dos alelos A e G, do gene *MTRR*, em 200 MSD e 340 controles.

	<i>MSD</i>	<i>controle</i>
f(A)	0,44	0,46
f(G)	0,56	0,54

Com relação à distribuição genotípica não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2_{(2)} = 1,66$; $p = 0,44$).

A frequência dos alelos A e G também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2 = 0,08$; $p = 0,78$; *Odds Ratio* = $0,92 < 0,51 < OR < 1,67 >$).

5.6- Análise *TCII* 776C>G

Como ilustra a Tabela 20, em relação às variantes do gene *TCII*, tanto o grupo MSD quanto o grupo controle estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 20- Equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação à distribuição genotípica do gene *TCII*.

MSD			controle			
	Observado	Esperado		Observado	Esperado	
CC(p²)	54	60	χ² (2) =2,11 p=0,35	141	131	χ² (2) =2,04 p=0,36
CG(2pq)	113	99		142	160	
GG(q²)	33	41		57	49	
TOTAL	200	200		340	340	

A distribuição genotípica e as freqüências alélicas dos grupos MSD e controle estão descritas, respectivamente, nas Tabelas 21 e 22.

Tabela 21- Distribuição genotípica do polimorfismo 776C>G, do gene *TCII*, nos grupos MSD e controle.

<i>Genótipo</i>	<i>MSD</i>	<i>controle</i>	<i>TOTAL</i>
CC	54 (27%)	141 (41,5%)	195 (36,1%)
CG	113 (56,5%)	142 (41,7%)	255 (47,2%)
GG	33 (16,5%)	57 (16,7%)	90 (16,7%)
<i>TOTAL</i>	<i>200 (100%)</i>	<i>340 (100%)</i>	<i>540 (100%)</i>

Tabela 22- Freqüência dos alelos C e G, do gene *TCII*, em 200 MSD e 340 controles.

	<i>MSD</i>	<i>controle</i>
f(C)	0,55	0,62
f(G)	0,45	0,38

Comparando o número de indivíduos com os genótipos CC, CG e GG entre os grupos MSD e controle observa-se uma diferença estatisticamente significativa ($\chi^2_{(2)} = 13,10$; $p = 0,0014$).

A frequência dos alelos C e G não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos MSD e controle ($\chi^2=1,00$; $p=0,32$; *Odds Ratio*=0,75 <0,41<OR<1,37>).

5.7- Análise de regressão logística univariada

Os resultados das regressões logísticas univariadas, para avaliação do efeito dos genótipos heterozigoto e homozigoto mutante no risco de nascimentos com SD, estão demonstrados no Quadro 1.

Quadro1- Resultados das regressões logísticas univariadas para estudo do risco de gestações com SD.

Variável	Níveis de comparação	Parâmetro estimado	Erro padrão	p-valor	p-valor corrigido*	Odds Ratio	IC 95%
<i>MTHFD-1</i>	GAXGG	0,0800	0,2100	0,7000	1,0000	1,08	0,72 - 1,62
	AAXGG	0,1800	0,2600	0,4800	1,0000	1,20	0,71 – 2,02
<i>SHMT-1</i>	CTXCC	-0,1600	0,1900	0,3900	1,0000	0,85	0,59 – 1,23
	TTxCC	0,2200	0,3400	0,5100	1,0000	1,25	0,64 – 2,45
<i>RFC-1</i>	GAXGG	0,2100	0,2100	0,3800	1,0000	1,24	0,82 – 1,87
	AAXGG	0,2800	0,2600	0,9100	1,0000	1,03	0,62 – 1,70
<i>MTR</i>	AGXAA	0,2800	0,1900	0,1400	1,0000	1,32	0,91 – 1,93
	GGXAA	0,2600	0,3800	0,4900	1,0000	1,29	0,62 – 2,72
<i>MTRR</i>	AGXAA	0,3600	0,3300	0,2700	1,0000	1,44	0,75 – 2,76
	GGXAA	0,4800	0,3700	0,2000	1,0000	1,62	0,77 – 3,39
<i>TCII</i>	CGXCC	0,7300	0,2000	0,0003	0,0036	2,08	1,39 – 3,09
	GGXCC	0,4100	0,2700	0,1275	1,0000	1,51	0,89 – 2,57

*Correção por Bonferroni

As análises de regressão logística univariada para MSD e controles, demonstraram que o polimorfismo *TCII* 776C>G é significativo, sendo que mulheres com o genótipo heterozigoto (CG) apresentam duas vezes mais chance de pertencer ao grupo MSD que ao grupo controle.

5.8- Análise de regressão logística múltipla

Os resultados das regressões logísticas múltiplas, para análise da influência das variantes polimórficas (variável independente) no risco de gestação com SD (variável dependente), estão demonstrados no Quadro 2.

Quadro 2- Resultados das regressões logísticas múltiplas.

Modelo completo				
Variável	Parâmetro estimado	Erro padrão	p-valor	*p-valor corrigido
Intercept	-1,64	0,44	0,0002	0,0028
<i>MTHFD-1</i> GA	0,12	0,21	0,5900	1,0000
<i>MTHFD-1</i> AA	0,21	0,27	0,4200	1,0000
<i>SHMT-1</i> CT	-0,21	0,19	0,2800	1,0000
<i>SHMT-1</i> TT	0,17	0,35	0,6200	1,0000
<i>RFC-1</i> GA	0,21	0,21	0,3300	1,0000
<i>RFC-1</i> AA	0,08	0,26	0,9700	1,0000
<i>MTR</i> AG	0,31	0,2	0,1200	1,0000
<i>MTR</i> GG	0,29	0,39	0,4500	1,0000
<i>MTRR</i> AG	0,44	0,34	0,2000	1,0000
<i>MTRR</i> GG	0,52	0,39	0,1800	1,0000
<i>TCII</i> CG	0,76	0,21	0,0003	0,0042
<i>TCII</i> GG	0,41	0,27	0,1336	1,0000

*Correção por Bonferroni

Os resultados das regressões logísticas múltiplas, comparando grupos MSD e controle, utilizando o processo de seleção de variáveis “*stepwise*”, confirmam que apenas a substituição de uma citosina por uma guanina na posição 776 do gene *TCII* é significativa ($p=0,0042$) e que o risco está associado ao genótipo heterozigoto.

5.9- Interação entre o polimorfismo *TCII* 776 C>G e os demais polimorfismos estudados

Diante do resultado obtido, foi realizada a análise do efeito da interação do polimorfismo *TCII* 776C>G com os outros polimorfismos estudados. Esta análise encontra-se descrita no Quadro 3.

Quadro 3- Estudo da interação entre o polimorfismo *TCII* 776C>G e os outros polimorfismos analisados nesse estudo.

