



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da
Saúde

Mariana Fernanda dos Santos

Impacto de polimorfismos de genes do
metabolismo do folato e do microRNA
hsa-mir-149 no risco para cardiopatias
congênitas em indivíduos com síndrome de Down

São José do Rio Preto
2016

Mariana Fernanda dos Santos

**Impacto de polimorfismos de genes do
metabolismo do folato e do microRNA
hsa-mir-149 no risco para cardiopatias
congenitas em indivíduos com síndrome de Down**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Érika Cristina Pavarino

Coorientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Joice Matos Biselli Périco

São José do Rio Preto

2016

Santos, Mariana Fernanda

Impacto de polimorfismos de genes do metabolismo do folato e do microRNA hsa-mir-149 no risco para cardiopatias congênitas em indivíduos com síndrome de Down/ Mariana Fernanda dos Santos

São José do Rio Preto, 2016.

80 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Érika Cristina Pavarino

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Joice Matos Biselli Périco

1. Síndrome de Down; 2. Polimorfismo genético; 3. Ácido fólico.

Mariana Fernanda dos Santos

**Impacto de polimorfismos de genes do
metabolismo do folato e do microRNA
hsa-mir-149 no risco para cardiopatias
congenitas em indivíduos com síndrome de Down**

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE

Presidente e Orientadora: Érika Cristina Pavarino

1º Examinador: Lilian Castiglioni

2º Examinador: Ana Livia Silva Galbiatti Dias

1º Suplente: Patrícia Matos Biselli Chicote

2º Suplente: Anelise Russo

São José do Rio Preto, 2016.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas e Quadros.....	viii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	01
1.1 Defeitos cardíacos congênitos na síndrome de Down e o metabolismo do folato.....	02
1.1.2 Controle da expressão do gene <i>MTHFR</i> por microRNA (miRNA)...	08
1.2 Objetivos.....	12
2. Casuística e Métodos.....	13
2.1 Casuística.....	14
2.2 Métodos.....	14
2.2.1 Coleta e extração de DNA das amostras de sangue periférico.....	14
2.2.2. Quantificação do DNA genômico.....	16
2.2.3. Análise molecular.....	16
2.2.4. Análise Estatística.....	22
3. Resultados.....	23
3. 1 Resultados Clínicos.....	24

3. 2 Resultados dos polimorfismos hsa-mir-149 rs2292832, <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049.....	26
3. 3 Resultados dos 17 polimorfismos como fatores de risco para cardiopatias congênitas.....	36
4. Discussão.....	42
5. Conclusões.....	52
6. Referências Bibliográficas.....	54
7. Apêndices.....	73
8. Anexos.....	78

Dedicatória

Deus e a Virgem Maria: pelo constante cuidado, amor e proteção em todos os momentos. Por iluminarem e abençoarem meu caminho, permitindo-me discernimento para enfrentar as dificuldades.

Aos meus pais Marcia e Nivaldo: por nunca medirem esforços e amor dedicados à minha vida, para alcançar meus objetivos e realizar os meus sonhos. Por me ensinar que o amor e a família são os bens mais necessários e preciosos. Vocês são meus grandes exemplos e os maiores participantes dessa conquista. Minha imensa gratidão vai além do sentimento, pois vós cumpristes o dom divino e emprestaram-me seu amor para que pudesse existir. Amo vocês!

À minha irmã Isabella: por fazer parte da minha vida, pela admiração, incentivo e amizade em todos os momentos. Por você procuro ser melhor a cada dia e continuar a ser o exemplo de dedicação e esforço por ti admirado. Amo você!

Ao meu namorado Fernando: que com amor torna os meus dias mais alegres. Que sempre me incentiva a continuar na realização dos meus sonhos. Obrigada, pelo seu apoio, paciência e companheirismo.

Aos meus avós Maria Aparecida, Antônio e Maria Nadir: por cuidarem de mim com muito amor e vibrarem a cada conquista. Amo vocês!

Aos meus tios, tias e primos: pelo incentivo, apoio e companhia diária. Vocês são muito especiais na minha vida!

Agradecimentos

Deus e a Virgem Maria

Pelo dom da vida, por guiar e abençoar cada passo desse desafio. Por me amparar e interceder em todos os momentos da minha vida.

Prof^ª. Dr^ª Érika Cristina Pavarino

Pela oportunidade a mim concedida, apoio, conhecimento compartilhado no desenvolvimento deste trabalho e exemplo profissional.

Prof^ª. Dr^ª Joice Matos Biselli Périco

Todo o meu agradecimento pela ajuda, apoio, paciência e disponibilidade no decorrer deste trabalho.

Prof^ª. Dr^ª Eny Maria Goloni Bertollo

Pela oportunidade concedida no laboratório e convívio diário.

Prof^ª. Dr^ª Lilian Castiglioni e Prof^ª. Dr^ª Ana Livia Silva Galbiatti Dias

Pela disponibilidade e colaboração.

Meus pais, Marcia e Nivaldo e minha irmã Isabella

Pelo amor, cuidado, carinho e orações dedicadas a mim. Minha eterna gratidão por renunciarem aos seus sonhos para que realizasse os meus. Por me incentivar a prosseguir na jornada, mostrando que esse caminho deve ser seguido sem medo, independente dos obstáculos. Obrigada por simplesmente existirem, sem vocês nada tem sentido!

Meu namorado Fernando

Pelo companheirismo ao longo dos meus dias. Obrigada por sua compreensão e respeito ao meu trabalho, incentivando-me sempre a realizar minhas conquistas.

Minha família

Pelo importante carinho, cuidado, afeto e essencial incentivo.

Prof^ª. Dr^a Márcia Maria Urbanin Castanhole Nunes e Prof^a. Dr^a Patrícia Matos Biselli Chicote

Pelo apoio, por partilharem suas experiências, conhecimentos e preciosas sugestões durante a realização deste trabalho.

Prof^º. Dr^º Moacir Fernandes Godoy

Pela disponibilidade, auxílio e colaboração durante o decorrer do trabalho.

Analice Andreoli

Pela amizade e companheirismo desde o início. Você foi fundamental no decorrer desse trabalho, permitiu que os dias e as dificuldades tivessem o fardo mais leve. Obrigada por ser minha dupla, por toda parceria, paciência e auxílio.

Marlon Fraga Mattos

Pela amizade, companhia e auxílio constante. Obrigada por tornar os dias mais tranquilos e alegres.

As minhas amigas Letícia, Mariana e Millena

Que sempre me incentivaram e apoiaram a encarar este desafio.

Enfermeiras, Mariana, Miriam e Liliam

Pela disponibilidade, auxílio e paciência para as constantes coletas de amostras de pacientes.

Funcionários e pós-graduandos da UPGEM

Pela amizade, companheirismo e pelos momentos agradáveis, deixando os dias mais leves.

Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e a Fundação Faculdade Regional de Medicina (FUNFARME) / Hospital de Base

Pelo suporte durante todo o desenvolvimento do trabalho

Aos indivíduos com síndrome de Down e suas mães

Pela grande colaboração e contribuição.

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP

Pela oportunidade concedida e suporte necessário.

CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Pela concessão da bolsa de mestrado.

FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)

Pelo apoio financeiro concedido à UPGEM em nome da Prof^a Dra. Érika Cristina Pavarino.

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

Pelo apoio financeiro concedido.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para o meu aprendizado, crescimento profissional, pessoal e na realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos e gratidão.

*“Não sou nada, sou apenas um instrumento,
um pequeno lápis nas mãos do Senhor, com o
qual ele escreve aquilo que deseja. Por mais
imperfeitos que sejamos, Ele escreve
magnificamente.”*

Santa Madre Teresa de Calcutá

Lista de Figuras

Figura 1. Metabolismo do folato e suas principais enzimas (Figura modificada segundo Coppedè, 2015). TC2 = Transcobalamina 2, DHFR = Dihidrofolato redutase, DHF = Dihidrofolato, THF = Tetrahydrofolato, SHMT = Serina hidoximetiltransferase, 5,10 MTHF = 5,10 Metilenotetrahydrofolato, MTHFR = Metilenotetrahydrofolato redutase, 5-MTHF = 5-Metiltetrahydrofolato, MTR = Metionina sintase, MTRR = Metionina sintase redutase, BHMT = Betaína-homocisteína metiltransferase, SAM = S-adenosilmetionina, SAH = S-adenosilhomocisteína, Hcy = Homocisteína, CβS = Cistationina β-sintase, MTHFD1 = Metilenotetrahydrofolato desidrogenase 1, 5,10-MetiniLTHF = 5,10-Metinitetrahydrofolato, 10-formilTHF = 10-Formiltetrahydrofolato, RFC1 = Carregador de folato reduzido 1, B₁₂ = Vitamina B₁₂, B₆ = Vitamina B₆, CH₃ = Grupo metil, dUMP = Deoxiuridina monofosfato, dTMP = Deoxitimidina monofosfato..... 11

Figura 2. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo hsa-mir-149 (rs2292832). O fluoróforo VIC (verde) foi utilizado para marcar as sondas que reconhecem os alelos selvagens e o fluoróforo FAM (azul) as sondas que reconhecem os alelos polimórficos. Desse modo (A) representa o genótipo homozigoto selvagem CC, (B) genótipo heterozigoto CT e (C) genótipo homozigoto polimórfico TT..... 19

Figura 3. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo *MTHFR* (rs4846048). O fluoróforo VIC (verde) foi utilizado para marcar as sondas que reconhecem os alelos selvagens e o fluoróforo FAM (azul) as sondas que reconhecem os alelos polimórficos. Desse modo (A) representa o genótipo homozigoto selvagem AA, (B) genótipo heterozigoto AG e (C) genótipo homozigoto polimórfico GG..... 20

Figura 4. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo *MTHFR* (rs4846049). O fluoróforo VIC (verde) foi utilizado para marcar as sondas que reconhecem os alelos selvagens e o fluoróforo FAM (azul) as sondas que reconhecem os alelos polimórficos. Desse modo (A) representa o genótipo homozigoto selvagem GG, (B) genótipo heterozigoto GT e (C) genótipo

homozigoto polimórfico TT.....	21
--------------------------------	----

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1. Variáveis clínico-epidemiológicas dos indivíduos com síndrome de Down.....	25
Tabela 2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos hsa-mir-149 rs2292832, <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049, nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle) e nas suas mães.....	26
Tabela 3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos hsa-mir-149 rs2292832, <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049, nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle) e nas suas mães.....	27
Tabela 4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos hsa-mir-149 rs2292832, <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049, nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle) e nas suas mães.....	27
Tabela 5. Análises de regressão logística múltipla envolvendo indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso) e com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	28
Tabela 6. Análises de regressão logística múltipla envolvendo indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	29
Tabela 7. Análises de regressão logística múltipla envolvendo indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	29
Tabela 8. Haplótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049 nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente da cardiopatia (caso), e indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	30
Tabela 9. Haplótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049 nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	30

Tabela 10. Haplótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049 nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	30
Tabela 11. Análises de regressão logística múltipla envolvendo mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	31
Tabela 12. Análises de regressão logística múltipla envolvendo mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	32
Tabela 13. Análises de regressão logística múltipla envolvendo mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	32
Tabela 14. Haplótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049 nas mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	33
Tabela 15. Haplótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049 nas mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	33
Tabela 16. Haplótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049 nas mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	33
Tabela 17. Análises de combinação genotípica em indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e em indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).....	34
Tabela 18. Análises de combinação genotípica em indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e em indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).....	34
Tabela 19. Análises de combinação genotípica em indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e em indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).....	34

Tabela 20. Análises de combinação genotípica em mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e de indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).....	35
Tabela 21. Análises de combinação genotípica em mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e de indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).....	35
Tabela 22. Análises de combinação genotípica em mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e de indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).....	35
Tabela 23. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos 17 polimorfismos nos indivíduos com SD.....	36
Tabela 24. Distribuição dos 17 alelos polimórficos no grupo de indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente da cardiopatia (caso) e no grupo com indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	38
Tabela 25. Análises de regressão logística múltipla envolvendo indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	39
Tabela 26. Haplótipos para os polimorfismos <i>MTHFR</i> C677T, <i>MTHFR</i> A1298C, <i>MTHFR</i> T1317C, <i>MTHFR</i> rs4846048 e <i>MTHFR</i> rs4846049 nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente da cardiopatia (caso), e de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	41
Tabela 27. Haplótipos para os polimorfismos <i>TC2</i> A67G e <i>TC2</i> C776G nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente da cardiopatia (caso), e de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).....	41
Tabela 28. Estudos sobre associação entre polimorfismos maternos em genes do metabolismo do folato e risco para DCC na prole sem síndrome genética.....	45
Tabela 29. Estudos sobre associação entre polimorfismos em genes do metabolismo do folato e risco para DCC em indivíduos sem síndrome genética..	46
Quadro 1. Ensaio Taqman (<i>Applied Biosystems</i> ®) para genotipagem dos polimorfismos por discriminação alélica por PCR em tempo real.....	17
Quadro 2. Reação e ciclagem do polimorfismo hsa-mir-149 (rs2292832).....	18

Quadro 3. Reação e ciclagem do polimorfismo <i>MTHFR</i> (rs4846048).....	18
Quadro 4. Reação e ciclagem do polimorfismo <i>MTHFR</i> (rs4846049).....	18

Lista de Abreviaturas e Símbolos

BHMT	Betaína-homocisteína metiltransferase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI 95%	Intervalo de confiança 95%
CIA	Comunicação interatrial
CIV	Comunicação interventricular
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
<i>CβS</i>	Cistationina β -sintase
DCC	Defeitos cardíacos congênitos
DHF	Dihidrofolato
DHFR	Dihidrofolato redutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSAV	Defeito do septo atrioventricular
dTMP	Deoxitimidina monofosfato
dUMP	Deoxiuridina monofosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
10-formil-THF	10-Formiltetrahydrofolato
HB	Hospital de Base de São José do Rio Preto
Hcy	Homocisteína
mL	Mililitro
5,10-MTHF	5,10-Metilenotetrahydrofolato
5,10-MTHFR	5,10-Metilenotetrahydrofolato redutase
5-MTHF	5-Metiltetrahydrofolato
5,10-metil-THF	5,10-Metiltetrahydrofolato
miRNA	microRNA
MTHFD1	Metilenotetrahydrofolato desidrogenase 1
MTHFR	Metilenotetrahydrofolato redutase
MTR	Metionina sintase

MTRR	Metionina sintase redutase
OD	Densidade óptica
OR	Odds ratio
PDA	Persistência do ducto arterial
pri-miRNA	Transcrito primário
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RFC1	Carregador de folato reduzido 1
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosilmetionina
SD	Síndrome de Down
SHMT	Serina hidroximetiltransferase
SLC19A1	Carregador de folato reduzido 1
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TC2	Transcobalamina II
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THF	Tetrahydrofolato
TYMS	Timidilato sintase
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
UTR 3'	Região 3' não traduzida
X ²	Qui-quadrado

Resumo

Introdução: Defeitos cardíacos congênitos (DCC) estão presentes em aproximadamente 40 a 60% dos indivíduos com a síndrome de Down (SD) e representam a principal causa de morte nos primeiros anos de vida em indivíduos com a síndrome. Polimorfismos em genes maternos e fetais, que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do folato, têm sido associados com o desenvolvimento de cardiopatias congênitas. **Objetivos:** Avaliar se a presença dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049, hsa-mir-149 rs2292832, *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1317C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *SLC19A1* A80G, *TC2* A67G, *TC2* C776G, *CβS* 844ins68, *CβS* T833C, *MTHFD1* G1958A, *BHMT* G742A, *DHFR* del 19 pb, *SHMT* C1420T em indivíduos com SD está associada com a ocorrência de DCC nesses indivíduos. Também foi avaliada a associação entre os polimorfismos genéticos maternos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 e a presença de DCC na prole com SD. **Casuística e Método:** Este estudo incluiu 139 indivíduos (80 indivíduos com SD e DCC e 59 indivíduos controles com SD, sem cardiopatia congênita). A análise molecular dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 foi realizada pelo método discriminação alélica por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os dados da genotipagem dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1317C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *SLC19A1* A80G, *TC2* A67G, *TC2* C776G, *CβS* 844ins68, *CβS* T833C, *MTHFD1* G1958A, *BHMT* G742A, *DHFR* del 19 pb, *SHMT* C1420T foram obtidos de banco de dados de trabalhos previamente publicados pelo grupo de pesquisa e utilizados para avaliar o risco para a ocorrência de DCC no presente estudo. Análises de regressão logística múltipla foram realizadas para avaliar o risco de DCC na

presença dos 17 polimorfismos nos modelos genéticos dominante e recessivo. A mediana do número de alelos mutantes entre os grupos foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney. Análise de combinação genotípica foi realizada para os polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832, utilizando o teste exato de Fisher, no modelo dominante. **Resultados:** As análises de regressão logística múltipla, envolvendo os indivíduos com SD, não evidenciaram associação entre os 17 polimorfismos e o risco para DCC. A mediana do número de alelos polimórficos também não diferiu entre os indivíduos com SD com e sem DCC. Por outro lado, os genótipos maternos hsa-mir-149 rs2292832 CT ou TT foram associados ao risco reduzido para cardiopatia isolada na prole com SD (OR = 0,31; IC 95% = 0,13-0,72; P = 0,0063). A análise das combinações genotípicas dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832, nos indivíduos com SD e nas suas mães, não mostrou associação entre as diferentes combinações e o risco para cardiopatia congênita. **Conclusões:** Na casuística avaliada não há evidências de associação entre os polimorfismos analisados em indivíduos com SD e a ocorrência de DCC; entretanto um menor risco de cardiopatia congênita isolada para os indivíduos com SD é observado na presença dos genótipos maternos hsa-mir-149 rs2292832 CT ou TT.

Palavras-chave: 1. Síndrome de Down 2. Polimorfismo genético 3. Ácido fólico.