Efeito	p-valor	#p-valor corrigido
<i>MTHFD-1</i>	0,530	
<i>TCII</i>	0,820	
<i>MTHFD-1*TCII</i>	0,420	1,000
<i>RFC-1</i>	0,670	
<i>TCII</i>	0,049	
<i>RFC-1*TCII</i>	0,740	1,000
<i>MTRR</i>	0,510	
<i>TCII</i>	0,300	
<i>MTRR*TCII</i>	0,980	1,000
<i>SHMT-1</i>	0,990	
<i>TCII</i>	0,033	
<i>SHMT-1*TCII</i>	0,740	1,000
<i>MTR</i>	0,070	
<i>TCII</i>	0,0003	
<i>MTR*TCII</i>	0,260	1,000

#Correção por Bonferroni

Os polimorfismos *MTHFD-1* 1958G>A, *SHMT-1* 1420C>T, *RFC-1* 80G>A, *MTR* 2756A>G e *MTRR* 66A>G quando associados com o polimorfismo *TCII* 776C>G não representaram aumento no risco de nascimento com SD.

5.10- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *MTHFD-1* E *SHMT-1*

A Tabela 23 compara o número de mães com os genótipos *MTHFD-1* 1958GA/*SHMT-1* 1420CT, *MTHFD-1* 1958AA/*SHMT-1* 1420TT, *MTHFD-1* 1958AA/*SHMT-1* 1420CT e *MTHFD-1* 1958GA/*SHMT-1* 1420TT nos grupos MSD e controle, com o objetivo de avaliar se a presença combinada de alteração em ambos os genes *MTHFD-1* e *SHMT-1* aumenta o risco de gerar uma criança com SD.

Tabela 23- A Tabela 23 compara a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/CT) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/CT, GA/TT) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/TT) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
	77	142	
GA/CT			Odds Ratio=0,87
AA/TT			<0,60<OR<1,27>
AA/CT			$\chi^2=0,56$; $p=0,45$
GA/TT			
Demais genótipos	123	198	
TOTAL	200	340	

5.11- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *MTHFD-1* E *MTR*

A Tabela 24 compara o número de mães com os genótipos *MTHFD-1* 1958GA/*MTR* 2756AG, *MTHFD-1* 1958AA/*MTR* 2756GG, *MTHFD-1* 1958AA/*MTR* 2756AG e *MTHFD-1* 1958GA/*MTR* 2756GG entre os grupos MSD e controle, com o objetivo de avaliar se a presença combinada de alteração em ambos os genes *MTHFD-1* e *MTR* aumenta o risco de gerar uma criança com SD.

Tabela 24- A Tabela 24 compara a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/AG, GA/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
	56	76	
GA/AG			<i>Odds Ratio</i> =1,35
AA/GG			<0,89<OR<2,06>
AA/AG			$\chi^2=2,17$; $p=0,14$
GA/GG			
Demais genótipos	144	264	
TOTAL	200	340	

5.12- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *MTHFD-1* E *MTRR*

A Tabela 25 compara o número de mães com os genótipos *MTHFD-1* 1958GA/*MTRR* 66AG, *MTHFD-1* 1958AA/*MTRR* 66GG, *MTHFD-1* 1958AA/*MTRR* 66AG e *MTHFD-1* 1958GA/*MTRR* 66GG entre os grupos MSD e controle, com o objetivo de avaliar se a presença combinada de alteração em ambos os genes *MTHFD-1* e *MTRR* aumenta o risco de gerar uma criança com SD.

Tabela 25- A Tabela 25 compara a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/AG, GA/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
GA/AG	134	217	Odds Ratio=1,15 <0,78<OR<1,69> $\chi^2=0,56$; $p=0,45$
AA/GG			
AA/AG			
GA/GG			
Demais genótipos	66	123	
TOTAL	200	340	

5.13- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *SHMT-1* E *MTR*

A Tabela 26 compara o número de mães com os genótipos *SHMT-1* 1420CT/*MTR* 2756AG, *SHMT-1* 1420TT/*MTR* 2756GG, *SHMT-1* 1420TT/*MTR* 2756AG e *SHMT-1* 1420CT/*MTR* 2756GG entre os grupos MSD e controle, com o objetivo de avaliar se a presença combinada de alteração em ambos os genes *SHMT-1* e *MTR* aumenta o risco de gerar uma criança com SD.

Tabela 26- A Tabela 26 compara a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (CT/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (TT/AG, CT/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (TT/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
	49	75	
CT/AG			<i>Odds Ratio=1,15</i>
TT/GG			<i><0,74<OR<1,77></i>
TT/AG			<i>$\chi^2=0,42$; $p=0,52$</i>
CT/GG			
Demais genótipos	151	265	
TOTAL	200	340	

5.14- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *SHMT-1* E *MTRR*

A Tabela 27 compara o número de mães com os genótipos *SHMT-1* 1420CT/*MTRR* 66AG, *SHMT-1* 1420TT/*MTRR* 66GG, *SHMT-1* 1420TT/*MTRR* 66AG e *SHMT-1* 1420CT/*MTRR* 66GG entre os grupos MSD e controle, com o objetivo de avaliar se a presença combinada de alteração em ambos os genes *SHMT-1* e *MTRR* aumenta o risco de gerar uma criança com SD.

Tabela 27- A Tabela 27 compara a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (CT/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (TT/AG, CT/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (TT/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
CT/AG	103	174	<i>Odds Ratio=1,01 <0,7<OR<1,46> $\chi^2=0,01$; $p=0,94$</i>
TT/GG			
TT/AG			
CT/GG			
Demais genótipos	97	166	
TOTAL	200	340	

5.15- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *RFC-1* E *MTHFD-1*

A Tabela 28 compara o número de mães com os genótipos *RFC-1* 80GA/*MTHFD-1* 1958GA, *RFC-1* 80AA/*MTHFD-1* 1958AA, *RFC-1* 80AA/*MTHFD-1* 1958GA e *RFC-1* 80GA/*MTHFD-1* 1958AA entre os grupos MSD e controle, com o objetivo de avaliar se a presença combinada de alteração em ambos os genes, *RFC-1* e *MTHFD-1*, aumenta o risco de gerar uma criança com SD.

Tabela 28- A Tabela 28 compara a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/GA) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/GA, GA/AA) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/AA) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
	107	174	<i>Odds Ratio=1,10</i>
GA/GA			<i><0,76<OR<1,58></i>
AA/AA			<i>$\chi^2=0,27$; $p=0,60$</i>
AA/GA			
GA/AA			
Demais genótipos	93	166	
TOTAL	200	340	

5.16- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *RFC-1* E *SHMT-1*

A Tabela 29 compara o número de mães com os genótipos *RFC-1* 80GA/*SHMT-1* 1420CT, *RFC-1* 80AA/*SHMT-1* 1420TT, *RFC-1* 80AA/*SHMT-1* 1420CT e *RFC-1* 80GA/*SHMT-1* 1420TT entre os grupos MSD e controle, com o objetivo de avaliar se a presença combinada de alteração em ambos os genes, *RFC-1* e *SHMT-1*, aumenta o risco de gerar uma criança com SD.

Tabela 29- A Tabela 29 compara a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/CT) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/CT, GA/TT) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/TT) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
	80	142	<i>Odds Ratio</i> =0,93
GA/CT			<0,64<OR<1,35>
AA/TT			$\chi^2=0,16$; $p=0,68$
AA/CT			
GA/TT			
Demais genótipos	120	198	
TOTAL	200	340	

5.17- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *RFC-1* E *MTR*

A Tabela 30 compara o número de mães com os genótipos *RFC-1* 80GA/*MTR* 2756AG, *RFC-1* 80AA/*MTR* 2756GG, *RFC-1* 80AA/*MTR* 2756AG e *RFC-1* 80GA/*MTR* 2756GG entre os grupos MSD e controle, com o objetivo de avaliar se a presença combinada de alteração em ambos os genes, *RFC-1* e *MTR*, aumenta o risco de gerar uma criança com SD.

Tabela 30- A Tabela 30 compara a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/AG, GA/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
	67	93	<i>Odds Ratio</i> =1,34
GA/AG			<0,90<OR<1,99>
AA/GG			$\chi^2=2,28$; $p=0,13$
AA/AG			
GA/GG			
Demais genótipos	133	247	
TOTAL	200	340	

5.18- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *RFC-1* E *MTRR*

A Tabela 31 compara o número de mães com os genótipos *RFC-1* 80GA/*MTRR* 66AG, *RFC-1* 80AA/*MTRR* 66GG, *RFC-1* 80AA/*MTRR* 66AG e *RFC-1* 80GA/*MTRR* 66GG entre os grupos MSD e controle, com o objetivo de avaliar se a presença combinada de alteração em ambos os genes, *RFC-1* e *MTRR*, aumenta o risco de gerar uma criança com SD.

Tabela 31- A Tabela 31 compara a soma do número de mães que possuem um alelo variante para os dois genes (GA/AG) ou um alelo variante para um gene e dois para o outro gene (AA/AG, GA/GG) ou dois alelos variantes para os dois genes (AA/GG) e a soma do número de mães com os demais genótipos entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
	137	210	<i>Odds Ratio</i> =1,35
GA/AG			<0,91<OR<1,98>
AA/GG			$\chi^2=2,48$; $p=0,11$
AA/AG			
GA/GG			
Demais genótipos	63	130	
TOTAL	200	340	

5.19- Estudo do efeito da presença de um ou dois alelos alterados para ambos os genes *MTRR* E *MTR*

A *MTRR* desempenha a função de manter a *MTR* em seu estado ativo. Portanto a presença de um ou dois alelos polimórficos no gene *MTRR* prejudicaria o funcionamento da *MTR* independente da presença ou ausência de alelos polimórficos no gene que codifica essa enzima.

Assim sendo, na Tabela 32 comparamos o número de mães que possuem pelo menos um alelo variante para *MTRR* ou/e *MTR*, entre os grupos MSD e controle.

Tabela 32- A Tabela 32 compara a soma do número de mães que possuem pelo menos um alelo variante para *MTRR* e/ou *MTR* e a soma do número de mães sem nenhum alelo alterado, com relação aos polimorfismos *MTRR* 66A>G e *MTR* 2756A>G, entre os grupos MSD e controle. O resultado obtido não demonstrou diferença estatisticamente significativa.

<i>Genótipos</i>	<i>MSD</i>	<i>CONTROLE</i>	<i>Resultado</i>
	196	323	
AA/AG			
AG/AA			<i>Odds Ratio</i> =1,70
GG/AA			<0,62<OR<4,92>
AA/GG			$\chi^2=1,23$; $p=0,27$
GG/GG			
GG/AG			
GA/GG			
AG/AG			
AA/AA	6	17	
TOTAL	200	340	

6- DISCUSSÃO

6.1- Aspectos gerais

Estudos recentes dão suporte a hipótese de que o padrão de metilação do DNA pode estar associado a alterações epigenéticas na estrutura da cromatina requerida para uma segregação cromossômica normal. A perda de grupos metil em sítios CpG metilados pode ocorrer durante a atividade de reparo por excisão de nucleotídeos (Brooks et al, 1996), por desaminação espontânea da 5-metil citosina (Gonzalzo e Jones, 1997) ou durante a recombinação cromossômica (Bestor e Tycko, 1996). A falha da DNA-metiltransferase na remetilação do DNA, ocasionada pela deficiência de folato, resultaria na perda permanente do padrão de metilação (Hobbs, 2000).

Diante disso o presente trabalho propôs que mutações em enzimas envolvidas no metabolismo do folato seriam fatores de risco para não-disjunção do cromossomo 21, sendo o primeiro a analisar os polimorfismos *MTHFD-1* 1958G>A, *SHMT-1* 1420C>T, *TCII* 776C>G e o efeito da interação entre os genótipos: *MTHFD-1* 1958GA e 1958AA, *SHMT-1* 1420CT e TT, *RFC-1* 80GA e AA, *TCII* 776CG e GG, *MTR* 2756AG e GG e *MTRR* 66AG e GG no risco de gerar um filho com SD.

6.2- *MTHFD-1*

Com relação ao polimorfismo 1958G>A do gene *MTHFD-1*, Brody et al. (2002) não encontraram uma correlação entre o genótipo 1958AA e alterações na concentração plasmática ou intracelular de folato e de homocisteína em mães de pacientes com DTN. Este resultado já era esperado porque, de acordo com West et al. (1996), embora o gene *MTHFD-1* indiretamente participe do ciclo da metionina fornecendo 5,10-metilenoTHF, este papel é melhor desempenhado pela enzima *SHMT-1*. No entanto, o domínio sintase realiza a conversão de THF em 10-formilTHF que é doador de cofator para biosíntese *de novo* de purina (Barlowe e Appling, 1990; West et al., 1996). Desse modo o

genótipo de risco (*MTHFD-1* 1958AA) afetaria então a taxa de síntese de DNA e conseqüentemente a taxa de divisão celular (Brody et al., 2002).

Quanto a associação deste polimorfismo e aumento no risco de gestações com DTN os resultados são discordantes: um estudo realizado na Irlanda encontrou uma diferença estatisticamente significativa na distribuição genotípica entre grupo caso e controle (*Odds Ratio*= 1,52 <1,16<OR<1,99> IC 95%; $p=0,003$) (Brody et al., 2002); outro estudo caso-controle realizado com amostras de DNAs de mães também originadas da Irlanda confirmaram a associação entre o genótipo considerado de risco (AA) e aumento no risco de gerar um filho com DTN (*Odds Ratio*= 1,49 <1,07<OR<2,09> IC 95%; $p=0,009$) (Parle-Mcdermott et al., 2006); já um estudo realizado na Itália não encontrou nenhuma diferença significativa na freqüência do alelo ou do genótipo entre grupo de mães caso e controle. As possíveis razões para esta discrepância podem ser a heterogeneidade entre as populações estudadas e os diferentes fatores ambientais existentes na Irlanda e na Itália (Marco et al., 2006).

Uma vez que tanto a SD como DTN podem estar relacionados a polimorfismos do metabolismo do folato, é interessante imaginar que em famílias que possuam indivíduos com a síndrome também apresentem casos de DTN e vice-versa. De fato, Barkai et al. (2003) encontraram um aumento significativo nos casos de síndrome de Down em famílias que possuíam eventos de DTN ($p<0,00001$), e um aumento significativo de casos de DTN em famílias que apresentavam casos de síndrome de Down ($p<0,001$), demonstrando, portanto, uma relação forte na etiologia das duas manifestações clínicas. No entanto, apesar de em alguns casos o polimorfismo *MTHFD-1* 1958G>A estar associado a gestações com DTN, nosso estudo não encontrou associação entre os genótipos GA e AA e acréscimo no risco de gerar uma criança com SD. A distribuição genotípica e a freqüência dos alelos não divergiu significativamente entre MSD e controle.