Abstract

Introduction: Congenital heart defects (CHD) are present in approximately 40 to 60% of individuals with Down syndrome (DS). It is the leading cause of death in the first years of life in individuals with the syndrome. Polymorphisms in maternal and fetal genes encoding enzymes involved in folate metabolism have been associated with the development of congenital heart defects. **Objectives:** To assess if the presence of polymorphism (*MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049, hsa-mir-149 rs2292832, *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1317C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *SLC19A1* A80G, *TC2* A67G, *TC2* C776G, *C β S* 844ins68, *C β S* T833C, *MTHFD1* G1958A, *BHMT* G742A, *DHFR* del 19 pb, and *SHMT* C1420T) in individuals with DS is associated with the occurrence of CHD in these individuals. We also evaluated the association between maternal genetic polymorphisms *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 and hsa-mir-149 rs2292832, and the presence of CHD in offspring with DS. **Methods:** This study included 139 individuals (80 individuals with DS and CHD, and 59 control subjects with DS without congenital heart disease). Molecular analysis of *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 and hsa-mir-149 rs2292832 was carried out by real time polymerase chain reaction allelic discrimination. Genotyping data of *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1317C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *SLC19A1* A80G, *TC2* A67G, *TC2* C776G, *C β S* 844ins68, *C β S* T833C, *MTHFD1* G1958A, *BHMT* G742A, *DHFR* del 19 pb, and *SHMT* C1420T were obtained from database of previous studies of the research group and also used to assess the risk for the occurrence of CHD in this study. Multiple logistic regression analyzes were performed to assess the risk of CHD in the presence of 17 polymorphisms in dominant and recessive genetic models. The median number of mutant alleles between groups was assessed by the Mann-

Whitney test. Genotypic combination analysis was performed for the polymorphisms *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049, and hsa-mir-149 rs2292832, using Fisher's exact test, dominant model. **Results:** Multiple logistic regression analysis involving individuals with DS showed no association between 17 polymorphisms and the risk for CHD. The median number of polymorphic alleles did not differ among individuals with DS with and without CHD. On the other hand, the maternal genotypes hsa-mir-149 rs2292832 CT or TT were associated with reduced risk for isolated heart disease in the offspring (OR = 0,31; 95% CI = 0,13 to 0,72; P = 0,0063). The analysis of genotypic combinations of *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049, and hsa-mir-149 rs2292832 in individuals with DS, and their mothers showed no association between the different combinations and the risk for congenital heart disease. **Conclusions:** There is no evidence of association between the polymorphisms analyzed in individuals with DS and the occurrence of CHD. However, a lower risk of isolated congenital heart disease for individuals with DS is observed in the presence of maternal genotypes hsa-mir-149 rs2292832 CT or TT.

Key words: 1. Down syndrome 2. Genetic Polymorphism 3. Folic acid.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Down (SD), com incidência aproximada de um em 660 nativos⁽¹⁾ é a alteração cromossômica humana mais frequente. Em 95% dos casos, os indivíduos acometidos apresentam trissomia livre ou simples, decorrente de não disjunção cromossômica durante a meiose materna⁽²⁾. Em menor frequência são observadas as translocações cromossômicas (4%), geralmente entre os cromossomos 14 e 21 e o mosaïcismo (1%), representado por populações de células com 46 e 47 cromossomos no mesmo indivíduo^(1,3,4,5).

Os indivíduos apresentam comprometimento intelectual e, frequentemente, perfil facial achatado, braquicefalia, fissura palpebral oblíqua, ponte nasal achatada, comissuras bucais voltadas para baixo, occipital achatado, pescoço curto, micrognatia, prega palmar única, braquidactilia e prega epicântica⁽⁶⁾. Dentre as características clínicas observam-se defeitos cardíacos congênitos (DCC)⁽⁷⁾, problemas oftalmológicos, perda auditiva, obstrução das vias aéreas superiores^(8,9,10), disfunção da tireóide^(11,12), malformações gastrointestinais e geniturinárias⁽¹³⁾ e anomalias periodontais^(14,15). Outros aspectos clínicos relevantes da SD são manifestação precoce da doença de Alzheimer⁽¹⁶⁾, deficiência imunológica⁽¹⁷⁾ e risco aumentado para acidente cérebro vascular⁽¹⁸⁾ e para leucemias específicas^(19,20).

1.1 Defeitos cardíacos congênitos na síndrome de Down e o metabolismo do folato

Os DCC são malformações causadas por um desenvolvimento cardiovascular anormal durante o período fetal e estão presentes em 40-60% dos indivíduos com SD, que exibem principalmente comunicação interatrial (CIA), persistência do ducto arterial

(PDA), comunicação interventricular (CIV), defeito do septo atrioventricular (DSAV), insuficiência valvar e Tetralogia de Fallot^(7,21,22,23).

A etiologia dos DCC é multifatorial e estudos têm mostrado um efeito benéfico da suplementação materna de ácido fólico na redução de cardiopatias na prole⁽²⁴⁾. Embora não se conheça o mecanismo biológico específico da associação entre a deficiência de ácido fólico e risco de cardiopatia congênita, estudos *in vitro* demonstraram que o metabolismo anormal do folato/homocisteína (Hcy) afeta a formação e migração de células da crista neural^(25,26) que participam da septação do coração primitivo⁽²⁷⁾, contribuindo assim para os defeitos conotruncais⁽²⁸⁾ e defeitos de septação conoventricular^(29,30).

O efeito benéfico da suplementação de ácido fólico durante a gestação para a prevenção de DCC pode ser explicado pelo efeito desta vitamina no crescimento das células neuroectodérmicas, as quais são precursoras das células da crista neural cardíaca, durante o desenvolvimento embrionário. Experimento *in vitro* mostrou que a adição de ácido fólico, em cultura proveniente da região do tubo neural cardíaco de embriões de galinha, estimula a proliferação das células neuroepiteliais no período embrionário do fechamento desta estrutura⁽²⁵⁾.

Outro estudo *in vitro* demonstrou que a deficiência de ácido fólico pode resultar no aumento da apoptose celular durante o desenvolvimento cardíaco. Neste estudo Tang et al. (2004)⁽²⁹⁾ observaram maior concentração de células apoptóticas no tronco arterioso e septo interventricular da região conotruncal em cardiomiócitos de embriões de camundongo *knockout* para o gene *Folbp1*, cuja proteína é mediadora de transporte de ácido fólico, e sugeriram que a inativação desse gene pode resultar em deficiência geral de ácido fólico e susceptibilidade para defeitos cardíacos.

O ácido fólico também conhecido como ácido pteroilglutâmico, é uma vitamina do complexo B, de fonte exógena e hidrossolúvel. É responsável por uma série de atividades: síntese de purinas e pirimidinas, metabolismo de aminoácidos e metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA). Esta última é essencial nos processos de desenvolvimento celular e expressão gênica⁽³¹⁾. Assim, é possível que o folato possa exercer um efeito de proteção para DCC por fornecer um balanço entre metilação e síntese de DNA, pois a cardiogênese é uma fase embrionária na qual a rápida proliferação celular e a síntese DNA livre de erros são críticas⁽³²⁾. A ação da enzima metilenotetrahidrofolato desidrogenase 1 (MTHFD1), envolvida no metabolismo do folato, fornece substrato a biossíntese de purinas e embriões de camundongos com deficiência da atividade dessa enzima apresentam risco aumentado de DCC, principalmente defeitos de septo ventricular⁽³³⁾.

O metabolismo do ácido fólico envolve várias reações enzimáticas (Figura 1). Após ingestão, esta vitamina é transportada pela enzima carreadora de folato reduzido 1 (SLC19A1, RFC1) presente nas membranas celulares intestinais para o interior da célula. A proteína SLC19A1 é responsável pelo transporte de folato reduzido 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) para o interior das células, enquanto a enzima transcobalamina II (TC2) transporta a vitamina B₁₂. Estas enzimas merecem destaque no metabolismo do folato/Hcy, pois são importantes para a manutenção da disponibilidade de folato e vitamina B₁₂ no interior das células^(34,35,36,37).

O substrato 5-MTHF fornece grupos metil para remetilação da Hcy em metionina^(36,38). Esse processo de remetilação é catalisado pela enzima metionina sintase (MTR) que necessita de vitamina B₁₂ como cofator, para originar o S-adenosilmetionina (SAM). A enzima MTR se mantém ativa pela ação de outra enzima,

a metionina sintase redutase (MTRR). Seguindo o metabolismo, uma reação de desmetilação originará a S-adenosil-homocisteína (SAH) com posterior liberação de Hcy⁽³⁶⁾.

Em uma via alternativa de remetilação da Hcy, a enzima Betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT) catalisa a transformação da Hcy em metionina usando o aminoácido betaína como doador de grupo metil^(39,40). A Hcy pode também ser catalisada em cistationina e, posteriormente, em cisteína em uma via denominada de transulfuração, pela ação da enzima Cistationina β -sintase (C β S), dependente de vitamina B6, codificada por um gene presente no cromossomo 21^(41,42).

A via do folato também é essencial para a síntese purinas e pirimidinas. O tetrahydrofolato (THF) proveniente do processo de remetilação catalisado pela enzima MTR, sob a ação da enzima Serina hidroximetiltransferase (SHMT) transforma-se em 5,10 metilenotetrahydrofolato (5,10-MTHF)^(43,44,45). O THF pode também sofrer ação sequencial pela enzima trifuncional MTHFD1, que o converte em 10-formiltetrahydrofolato (10-formil-THF), substrato essencial para a síntese de novo de purinas e pirimidinas^(46,47) e, em seguida, em 5,10-metiltetrahydrofolato (5,10-metil-THF) e em 5,10-MTHF⁽⁴⁸⁾.

O substrato 5,10-MTHF pela ação da enzima timidilato sintase (TYMS)^(49,50) é convertido em dihydrofolato (DHF) e, posteriormente, em THF pela ação da enzima Dihydrofolato redutase (DHFR). A enzima TYMS também converte a deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP) para síntese de pirimidina⁽⁵¹⁾. Além disso, o 5,10-MTHF, pela ação da enzima 5,10 metilenotetrahydrofolato redutase (5,10-MTHFR) é convertido em 5-MTHF, a principal forma circulante de folato⁽⁵²⁾.

Polimorfismos em genes que codificam as enzimas da via do folato podem reduzir a atividade dessas enzimas e resultar em alterações neste metabolismo⁽³⁷⁾. Assim, embora estudos epidemiológicos mostrem que a suplementação materna com ácido fólico pode reduzir o risco de cardiopatia congênita^(53,54,55,56), o impacto da ingestão de ácido fólico durante a gestação pode ser modificado por polimorfismos, em genes maternos e fetais, que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do folato⁽⁵⁷⁾.

Estudos caso-controle têm investigado o efeito destes polimorfismos como possíveis fatores de risco para DCC e mostram uma associação entre genótipos polimórficos maternos e aumento do risco para cardiopatia na prole não síndrômica^(28,58,59,60,61,62), embora existam resultados controversos^(63,64). Outros achados significantes de associação entre defeitos conotrunciais e genótipos polimórficos materno *MTHFR* C677T, *CBS* 844ins68 e *TYMS* 1494del6, observados nos estudos de Lupo et al. (2010)⁽³⁰⁾ e (2011)⁽⁶⁵⁾, perderam a significância estatística após correção para múltiplo testes.

Além disso, polimorfismos funcionais da via do folato aumentam o risco materno para prole com DCC em associação ao estilo de vida. No estudo de Hobbs *et al.* (2010)⁽³⁷⁾, por exemplo, o aumento de risco para DCC na prole não síndrômica foi observado na presença da combinação do polimorfismo *TC2* C776G aos hábitos tabagista e etilista materno. Além disso, estes autores mostraram que gestantes obesas com uma ou duas cópias do alelo A do polimorfismo *BHMT* G742A apresentam um risco aumentado de 1,8 vezes para prole com DCC comparado a mulheres com peso normal e portadoras do genótipo *BHMT* 742GG.

A análise em crianças não sindrômicas também mostra genótipos suscetíveis para cardiopatias congênitas^(59,61,66,67). Wang et al. (2013)⁽⁶⁸⁾ analisaram 160 crianças com DCC e 188 crianças sem cardiopatias e observaram que os genótipos polimórficos combinados (*MTHFD1* G1958A, *MTHFR* C677T e *MTR* A2756G) e (*MTHFD* G1958A, *MTR* A2756G e *SLC19A1* G80A) podem aumentar o risco de DCC, enquanto os genótipos AA, GG e (AG+GG) do polimorfismo *DHFR*-c595+59del19 são protetores para DCC. Um efeito protetor para DCC também foi observado para o alelo *MTHFR* 1298C nos estudos de Hobbs et al. (2006)⁽³²⁾ e Goldmuntz et al. (2008)⁽⁶⁹⁾ e nenhuma associação entre variantes funcionais da via do folato e DCC foi observada em outros estudos^(63,70,71,72).

Estudos que analisaram o efeito de polimorfismos do metabolismo do folato no desenvolvimento de DCC em SD são escassos. Um estudo na população brasileira mostrou que a presença do alelo T materno do polimorfismo *MTHFR* C677T aumentou o risco de DCC em 2,07 vezes na prole com SD. Este risco foi acentuado em mães que não fizeram uso de ácido fólico no período pré-concepcional⁽⁷³⁾.

Avaliando vários polimorfismos do gene *SLC19A1*, Locke et al. (2010)⁽⁷⁴⁾ observaram, em população americana, uma maior proporção de alelos polimórficos em indivíduos com SD e DSAV em comparação com aqueles com SD sem DCC. Além disso, uma maior transmissão do alelo materno *MTHFR* 1298A para a prole com defeito do septoatrioventricular (DSAV) foi observada em relação aos controles sem cardiopatia. Por outro lado, um estudo realizado na Croácia, em indivíduos com SD e suas mães, não encontrou associação dos polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C com a presença de DCC⁽²¹⁾.

1.1.2 Controle da expressão do gene *MTHFR* por microRNA (miRNA)

É estimado que cerca de 30-90% dos genes humanos sejam regulados por microRNAs (miRNAs)^(75,76). Muitos miRNAs atuam em combinação para regular os mesmos genes-alvo e esses genes não são restritos a uma categoria funcional particular ou via biológica, mas estão envolvidos em uma grande variedade de processos biológicos^(77,78).

Os miRNA são pequenas moléculas de ácidos ribonucleicos (RNAs) não-codificantes envolvidas na regulação gênica pós-transcricional. São expressos como longos transcritos primários (pri-miRNA)⁽⁷⁹⁾ e processados no núcleo, dando origem aos pré-microRNAs⁽⁸⁰⁾. Os pré-microRNAs são exportados para o citoplasma⁽⁸¹⁾, onde são processados em microRNAs maduros⁽⁸²⁾. Uma das fitas do microRNA maduro é selecionada para integrar o complexo de silenciamento induzido por RNA (complexo RISC), que guiará a repressão da tradução do RNA mensageiro (RNAm) alvo e consequente por meio do pareamento entre o microRNA maduro e o RNAm alvo^(75,83,84,85).

É sabido que a expressão do gene *MTHFR* é controlada pela ação de miRNAs^(86,87). Estudo de Wu et al. (2013)⁽⁸⁸⁾ mostrou que o RNAm do gene *MTHFR* é alvo do hsa-mir-149. Um polimorfismo na região UTR 3' do gene *MTHFR*, rs4846049 (G→T), parece alterar a ligação entre seu RNAm e o hsa-mir-149, uma vez que foi observada uma diminuição significativa na expressão da proteína MTHFR em indivíduos homocigotos para o alelo T em relação aos indivíduos homocigotos para o alelo G. Os autores sugerem um mecanismo potencialmente patogênico de regulação gênica pós-transcricional por miRNA para o gene *MTHFR*, modificado por um SNP.

Além disso, o alelo T do polimorfismo *MTHFR* rs4846049 (G→T) foi associado com risco aumentado para doenças coronarianas⁽⁸⁸⁾. O alelo T desta variante também foi associada à paralisia cerebral combinada com deficiência mental⁽⁸⁷⁾.

Outro polimorfismo do gene *MTHFR* (rs4846048 A→G), também localizado na região UTR 3', a 463 pares de base upstream a um sítio putativo de sinal de poliadenilação⁽⁸⁹⁾ também mostrou-se uma variante funcional, uma vez que foi associado à perda de massa corporal magra e ao índice de massa corpórea⁽⁹⁰⁾. Estes autores sugerem que o gene *MTHFR* pode atuar na variação de massa corporal magra por meio da regulação da atividade mitocondrial e apoptose das células musculares⁽⁹⁰⁾.

A análise de haplótipos de seis polimorfismos do gene *MTHFR*, incluindo os polimorfismos rs4846049 e rs4846048, também mostrou que as combinações haplotípicas GGT/ TGGT/ TGAG (rs1476413, rs4846048, rs4846049/ rs1801133, rs1476413, rs4846048, rs4846049/ rs1801133, rs1476413, rs4846048, rs4846049) foram associadas à idade de início da menopausa⁽⁹¹⁾.

Evidências de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região gênica UTR 3', afetando as funções de diversos miRNAs (mir-155, mir-219, mir-124-1, mir-149), foram anteriormente descritas em doença cardiovascular e câncer^(92,93).

Além dos polimorfismos gênicos que podem alterar a ligação entre o miRNA e seu alvo, SNPs em miRNAs maduros e/ou em suas moléculas precursoras podem alterar sua expressão e/ou maturação e também modificar suas interações com seus genes alvos com consequências patogênicas⁽⁹³⁾. O alelo T do polimorfismo rs2292832 (C→T), localizado na região precursora do hsa-mir-149, em combinação com os alelos hsa-mir-146aG/-196a2C/-499G, foi significativamente associado com a ocorrência de acidente vascular cerebral isquêmico. Efeitos combinados entre polimorfismos de miRNA (mir-

146aG/-149T/-196a2C/-499G) e concentrações de Hcy e folato também foram observados em pacientes com acidente vascular cerebral⁽⁹⁴⁾. Outros estudos associaram o polimorfismo hsa-mir-149 (rs2292832 C→T) à modulação de alguns tipos de câncer^(95,96).