6.3- *SHMT-1*

Com relação ao polimorfismo 1420C>T do gene *SHMT-1*, Heil et al. (2001) não observaram aumento no risco de DTN e relataram que no grupo caso a frequência do genótipo CC era significativamente maior quando comparado ao grupo controle (grupo caso: 53,8%CC; grupo controle: 45%CC). Relataram também um aumento na concentração de homocisteína plasmática e redução da concentração de folato plasmático e intracelular em mães com o genótipo selvagem.

Relton et al. (2004) encontraram um resultado semelhante: frequência do alelo C significativamente maior em mães de pacientes com DTN ($p=0,0036$).

Niclot et al. (2006) analisaram o efeito deste SNP no risco de linfoma folicular (FL) e verificaram que a frequência do alelo variante T no grupo controle foi maior (32,7%) do que no grupo caso (29,9%).

Diante destes resultados foi sugerido que o polimorfismo ofereceria um efeito protetor contra FL e gestações com DTN (Heil et al., 2001; Relton et al., 2004; Niclot et al., 2006).

Uma possível explicação para este fato é que o substrato 5,10-metilenoTHF pode ser direcionado para a biosíntese de nucleotídeos ou pode ser reduzido a 5-metilTHF que irá doar um grupo metil para remetilação de homocisteína a metionina (precursor de SAM). Sob condições celulares normais, a reação de redução do 5,10 metilenoTHF é controlada pela concentração de SAM: altos níveis celulares de SAM inibeM MTHFR. Isso garante que exista um equilíbrio na competição por folato entre a síntese de nucleotídeos e a síntese de SAM (Herbig et al., 2002). Entretanto Herbig et al. (2002) e Hayashi et al. (2007) concluíram que a enzima SHMT-1 influencia nessa competição dando prioridade à via de síntese de precursores de DNA. SHMT-1 atua através de três mecanismos: (1) captura 5,10-metilenoTHF para a síntese de dTMP esgotando a disponibilidade deste; (2) aumenta a concentração de THF para a produção de 10-formilTHF; (3) seqüestra 5metilTHF e inibe a remetilação da homocisteína a metionina.

Nossos resultados não indicam divergência estatisticamente significativa na distribuição do genótipo entre MSD e controle. Também não verificamos divergência na frequência dos alelos entre os dois grupos. Portanto diferentemente dos dados encontrados para as manifestações clínicas supracitadas, não observamos nenhum efeito do alelo selvagem C no risco de gerar uma criança com SD e também não observamos efeito protetor do alelo variante T.

6.4- RFC-1

Estudos encontraram evidências de que a proteína RFC-1 é responsável pela internalização celular do 5-metilTHF (Branda et al., 1985; Moscow et al., 1995). Desse modo, o presente estudo supôs que o polimorfismo 80G>A no gene que codifica essa proteína poderia estar relacionado com baixa concentração intracelular de folato e conseqüentemente representar um fator de risco para gestações com SD. No entanto não encontramos diferença estatisticamente significativa na distribuição genotípica ou nas frequências alélicas entre os grupos MSD e controle, não confirmando a hipótese. Nossos dados concordam com os obtidos na França por Chango et al. (2005).

Uma possível explicação para esses resultados é a existência de um outro mecanismo de absorção de folato conhecido como potocitose, mediado por receptores de folato que permanecem ancorados à membrana das células de vários tecidos por uma cauda glicosil-fosfatidil-inositol (Antony, 1996; Chango et al., 2000).

Morin et al. (2003) não encontraram associação entre o polimorfismo 80G>A e acréscimo no risco de DTN (*Odds Ratio*= 1,39 <0,55<OR<3,54> IC 95%) porém, foi constatada uma concentração intracelular de folato significativamente menor em indivíduos com genótipo 80AA. Já no estudo realizado por Chango et al. (2000) não foi observado alteração na concentração de folato presente nas células sangüíneas vermelhas e no plasma de indivíduos que possuíam um ou dois alelos mutados.

6.5- *MTR*

A enzima *MTR* desempenha um papel essencial na produção de SAM transferindo um grupo metil do 5-metilTHF para homocisteína.

O polimorfismo mais comum descrito no gene *MTR* (2756A>G) leva a substituição de um aminoácido polar por um aminoácido apolar, alterando a estrutura tridimensional da proteína e prejudicando seu funcionamento (Van-Der-Put et al., 1997). Conseqüentemente, indivíduos com o genótipo AG ou GG apresentariam aumento na concentração de homocisteína, redução na produção de SAM e maior chance de segregação cromossômica aberrante.

No entanto nossos resultados não relatam divergências na distribuição genotípica ou na frequência alélica entre grupo MSD e controle, não oferecendo evidências que comprovem essa hipótese. Os resultados dos estudos realizados no Brasil por Biselli et al. (2008) e Silva et al. (2005) e o realizado na França por Chango et al. (2005) são concordantes com os obtidos neste trabalho.

Entretanto um estudo caso-controle, realizado na Sicília, apresentou um resultado diferente: *MTR* 2756AG e GG foi considerado um fator de risco para gestações com SD (*Odds Ratio*= 3,5 <1,2<OR<10,9> IC 95%) (Bosco et al., 2003).

O contraste entre as conclusões pode ser explicado pela diferença entre as populações, com componentes étnicos variados influenciando cada amostra.

6.6- *MTRR*

A enzima *MTRR* desenvolve a função de manter *MTR* ativa. Portanto mutações no gene que codifica *MTRR* teria um impacto sobre a metilação do DNA e conseqüentemente sobre a não-disjunção cromossômica.

O polimorfismo *MTRR* 66A>G foi associado com aumento no risco de gerar uma criança com SD em três recentes estudos caso-controle (Hobbs et al., 2000; O'Leary et al., 2002; Wang et al., 2008).

Nossos resultados, porém, não indicaram diferença estatisticamente significativa na frequência alélica e na distribuição genotípica entre grupo MSD e controle. Os resultados obtidos por Bosco et al. (2003), Chango et al. (2005) e Silva et al. (2005) são concordantes.

Os dados obtidos neste trabalho relatam que as variantes do gene *MTRR* não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Outro estudo, realizado também no Brasil por Silva et al. (2005), constatou um desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg em seu grupo CASO.

A formulação da lei de Hardy –Weinberg supõe uma população grande, onde as reproduções são aleatórias com relação ao *locus* em questão e onde não há taxa apreciável de mutação, seleção contra nenhum genótipo em particular, deriva genética e fluxo gênico. Evidentemente essas condições estabelecidas para a obtenção do equilíbrio de Hardy - Weinberg não são satisfeitas completamente por nenhuma população real, seja ela humana ou não. Aliás, o que torna possível explicar o processo evolutivo dos seres vivos em termos mendelianos é, justamente, essa desobediência ao modelo teórico (Beiguelman 1996; Thompson et al., 2002; Jorde et al., 2004).

Quando há casamento preferencial, endogamia ou estratificação o resultado para qualquer *locus* com mais de um alelo é um excesso de homozigotos, diferente do que observamos em nossos resultados. Além disso, esses fatores, assim como fluxo gênico e deriva genética, refletiriam em alteração do equilíbrio de Hardy – Weinberg também nos outros polimorfismos estudados. Portanto, sugerimos que o fator atuante dentro da população avaliada pode ser seleção natural a favor do heterozigoto.

6.7- TCII

A vitamina B₁₂ é essencial para as reações de metilação pois atua como cofator para a enzima MTR. A proteína responsável pelo transporte desse nutriente para as células é a TCII.

Namour et al. (1998) e Namour et al. (2001) observaram que a troca de uma citosina por uma guanina na posição 776 afeta negativamente o nível de transcrição do gene que codifica TCII. Além disso, Afman et al. (2001), Afman et al. (2002) e Miller et al. (2002) sugerem que essa alteração genética causa também a perda de afinidade da enzima pela vitamina B₁₂. Diante disso, o presente estudo sugeriu que o polimorfismo 776C>G poderia levar a hipometilação do DNA e não-disjunção do cromossomo 21.

Estudos recentes associaram o alelo mutante G com fissura labial não-sindrômica, com ou sem fenda de palato (Martinelli et al., 2006), DTN (Afman et al., 2002) e aborto espontâneo (Zetterberg et al., 2002).

Nossos resultados indicam que o polimorfismo 776C>G pode estar associado com um aumento de duas vezes no risco de gestações com SD (*Odds Ratio*=2,08<1,39<OR<3,09>), sendo o primeiro estudo a investigar e relatar tal associação.

6.8- Interação entre os genótipos

Como a metilação do DNA está relacionada a um metabolismo regido por várias etapas bioquímicas catalisadas por diferentes enzimas é de se esperar que exista uma interação gene-gene. Bosco et al. (2003) não encontraram associação entre o polimorfismo *MTRR* 66A>G e aumento no risco de não-disjunção do cromossomo 21. Porém quando o analisou em conjunto com o polimorfismo *MTR* 2756A>G, verificou que mulheres heterozigotas para ambas mutações possuem um risco cinco vezes maior de gerar uma criança com SD.

Nos resultados obtidos por este estudo, entretanto, não observamos efeito somatório significativo quando analisamos diferentes interações entre os polimorfismos.

6.9- Considerações finais

O estudo realizado por James et al. 1999 forneceu um argumento para a associação entre metabolismo celular do folato, metilação do DNA e segregação cromossômica anormal. Desde então, muitos estudos investigam polimorfismos em enzimas envolvidas na via metabólica do ácido fólico como possíveis fatores genéticos de risco para não-disjunção do cromossomo 21.

Nosso trabalho foi o primeiro a relatar uma associação do polimorfismo *TCII* 776C>G e aumento no risco de gestações com SD. Porém o impacto desse polimorfismo deve ser confirmado em outras áreas geográficas devido a heterogeneidade genética e nutricional de diferentes regiões.

Nosso trabalho não encontrou evidências que sugiram associação entre os polimorfismos *RFC-1* 80G>A, *MTR* 2756A>G e *MTRR* A>G e aumento no risco de gerar um filho com SD. Resultados discrepantes podem ser devidos a diferenças étnicas e diferenças na interação entre os genes e gene-ambiente. Outro estudo realizado também em São Paulo (Brasil) obteve resultados semelhantes para os polimorfismos *MTR* 2756A>G e *MTRR* A>G (Silva et al., 2005).

Nosso trabalho foi o primeiro a investigar os polimorfismos *MTHFD-1* 1958G>A e *SHMT-1* 1420C>T não encontrando dados que suponham associação entre esses e aumento no risco de gestações com SD na amostra analisada. Entretanto resultados diferentes podem ser encontrados em outras populações com componentes étnicos distintos.

7- CONCLUSÃO

- As distribuições genotípicas dos genes *MTHFD-1*, *SHMT-1*, *RFC-1*, *MTR* e *TCII* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg entre indivíduos do grupo MSD e controle.
- As distribuições genotípicas do gene *MTRR* não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg nos grupos MSD e controle.
- Com relação ao gene *MTHFD-1*, a frequência dos alelos G e A, no grupo MSD, foi respectivamente 0,54 e 0,46. No grupo controle as frequências alélicas observadas foram G=0,56 e A=0,44.
- Com relação ao gene *SHMT-1*, a frequência dos alelos C e T, tanto no grupo MSD quanto no grupo controle, foi respectivamente 0,68 e 0,32.
- Com relação ao gene *RFC-1*, a frequência dos alelos G e A, no grupo MSD, foi respectivamente 0,53 e 0,47. No grupo controle as frequências alélicas observadas foram G=0,54 e A=0,46.
- Com relação ao gene *MTR*, a frequência dos alelos A e G, no grupo MSD, foi respectivamente 0,75 e 0,25. No grupo controle as frequências alélicas observadas foram A=0,79 e G=0,21.
- Com relação ao gene *MTRR*, a frequência dos alelos A e G, no grupo MSD, foi respectivamente 0,44 e 0,56. No grupo controle as frequências alélicas observadas foram A=0,46 e G=0,54.
- Com relação ao gene *TCII*, a frequência dos alelos C e G, no grupo MSD, foi respectivamente 0,55 e 0,45. No grupo controle as frequências alélicas observadas foram C=0,62 e G=0,38.
- A distribuição genotípica dos polimorfismos *MTHFD-1* 1958G>A, *SHMT-1* 1420C>T, *RFC-1* 80G>A, *MTR* 2756A>G e *MTRR* 66A>G não diferiu significativamente entre os grupos MSD e controle.

- A distribuição genotípica do polimorfismo *TCII* 776C>G observada nos grupos MSD e controle apresentou uma diferença estatisticamente significativa. Nossos dados demonstram que mulheres com genótipo heterozigoto (CG) possuem um risco duas vezes maior de gerar crianças com SD.
- No estudo da interação entre os polimorfismos estudados, não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos MSD e controle.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams R L P. DNA methylation — The effect of minor bases on DNA – protein interactions. *Biochem J* 1990; 265:309–320.

Afman LA, Van Der Put NMJ, Thomas CMG, Trijbels JMF, Blom HJ. Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of neural tube defects. *Q J Med* 2001; 94:159-166.

Afman LA, Lievers KJA, Van Der Put NMJ, Trijbels JMF, Blom HJ. Single nucleotide polymorphisms in the transcobalamin gene: relationship with transcobalamin concentrations and risk for neural tube defects. *European Journal of Human Genetics* 2002; 10:433 – 438.

Agresti A. Categorical data analysis. New York: Wiley, 1990; 59-66.

Antonarakis SE. 10 Years of Genomics, Chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 1998; 51:1-16.

Antony AC. The biological chemistry of folate receptors. *Blood* 1992; 79: 2807–2820.

Balaghi M, Wagner C. DNA methylation in folate deficiency: use of CpG methylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193:1184–1190.

Barkai G, Arbuzova S, Berkenstadt M, Heifetz S, Cuckle H. Frequency of Down's syndrome and neural-tube defects in the same family. *Lancet* 2003; 361:1331-5.

Barlowe CK, Appling DR. Molecular genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* C1-tetrahydrofolate synthase mutants reveals a noncatalytic function of the ADE3 gene product and an additional folate-dependent enzyme. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 5679-5687.