Considerando-se a importância do metabolismo do folato para o desenvolvimento cardíaco e o impacto da ocorrência cardiopatias congênitas em indivíduos com SD, o estudo de variantes genéticas funcionais que modulam esse metabolismo mostra-se relevante.

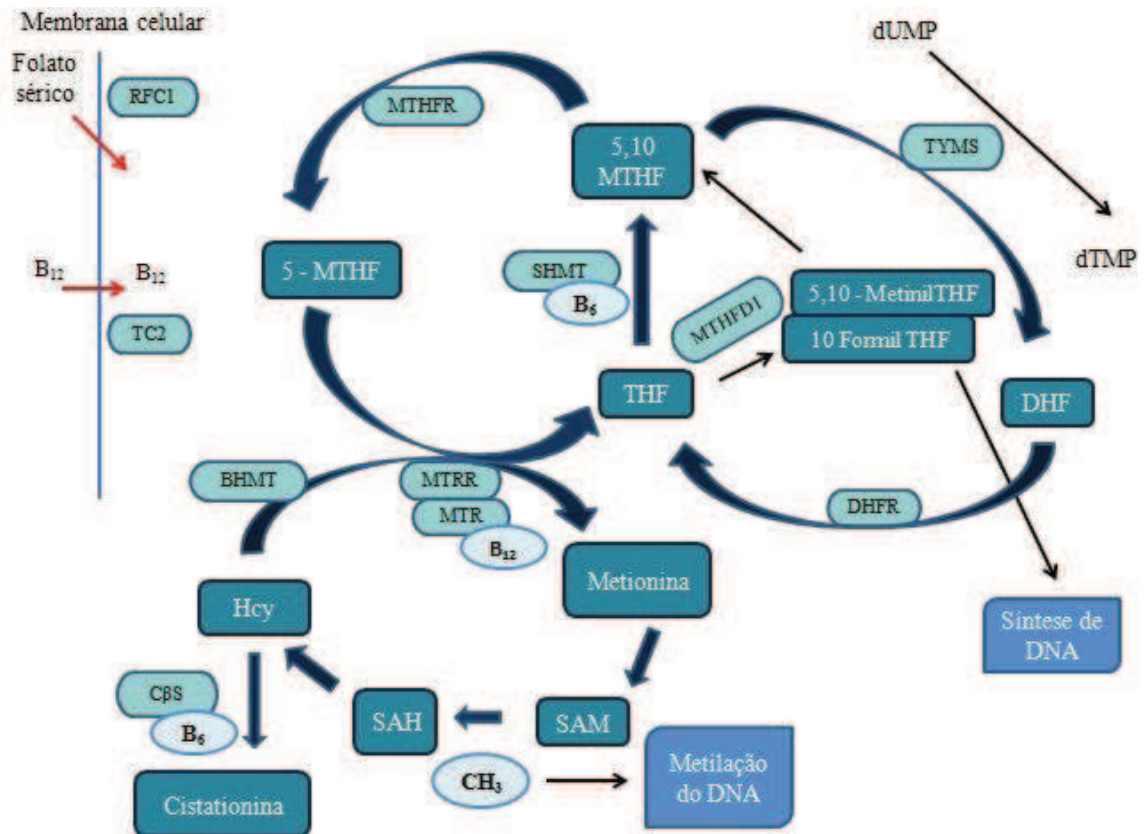


Figura 1. Metabolismo do folato e suas principais enzimas (Figura modificada segundo Coppedè, 2015). TC2 = Transcobalamina 2, DHFR = Dihidrofolato redutase, DHF = Dihidrofolato, THF = Tetrahydrofolato, SHMT = Serina hidoximetiltransferase, 5,10 MTHF = 5,10 Metilenotetrahydrofolato, MTHFR = Metilenotetrahydrofolato redutase, 5-MTHF = 5-Metiltetrahydrofolato, MTR = Metionina sintase, MTRR = Metionina sintase redutase, BHMT = Betaína-homocisteína metiltransferase, SAM = S-adenosilmetionina, SAH = S-adenosilhomocisteína, Hcy = Homocisteína, CBS = Cistationina β -sintase, MTHFD1 = Metilenotetrahydrofolato desidrogenase 1, 5,10-MetilTHF = 5,10-Metiltetrahydrofolato, 10-formilTHF = 10-Formiltetrahydrofolato, RFC1 = Carregador de folato reduzido 1, B₁₂ = Vitamina B₁₂, B₆ = Vitamina B₆, CH₃ = Grupo metil, dUMP = Deoxiuridina monofosfato, dTMP = Deoxitimidina monofosfato.

1.2 OBJETIVOS

Com base nos dados descritos, este estudo teve como objetivos:

1. Investigar se a presença dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1371C, *MTR* A2756G, *SLC19A1* A80G, *MTRR* A66G, *TC2* C776G, *TC2* A67G, *CβS* 844ins68, *CβS* T833C, *BHMT* G742A, *MTHFD1* G1958A, *DHFR* del 19 pb, *SHMT* C1420T, *MTHFR* rs4846049, *MTHFR* rs4846048 e hsa-mir-149 rs2292832 em indivíduos com trissomia livre do 21 está associada com a ocorrência de cardiopatia congênita.
2. Avaliar a associação entre os polimorfismos genéticos *MTHFR* rs4846049, *MTHFR* rs4846048 e hsa-mir-149 rs2292832, tanto maternos quanto em indivíduos com SD, e a presença de defeitos cardíacos congênitos nos indivíduos com SD.

2. CASUÍSTICAS E MÉTODOS

2. CASUÍSTICAS E MÉTODOS

2.1 Casuística

Seguindo as Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), parecer nº 529.830 (Anexo 1), CAAE nº 25712013.0.0000.5415. Foram incluídos no estudo 139 indivíduos com trissomia livre do cromossomo 21, confirmado por exame do cariótipo (indivíduos com translocação ou mosaïcismo não foram incluídos). O grupo caso foi composto por 80 indivíduos com DCC (52 com cardiopatia isolada e 28 com cardiopatia associada) e o grupo controle composto por 59 indivíduos sem cardiopatia congênita. Também foram incluídas 131 mães dos indivíduos com SD (75 mães de indivíduos com cardiopatia congênita e 56 mães de indivíduos sem cardiopatia). Os participantes do estudo foram provenientes do Serviço Ambulatorial de Genética e Pediatria do Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB), hospital-escola vinculado à FAMERP. As informações sobre as cardiopatias congênitas foram obtidas em prontuários médicos e revisadas com o auxílio de um médico cardiologista.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Coleta e extração de DNA das amostras de sangue periférico

Após o convite, esclarecimento da pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo responsável legal (Apêndices 1 e 2), amostras de sangue periférico de 81 indivíduos com SD e de 79 mães de indivíduos com SD foram coletadas em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), para posterior extração de DNA por meio da técnica de Extração

Salina ou “salting-out”⁽⁹⁷⁾. Uma amostra de sangue (1mL) foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril, centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente (25°C). Foi preparado o tampão 1 [10x] (100 mM Tris-HCl pH8, 100 mM KCl, 100 mM MgCl₂.6H₂O, 20 mM EDTA pH8). O plasma foi descartado e ao sedimento foram adicionados 900 µL de Tampão 1x contendo Triton (5 ml do tampão 1 [10x] e 45 ml solução de triton 2,75%). O material foi homogeneizado utilizando o vórtex por 40 segundos e centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente (25°C). O sobrenadante foi descartado e ao sedimento foi adicionado 1 mL de tampão 1 [1x], que foi homogeneizado utilizando o vórtex por 40 segundos e centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente (25°C). Esta etapa foi repetida três vezes. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi suspenso com 200µL de tampão 2 [1x] (10 mM Tris-HCl pH8, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂.6H₂O, 2 mM EDTA pH8, 0,4 M NaCl) e homogeneizado no vórtex. Foram adicionados 20 µL de solução de SDS 10% e o material foi homogeneizado com auxílio de uma pipeta e incubado em banho-maria a 56°C por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de NaCl 5M, homogeneizado no vórtex e centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos a 25°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril e o precipitado, descartado. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e o microtubo foi invertido várias vezes, vagarosamente, para precipitação do DNA. A amostra foi mantida no freezer (-20°C) *overnight* para auxiliar na precipitação. Posteriormente, foi centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos a 25°C e o etanol absoluto foi removido, cuidadosamente, por inversão. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado, que foi homogeneizado no vórtex e centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos a 25°C. Esta etapa foi repetida mais uma vez.

O etanol 70% foi removido por inversão e o tubo ficou invertido sobre papel absorvente para completa evaporação do etanol. O DNA foi, então, ressuspendido em 100 μ L de tampão TE (1 M Tris-HCl pH8, 0,5 M EDTA) e a solução de DNA foi armazenada a -20°C.

Cinquenta e oito amostras de DNA do grupo de indivíduos com SD e 52 de mães de indivíduos com SD, previamente coletadas e armazenadas na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM com aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP (Parecer nº 2400/2004) foram também incluídas neste estudo (Anexo 2).

2.2.2. Quantificação do DNA genômico

As amostras foram submetidas à leitura da concentração e avaliação do grau de pureza no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (*Uniscience*®). A quantificação do DNA genômico é determinada pela absorbância do comprimento de onda de 260nm e o valor da concentração é dado em ng/ μ L. O grau de pureza é determinado por meio do cálculo de densidade óptica (OD) a 260 e 280nm; onde a amostra é considerada pura quando a relação OD260/OD280 é igual a 1,8. Após a leitura, a concentração das amostras de DNA genômico foi ajustada para 50ng/ μ L.

2.2.3. Análise molecular

A genotipagem dos polimorfismos hsa-mir-149 (rs2292832), *MTHFR* rs4846049 e *MTHFR* rs4846048 foi realizada nos 139 indivíduos com SD e em 131 mães dos indivíduos com SD. As amostras de DNA foram genotipadas pela técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real utilizando-se os ensaios comerciais

TaqMan® *SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems*®), segundo instruções do fabricante. As reações foram submetidas ao equipamento *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*®). O quadro 1 apresenta a identificação dos ensaios específicos e os quadros 2, 3 e 4 apresentam as reações e ciclagem de amplificação para cada polimorfismo. As Figuras 2, 3 e 4 mostram os padrões de genotipagem dos polimorfismos hsa-mir-149 (rs2292832), *MTHFR* (rs4846048) e *MTHFR* (rs4846049), respectivamente.

Dos 139 indivíduos com trissomia livre, um subgrupo de 58 indivíduos foi previamente genotipado pelo nosso grupo de pesquisa para os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1371C, *MTR* A2756G, *SLC19A1* A80G, *MTRR* A66G, *TC2* C776G, *TC2* A67G, *CβS* 844ins68, *CβS* T833C, *BHMT* G742A, *MTHFD1* G1958A, *DHFR* del 19 pb, *SHMT* C1420T^(98,99,100,101). No presente estudo, esses dados de genotipagem foram utilizados para avaliar o risco para DCC.

Quadro 1. Ensaios *Taqman* (*Applied Biosystems*®) para genotipagem dos polimorfismos por discriminação alélica por PCR em tempo real.

Polimorfismo (rs*)	Substituição	<i>Taqman Assay ID</i>
hsa-mir-149 rs2292832	C→T	C__11533078_1_
<i>MTHFR</i> rs4846048	A→G	C__1766946_10
<i>MTHFR</i> rs4846049	G→T	C__27968106_10

*www. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>

Quadro 2. Reação e ciclagem do polimorfismo hsa-mir-149 (rs2292832).

Real Time	
H ₂ O	1,30µL
Master Mix (2x)	2,50µL
Assay (40x)	0,20µL
DNA (10 ng/ µL)	1,50µL
Ciclagem	
95°C-----10 minutos	} 45 ciclos
95°C-----15 segundos	
60°C-----01 minuto	

Quadro 3. Reação e ciclagem do polimorfismo *MTHFR* (rs4846048).

Real Time	
H ₂ O	1,35µL
Master Mix (2x)	2,50µL
Assay (40x)	0,15µL
DNA (10 ng/ µL)	1,00µL
Ciclagem	
95°C-----10 minutos	} 40 ciclos
95°C-----15 segundos	
60°C-----01 minuto	

Quadro 4. Reação e ciclagem do polimorfismo *MTHFR* (rs4846049).

Real Time	
H ₂ O	1,30µL
Master Mix (2x)	2,50µL
Assay (40x)	0,20µL
DNA (10 ng/ µL)	1,50µL
Ciclagem	
95°C-----10 minutos	} 45 ciclos
95°C-----15 segundos	
60°C-----01 minuto	

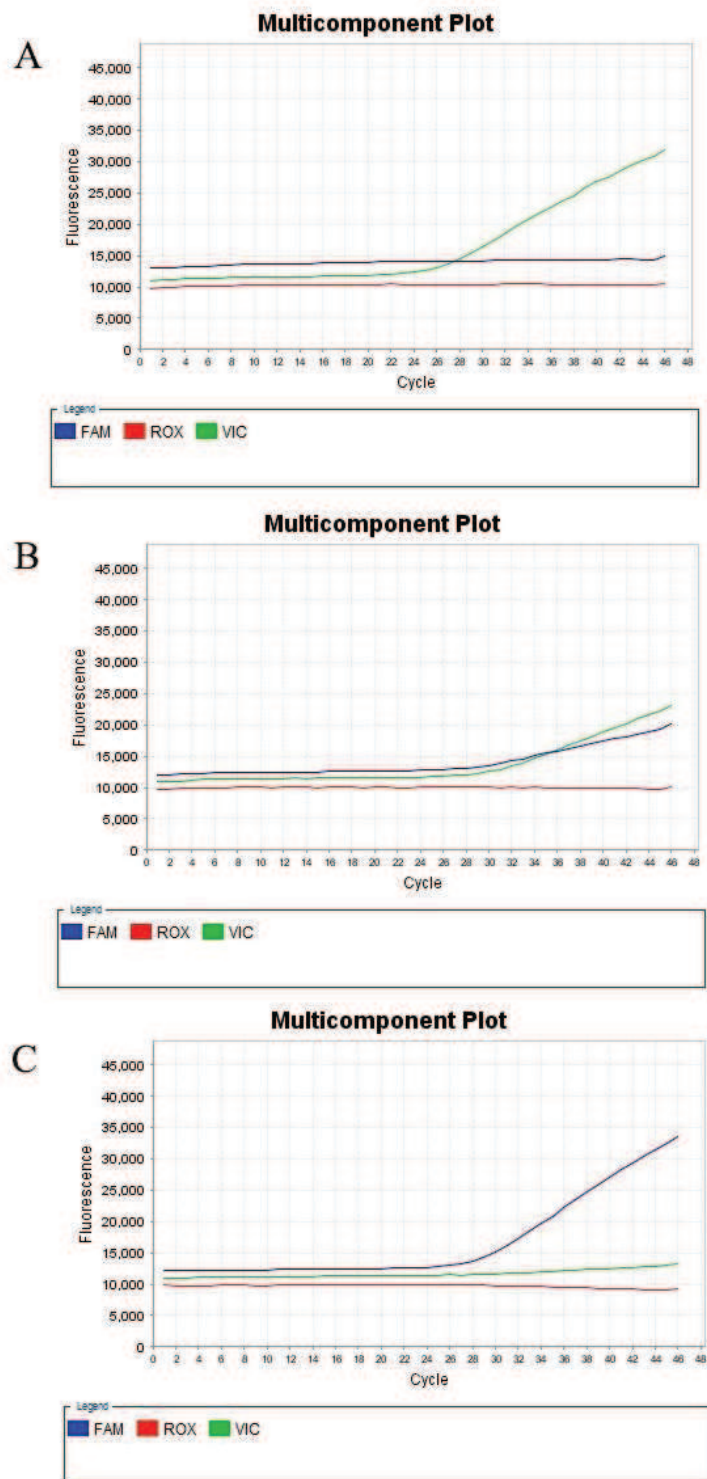


Figura 2. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo hsa-mir-149 (rs2292832). O fluoróforo VIC (verde) foi utilizado para marcar as sondas que reconhecem os alelos selvagens e o fluoróforo FAM (azul) as sondas que reconhecem

os alelos polimórficos. Desse modo (A) representa o genótipo homocigoto selvagem CC, (B) genótipo heterocigoto CT e (C) genótipo homocigoto polimórfico TT.