Branda RF, Bruce BA, Jacob HS. The mechanism of 5-methyltetrahydrofolate transport by human erythrocytes. *J. Clin Invest* 1978; 61:1270-1275.

Beetstra S, Thomas P, Salisbury C, Turner J, Fenech M. Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei. *Mutat. Res* 2005; 578: 317-326.

Beiguelman B. Dinâmica dos genes nas famílias e nas populações. 2 ed. Ribeirão Preto: Ed. Sociedade Brasileira de Genética; 1996. p.472.

Bestor TH, Tycko B. Creation of genomic methylation patterns. *Nat genet* 1996; 12: 363-367.

Biseli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin M N, Bertelli PEC. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genetics and Molecular Research* 2008; 7(1):33-42.

Blount BC, Mack MM, Wehr CM, MacGregor JT, Hiatt RA, Wickremasinghe RG, et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:3290–3295.

Bonadia LC. Estudo de associação entre polimorfismos em genes que codificam enzimas participantes do metabolismo do folato e a formação de embriões com aberrações cromossômicas [Tese – Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.

Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A > G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *Am J Med Genet* 2003; 121A: 219–224.

Böttiger AK, Nilsson TK. Pyrosequencing assay for genotyping of the Transcobalamin II 776C>G polymorphism. *Scan. J. Clin. Lab. Invest* 2007; 67(2):247-51.

Brody LC, Conley M, Cox C, Kirke PN, McKeever MP, Mills JL, et al. Polymorphism, R653Q, in the trifunctional enzyme methylenetetrahydrofolate dehydrogenase / methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase / formyltetrahydrofolate synthetase is a maternal genetic risk factor for neural tube defects: report of the birth defects research group. *Am J. Hum. Genet* 2002; 71:1207-1215.

Brooks PJ, Marietta CG. DNA mismatch repair and DNA methylation in adult brain neurons. *J Neurosci* 1996; 16:939-945.

Castaner MJG. Características epidemiológicas, preventivas y metabólicas de los defectos del tubo neural en la isla de mallorca [Tese – Doutorado] Barcelona: Universidade de Barcelona; 2003.

Caponi GT. Down syndrome advances in molecular biology and the neuroscience. *Developmental and behavioral Pediatrics* 2001; 22:40-59.

Castel-Dunwoody KM, Kauwell GP, Shelnutt KP, Vaughn JD, Griffin ER, Maneval DR, et al. Transcobalamin 776C->G polymorphism negatively affects vitamin B-12 metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(6):1436-41.

Chango A, Emery-Fillon N, Courcy GP, Lambert D, Pfister M, Rosenblatt DS, et al. A Polymorphism (80G->A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia. *Molecular Genetics and Metabolism* 2000; 70: 310–315.

Chango A, Emery-Fillon N, Mircher C, Bléhaut H, Lambert D, Herberth B, et al. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *British Journal of Nutrition* 2005; 94:166–169.

Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature* 1998; 395: 89–93.

Cheng J, Zhu WL, Dao JJ, Li SQ, Li Y. Relationship between polymorphism of methylenetetrahydrofolate dehydrogenase and congenital heart defect. *Biomed Environ Sci* 2005;18:58-64.

Christensen B, Frosst P, Lussier-Cacan S, Selhub J, Goyette P, Rosenblatt DS, et al. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 1997;17:569-73.

Clarke L. Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 212-8.

Clarke S, Banfield K. S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. In: Carmel R, Jacobson DW. (eds) **Homocysteine in Health and Disease**. Cambridge: Cambridge Press, 2001.

Cobb J, Miyaike M, Kikuchi A, Handel MA. Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase IIa localization and chromosome condensation. *Chromosoma* 1999; 108: 412–425.

Conover WJ. Practical nonparametric statistic. New York: John Wiley & Sons, 1971.

Cooley WC, Graham JM. Down syndrome: An update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr* 1991; 30: 233-53.

Dufficy L, Naumovski N, Ng X, Blades B, Yates Z, Traves CSP, et al. G80A reduced folate carrier SNP influences the absorption and cellular translocation of dietary folate and its association with blood pressure in an elderly population. *Life Sciences* 2006; 79:957–966.

Duthie SJ. Folic acid deficiency and cancer: mechanism of DNA instability. *Br Med Bull* 1999; 55:578-92.

El-Khairi L, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Plasma total cysteine, pregnancy complications, and adverse pregnancy outcomes: the Hordaland Homocysteine Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 2003; 77(2):467-472.

Eskes TKAB. Abnormal folate metabolism in mothers with Down syndrome offspring: Review of the literature. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006; 124:130–133.

Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner AG. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavior and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods* 2007; 39(2):175-191.

Fenton WA, Rosenberg LE. Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic bases of inherited disease*. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1995. p. 3129-49.

Foss HM, Roberts CJ, Clayes KM, Selker EU. Abnormal chromosome behavior in *Neurospora* mutants defective in DNA methylation. *Science* 1993;262:1737–1741.

Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1981.

Fowler BM, Giuliano AR, Piyathilake C, Nour M, Hatch K. Hypomethylation in cervical tissue: is there a correlation with folate status? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998; 7:901–906.

Fritz B, Hallermann C, Olert J, Fuchs B, Bruns M, Aslan M, et al. Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH). Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions. *Eur. J. Hum. Genet* 2001; 9:539–547.

Fuentes JJ, Pritchard MA, Planas AM, Bosch A, Ferrer I, Estivill X. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Human. Mol. Genet* 1995; 4:1935-1944.

Girgis S, Nasrallah IM, Suh JR, Oppenheim E, Zanetti KA, Mastri MG, et al. Molecular cloning, characterization and alternative splicing of the human cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase gene. *Gene* 1998; 210(2):315-324.

Gonzalvo ML, Jones PA. Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation. *Mutat Res* 1997; 386:107-118.

Gos M, Szpecht-Potocka A. Genetic basis of neural tube defects. II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J. Appl. Genet.* 2002; 43(4): 511-524.

Gusmão FAF, Tavares EJM, Moreira LMA. Idade materna e síndrome de Down no nordeste do Brasil. *Cad. Saúde Pública* 2003; 19:973-978.

Habib EE, Aziz M, Kotb M. Genetic polymorphism of folate na methionine metabolizing enzymes and their susceptibility to malignant lymphoma. *Journal of the Egyptian Nat Cancer Inst* 2005; 17(3):184-192.

Hayashi I, Kyoung-Jin S, Joanne MS, Croxford R, Young-In K. Folate Deficiency Induces Cell-Specific Changes in the Steady-State Transcript Levels of Genes Involved in Folate Metabolism and 1-Carbon Transfer Reactions in Human Colonic Epithelial Cells. *The Journal of Nutrition* 2007; 137(3):607-613.

Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet* 2001; 2: 280–291.

Hassold TJ, Burrage LC, Chan ER, Judis LM, Schwartz S, James SJ, et al. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. *Am. J. Hum. Genet.* 2001; 69:434-39.

Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, et al. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000; 405:311-319.

Heat CWJr. Cytogenetic observations in vitamin B12 and folate deficiency. *Blood* 1966; 27:800-15.

Heil SG, Van Der Put NMJ, Waas ET, Heijer MD, Trijbels FJM, Blom JH. Is Mutated Serine Hydroxymethyltransferase (SHMT) Involved in the Etiology of Neural Tube Defects? *Molecular Genetics and Metabolism* 2001; 73:164–172.

Herbig K, Chiang E P, Lee L R, Hills J, Shane B, Stover PJ. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses. *J Biol Chem* 2002; 277:38381-38389.

Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, Ogura M, Kagami Y, et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Journal of Hematology* 2003; 88(2):159-166.

Hobbs CA, Sherman SL, Ping Y, Hopkins SE, Torfs CP, Hine J, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for down syndrome. *Am J Hum Genet* 2000; 67(3):623-630.

Hosmer DW, Lemeshow SL. *Applied logistic regression*. New York:John Wiley & Sons, 1989.

Howard KM, Muga SJ, Zhang L, Thigpen AE, Appling DR. Characterization of the rat cytoplasmic C1-tetrahydrofolate synthase gene and analysis of its expression in liver regeneration and fetal development. *Gene* 2003; 319(13):85-97.

Hunt, P. A.; Lemaire-Adkins, R. Genetic control of mammalian female meiosis. *Curr Top Dev Biol*, v. 37, p.359–381, 1998.

Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *J Nutr* 1998; 128:1204–1212.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999; 70:495–501.

James SJ, Pogribny M, Miller BJ, Melnyk S. Mechanisms of DNA damage, DNA hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. *J Nutr* 2003;133(11 Suppl 1):3740S-3747S.

Ji W, Hernandez R, Zhangx-Y, Qug-Z, Frady A, Varela M, Ehrlic M. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome1. *Mutat Res* 1997; 379:33–41.

Jorde LB, Carey JC, Bamshad MJ, White RL. *Genética Médica*. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2004. p.415.

Karpen GH, Allshire RC. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. *Trends Genet* 1997; 13: 489–496.

Kempisty B, Sikora J, Lianeri M, Szczepankiewicz A, Czerski P, Hauser J, et al. MTHFD 1958G>A and MTR 2756A>G polymorphisms are associated with bipolar disorder and schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2007; 17(3): 177-81.

Kim YI, Pogribny IP, Basnakin AG, Miller JW, Selhub J, James SJ, Mason JB. Folate deficiency in rats induces DNA strand breakz and hypometylation with the p53 tumor suppressor gene. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:46-52.

Knuutila S, Helminen E, Vuopio P, de la Chapelle A. Increased sister chromatid exchange in megaloblastic anaemia—studies on bone marrow cells and lymphocytes. *Hereditas* 1978; 89:175–181.

Konrad C, Muller GA, Langer C, Kuhlenbaumer G, Nabavi DG, Dziewas R, Stogbauer F, Ringelstein EB, Junker R. Plasma homocysteine, MTHFR C677T, CBS 8844ins68bp, and MTHFD1 G1958A polymorphisms in spontaneous cervical artery dissections. *J Neurol* 2004; 251:1242-1248.

Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S. Down syndrome phenotypes: The consequences of chromosomal imbalances. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4997-5001.

Lamb NE, Freeman SB, Savage-Austin A, Pettay LT, Hersey J, Gu Y, et al. Susceptible chiasmate configurations of chromosome 21 predispose to non-disjunction in both maternal meiosis I and meiosis II. *Nature* 1996; 14:400-405.

Leclerc D, Campeau E, Goyette P, Adjalla CE, Christensen B, Ross M, et al. Human methionine synthase: cDNA cloning and identification of mutations in patients of the cblG complementation group of folate/cobalamin disorders. *Human Molecular Genetics* 1996; 5(12):1867-1874.

Lemaire-Adkins R, Radke K, Hunt PA. Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol* 1997; 139:1611–1619.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:2545–50.

Leyton C, Mergudich D, de la Torre D, Sans J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. *Cell Prolif* 1995; 28:481–496.

Li Y, Cheng J, Zhu WL, Dao JJ, Yan LY, Li MY, et al. Study of serumHcy and polymorphisms of Hcymetabolic enzymes in 192 families affected by congenital heart disease. *Beijing DaXue Xue Bao* 2005;37:75-80.

Libbus BL, Borman LS, Ventrone CH, Branda RF. Nutritional folate deficiency in CHO cells: chromosomal abnormalities associated with perturbations in nucleic acid precursors. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 46:231–242.

MacGregor JT, Wehr C, Hiatt RA, Peters B, Tucker JD, Langlois RG, et al. Spontaneous genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutat Res* 1997; 377:125–135.

Marco PD, Merello E, Calevo MG, Moronil A, Raso A, Finnell RH, et al. Reduced folate carrier polymorphism (80A-G) and neural tube defects. *European Journal of Human Genetics* 2003; 11:245–252.

Marco PD, Merello E, Calevo MG, Mascelli S, Raso A, Cama A, et al. Evaluation of a methylenetetrahydrofolate-dehydrogenase 1958G>A polymorphism for neural tube defect risk. *European Journal of Human Genetics* 2006; 51(2):98-103.

Mason JB, Levesque T. Folate effects on carcinogenesis and potential for cancer chemoprevention. *Oncology* 1996; 10:1727-36.

Martinelli M, Scapoli L, Palmieri A, Pezzetti F, Bacillero U, Padula E, et al. Study of four genes belonging to the folate pathway: transcobalamin 2 is involved in the onset of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate. *Hum Mutat* 2006; 27(3):294.

Martinez-Frias ML, Perez B, Desviat LR, Castro M, Leal F, Rodriguez L, et al. Maternal polymorphisms 677C>T and 1298A>C of MTHFR, and 66A>G MTRR genes: is there any relationship between polymorphisms of the folate pathway, maternal homocysteine levels, and the risk for having a child with Down syndrome? *American Journal of Medical Genetics Part A* 2006; 140A:987–997.

Miller JW, Ramos MI, Garrod MG, Flynn AM, Green R. Transcobalamin II 775G>C polymorphism and indices of vitamin B12 status in healthy older adults. *Blood* 2002;100(2): 718 – 720.

Meyer K, Fredriksen A, Ueland PM. High-Level Multiplex Genotyping of Polymorphisms Involved in Folate or Homocysteine Metabolism by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry* 2004; 50(2):391– 402.

Morin I, Devlin AM, Leclerc D, Sabbaghian N, Halsted CH, Finnell R, et al. Evaluation of genetic variants in the reduced folate carrier and in glutamate carboxypeptidase II for spina bifida risk. *Mol Genet Metab* 2003; 79:197–200.

Moscow JA, Gong M, He R, Sgagias MK, Dixon KH, Anzick SL, et al. Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC-1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res* 1995; 55:3790–3794.

Namour F, Guy M, Aimone-Gastin I, Nonancourt M, Mrabet N, Guéant JL. Isoelectrofocusing phenotype and relative concentration of transcobalamin II isoprotein related to the codon 259 Arg/Pro polymorphism. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251:769–74.

Namour F, Olivier J, Abdelmoultaleh I, Adjalla C, Debard R, Salvat C, et al. Transcobalamin codon 259 polymorphism in HT-29 and Caco-2 cells and in Caucasians: relation to transcobalamin and homocysteine concentration in blood. *Blood* 2001; 97:1092-1098.