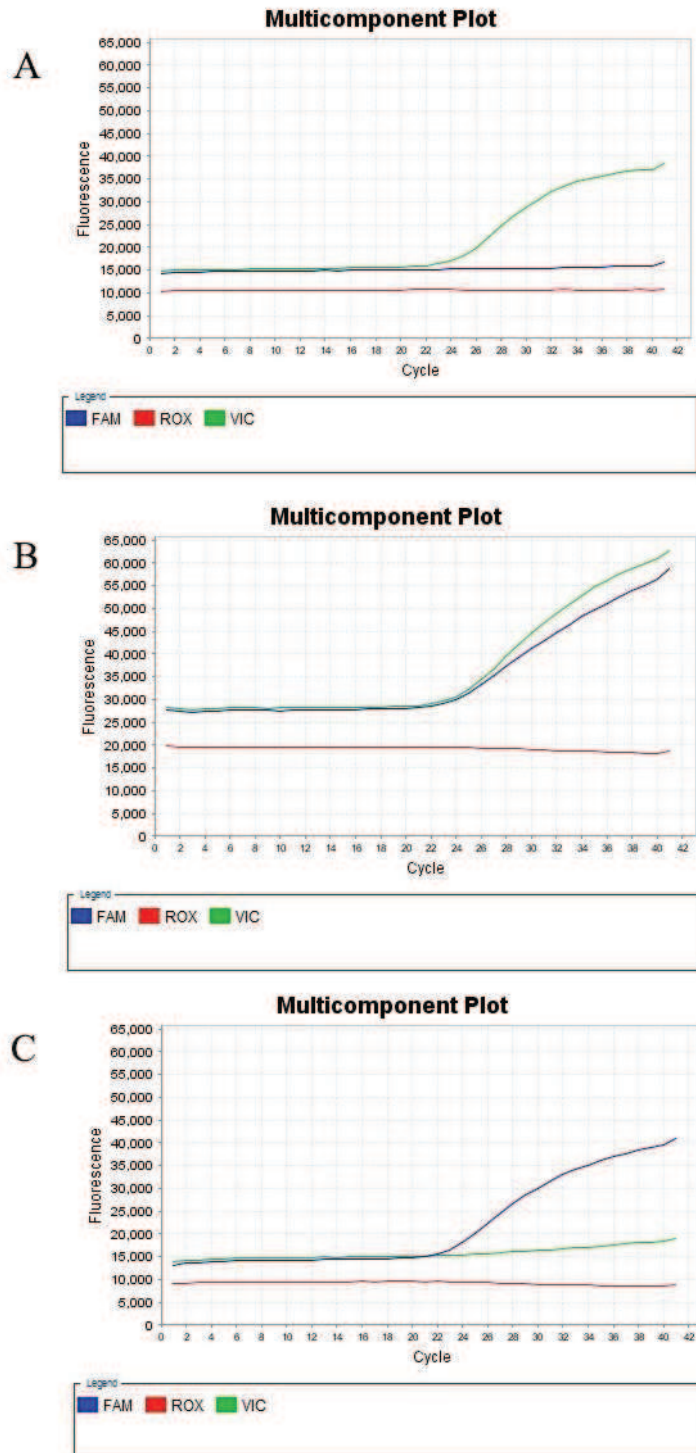


Figura 3. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo *MTHFR* (rs4846048). O fluoróforo VIC (verde) foi utilizado para marcar as sondas que

reconhecem os alelos selvagens e o fluoróforo FAM (azul) as sondas que reconhecem os alelos polimórficos. Desse modo (A) representa o genótipo homocigoto selvagem AA, (B) genótipo heterocigoto AG e (C) genótipo homocigoto polimórfico GG.

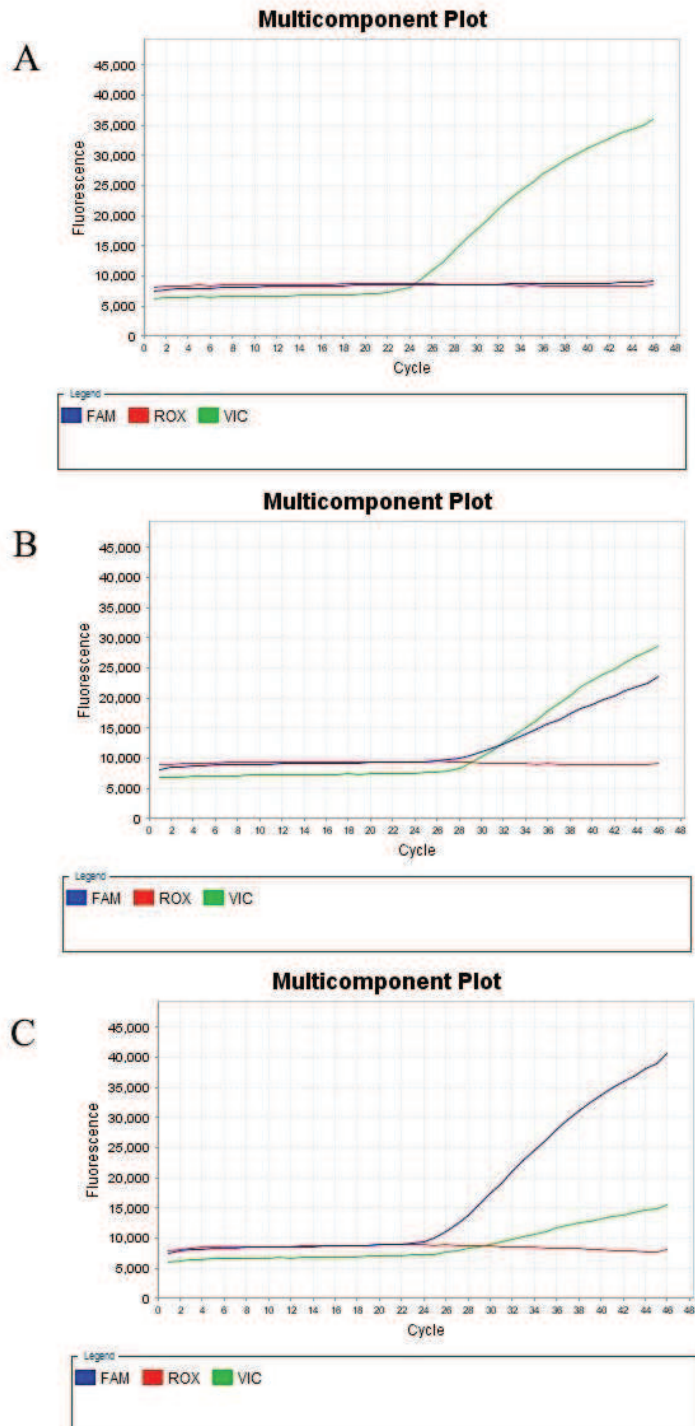


Figura 4. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo *MTHFR* (rs4846049). O fluoróforo VIC (verde) foi utilizado para marcar as sondas que reconhecem os alelos selvagens e o fluoróforo FAM (azul) as sondas que reconhecem os alelos polimórficos. Desse modo (A) representa o genótipo homocigoto selvagem GG, (B) genótipo heterocigoto GT e (C) genótipo homocigoto polimórfico TT.

2.2.4. Análise Estatística

O programa Bioestat foi utilizado para avaliar a concordância das frequências genotípicas com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, pelo teste Qui-quadrado (1 grau de liberdade), e para a análise de haplótipos dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1317C, *MTHFR* rs4846048 e rs4846049; *TC2* A67G e *TC2* C776G. Para as outras análises utilizou-se o programa Stats Direct v. 2.7.2. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Teste de regressão logística múltipla foi utilizado para a análise dos polimorfismos *hsa-mir-149* rs2292832, *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 utilizando-se dois modelos genéticos: dominante (homocigoto polimórfico + heterocigoto versus homocigoto selvagem) e recessivo (homocigoto polimórfico versus heterocigoto + homocigoto selvagem). O teste exato de Fisher (modelo dominante) foi utilizado para avaliar os genótipos combinados desses três polimorfismos considerando-se o genótipo combinado *MTHFR* rs4846048 AA / *MTHFR* rs4846049 GG / *hsa-mir-149* rs2292832 CC como referência (triplo homocigoto selvagem). Estas análises também foram realizadas separando os casos em cardiopatias isoladas ou associadas.

A mediana do número de alelos mutantes entre os grupos dos 17 polimorfismos foi avaliada pelo teste de Mann-Whitney pelo programa StatsDirect. Análises de regressão logística múltipla também foram realizadas para avaliar o risco de DCC desses 17 polimorfismos nos modelos genéticos dominante e recessivo.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1 Resultados Clínicos

As variáveis clínico-epidemiológicas dos 139 indivíduos com trissomia livre do cromossomo 21 estão apresentadas na Tabela 1. A idade ao diagnóstico de cardiopatia mostrou-se precoce, pois pelo menos 70,0% dos pacientes foram diagnosticados nos primeiros seis meses de idade. As cardiopatias isoladas apresentaram maior incidência (65,0%), enquanto as associadas foram observadas em 35,0% dos indivíduos com cardiopatia. No grupo de cardiopatia isolada foi observada uma alta prevalência de CIA (42,3%) e no grupo de cardiopatia associada a maior prevalência foi de DSAV + PDA (28,5%) e CIA + PDA (28,5%).

Tabela 1. Variáveis clínico-epidemiológicas dos indivíduos com síndrome de Down (n = 139).

Variáveis	N	%
Sexo		
Feminino	65	46,7
Masculino	74	53,3
Cardiopatía		
Presença	80	57,5
Ausência	59	42,5
Idade ao diagnóstico		
0-6 meses	56	70,0
7-12 meses	09	11,3
13-18 meses	03	3,7
≥ 19 meses	09	11,3
Ignorado*	03	3,7
Tipo de cardiopatía		
Associada	28	35,0
Isolada	52	65,0

* Ausência de informação no prontuário médico.

3. 2 Resultados dos polimorfismos hsa-mir-149 rs2292832, *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049

As frequências genóticas do polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832 no grupo controle de indivíduos SD e de mães apresentou-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como o polimorfismo *MTHFR* rs4846049 no grupo controle de mães. No grupo caso de indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia e no subgrupo de cardiopatia associada foi observado desequilíbrio para o polimorfismo hsa-mir-149 (rs2292832). No grupo caso de mães este polimorfismo (hsa-mir-149 rs2292832) também apresentou-se em desequilíbrio nos grupos de cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia e no subgrupo de cardiopatia isolada. Os resultados da concordância das frequências genóticas com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos hsa-mir-149 rs2292832, *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049, nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle) e nas suas mães.

	Indivíduos com SD		Mães	
	X ²	Valor de P	X ²	Valor de P
hsa-mir-149 rs229283				
Caso	6,27	0,012	24,60	< 0,0001
Controle	16,83	< 0,0001	14,36	0,0002
<i>MTHFR</i> rs4846048				
Caso	0,18	0,67	1,34	0,24
Controle	0,50	0,47	3,67	0,055
<i>MTHFR</i> rs4846049				
Caso	1,91	0,16	0,02	0,86
Controle	0,0003	0,98	6,91	0,008

Tabela 3. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos hsa-mir-149 rs2292832, *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049, nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle) e nas suas mães.

	Indivíduos com SD		Mães	
	X ²	Valor de P	X ²	Valor de P
hsa-mir-149 rs229283				
Caso	3,99	0,045	2,00	0,15
Controle	16,83	< 0,0001	14,36	0,0002
<i>MTHFR</i> rs4846048				
Caso	0,73	0,39	0,51	0,47
Controle	0,50	0,47	3,67	0,055
<i>MTHFR</i> rs4846049				
Caso	0,31	0,57	1,39	0,23
Controle	0,0003	0,98	6,91	0,008

Tabela 4. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos hsa-mir-149 rs2292832, *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049, nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle) e nas suas mães.

	Indivíduos com SD		Mães	
	X ²	Valor de P	X ²	Valor de P
hsa-mir-149 rs229283				
Caso	2,29	0,12	28,02	< 0,0001
Controle	16,83	< 0,0001	14,36	0,0002
<i>MTHFR</i> rs4846048				
Caso	0,13	0,71	0,75	0,38
Controle	0,50	0,47	3,67	0,055
<i>MTHFR</i> rs4846049				
Caso	1,86	0,17	0,52	0,46
Controle	0,0003	0,98	6,91	0,008

As análises de regressão logística múltipla dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 envolvendo os indivíduos com SD não evidenciaram associação entre os polimorfismos e o risco para cardiopatia congênita tanto quando considerados todos os indivíduos, independente do tipo de

cardiopatía (Tabela 5), como quando analisados separadamente os indivíduos com cardiopatía associada ou isolada (Tabelas 6 e 7). Da mesma forma, não houve associação entre os haplótipos para *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 e o risco para cardiopatías congênitas (Tabelas 8, 9 e 10).

Tabela 5. Análises de regressão logística múltipla envolvendo indivíduos com SD com cardiopatía congênita, independente do tipo de cardiopatía (caso) e com SD sem cardiopatía congênita (controle).

Polimorfismo	Modelo	Genótipo	Controle N (%)	Caso N (%)	OR (95% CI)	P
hsa-mir-149 rs2292832	Dominante	C/C	34 (57,6%)	43 (54,4%)	1,17	0,65
		C/T–T/T	25 (42,4%)	36 (45,6%)	(0,58-2,32)	
	Recessivo	C/C–C/T	46 (78,0%)	67 (84,8%)	0,61	0,27
		T/T	13 (22,0%)	12 (15,2%)	(0,25-1,48)	
<i>MTHFR</i> rs4846048	Dominante	A/A	27 (45,7%)	40 (50,0%)	0,71	0,41
		A/G–G/G	32 (54,3%)	40 (50,0%)	(0,32-1,58)	
	Recessivo	A/A–A/G	51 (86,4%)	72 (90,0%)	0,87	0,81
		G/G	08 (13,6%)	08 (10,0%)	(0,27-2,77)	
<i>MTHFR</i> rs4846049	Dominante	G/G	22 (37,3%)	29 (36,3%)	1,30	0,52
		G/T–T/T	37 (62,7%)	51 (63,7%)	(0,57-2,97)	
	Recessivo	G/G–G/T	50 (84,7%)	72 (90,0%)	0,63	0,43
		T/T	09 (15,3%)	08 (10,0%)	(0,20-1,96)	

Tabela 6. Análises de regressão logística múltipla envolvendo indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Polimorfismo	Modelo	Genótipo	Controle N (%)	Caso N (%)	OR (95% CI)	P
hsa-mir-149 rs2292832	Dominante	C/C	34 (57,6%)	14 (50,0%)	1,35	0,51
		C/T–T/T	25 (42,4%)	14 (50,0%)	(0,54-3,34)	
	Recessivo	C/C–C/T	46 (78,0%)	22 (78,6%)	0,94	0,92
		T/T	13 (22,0%)	06 (21,4%)	(0,31-2,83)	
MTHFR rs4846048	Dominante	A/A	27 (45,7%)	12 (42,8%)	0,98	0,97
		A/G–G/G	32 (54,3%)	16 (57,2%)	(0,33-2,89)	
	Recessivo	A/A–A/G	51 (86,4%)	23 (82,2%)	1,58	0,51
		G/G	08 (13,6%)	05 (17,8%)	(0,39-6,36)	
MTHFR rs4846049	Dominante	G/G	22 (37,3%)	09 (32,2%)	1,25	0,69
		G/T–T/T	37 (62,7%)	19 (67,8%)	(0,40-3,89)	
	Recessivo	G/G–G/T	50 (84,7%)	24 (85,7%)	0,74	0,68
		T/T	09 (15,3%)	04 (14,3%)	(0,17-3,16)	

Tabela 7. Análises de regressão logística múltipla envolvendo indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Polimorfismo	Modelo	Genótipo	Controle N (%)	Caso N (%)	OR (95% CI)	P
hsa-mir-149 rs2292832	Dominante	C/C	34 (57,6%)	29 (56,9%)	1,08	0,83
		C/T–T/T	25 (42,4%)	22 (43,1%)	(0,49-2,36)	
	Recessivo	C/C–C/T	46 (78,0%)	45 (88,3%)	0,44	0,13
		T/T	13 (22,0%)	06 (11,7%)	(0,15-1,28)	
MTHFR rs4846048	Dominante	A/A	27 (45,7%)	28 (53,9%)	0,56	0,23
		A/G–G/G	32 (54,3%)	24 (46,1%)	(0,22-1,45)	
	Recessivo	A/A–A/G	51 (86,4%)	49 (94,3%)	0,48	0,33
		G/G	08 (13,6%)	03 (05,7%)	(0,11-2,11)	
MTHFR rs4846049	Dominante	G/G	22 (37,3%)	20 (38,4%)	1,43	0,47
		G/T–T/T	37 (62,7%)	32 (61,6%)	(0,53-3,85)	
	Recessivo	G/G–G/T	50 (84,7%)	48 (92,3%)	0,52	0,33
		T/T	09 (15,3%)	04 (07,7%)	(0,13-1,96)	

Tabela 8. Haplótipos para os polimorfismos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente da cardiopatia (caso), e indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Haplótipos <i>MTHFR</i>	Caso	Controle	X ²	Valor de P
rs4846048 / rs4846049				
A/G	0,546	0,547	0,0	0,99
G/T	0,215	0,276	1,37	0,24
A/T	0,154	0,114	0,90	0,34
G/G	0,085	0,063	0,46	0,49

Tabela 9. Haplótipos para os polimorfismos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Haplótipos <i>MTHFR</i>	Caso	Controle	X ²	Valor de P
rs4846048 / rs4846049				
A/G	0,474	0,549	0,86	0,35
G/T	0,267	0,277	0,02	0,88
A/T	0,147	0,112	0,42	0,51
G/G	0,112	0,062	1,38	0,24

Tabela 10. Haplótipos para os polimorfismos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Haplótipos <i>MTHFR</i>	Caso	Controle	X ²	Valor de P
rs4846048 / rs4846049				
A/G	0,590	0,549	0,36	0,54
G/T	0,188	0,278	2,46	0,11
A/T	0,155	0,112	0,90	0,34
G/G	0,067	0,061	0,03	0,85

A análise dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 envolvendo as mães de indivíduos com SD com e sem cardiopatias mostrou os que genótipos maternos hsa-mir-149 rs2292832 CT/TT foram associados ao risco reduzido para cardiopatia isolada na prole com SD (OR = 0,31; IC 95% = 0,13-0,72; P = 0,0063). Os resultados das análises de regressão logística nas mães dos

indivíduos com SD estão apresentados nas Tabelas 11, 12 e 13. Não houve associação entre os haplótipos para *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 e o risco materno para cardiopatias congênitas na prole com SD (Tabelas 14, 15 e 16).