Nelen WL, Blom HJ, Steegers EA, Den-Heijer M, Eskes TK. Hyperhomocysteinemia and recurrent early pregnancy loss: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2000; 74(6):1196-1199.

Niclot S, Pruvot Q, Besson C, Savoy D, Macintyre E, Salles G, et al. Implication of the folate-methionine metabolism pathways in susceptibility to follicular lymphomas. *Blood* 2006; 108(1):278-285.

O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet* 2002; 107:151–155.

Opitz JM, Gilbert-Barness EF. Reflections on the pathogenesis of Down syndrome. *Am J Med Genet* 1990; 7:38-51.

Ouerhania S, Oliveira E, Marrakchia R, Slamad MRB, Sfaxid PM, Ayedd M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase polymorphisms and risk of bladder cancer in a Tunisian population. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2007; 176: 48-53.

Parle-Mcdermott A, Kirker P, Mills JL, Molloy A, Cox C, O'Leary V, et al. Confirmation of the R653Q polymorphism of the trifunctional C1-synthase enzyme as a maternal risk for neural tube defects in the Irish population. *European Journal of Human Genetics* 2006; 14:768–772.

Peterson A, Patil N, Robbins C, Wang L, Cox DR, Myers RM. A transcript map of the Down syndrome critical region on chromosome 21. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1735-42.

Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145:27–37.

Pogribny IP, Basankian AG, Miller BJ, Lopatina NG, Poirier LA, James SJ. DNA strand breaks in genomic DNA and within the p53 gene are associated with hypomethylation in livers of folate/methyl deficient rats. *Cancer Res*; 55: 1894–1901.

Pogribny IP, Muskhelishvili L, Miller BJ, James SJ. Presence and consequence of uracil in preneoplastic DNA from folate/methyl deficient rats. *Carcinogenesis* 1997; 18:2071–2076.

Polani PE, Briggs JH, Ford CE, Clarke CM, Berg JM. A Mongol girl with 46 chromosomes. *Lancet* 1960: 721-724.

Qu GZ, Grundy P, Narayan A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;76:196–201.

Rahmani Z, Blounin JL, Creau-Goldberg N, Watkins PC, Mattei JF, Poissonnier M, et al. Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5958-5962.

Relton CL, Wilding CS, Laffling AJ, Jonas P. A.; BURGESS, T.; BINKS, K.; TAWN, J. E.; BURN, J. Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy. *Molecular Genetics and Metabolism* 2004; 81:273–281.

Renauld H, Gasser SM. Heterochromatin: a meiotic matchmarker? Trends Biol Sci 1997; 7:201-5.

Riozen NJ, Patterson Down's syndrome. Lancet 2003; 361:1281-89.

Ronsenblatt DS. Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic bases of inherited disease. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1995. p. 3111-28.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higushi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239: 487-91.

Sciandrello G, Caradonna F, Mauro M, Barbata G. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. Carcinogenesis 2004; 25: 413-417.

Scholl TO, Johnson WG. Folic acid: influence on the outcome of pregnancy. American Journal of Clinical Nutrition 2000; 71(5):1295S-1303s.

Silva LRJ, Vergani N, Galdieri LC, Porto MPR, Longhitano SB, Brunoni D, et al. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. Am J Med Genet 2005; 135: 263–267.

Shet JJ, Sheth FJ. Gene polymorphism and folate metabolism: a maternal risk factor for Down syndrome. Indian Pediatr 2003; 40(2):115-23.

Siegel S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. São Paulo: McGraw-Hill, 1975.

Stover PJ, Chen LH, Suh JR, Stover DM, Keyomarsi K, Shane B. Molecular cloning, characterization, and regulation of the human mitochondrial serine hydroxymethyltransferase gene. J Biol Chem 1997; 272(3):1842-1848.

Strachan T, Read AP. Mapeamento genético de caracteres complexos. In: Strachan T, Read AP. Genética Molecular Humana, 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002b. p. 283-94.

Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. Am J Hum Genet 1979; 31:125-135.

Tease C, Fisher G. The influence of maternal age on radiation-induced chromosome aberrations in mouse oocytes. Mutat Res 1991; 262:57-62.

Titenko-Holland N, Jacob RA, Shang N, Balaraman A, Smith MT. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. Mutat Res 1998; 417:101–114.

Thompson MW, McInnes RR, Huntington FW. Genética Médica, 6 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 387, 2002.

Van Der Put NM, Van Der Molen EF, Kluijtmans LA, Trijbels JM, Eskes TK, Van Oppenraaij-Emmerzaal D, et al. Sequence analysis of the coding region of human methionine synthase: relevance hyperhomocysteinaemia in neural-tube defects and vascular disease. Q J Med 1997; 90:511-517.

Vidal-Taboada JM, Sanz S, Egea A, Scartezzini P, Oliva R. Identification and characterization of a new gene from human chromosome 21 between markers D21S343 and D21S268 encoding a leucine-rich protein. Biochemical and Biophysical Research Communications 1998; 250:547-554.

Vilaseca MA, Vilarinho L, Zavadakova P, Vela E, Ceto E, Pineda M. CblE type of homocystinuria: Mild clinical phenotype in two patients homozygous for a novel mutation in the MTRR gene. J Inher Metab Dis 2003; 26:361-93.

Vig BK, Hallett WH. 5-azacytidine-induced and Hoechst-induced aneuploidy in Indian muntjac. Mutat Res 2000; 466:79-86.

Wang L, Ke Q, Chen W, Wang J, Tan Y, Zhou Y, et al. Polymorphisms of MTHFD, plasma homocysteine levels, and risk of gastric cancer in a high-risk chinese population. *Clinical Cancer Research* 2007; 13:2526-2532.

Wang X, Thomas P, Xue J, Fenech M. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro—evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutation Research* 2004; 551:167–180.

Wang SS, Qiao F, Feng L, Juan-Juan LV. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B* 2008; 9(2):93-99.

West MG, Home DW, Appling DR. Metabolic role of cytoplasmic isozymes of 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* 1996; 35:3122-3132.

Wilson A, Platt R, Wu Q, Leclerc D, Christensen B, Hong Y, et al. A Common Variant in Methionine Synthase Reductase Combined with Low Cobalamin (Vitamin B12) Increases Risk for Spina Bifida. *Molecular Genetics and Metabolism* 1999; 67:317-323.

Xu GL, Bestor TH, Bouchis D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature* 1999; 402:187–191.

Zetterberg H, Regland B, Palmer M, Rymo L, Zafiropoulos A, Arvanitis DA, et al. The transcobalamin codon 259 polymorphism influences the risk of human spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2002; 17:3033–6.

Zijno A, Andreoli C, Leopardi P, Marconi F, Rossi S, Caiola S, et al. Folate status, metabolic genotype, and biomarkers of genotoxicity in healthy subjects. *Carcinogenesis* 2003; 24(6):1097-1103.

REFERÊNCIAS ON-LINE:

(1) Disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=RFC-1>

(2) Disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=MTRR>

(3) Disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=search&term=TCII>

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, 2007. <http://www.R-project.org>.