Tabela 11. Análises de regressão logística múltipla envolvendo mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Polimorfismo	Modelo	Genótipo	Controle N (%)	Caso N (%)	OR (95% CI)	P
hsa-mir-149 rs2292832	Dominante	C/C	26 (47,3%)	46 (63,9%)	0,49	0,05
		C/T–T/T	29 (52,7%)	26 (36,1%)	(0,24-1,01)	
	Recessivo	C/C–C/T	39 (70,9%)	58 (80,6%)	0,55	0,17
		T/T	16 (29,1%)	14 (19,4%)	(0,23-1,29)	
<i>MTHFR</i> rs4846048	Dominante	A/A	28 (50,0%)	43 (57,4%)	0,78	0,56
		A/G–G/G	28 (50,0%)	32 (42,6%)	(0,35-1,75)	
	Recessivo	A/A–A/G	55 (98,2%)	68 (90,7%)	2,02 (0,16-	0,58
		G/G	01 (01,8%)	07 (09,3%)	24,89)	
<i>MTHFR</i> rs4846049	Dominante	G/G	23 (41,1%)	33 (44,0%)	0,96	0,93
		G/T–T/T	33 (58,9%)	42 (56,0%)	(0,43-2,15)	
	Recessivo	G/G–G/T	55 (98,2%)	66 (88,0%)	5,71 (0,50-	0,15
		T/T	01 (01,8%)	09 (12,0%)	64,05)	

Tabela 12. Análises de regressão logística múltipla envolvendo mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Polimorfismo	Modelo	Genótipo	Controle N (%)	Caso N (%)	OR (95% CI)	P
hsa-mir-149 rs2292832	Dominante	C/C	26 (47,3%)	11 (45,9%)	1,06	0,89
		C/T–T/T	29 (52,7%)	13 (54,1%)	(0,40-2,79)	
	Recessivo	C/C–C/T	39 (70,9%)	19 (79,1%)	0,55	0,35
		T/T	16 (29,1%)	05 (20,9%)	(0,15-1,93)	
MTHFR rs4846048	Dominante	A/A	28 (50,0%)	13 (52,0%)	1,15	0,79
		A/G–G/G	28 (50,0%)	12 (48,0%)	(0,39-3,39)	
	Recessivo	A/A–A/G	55 (98,2%)	22 (88,0%)	1,65 (0,08-	0,74
		G/G	01 (01,8%)	03 (12,0%)	32,41)	
MTHFR rs4846049	Dominante	G/G	23 (41,1%)	11 (44,0%)	0,79	0,68
		G/T–T/T	33 (58,9%)	14 (56,0%)	(0,26-2,35)	
	Recessivo	G/G–G/T	55 (98,2%)	20 (80,0%)	12,40(0,96-	0,05
		T/T	01 (01,8%)	05 (20,0%)	159,13)	

Tabela 13. Análises de regressão logística múltipla envolvendo mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Polimorfismo	Modelo	Genótipo	Controle N (%)	Caso N (%)	OR (95% CI)	P
hsa-mir-149 rs2292832	Dominante	C/C	26 (47,3%)	35 (72,9%)	0,31	0,006
		C/T–T/T	29 (52,7%)	13 (27,1%)	(0,13-0,72)	
	Recessivo	C/C–C/T	39 (70,9%)	39 (81,3%)	0,51	0,17
		T/T	16 (29,1%)	09 (18,7%)	(0,19-1,33)	
MTHFR rs4846048	Dominante	A/A	28 (50,0%)	30 (60,0%)	0,58	0,24
		A/G–G/G	28 (50,0%)	20 (40,0%)	(0,23-1,45)	
	Recessivo	A/A–A/G	55 (98,2%)	46 (92,0%)	2,66 (0,09-	0,56
		G/G	01 (01,8%)	04 (08,0%)	72,38)	
MTHFR rs4846049	Dominante	G/G	23 (41,1%)	22 (44,0%)	1,15	0,75
		G/T–T/T	33 (58,9%)	28 (56,0%)	(0,46-2,86)	
	Recessivo	G/G–G/T	55 (98,2%)	46 (92,0%)	2,66 (0,09-	0,56
		T/T	01 (01,8%)	04 (08,0%)	72,38)	

Tabela 14. Haplótipos para os polimorfismos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 nas mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Haplótipos <i>MTHFR</i>	Caso	Controle	X ²	Valor de P
rs4846048 / rs4846049				
A/G	0,594	0,640	0,57	0,45
G/T	0,194	0,202	0,02	0,86
A/T	0,146	0,101	1,16	0,28
G/G	0,066	0,057	0,09	0,75

Tabela 15. Haplótipos para os polimorfismos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 nas mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Haplótipos <i>MTHFR</i>	Caso	Controle	X ²	Valor de P
rs4846048 / rs4846049				
A/G	0,535	0,640	1,59	0,20
G/T	0,215	0,203	0,03	0,85
A/T	0,165	0,101	1,33	0,24
G/G	0,085	0,056	0,46	0,49

Tabela 16. Haplótipos para os polimorfismos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 nas mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e mães de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Haplótipos <i>MTHFR</i>	Caso	Controle	X ²	Valor de P
rs4846048 / rs4846049				
A/G	0,625	0,642	0,07	0,79
G/T	0,185	0,205	0,13	0,71
A/T	0,135	0,099	0,68	0,40
G/G	0,055	0,054	0,001	0,97

A análise das combinações genóticas dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e *hsa-mir-149* rs2292832, nos indivíduos com SD e nas suas mães não mostrou associação entre as diferentes combinações e o risco para cardiopatia congênita, independente da cardiopatia, bem como cardiopatia associada e isolada (Tabelas 17 a 22).

Tabela 17. Análises de combinação genotípica em indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e em indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).

Combinação genotípica hsa-mir-149 rs2292832 - MTHFR rs484604 - MTHFR rs4846049	Grupos		P
	Controle	Caso	
CC - AA - GG	10	09	Referência
CC - AA - GT/TT	16	22	0,32
CC - AG/GG - GG	06	19	0,72
CC - AG/GG - GT/TT	19	33	1,00
CT/TT - AA - GG	19	22	0,88
CT/TT - AA - GT/TT	07	19	0,18
CT/TT - AG/GG - GG	03	19	0,28
CT/TT - AG/GG - GT/TT	19	29	1,00

Tabela 18. Análises de combinação genotípica em indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e em indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).

Combinação genotípica hsa-mir-149 rs2292832 - MTHFR rs484604 - MTHFR rs4846049	Grupos		P
	Controle	Caso	
CC - AA - GG	10	03	Referência
CC - AA - GT/TT	07	16	0,67
CC - AG/GG - GG	05	13	0,35
CC - AG/GG - GT/TT	07	26	1,00
CT/TT - AA - GG	05	20	1,00
CT/TT - AA - GT/TT	04	13	0,19
CT/TT - AG/GG - GG	01	13	0,57
CT/TT - AG/GG - GT/TT	11	24	0,66

Tabela 19. Análises de combinação genotípica em indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e em indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).

Combinação genotípica hsa-mir-149 rs2292832 - MTHFR rs484604 - MTHFR rs4846049	Grupos		P
	Controle	Caso	
CC - AA - GG	10	06	Referência
CC - AA - GT/TT	15	16	0,37
CC - AG/GG - GG	03	16	1,00
CC - AG/GG - GT/TT	16	29	0,87
CT/TT - AA - GG	16	20	0,68
CT/TT - AA - GT/TT	04	16	0,43
CT/TT - AG/GG - GG	02	16	0,36
CT/TT - AG/GG - GT/TT	13	24	1,00

Tabela 20. Análises de combinação genotípica em mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e de indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).

Combinação genotípica hsa-mir-149 rs2292832 - MTHFR rs484604 - MTHFR rs4846049	Grupos		P
	Controle	Caso	
CC - AA - GG	09	12	Referência
CC - AA - GT/TT	12	24	0,28
CC - AG/GG - GG	09	21	0,94
CC - AG/GG - GT/TT	20	28	1,00
CT/TT - AA - GG	18	25	1,00
CT/TT - AA - GT/TT	10	21	0,30
CT/TT - AG/GG - GG	03	21	0,86
CT/TT - AG/GG - GT/TT	20	21	0,64

Tabela 21. Análises de combinação genotípica em mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita associada (caso), e de indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).

Combinação genotípica hsa-mir-149 rs2292832 - MTHFR rs484604 - MTHFR rs4846049	Grupos		P
	Controle	Caso	
CC - AA - GG	09	02	Referência
CC - AA - GT/TT	06	12	0,23
CC - AG/GG - GG	04	12	0,73
CC - AG/GG - GT/TT	05	20	1,00
CT/TT - AA - GG	08	18	0,45
CT/TT - AA - GT/TT	02	16	0,71
CT/TT - AG/GG - GG	03	11	1,00
CT/TT - AG/GG - GT/TT	08	20	0,59

Tabela 22. Análises de combinação genotípica em mães de indivíduos com SD com cardiopatia congênita isolada (caso), e de indivíduos com SD e sem cardiopatia congênita (controle).

Combinação genotípica hsa-mir-149 rs2292832 - MTHFR rs484604 - MTHFR rs4846049	Grupos		P
	Controle	Caso	
CC - AA - GG	09	10	Referência
CC - AA - GT/TT	11	19	0,49
CC - AG/GG - GG	07	19	1,00
CC - AG/GG - GT/TT	19	24	1,00
CT/TT - AA - GG	16	19	0,85
CT/TT - AA - GT/TT	10	21	0,30
CT/TT - AG/GG - GG	02	19	0,52
CT/TT - AG/GG - GT/TT	13	20	0,14

3. 3 Resultados dos 17 polimorfismos como fatores de risco para cardiopatias congênitas

As frequências genóticas dos polimorfismos *MTRR* A66G, *SLC19A1* A80G, *BHMT* G742A e hsa-mir-149 (rs2292832) apresentaram-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo caso. No grupo controle foi observado desequilíbrio para o polimorfismo hsa-mir-149 (rs2292832) ($p < 0,05$). Os resultados da concordância das frequências genóticas com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos 17 polimorfismos nos indivíduos com SD.

	Indivíduos com SD	
	X ²	Valor de P
<i>MTHFR</i> C677T		
Caso	0,02	0,87
Controle	0,80	0,37
<i>MTHFR</i> A1298C		
Caso	0,60	0,43
Controle	0,0003	0,98
<i>MTHFR</i> T1317C		
Caso	0,27	0,59
Controle	0,05	0,82
<i>MTR</i> A2756G		
Caso	0,003	0,95
Controle	0,89	0,34
<i>MTRR</i> A66G		
Caso	4,07	0,043
Controle	0,03	0,85
<i>SLC19A1</i> A80G		
Caso	5,26	0,021
Controle	1,83	0,17
<i>TC2</i> A67G		
Caso	0,52	0,46
Controle	1,97	0,16
<i>TC2</i> C776G		
Caso	0,66	0,42
Controle	0,31	0,57

<i>CBS 844ins68</i>		
Caso	1,08	0,29
Controle	0,01	0,91
<i>CBS T833C</i>		
Caso	1,08	0,29
Controle	0,01	0,91
<i>MTHFD1 G1958A</i>		
Caso	1,46	0,22
Controle	0,31	0,57
<i>BHMT G742A</i>		
Caso	5,81	0,016
Controle	2,22	0,13
<i>DHFR del 19pb</i>		
Caso	1,33	0,24
Controle	0,01	0,91
<i>SHMT C1420T</i>		
Caso	1,08	0,29
Controle	0,43	0,51
<i>hsa-mir-149 rs2292832</i>		
Caso	6,38	0,011
Controle	6,02	0,014
<i>MTHFR rs4846048</i>		
Caso	1,03	0,31
Controle	0,80	0,37
<i>MTHFR rs4846049</i>		
Caso	0,74	0,74
Controle	0,13	0,71

A mediana do número de alelos polimórficos não diferiu entre os indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente da cardiopatia (caso), e os indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle) ($P = 0.19$). O número de alelos polimórficos nos grupos caso e controle estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Distribuição dos 17 alelos polimórficos no grupo de indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente da cardiopatia (caso) e no grupo com indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Número alelos polimórficos	Caso n (%)	Controle n (%)
0	0	0
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	2 (10,5%)
5	0	0
6	3 (8,8%)	2 (10,5%)
7	1 (3,0%)	3 (15,8%)
8	9 (26,4%)	3 (15,8%)
9	4 (11,7%)	2 (10,5%)
10	7 (20,6%)	3 (15,8%)
11	3 (8,8%)	0
12	3 (8,8%)	0
13	1 (3,0%)	2 (10,5%)
14	0	1 (5,3%)
15	0	0
16	1 (3,0%)	1 (5,3%)
17	2 (5,9%)	0

As análises de regressão logística múltipla envolvendo os indivíduos com SD não evidenciaram associação entre os 17 polimorfismos e o risco para cardiopatia congênita (Tabela 25). Também não houve associação entre os haplótipos do gene *MTHFR* C677T / A1298C / T1317C / rs4846048 / rs4846049 e do gene *TC2* A67G / C776G e o risco para cardiopatias congênitas (Tabelas 26, 27).

Tabela 25. Análises de regressão logística múltipla envolvendo indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente do tipo de cardiopatia (caso), e de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Polimorfismo	Modelo	Genótipo	Controle N (%)	Caso N (%)	OR (95% CI)	P
MTHFR C677T	Dominante	C/C	06 (30,0%)	18 (47,3%)	0,57	0,53
		C/T–T/T	14 (70,0%)	20 (52,7%)	(0,10-3,24)	
	Recessivo	C/C–C/T	14 (70,0%)	34 (89,4%)	0,32	0,13
		T/T	06 (30,0%)	04 (10,6%)	(0,07-1,41)	
MTHFR A1298C	Dominante	A/A	12 (60,0%)	23 (60,6%)	0,001 (4,86 E ⁻¹² -477052,7)	0,51
		A/C–C/C	08 (40,0%)	15 (39,4%)		
	Recessivo	A/A–A/C	19 (95,0%)	35 (92,1%)	9439,9 (3,29 E ⁻³⁴ -2,70 E ⁺⁴¹)	0,83
		C/C	01 (05,0%)	03 (07,9%)		
MTHFR T1317C	Dominante	T/T	18 (90,0%)	32 (84,2%)	0,002 (4,98 E ⁻¹² -834526,9)	0,54
		T/C–C/C	02 (10,0%)	06 (15,8%)		
	Recessivo	T/T–T/C	20 (100,0%)	38 (100,0%)	---	---
		C/C	00 (00,0%)	00 (00,0%)		
MTR A2756G	Dominante	A/A	13 (65,0%)	27 (71,0%)	0,35	0,27
		A/G–G/G	07 (35,0%)	11 (29,0%)	(0,05-2,24)	
	Recessivo	A/A–A/G	20 (100,0%)	32 (84,2%)	141939,6 (4,89 E ⁻¹¹ -4,12 E ⁺²⁰)	0,51
		G/G	00 (00,0%)	06 (15,8%)		
MTRR A66G	Dominante	A/A	07 (35,0%)	15 (39,4%)	1,26	0,76
		A/G–G/G	13 (65,0%)	23 (60,6%)	(0,26-6,11)	
	Recessivo	A/A–A/G	17 (85,0%)	32 (84,2%)	2,98	0,46
		G/G	03 (15,0%)	06 (15,8%)	(0,16-55,2)	
SLC19A1 A80G	Dominante	A/A	04 (20,0%)	05 (13,1%)	1,85	0,59
		A/G–G/G	16 (80,0%)	33 (86,9%)	(0,19-17,8)	
	Recessivo	A/A–A/G	17 (85,0%)	31 (81,6%)	2,73	0,32
		G/G	03 (15,0%)	07 (18,4%)	(0,36-20,3)	
TC2 A67G	Dominante	A/A	16 (80,0%)	30 (78,9%)	3,00	0,34
		A/G–G/G	04 (20,0%)	08 (21,1%)	(0,31-29,0)	
	Recessivo	A/A–A/G	19 (95,0%)	37 (97,3%)	1523,7 (5,83 E ⁻³⁵ -3,98 E ⁺⁴⁰)	0,86
		G/G	01 (05,0%)	01 (02,7%)		
TC2 C776G	Dominante	C/C	06 (30,0%)	16 (42,1%)	0,65	0,70
		C/G–G/G	14 (70,0%)	22 (57,9%)	(0,07-5,66)	
	Recessivo	C/C–C/G	17 (85,0%)	35 (92,1%)	0,28	0,21
		G/G	03 (15,0%)	03 (07,9%)	(0,04-2,02)	

CBS 844ins68	Dominante	S/S	19 (95,0%)	27 (71,1%)	2,76	0,06
		S/M–M/M	01 (05,0%)	11 (28,9%)	(0,94-2,08)	
	Recesivo	S/S –S/M	20 (100,0%)	38 (100,0%)	---	---
		M/M	00 (00,0%)	00 (00,0%)		
CBS T833C	Dominante	T/T	19 (95,0%)	27 (71,1%)	2,76	0,06
		T/C–C/C	01 (05,0%)	11 (28,9%)	(0,94-2,08)	
	Recesivo	T/T–T/C	20 (100,0%)	38 (100,0%)	----	---
		C/C	00 (00,0%)	00 (00,0%)		
MTHFD1 G1958A	Dominante	G/G	06 (30,0%)	14 (36,8%)	0,73	0,75
		G/A–A/A	14 (70,0%)	24 (63,2%)	(0,11-4,80)	
	Recesivo	G/G–G/A	17 (85,0%)	29 (76,3%)	1462,6	0,45
		A/A	03 (15,0%)	09 (23,7%)	(0,000007- 318750765790 ,5)	
BHMT G742A	Dominante	G/G	10 (50,0%)	21 (55,2%)	0,51	0,48
		G/A–A/A	10 (50,0%)	17 (44,8%)	(0,08-3,25)	
	Recesivo	G/G–G/A	20 (100,0%)	31 (81,6%)	610,7	0,61
		A/A	00 (00,0%)	07 (18,4%)	(8,33 E ⁻⁹ - 44797431024 030,2)	
DHFR del 19 pb	Dominante	I/I	06 (33,3%)	08 (21,6%)	2,21	0,41
		I/D–D/D	12 (66,7%)	29 (78,4%)	(0,32-15,38)	
	Recesivo	I/I–I/D	15 (83,3%)	30 (81,1%)	1,06	0,93
		D/D	03 (16,7%)	07 (18,9%)	(0,21-5,23)	
SHMT C1420T	Dominante	C/C	09 (47,3%)	15 (39,4%)	0,58	0,55
		C/T–T/T	10 (52,7%)	23 (60,6%)	(0,09-3,50)	
	Recesivo	C/C–C/T	18 (94,8%)	35 (92,1%)	0,16	0,38
		T/T	01 (05,2%)	03 (07,9%)	(0,002-10,11)	
hsa-mir-149 rs2292832	Dominante	C/C	13 (68,4%)	20 (58,8%)	1,60	0,45
		C/T–T/T	06 (31,6%)	14 (41,2%)	(0,46-5,49)	
	Recesivo	C/C–C/T	16 (84,2%)	28 (82,4%)	6,57	0,25
		T/T	03 (15,8%)	06 (17,6%)	(0,25-168,3)	
MTHFR rs4846048	Dominante	A/A	12 (60,0%)	21 (55,2%)	1,28	0,79
		A/G–G/G	08 (40,0%)	17 (44,8%)	(0,18-8,77)	
	Recesivo	A/A–A/G	18 (90,0%)	37 (97,3%)	0,25	0,49
		G/G	02 (10,0%)	01 (02,7%)	(0,005-13,00)	

<i>MTHFR</i> rs4846049	Dominante	G/G	10 (52,7%)	18 (48,7%)	466,5 (0,000002- 144394430148 ,0)	0,53
		G/T–T/T	09 (47,3%)	19 (51,3%)		
	Recessivo	G/G–G/T	18 (94,8%)	33 (89,2%)	1,43 E ⁻⁷ (5,97 E ⁻⁴⁶ -3,40 E ⁺³¹)	0,72
		T/T	01 (05,2%)	04 (10,8%)		

Tabela 26. Haplótipos para os polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1317C, *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente da cardiopatia (caso), e de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Haplótipos <i>MTHFR</i>	Caso	Controle	X ²	P
C677T / A1298C / T1317C / rs4846048/ rs4846049				
T/A/T/A/G	0,315	0,440	1,71	0,19
C/A/T/A/G	0,302	0,156	2,82	0,09
C/C/T/A/T	0,141	0,115	0,14	0,70
C/C/T/G/T	0,081	0,067	0,06	0,79
C/A/T/G/G	0,058	0,109	0,95	0,32
C/A/C/G/T	0,081	0,053	0,30	0,58
C/C/T/A/G	0,014	0,026	0,23	0,62
T/C/T/G/T	0,008	0,029	0,69	0,40

Tabela 27. Haplótipos para os polimorfismos *TC2* A67G e *TC2* C776G nos indivíduos com SD com cardiopatia congênita, independente da cardiopatia (caso), e de indivíduos com SD sem cardiopatia congênita (controle).

Haplótipos <i>TC2</i>	Caso	Controle	X ²	Valor de P
A67G / C776G				
A/C	0,605	0,524	0,70	0,40
A/G	0,277	0,351	0,68	0,40
G/C	0,066	0,051	0,10	0,74
G/G	0,052	0,074	0,22	0,63

4.DISSCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Sabe-se que os indivíduos com SD apresentam alta prevalência de DCC, que resultam no aumento de mortalidade nos primeiros anos de vida^(21,102,103) assim a avaliação cardíaca logo após o nascimento é de grande importância. Neste estudo, a maioria das crianças foi diagnosticada precocemente com malformações cardíacas, indicando uma avaliação cardíaca adequada e precoce. O exame de ecocardiograma, ferramenta indispensável de avaliação não invasiva nos indivíduos com DCC⁽¹⁰⁴⁾, é realizado de rotina para os indivíduos com SD do ambulatório do Hospital de Base de São José do Rio Preto, assim aqueles que passaram pelo Serviço de Cardiologia do HB, realizaram o exame.

Após a avaliação cardíaca, 57,5% dos indivíduos com SD foram diagnosticados com DCC isolado ou associado. Este resultado está de acordo com a literatura, que mostra alta prevalência de cardiopatias congênitas em indivíduos com SD^(22,23,105). A alta prevalência de CIA e a baixa prevalência de tetralogia de Fallot encontradas nos pacientes do presente estudo também são características observadas em outros estudos nos indivíduos com SD^(21,22,106). No nosso estudo observamos maior prevalência de DCC isolado, os quais apresentaram as seguintes frequências: CIA (42,3%), DSAV (23,1%), CIV (15,4%), PDA (13,5%), pentalogia de fallot (3,8%) e tetralogia de fallot (1,9%). Esses dados corroboram com outros estudos que também avaliaram DCC em indivíduos com SD e observaram as seguintes frequências CIA (24-36%), DSAV (19-36%), CIV (14-27%), PDA (5-7%) e tetralogia de fallot (7%)^(21,22,106).

No grupo de DCC associado, observamos as seguintes frequências CIA + PDA e DSAV + PDA (28,5%), CIA + CIV (14,8%), DSAV + tetralogia de fallot e CIA + CIV + PDA (7,1%) e CIA + estenose da artéria pulmonar, DSAV + estenose da artéria pulmonar, DSAV + tetralogia de fallot + PDA e CIV + PDA (3,5%). Estas frequências

também corroboraram com os dados observados em outro estudo CIA + CIV + PDA (15%), CIA + CIV (14%), CIV + PDA (8%) e CIA + PDA (7%)⁽²²⁾.

A análise da associação entre os polimorfismos localizados na região UTR 3' do gene *MTHFR* (A→G rs4846048 e G→T rs4846049), avaliados em indivíduos com SD e suas mães, não mostrou associação com o risco para DCC. Também não foi observada associação entre DCC e os outros 14 polimorfismos envolvidos na via do folato (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1371C, *MTR* A2756G, *SLC19A1* A80G, *MTRR* A66G, *TC2* C776G, *TC2* A67G, *CβS* 844ins68, *CβS* T833C, *BHMT* G742A, *MTHFD1* G1958A, *DHFR* del 19 pb, *SHMT* C1420T) avaliados apenas nos indivíduos com SD.

Vários estudos que avaliam polimorfismos genéticos da via metabólica do folato em indivíduos sem síndrome genética e/ou em suas mães têm mostrado associação destas variantes com a presença de cardiopatia congênita (Tabelas 28, 29). Por outro lado, outros estudos não encontraram associação entre genótipos polimórficos maternos da via do folato e o risco para DCC na prole não síndrômica^(63,64,107,108,109). Também há estudos em crianças sem síndrome genética que não observaram associação entre polimorfismos da via do folato e o risco para DCC^(63,70,71,72). Além disso, um efeito protetor para DCC foi observado para o alelo *MTHFR*1298C em indivíduos sem síndrome genética nos estudo de Hobbs et al. (2006)⁽³²⁾.

Tabela 28. Estudos sobre associação entre polimorfismos maternos em genes do metabolismo do folato e risco para DCC na prole sem síndrome genética.

Autor	País	Mães Caso/ Controle Nº	MTHFR C677T	MTHFR1 298C	SLC19A1 A80G	MTRR A66G	MTR A2756G	CBS 844ins68	BHMT G742A	SHMT C1420T	Outros
Wenstrom et al., 2001 ⁽⁵⁸⁾	EUA	26/116	As	---	---	---	---	---	---	---	---
Zhu et al., 2006 ⁽⁵⁹⁾	China	57/104	As	---	---	---	---	---	---	---	---
Pei et al., 2006 ⁽⁶⁰⁾	China	65/100	---	---	As	---	---	---	---	---	---
Van Beynum et al., 2006 ⁽²⁸⁾	Holanda	158/261	As	---	---	---	---	---	---	---	---
Van Beynum et al., 2007 ⁽¹¹⁰⁾	Metanalise		As	---	---	---	---	---	---	---	---
Verkleij-Hagoort et al., 2008 ⁽⁶¹⁾	Países Baixos	230/251	---	---	---	As	---	---	---	---	As TC2 C776G
Christensen et al., 2009 ⁽⁶⁴⁾	Canadá	199/105	---	---	---	---	---	---	---	---	Na MTHDI
García-Fragoso et al., 2010 ⁽⁶²⁾	Porto Rico	27/220	As	Na	---	---	---	---	---	---	Arg653Gin
Hobbs et al., 2010 ⁽³⁷⁾	USA	572/363	Na	---	---	---	---	---	As	---	As TC2 C776G
Weiner et al., 2012 ⁽¹¹¹⁾	Russia	51/390	Na	Na	Na	Na	As	Na	Na	Na	Na MTHDI
Balderrábano-Saucedo et al., 2013 ⁽¹¹²⁾	México	31/62	As	---	---	---	---	---	---	---	G1958A
Cai et al., 2013 ⁽¹¹³⁾	China	Metanalise	---	---	---	As	Na	---	---	---	---
Zidan et al., 2013 ⁽¹¹⁴⁾	Egito	80/80	Na	As	---	---	---	---	---	---	---
Wang et al., 2013 ⁽¹¹⁵⁾	China	Metanalise	As	---	---	---	---	---	---	---	---
Xuan et al., 2014 ⁽¹¹⁶⁾	China	Metanalise	As	Na	---	---	---	---	---	---	---

Nº de indivíduos avaliados; As = associação entre o polimorfismo materno e o risco para DCC na prole sem síndrome genética; Na = ausência de associação entre o polimorfismo materno e o risco para DCC na prole sem síndrome genética; --- = polimorfismo não avaliado.

Tabela 29. Estudos sobre associação entre polimorfismos em genes do metabolismo do folato e risco para DCC em indivíduos sem síndrome genética.

Autor	País	Indivíduos Caso/ Controle Nº	MTHFR C677T	MTHFR 1298C	SLC19A1 A80G	MTRR A66G	MTR A2756G	CBS 844ins68	BHMT G742A	SHMT C1420T	Outros
Junker et al., 2001 ⁽⁶⁶⁾	Alemanha	114/228	As	---	---	---	---	---	---	---	---
Shaw et al., 2003 ⁽⁶⁷⁾	EUA	163/364	---	---	As	---	---	---	---	---	---
Zhu et al., 2006 ⁽⁵⁹⁾	China	57/104	Na	---	---	---	---	---	---	---	---
Pei et al., 2006 ⁽⁶⁰⁾	China	67/99	---	---	As	---	---	---	---	---	---
Van Beynum et al., 2006 ⁽²⁸⁾	Holanda	165/220	Na	---	---	---	---	---	---	---	---
Goldmuntz et al., 2008 ⁽⁶⁹⁾	EUA	727	Na	As	---	Na	Na	Na	Na	Na	Na <i>DHFR</i> 19pb
Verkleij-Hagoort et al., 2008 ⁽⁶¹⁾	Países Baixos	230/251	---	---	---	Na	---	---	---	---	Na <i>TC2 C776G</i>
Christensen et al., 2008 ⁽⁶⁴⁾	Canadá	158/110	---	---	---	---	---	---	---	---	As <i>MTHD1</i> Arg653Gin
Garcia-Fragoso et al., 2010 ⁽⁶²⁾	Porto Rico	27/220	Na	Na	---	---	---	---	---	---	---
Zidan et al., 2013 ⁽¹¹⁴⁾	Egito	80/80	As	As	---	---	---	---	---	---	---
Wang et al., 2013 ⁽¹¹⁵⁾	China	160/188	As	Na	As	Na	As	---	---	---	As <i>MTHD1</i> G1958A; Na <i>TC2</i> C776G

Nº de indivíduos avaliados; As = associação entre o polimorfismo e o risco para DCC em indivíduos sem síndrome genética; Na = ausência de associação entre o polimorfismo e o risco para DCC em indivíduos sem síndrome genética; --- = polimorfismo não avaliado.

A escassez de estudos caso-controle que avaliam a influência de polimorfismos genéticos da via metabólica do folato no risco para DCC na SD dificulta uma análise mais crítica dos resultados. Dentre os estudos existentes, os resultados também são divergentes; é possível que as discrepâncias observadas possam estar associadas a fatores geográficos e nutricionais de cada região, além de características genéticas da população. Predisposição para doenças e frequências alélicas são variáveis entre as populações como um resultado de deriva genética e adaptação a fatores seletivos locais⁽¹¹⁷⁾.

Corroborando com os nossos resultados, um estudo realizado na população croata também não observou associação entre DCC e a presença dos polimorfismos *MTHFR* C677T e A1298C em indivíduos com SD e nas suas mães⁽²¹⁾. Por outro lado, estudo realizado no Brasil por Brandalize et al. (2009)⁽⁷³⁾ mostrou um risco aumentado de 2,07 vezes de DCC na prole com SD para mães portadoras do alelo T do polimorfismo *MTHFR* C677T. Além disso, naquelas que não utilizaram ácido fólico no período pré-concepcional, o risco de prole com DCC foi ainda maior (probabilidade maior que 2,26 vezes).

Outro estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que indivíduos com SD com DSAV apresentaram um aumento significativo na proporção de alelos polimórficos compartilhados do gene *SLC19A1* em relação ao esperado; neste estudo foram avaliados vários polimorfismos deste gene. Além disso, esses autores observaram que as mães desses indivíduos com SD e DSAV apresentam maior probabilidade de transmitir o alelo A do polimorfismo *MTHFR* A1298C aos seus filhos do que aquelas mães de indivíduos com SD sem cardiopatia e sugerem que as alterações da via do folato pode contribuir para a incidência de DSAV nos indivíduos com SD⁽⁷⁴⁾.

Embora nossos resultados não confirmem a associação entre alterações no metabolismo do folato e desenvolvimento de DCC, a casuística reduzida foi uma das limitações do presente estudo, uma vez que estudos de associação requerem amostragem mais ampla. De fato, o cálculo do poder estatístico do presente estudo foi de 65% e, por isso é possível que estudos adicionais com casuísticas maiores possam esclarecer melhor a influência desses polimorfismos no risco para DCC.

Outra limitação é que não foi realizada no presente estudo a dosagem de metabólitos da via folato como, por exemplo, a Hcy. É sabidamente conhecido que a hiperhomocisteinemia é um fator de risco independente para doenças cardiovasculares^(118,119). Além disso, a hiperhomocisteinemia no período periconcepcional aumenta em 3 a 4 vezes o risco de DCC na prole⁽¹²⁰⁾. Concentrações elevadas de Hcy leva ao acúmulo de SAH⁽¹²¹⁾ e o aumento deste substrato, SAH, resulta na inibição das metiltransferases celulares, que durante a organogênese pode alterar a expressão gênica, diferenciação celular e apoptose^(122,123), contribuindo assim para o desenvolvimento de DCC⁽¹²⁴⁾.

A influência do metabolismo anormal do folato no desenvolvimento de DCC também é observada em estudos com biomarcadores de metilação. Concentrações elevadas de Hcy total, de SAH e menor razão SAM:SAH, um indicador de hipometilação, foram significativamente associadas com um risco aumentado de ter uma criança com doença cardíaca congênita não sindrômica⁽¹²⁴⁾ e, mais especificamente, com doença cardíaca congênita e SD⁽¹²⁵⁾. Elevadas concentrações de biomarcadores de hipometilação (SAH elevada e baixa razão de SAM:SAH) também foram observadas em crianças com doença cardíaca congênita e SD no estudo de Obermann et al. (2011)⁽¹²⁶⁾. Assim, considerando que o embrião tenha sido exposto ao estado de

hipometilação global materna, o estado de hipometilação global nas crianças pode ser explicado por hereditariedade e adaptações intrauterinas com consequências para desenvolvimento cardíaco⁽¹²⁷⁾.

No presente estudo também foi analisado o polimorfismo rs2292832 (C→T) do hsa-mir-149 e nossos resultados mostraram um menor risco de DCC para os indivíduos com SD na presença dos genótipos maternos hsa-mir-149 rs2292832 CT/TT. O polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832 está localizado no pré-miRNA 149, portanto, pode interferir na biogênese, processamento e expressão do micro-RNA maduro e, conseqüentemente, alterar a ação desse miRNA em genes alvos^(128,129,130).

O papel dos miRNAs na modulação do metabolismo do folato (ou do carbono1) não está totalmente esclarecido⁽¹³¹⁾. Estudos sugerem que o folato influencia a expressão de miRNAs, uma vez que células linfoblastóides humanas cultivadas sob condições de deficiência de folato apresentam mudanças significativas na expressão de 24 miRNAs⁽¹³²⁾. Usando métodos de predição computacional de genes-alvo de miRNAs e análises estatísticas baseadas em Monte-Carlo⁽¹³¹⁾, foram identificados dois miRNAs candidatos a principais reguladores (miR-22 e miR-125) e dois miRNAs candidatos a principais co-reguladores (miR-344-5p/484 e miR-488) de um número significativo de genes envolvidos no metabolismo do carbono 1, com potencial influência na expressão gênica. Além disso, foram identificados 15 SNPs localizados em sítios alvo preditos de miRNAs em genes envolvidos no metabolismo do carbono 1 e associações significantes entre dois SNPs e vários metabólitos envolvidos nessa via foram descritas⁽¹³¹⁾.

É sabido que o hsa-mir-149 controla a expressão do gene *MTHFR* envolvido no metabolismo do folato^(88,133); assim é possível que o polimorfismo rs2292832 na região

precursora do hsa-mir-149 possa alterar sua biogênese e interferir de forma direta e/ou indireta no metabolismo do folato, com consequências para o desenvolvimento de DCC.

Pelo nosso conhecimento, estudos que avaliam o polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832 na SD são ausentes e há apenas um estudo, realizado na população chinesa, que avalia o papel desse polimorfismo no risco para DCC em indivíduos não sindrômicos. Neste estudo, os autores avaliaram 1324 indivíduos com DCC esporádicos e 1783 indivíduos sem a patologia e não observaram associação entre o polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832 e cardiopatia congênita⁽¹³⁴⁾. Nesse estudo foram avaliados também outros três polimorfismos em pré-miRNA (hsa-mir-146a rs2910164, hsa-mir-196a2 rs11614913, hsa-mir-499 rs3746444) e os autores mostraram que indivíduos com o genótipo CC hsa-mir-196a2 rs11614913 apresentam um risco aumentado de 1,48 vezes para DCC comparado àqueles com genótipos CT ou TT. Além disso, este genótipo foi associado com a expressão elevada do miR-196a maduro em amostras de tecidos cardíacos obtidas de cirurgia de indivíduos com DCC.

A maioria dos estudos que analisa o impacto do polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832 é realizado em cânceres e outras patologias^(135,136,137). O estudo de Hu et al. (2008)⁽¹²⁹⁾ avaliou o hsa-mir-149 rs2292832, além de outros três polimorfismos (hsa-mir-146a rs2910164, hsa-mir-196a2 rs11614913, hsa-mir-499 rs3746444) em pré-miRNAs e mostrou que os indivíduos com câncer de pulmão com genótipo TT hsa-mir-149 rs2292832 e com genótipo CC hsa-mir-196a2 rs11614913 apresentam um pior prognóstico e uma menor sobrevida. Ainda sugerem que o genótipo CC rs11614913 possa estar associado a uma elevada expressão do hsa-mir-196a2 maduro. Também observaram que o polimorfismo hsa-mir-196a2 rs11614913 pode interferir na ligação do hsa-mir196a2-3p maduro no RNA alvo, podendo ser utilizado como biomarcador no

prognóstico para câncer de pulmão. Outro estudo em câncer de pulmão que também avaliou os mesmos polimorfismos em pré-miRNAs associou os genótipos CC/CT hsa-mir-149 rs2292832 e TT/CT hsa-mir-196a2 rs11614913 a um prognóstico favorável e maior sobrevida quando comparados com os genótipos TT rs2292832 e CC rs11614913⁽¹³⁸⁾.

O polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832 (genótipo TT e o alelo T), além de outros três em pré-miRNA (hsa-mir-146a rs2910164, hsa-mir-196a2 rs11614913, hsa-mir-499 rs3746444), foram associados com redução do risco para a asma na população chinesa⁽¹³⁹⁾.

Devido à escassez de estudos com indivíduos com SD e os polimorfismos analisados no risco para cardiopatias congênitas, novos estudos incluindo um maior número de participantes devem ser realizados.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

1. A presença dos polimorfismos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1371C, *MTR* A2756G, *SLC19A1* A80G, *MTRR* A66G, *TC2* C776G, *TC2* A67G, *CβS* 844ins68, *CβS* T833C, *BHMT* G742A, *MTHFD1* G1958A, *DHFR* del 19 pb, *SHMT* C1420T, *MTHFR* rs4846049, *MTHFR* rs4846048 e hsa-mir-149 rs2292832, na população de indivíduos com SD avaliada, não está associada com a ocorrência de DCC nesses indivíduos. Assim, novos estudos, incluindo um maior número de participantes, devem ser realizados para melhor compreensão do impacto destes polimorfismos na ocorrência de DCC nos indivíduos com a SD.

2. Os genótipos maternos hsa-mir-149 rs2292832 CT ou TT estão associados ao risco reduzido para cardiopatia isolada na prole com SD na população estudada, evidenciando um papel do metabolismo do folato na ocorrência de DCC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jones KL. Smith Padrões Reconhecíveis de Malformações Congênitas. 6ª. Edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier; 2007. p.7.
2. Jyothy A, Kumar KS, Mallikarjuna GN, Babu Rao V, Uma Devi B, Sujatha M, et al. Parental age and the origin of extra chromosome 21 in Down syndrome. *J Hum Genet* 2001;46:347-50.
3. Newberger DS. Down Syndrome: prenatal risk assessment and diagnosis. *Am Fam Physician* 2000;62:825-832,837-8.
Ahmed I, Ghafoor T, Samore NA, Chattha MN. Down syndrome: clinical and cytogenetic analysis. *J Coll Physicians Surg Pak* 2005;15:426-9.
4. Ahmed I, Ghafoor T, Samore NA, Chattha MN. Down syndrome: clinical and cytogenetic analysis. *J Coll Physicians Surg Pak* 2005;15:426-9.
5. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC. Cytogenetic profile of Down syndrome cases seen by a general genetics outpatient service in Brazil. *Down's syndrome, research and practice* 2008;12.
6. Pavarino-Bertelli EC, Biselli JM, Bonfim D, Goloni-Bertollo EM. Clinical profile of children with Down syndrome treated in a genetics outpatient service in the southeast of Brazil. *Rev Assoc Med Bras* 2009;55(5):547-52.
7. Ko JM. Genetic Syndromes associated with Congenital Heart Disease. *Korean Circ J* 2015; 45:357-361.
8. Shott SR. Down syndrome: common otolaryngologic manifestations. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006:131-40.
9. Esbensen AJ. Health conditions associated with aging and end of life of adults with Down syndrome. *Int Rev Res Ment Retard* 2010;39:107-26.

10. Hamilton J, Yaneza MMC, Clement WA, Kubba H. The prevalence of airway problems in children with Down's syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2015; 81:1-4.
11. Hasanhodzić M, Tahirović H, Lukinac L. Down syndrome and thyroid gland. *Bosn J Basic Med Sci* 2006;6:38-42.
12. Murphy J, Philip M, Macken S, Meehan J, Roche E, Mayne PD, et al. Thyroid dysfunction in Down's syndrome and screening for hypothyroidism in children and adolescents using capillary TSH measurement. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2008; 21:155-63.
13. Cleves MA, Hobbs CA, Cleves PA, Tilford JM, Bird TM, Robbins JM. Congenital defects among liveborn infants with Down syndrome. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2007; 79:657-663.
14. Zigmond M, Stabholz A, Shapira J, Bachrach G, Chaushu G, Becker A, et al. The outcome of a preventive dental care programme on the prevalence of localized aggressive periodontitis in Down's syndrome individuals. *J Intellect Disabil Res* 2006;50:492-500.
15. Morais MEL, Morais LC, Dotto GN, Dotto PP, Santos LRA. Dental anomalies in patients with Down syndrome. *Braz Dent J* 2007;18:346-50.
16. Lott IT, Head E. Alzheimer disease and Down syndrome: factors in pathogenesis. *Neurobiol Aging* 2005;26(3):383-9.
17. Kusters MA, Verstegen RH, Gemen EF, de Vries E. Intrinsic defect of the immune system in children with Down syndrome: a review. *Clin Exp Immunol.* 2009 May;156(2):189-93.

18. Sobey CG, Judkins CP, Sundararajan V, Phan TG, Drummond GR, Srikanth V. Risk of Major Cardiovascular Events in People with Down Syndrome. *PloS One* 2015; 10(9): e0137093.
19. Ross JA, Spector LG, Robison LL, Olshan AF. Epidemiology of leukemia in children with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2005;44:8-12.
20. Zwaan MC, Reinhardt D, Hitzler J, Vyas P. Acute Leukemias in Children with Down Syndrome. *Pediatr Clin North Am* 2008;55(1):53-70.
21. Božović IB, Vraneković J, Cizmarević NS, Mahulja-Stamenković V, Prpić I, Brajenović-Milić B. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int* 2011;53(4):546-50.
22. Elmagrpy Z, Rayani A, Shah A, Habas E, Aburawi EH. Down syndrome and congenital heart disease: why the regional difference as observed in the Libyan experience? *Cardiovasc J Afr* 2011;22(6):306-9.
23. Irving CA, Chaudhari MP. Cardiovascular abnormalities in Down's syndrome: spectrum, management and survival over 22 years. *Arch Dis Child* 2012;97:326-30.
24. Feng Y, Wang S, Chen R, Tong X, Wu Z, Mo X. Maternal Folic Acid Supplementation and the Risk of Congenital Heart Defects in Offspring: A Meta-Analysis of Epidemiological Observational Studies. *Sci Rep* 2015; 5: 8506.
25. Boot MJ, Steegers-Theunissen RP, Poelmann RE, Van Iperen L, Lindemans J, Gittenberger-de Groot AC. Folic acid and homocysteine affect neural crest and neuroepithelial cell outgrowth and differentiation in vitro. *Dev Dyn* 2003;227:301–308.

26. Tierney BJ, Ho T, Reedy MV, Brauer PR. Homocysteine inhibits cardiac neural crest cell formation and morphogenesis in vivo. *Dev Dyn* 2004;229(1):63-73.
27. Schoenwolf, G. Larsen *Embriologia Humana*. 4ª ed. Rio de Janeiro, Ed. Elsevier, 2010.
28. van Beynum IM, Kapusta L, den Heijer M, Vermeulen SHHM, Kouwenberg M, Daniëls O, et al. Maternal MTHFR 677C>T is a risk factor for congenital heart defects: effect modification by periconceptional folate supplementation. *Eur Heart J* 2006; 27(8):981-7.
29. Tang LS, Wlodarczyk BJ, Santillano DR, Miranda RC & Finnell RH. Developmental consequences of abnormal folate transport during murine heart morphogenesis. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70:449–458.
30. Lupo PJ, Goldmuntz E, Mitchell LE. Gene-gene interactions in the folate metabolic pathway and the risk of conotruncal heart defects. *J Biomed Biotechnol* 2010;2010:630940.
31. Vannucchi H. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Ácido Fólico. Força-tarefa Alimentos Fortificados e Suplementos Comitê de Nutrição. Fascículo 10, Ed. ILSI Brasil, 2010.
32. Hobbs CA, James SJ, Parsian A, Krakowiak PA, Jernigan S, Greenhaw JJ, et al. Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydrofolate reductase gene. *J Med Genet* 2006;43:162–6.

33. Christensen KE, Deng L, Bahous RH, Jerome-Majewska LA, Rozen R. MTHFD1 formyltetrahydrofolate synthetase deficiency, a model for the MTHFD1 R653Q variant, leads to congenital heart defects in mice. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2015;103(12):1031-8.
34. Nguyen TT, Dyer DL, Dunning DD, Rubin SA, Grant KE, Said HM. Human intestinal folate transport: cloning, expression, and distribution of complementary RNA. *Gastroenterology* 1997;112:783-91.
35. Quadros EV, Regec AL, Khan KM, Quadros E, Rothenberg SP. Transcobalamin II synthesized in the intestinal villi facilitates transfer of cobalamin to the portal blood. *Am J Physiol* 1999;277:G161-66.
36. Finkelstein JD, Martin JJ. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:385-9.
37. Hobbs CA, Cleves MA, Karim MA, Zhao W, MacLeod SL. Maternal folate-related gene environment interactions and congenit heart defects. *Obstet Gynecol* 2010;116:316–22.
38. Galbiatti ALS, Ruiz MT, Maniglia JV, Raposo LS, Pavarino-Bertelli EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck câncer: genetic polymorphisms and folate metabolism. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012;78(1):132-9.
39. Morin I, Platt R, Weisberg I, Sabbaghian N, Wu Q, Garrow TA, et al. Common variant in betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT) and risk for spina bifida. *Am. J Med Genet* 2003;119A:172-76.
40. Ueland PM, Holm PI, Hustad S. A key modulator of one-carbon metabolism and homocysteine status. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(10):1069-75.

41. Haddad R, Mendes MA, Hoehr NF, Eberlin MN. Amino acid quantitation in aqueous matrices via trap and release membrane introduction mass spectrometry: homocysteine in human plasma. *Analyst*. 2001;126(8):1212-5.
42. Födinger M, Dierkes J, Skoupy S, Röhrer C, Hagen W, Puttinger H, et al. Effect of glutamate carboxypeptidase ii and reduced folate carrier polymorphisms on folate and total homocysteine concentrations in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(5):1314-9.
43. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolatereductase. *Nat Genet* 1995;10(1):111-3.
44. Sunder-Plassmann G, Floth A, Födinger M. Hyperhomocysteinemia in organ transplantation. *Curr Opin Urol* 2000;10:87-94.
45. Williams LJ, Correa A & Rasmussen S. Maternal lifestyle factors and risk for ventricular septal defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004;70:59–64.
46. Hum DW, Bell AW, Rozen R, MacKenzie RE. Primary structure of a human trifunctional enzyme. Isolation of a CDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methylenetetrahydrofolate ciclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. *J Biol Chem* 1988;263:15946-50.
47. Krajinovic M. MTHFD1 gene: role in disease susceptibility and pharmacogenetics. *Pharmacogenomics*. 2008;9(7):829-32.
48. Steck SE, Keku T, Butler LM, Galanko J, Massa B, Millikan RC, et al. Polymorphisms in Methionine synthase, Methionine synthase reductase and Serine hydroxymethyltransferase, folate and alcohol intake, and colon cancer risk. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, 2008, Vol.1, No.4, 196-204.

- 49.** Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(1):75-81.
- 50.** Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, gene, polymorphisms, and the associated diseases. *Gene.* 2014;533(1):11-20.
- 51.** Coppedè F. The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Front Genet.* 2015;6:223.
- 52.** Martínez-Frías ML. The biochemical structure and function of Methylene tetrahydrofolate Reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down Syndrome. *Am J Med Genet* 2008;146A:1477-82.
- 53.** Shaw G, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM & Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet* 1995;59:536–545.
- 54.** Kapusta L, Haagsma ML, Steegers EA, Cuypers MH & Blom HJ. Congenital heart defects and maternal derangement of homocysteine metabolism. *J Pediatr* 1999;135:773–774.
- 55.** Correa A, Botto L, Liu Y, Mulinare J, Erickson JD. Do multivitamin supplements attenuate the risk for diabetes-associated birth defects? *Pediatrics* 2003;111:1146–1151.
- 56.** van Beynum IM, Kapusta L, Bakker MK, den Heijer M, Blom HJ, de Walle HE. Protective effect of periconceptional folic acid supplements on the risk of congenital heart defects: a registry-based case-control study in the northern Netherlands. *Eur Heart J* 2010;31:464–471.

57. Botto LD, Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGe review. *Am J Epidemiol.* 2000;151(9):862-77.
58. Wenstrom KD, Johanning GL, Johnston KE, DuBard M. Association of the C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation and elevated homocysteine levels with congenital cardiac malformations. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:806–12.
59. Zhu WL, Li Y, Yan L, Dao J, Li S. Maternal and offspring MTHFR gene C677T polymorphism as predictors of congenital atrial septal defect and patent ductus arteriosus. *Mol Hum Reprod* 2006;12:51–4.
60. Pei L, Zhu H, Zhu J, Ren A, Finell RH, Li Z. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial defects and congenital heart defects in China. *Ann Epidemiol.* 2006;16(5):352-6.
61. Verkleij-Hagoort AC, van Driel LM, Lindemans J, Isaacs A, Steegers EAP, Helbing WA, et al. Genetic and lifestyle factors related to the periconception vitamin B12 status and congenital heart defects: a Dutch case-control study. *Mol Genet Metab* 2008;94:112–19.
62. Gracia-Fragoso L, Garcia-Garcia I, Leavitt G, Renta J, Ayala MA, Cadilla CL. MTHFR polymorphisms in Puerto Rican children with isolated congenital heart disease and their mothers. *Int J Genet Mol Biol* 2010;2:43–7.
63. Storti S, Vittorini S, Lascone MR, Sacchelli M, Collavoli A, Ripoli A, et al. Association between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and conotruncal heart defects. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:276–80.

64. Christensen KE, Rohlicek CV, Andelfinger GU, Michaud J, Bigras JL, Richter A, et al. The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects. *Human Mutation* 2009;30:212–20.
65. Lupo PJ, Mitchell LE, Goldmuntz E. NAT1, NOS3, and TYMS genotypes and the risk of conotruncal cardiac defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2011;91:61-5.
66. Junker R, Kotthoff S, Vielhaber H, Halimeh S, Kosch A, Koch HG, et al. Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovasc Res* 2001;51:251–4.
67. Shaw GM, Zhu H, Lammer EJ, Yang W, Finell RH. Genetic variation of infant reduced folate carrier (A80G) and risk of orofacial and conotruncal heart defects. *Am J Epidemiol* 2003;158:747–52.
68. Wang B, Liu M, Yan W, Mao J, Jiang D, Li H, et al. Association of SNPs in genes involved in folate metabolism with the risk of congenital heart disease. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2013;26(18):1768–1777.
69. Goldmuntz E, Woyciechowski S, Renstrom D, Lupo PJ, Mitchell LE. Variants of folate metabolism genes and the risk of conotruncal cardiac defects. *Circ Cardiovasc Genet* 2008;1:126–32.
70. Shaw GM, Iovannisci DM, Yang W, Finell RH, Carmichael SL, Cheng S, et al. Risks of human conotruncal heart defects associated with 32 single nucleotide polymorphisms of selected cardio-vascular disease-related genes. *Am J Med Genet A* 2005;138:21–6.
71. Shaw GM, Lu W, Zhu H, Yang W, Briggs FBS, Carmichael SL, et al. 118 SNPs of folate-related genes and risks of spina bifida and conotruncal heart defects. *BMC Med Genet* 2009;10:49.

72. Zhao JY, Sun JW, Gu ZY, Wang J, Wang EL, Yang XY, et al. Genetic polymorphisms of the TYMS gene are not associated with congenital cardiac septal defects in a Han Chinese population. *PLoS One* 2012;7:e31644.
73. Brandalize APC, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schüler-Faccini L. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the *MTFHR* gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet A* 2009;149A(10):2080-7.
74. Locke AE, Dooley KJ, Tinker SW, Cheong SY, Feingold E, Allen EG, et al. Variation in folate pathway genes contributes to risk of congenital heart defects among individuals with Down syndrome. *Genet Epidemiol* 2010;34(6):613-23.
75. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120(1):15-20.
76. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006; 126:1203-17.
77. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS boil* 2004;2(11):e363.
78. Dierssen M, Hérault Y, Estivill X. Aneuploidy: from a physiological mechanism of variance to Down syndrome. *Physiol Rev* 2009;89(3):887-920.
79. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23(20):4051-60.
80. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415-9.

- 81.** Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003;17:3011-6.
- 82.** Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409(6818):363-6.
- 83.** Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* 2004;304:594-6.
- 84.** Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008;455:58-63.
- 85.** Wu L, Belasco JG. Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2008;29:1-7.
- 86.** Pickrell JK, Marioni JC, Pai AA, Degner JF, Engelhardt BE, Nkadori E, et al. Understanding mechanisms underlying human gene expression variation with RNA sequencing. *Nature* 2010; 464:768-72.
- 87.** Cheng X, Li T, Wang H, Zhu D, Ma C, Wang Y, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and cerebral palsy in Chinese infants. *J Hum Genet* 2011;5:17-21.
- 88.** Wu C, Gong Y, Sun A, Zhang Y, Zhang C, Zhang W, et al. The human MTHFR rs 4846049 polymorphism increases coronary heart disease risk through modifying miRNA binding. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2013;23(7):693-8.
- 89.** Gaughan DJ, Barboux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene* 2000;257(2):279-89.

- 90.** Liu X, Zhao LJ, Liu YJ, Xiong DH, Recker RR, Deng HW. The MTHFR gene polymorphism is associated with lean body mass but not fat body mass. *Hum Genet* 2008;123(2):189-96.
- 91.** Liu P, Lu Y, Recker RR, Deng HW, Dvornyk V. Association analyses suggest multiple interaction effects of the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on timing of menarche and natural menopause in white women. *Menopause* 2010; 17:185-90.
- 92.** Martin MM, Buckenberger JA, Jiang J, Malana GE, Nuovo GJ, Chotani M, et al. The human angiotensin II type 1 receptor +1166 A/C polymorphism attenuates microRNA-155 binding. *J Biol Chem* 2007;282:24262-9.
- 93.** Ryan BM, Robles AL, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* 2010;10:389-402.
- 94.** Jeon TJ, Kim OJ, Kim SY, Oh SH, Oh D, Kim OJ, et al. Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 Polymorphisms with ischemic stroke and silent brain infarction risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33:420-30.
- 95.** Tu HF, Liu CJ, Chang CL, Wang PW, Kao SY, Yang CC, et al. The association between genetic polymorphism and the processing efficiency of miR-149 affects the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2012; 7(12):e51606.
- 96.** Zhang M, Jin M, Yu Y, Zhang S, Wu Y, Liu H, et al. Associations of miRNA polymorphisms and female physiological characteristics with breast cancer risk in Chinese population. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2012; 21(2):274-80.

- 97.** Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, M O, Hirata RDC. Optimized Procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clinical Chemistry* 1998;n8:44.
- 98.** Biselli JM, Brumati D, Frigeri VF, Zampieri BL, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC. A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) and C776G polymorphism of transcobalamin 2 (TC2) genes in Down's syndrome etiology. *São Paulo Med J* 2008;126(6):329-32.
- 99.** Biselli JM, Goloni-Bertolo EM, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. The MTR A2756G polymorphism is associated with an increase of plasma homocysteine concentration in Brazilian individuals with Down syndrome. *Braz J Med Biol Res* 2008;41(1):34-40.
- 100.** Biselli JM, Zampieri BL, Goloni-Bertollo EM, Haddad R, Fonseca MF, Eberlin MN, et al. Genetic polymorphisms modulate the folate metabolism of Brazilian individuals with Down syndrome. *Mol Biol Rep* 2012;39(10):9277-84.
- 101.** Mendes CC, Raimundo AM, Oliveira LD, Zampieri BL, Marucci GH, Biselli JM, et al. DHFR 19bp deletion and SHMT C1420T polymorphisms and metabolite concentrations of the folate pathway in individuals with Down syndrome. *Genet Test Mol Biomarkers* 2013;17(4):274-7.
- 102.** Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C, et al. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genet Med* 2008;10(3):173-80.
- 103.** Ekure EN, Animashaun A, Bastos M, Ezeaka VC. Congenital heart diseases associated with identified syndromes and other extra-cardiac congenital malformations in children in Lagos. *West Afr J Med* 2009;28(1):33-7.

- 104.** Espinola-Zavaleta N, Soto ME, Romero-Gonzalez A, Gómez-Puente LC, Muñoz-Castellanos L, Gopal AS, Keirns C, Lupi-Herrera E. Prevalence of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hipertension in Down's Syndrome: an Echocardiographic study. *J Cardiovasc Ultrasound* 2015;23: 72-77.
- 105.** Serra-Juhé C, Cuscó I, Homs A, Flores R, Torán N, Pérez-Jurado LA. DNA methylation abnormalities in congenital heart disease. *Epigenetics* 2015;10: 167-177.
- 106.** Vilas Boas LT, Albernaz EP, Costa RG. Prevalence of congenital heart defects in patients with Down syndrome in the municipality of Pelotas, Brazil. *J Pediatr* 2009;85(5):403-7.
- 107.** Galdieri LC, Arrieta SR, Silva CM, Pedra CA, D'Almeida V. Homocysteine concentrations and molecular analysis in patients with congenital heart defects. *Arch Med Res* 2007;38(2):212-8.
- 108.** Wintner S, Hafner E, Stonek F, Stuempflen I, Metzenbauer M, Philipp K. Association of congenital cardiac defects and the C677T methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism. *Prenat Diagn* 2007;27(8):704-8.
- 109.** Sánchez-Urbina R, Galaviz-Hernández C, Sierra-Ramírez JA, Rangel-Villalobos H, Torres-Saldúa R, Alva-Espinoza C, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene 677CT polymorphism and isolated congenital heart disease in a Mexican population. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 2012;65(2):158-63.
- 110.** van Beynum IM, den Heijer M, Blom HJ, Kapusta L. The MTHFR 677C->T polymorphism and the risk of congenital heart defects: a literature review and meta-analysis. *QJM* 2007;100(12):743-53.
- 111.** Weiner AS, Gordeeva LA, Voronina EN, Boyarskikh UA, Shabaldin AV,

Filipenko ML. Polymorphisms in folate-metabolizing genes and risk of having an offspring with congenital anomalies in the West Siberian region of Russia: a case-control study. *Prenat Diagn* 2012;32(11):1041-8.

112. Balderrábano-Saucedo NA, Sánchez-Urbina R, Sierra-Ramírez JA, García-Hernández N, Sánchez-Boiso A, Klunder-Klunder M, et al. Polymorphism 677C → T MTHFR gene in Mexican mothers of children with complex congenital heart disease. *Pediatr Cardiol* 2013;34(1):46-51.

113. Cai B, Zhang T, Zhong R, Zou L, Zhu B, Chen W, et al. Genetic Variant in MTRR, but Not MTR, Is Associated with Risk of Congenital Heart Disease: An Integrated Meta-Analysis. *PLoS One* 2014;9(3):e89609.

114. Zidan HE, Rezk NA, Mohammed D. MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and their relation to homocysteine level in Egyptian children with congenital heart diseases. *Gene* 2013;529(1):119-24.

115. Wang W, Wang Y, Gong F, Zhu W, Fu S. MTHFR C677T polymorphism and risk of congenital heart defects: evidence from 29 case-control and TDT studies. *PLoS One* 2013;8(3):e58041.

116. Xuan C, Li H, Zhao JX, Wang HW, Wang Y, Ning CP, et al. Association between MTHFR polymorphisms and congenital heart disease: a meta-analysis based on 9,329 cases and 15,076 controls. *Sci Rep* 2014;4:7311.

117. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011;6(2):e17063.

- 118.** Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. *J Am Med Assoc* 1995;274:1049-57.
- 119.** Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
- 120.** Verkleij-Hagoort A, Blik J, Sayed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: a meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2007;143:952–60
- 121.** Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000;275:29318 –23.
- 122.** Ehrlich M. Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem* 2003;88(5):899–910.
- 123.** Finnell RH, Spiegelstein O, Wlodarczyk B, Triplett A, Pogribny IP, Melnyk S, et al. DNA methylation in Folbp1 knockout mice supplemented with folic acid during gestation. *J Nutr* 2002;132(8 Suppl):2457S-2461S.
- 124.** Hobbs CA, Cleves MA, Zhao W, Melnyk S, James SJ. Congenital heart defects and abnormal maternal biomarkers of methionine and homocysteine metabolism. *Am J Clin Nutr* 2005;81:147-53.
- 125.** van Driel LM, de Jonge R, Helbing WA, van Zelst BD, Ottenkamp J, Steegers EA, et al. Maternal global methylation status and risk of congenital heart diseases. *Obstet Gynecol* 2008;112(2):277-83.

- 126.** Obermann-Borst SA, van Driel LM, Helbing WA, de Jonge R, Wildhagen MF, Steegers EA, et al. Congenital heart defects and biomarkers of methylation in children: a case-control study. *Eur J Clin Invest* 2011;41(2):143-50.
- 127.** Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med* 2008;359:61-73.
- 128.** Duan S, Mi S, Zhang W, Dolan ME. Comprehensive analysis of the impact of SNPs and CNVs on human microRNAs and their regulatory genes. *RNA Biol* 2009;6(4):412-25.
- 129.** Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest* 2008;118(7):2600-8.
- 130.** Sun G, Yan J, Noltner K, Feng J, Li H, Sarkis DA, et al. SNPs in human miRNA genes affect biogenesis and function. *RNA* 2009;15(9):1640-51.
- 131.** Stone N, Pangilinan F, Molloy AM, Shane B, Scott JM, Ueland PM, et al. Bioinformatic and genetic association analysis of microRNA target sites in one-carbon metabolism genes. *PLoS ONE* 2011;6(7):e21851.
- 132.** Marsit CJ, Eddy k, Kelsey KT. MicroRNA responses to cellular stress. *Cancer Res* 2006; 66:10843-8.
- 133.** Target Scan Human - Target Scan, 2015. Accessed 30/03/2016. www.targetscan.org/vert_71/
- 134.** Xu J, Hu Z, Xu Z, Gu H, Yi L, Cao H, et al. Functional variant in microRNA-196a2 contributes to the susceptibility of congenital heart disease in a Chinese population. *Hum Mutat* 2009;30(8):1231-6.

- 135.** Yan P, Xia M, Gao F, Tang G, Zeng H, Yang S, et al. Predictive role of miR-146a rs2910164 (C>G), miR-149 rs2292832 (T>C), miR-196a2 rs11614913 (T>C) and miR-499 rs3746444 (T>C) in the development of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(11):15177-83.
- 136.** Hashemi M, Moradi N, Ziaee SA, Narouie B, Soltani MH, Rezaei M, et al. Association between single nucleotide polymorphism in miR-499, miR-196a2, miR-146a and miR-149 and prostate cancer risk in a sample of Iranian population. *J Adv Res* 2016;7(3):491-8.
- 137.** Wang C, Sturgis EM, Chen X, Zheng H, Wei Q, Li G. Pre-miRNA variants as predictors of clinical outcome in patients with squamous cell carcinomas of the oropharynx. *Oncotarget* 2016;7(18):26444-26453.
- 138.** Hong MJ, Choi YY, Jang JA, Jung HJ, Lee SY, Lee WK, et al. Association between genetic variants in pre-microRNAs and survival of early-stage NSCLC. *J Thorac Oncol* 2013;8(6):703-10.
- 139.** Su XW, Yang Y, Lv ML, Li LJ, Dong W, Miao-Liao, et al. Association between single-nucleotide polymorphisms in pre-miRNAs and the risk of asthma in a Chinese population. *DNA Cell Biol* 2011;30(11):919-23.

APÊNDICES

- **Objetivo da pesquisa:** Avaliar a associação entre os polimorfismos genéticos *MTHFR* rs4846049, *MTHFR* rs4846048 e *hsa-miR-149* rs2292832 e a presença de defeitos cardíacos congênitos em indivíduos com síndrome de Down e investigar o impacto desses polimorfismos na expressão do RNAm e da proteína do gene *MTHFR*.
- **Método empregado para colheita de material biológico (sangue periférico):** O sangue será colhido com seringa descartável por profissionais habilitados.
- **Desconfortos e riscos esperados:** O risco da coleta inclui vermelhidão local transitória, e raramente a formação de pequenos hematomas e inflamação local.
- **Benefícios que poderão ser obtidos:** Este estudo é importante, pois contribuirá para o conhecimento dos fatores de risco para cardiopatias congênitas em indivíduos com síndrome de Down.
- O sujeito da pesquisa/responsável legal consente ao pesquisador utilizar os resultados advindos da pesquisa para divulgação em reuniões de caráter científico e/ou publicações em meios especializados, sendo, portanto, mantido sigilo das informações.
- O sujeito da pesquisa/responsável legal pode consultar a pesquisadora responsável pelo telefone (17) 32015904 ou a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (17) 32015813, para esclarecimento de qualquer dúvida.
- O sujeito da pesquisa/responsável legal está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e não precisa apresentar justificativas para isso.
- O sujeito da pesquisa/responsável legal autoriza o armazenamento do material coletado e será contatado(a) para conceder ou não a autorização para o uso deste material em futuros projetos.
- O sujeito da pesquisa/responsável legal que concordar em participar desta pesquisa e com a retirada e uso do material, do modo descrito acima, não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes desta pesquisa e também não terá qualquer tipo de despesa para participar do estudo.
- Caso necessário, o sujeito da pesquisa será convocado para uma nova coleta de sangue periférico para avaliação da expressão do RNAm e da proteína do gene *MTHFR*.

V. Consentimento pós-esclarecimento:

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar na amostragem do projeto de pesquisa em questão, por livre vontade sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão.

São José do Rio Preto, _____ de _____, _____.

Responsável legal

Érika Cristina Pavarino
Pesquisadora Responsável

Nota: Este termo foi elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra com o pesquisador responsável pelo projeto.

Responsável pela coleta

**FAMERP – FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
AUTARQUIA ESTADUAL
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Obrigatório para Pesquisas Científica em Seres Humanos – Resolução n.º 466/12 – CNS)**

I. Dados de Identificação do sujeito da pesquisa

Nome: _____

Documento de identidade n.º: _____

Endereço: _____ n.º: _____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone para contato: _____

II. Dados sobre a pesquisa científica/pesquisador:

Título do Projeto: Impacto de polimorfismos da região 3' não traduzida do gene *MTHFR* e de polimorfismo do microRNA hsa-miR-149 no risco materno para a síndrome de Down.

Pesquisadora responsável: Profª Drª Érika Cristina Pavarino

Inscrição no Conselho Regional: Conselho de Biologia (CRB-1) no. 18306/01-D

Cargo/Função: Professor Adjunto

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Endereço: Avenida Brigadeiro Faria Lima, 5416 **Bairro:** Vila São Pedro

CEP: 1509-000 **Fone:** (17) 3201-5904

III. Avaliação do Risco da Pesquisa

(x) risco mínimo () risco médio () risco maior

Consequência imediata do estudo: Risco da coleta de sangue que inclui vermelhidão local transitória, e raramente a formação de pequenos hematomas e inflamação local.

IV. Esclarecimentos sobre a pesquisa científica:

•**Objetivo da pesquisa:** Objetivo do estudo é investigar a associação entre variações no material genético (gene *MTHFR* e microRNA) e o risco de mulheres terem filhos com síndrome de Down (SD) e associar a constituição genética (genótipos) com a expressão do gene estudado (RNA e proteína) e com as concentrações de homocisteína, ácido metilmalônico e folato.

•**Método empregado para colheita de material biológico (sangue periférico):** O sangue periférico será colhido com seringa descartável por profissionais habilitados.

•**Desconfortos e riscos esperados:** O risco da coleta inclui vermelhidão local transitória, e raramente a formação de pequenos hematomas e inflamação local.

•**Benefícios que poderão ser obtidos:** Não há benefícios diretos para os participantes da pesquisa. Entretanto, os dados gerados a partir do presente estudo contribuirão para a compreensão dos mecanismos envolvidos no risco materno para a síndrome de Down.

•O sujeito da pesquisa/responsável legal consente ao pesquisador utilizar os resultados advindos da pesquisa apenas para divulgação em reuniões de caráter científico e/ou publicações em meios especializados, sendo, portanto, mantido sigilo das informações.

•O sujeito da pesquisa/responsável legal pode consultar a pesquisadora responsável pelo telefone (17) 32015904 ou a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (17) 32015813, para esclarecimento de qualquer dúvida.

•O sujeito da pesquisa está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e não precisa apresentar justificativas para isso.

•O sujeito da pesquisa legal autoriza o armazenamento do material coletado e será contatado (a) para conceder ou não a autorização para o uso deste material em futuros projetos.

•O sujeito que concordar em participar desta pesquisa e com a retirada e uso do material, do modo descrito acima, não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes desta pesquisa e também não terá qualquer tipo de despesa para participar do estudo.

V. Consentimento pós-esclarecimento:

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador, consinto em participar na amostragem do projeto de pesquisa em questão, por livre vontade sem que tenha sido submetido a qualquer tipo de pressão.

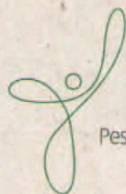
São José do Rio Preto, ____ de _____, _____.

Sujeito de Pesquisa

Érika Cristina Pavarino
Pesquisadora Responsável

Nota: este termo foi elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra com o pesquisador responsável pelo projeto.

ANEXOS



Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos
CEP/FAMERP

Parecer n.º 529.830

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa CAAE 25712013.0.0000.5415 sob a responsabilidade de Érika Cristina Pavarino com o título "Impacto de polimorfismos do gene MTHFR e do microRNA hsa-miR-149 no risco para cardiopatias congênitas em indivíduos com síndrome de Down" está de acordo com a resolução do CNS 466/12 e foi aprovado por esse CEP.

Lembramos ao senhor(a) pesquisador(a) que, no cumprimento da Resolução 251/97, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) deverá receber relatórios semestrais sobre o andamento do Estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, com certeza para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do Estudo.

São José do Rio Preto, 14 de fevereiro de 2014.

Luciano Garcia Lourenção
Prof. Dr. Luciano Garcia Lourenção
Vice-Presidente do CEP/FAMERP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº2400/2004

Registro CONEP: 10618 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 3340/04

Processo nº 25000.106488/2004-41

Projeto de Pesquisa: "Avaliação genético clínica e molecular em Síndrome de Down."

Pesquisador Responsável: Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP

Área Temática Especial: Genética Humana

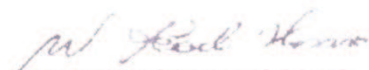
Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 2001/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

- 1) tendo em vista a afirmação da pesquisadora responsável que será estabelecido um banco de material biológico, solicita-se que seja feito um banco de dados junto ao CEP da instituição, informando: quem será o responsável pelo banco, condições de armazenamento, segurança do banco, como será o acesso pelos pesquisadores a esse banco, de que forma será garantida a confidencialidade dos indivíduos que doarem o material para a formação desse banco;
- 2) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos;
- 3) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto com a recomendação 1, acima citada, devendo esta ser acompanhada pelo CEP, para posterior início da pesquisa.

Situação: Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 29 de Novembro de 2004


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS