



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

---

**Cristiani Cortez Mendes**

**ESTUDO GENÉTICO E EPIGENÉTICO DE  
FATORES DE RISCO MATERNO PARA A  
SÍNDROME DE DOWN**

**São José do Rio Preto  
2017**

Cristiani Cortez Mendes

Estudo genético e epigenético de fatores de risco  
materno para a síndrome de Down

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de São José do Rio Preto para  
obtenção do Título de Doutor no Curso  
de Pós-graduação em Ciências da Saúde,  
Área de Concentração: Medicina e  
Ciências Correlatas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érika Cristina Pavarino

São José do Rio Preto  
2017

Mendes, Cristiani Cortez

Estudo genético e epigenético de fatores de risco materno para a síndrome de Down, 2017

100 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Prof<sup>ta</sup>. Dr<sup>a</sup>. Érika Cristina Pavarino

1. Síndrome de Down; 2. Metilação do DNA; 3. Polimorfismo Genético;  
4. Fatores de Risco.

CRISTIANI CORTEZ MENDES

Estudo genético e epigenético de fatores de risco  
materno para a síndrome de Down

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR

Presidente e Orientadora: Érika Cristina Pavarino

2º Examinador: Débora Ap. P. de Campos Zuccari

3º Examinador: Heloísa Cristina Caldas

4º Examinador: Flávia Cristina Rodrigues Lisoni

5º Examinador: Michele de Lima Gregório

Suplentes: Ana Livia Silva Galbiatti Dias

Patrícia Matos Biselli Chicote

São José do Rio Preto, 01/02/2017.

## Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos .....	ii
Epígrafe .....	iv
Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	vi
Lista de abreviaturas e símbolos .....	vii
Resumo .....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução .....	1
1.1. Objetivos.....	10
2. Artigos Científicos .....	11
Artigo Científico 1: Global DNA methylation and Down syndrome: a case-control study in Brazilian women .....	14
Artigo Científico 2: Effect of polymorphisms in the TYMS and DNMT3B genes on the maternal risk for Down syndrome and on the concentration of metabolites of folate pathway .....	41
Artigo Científico 3: DNMT3B -149C>T and -283T>C polymorphisms as maternal risk factor for Down syndrome .....	67
3. Conclusões .....	88
4. Referências Bibliográficas .....	90

**Dedicatória**

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.

## **Agradecimentos**

### **À professora Érika, minha orientadora**

Pela oportunidade de conhecer e me apaixonar pelo mundo da pesquisa e por todos os momentos compartilhados nesses muitos anos de orientação.

### **Aos meus pais, Rosa e Wilson**

Por todos os ensinamentos, incentivo e apoio incondicional.

### **Ao Fábio Júnior**

Pelo companheirismo, carinho e paciência e pela imensa ajuda na formatação da tese.

### **Ao meu irmão, Anderson, e à minha cunhada, Gabriele**

Pelo exemplo de dedicação e competência.

### **Às minhas sobrinhas, Júlia e Lívia**

Por tornarem minha vida mais feliz.

### **À minha amiga e companheira de laboratório por vários anos, Lídia**

Pela inestimável contribuição na realização do pirosequenciamento e por me receber tão bem em sua casa.

### **Aos pesquisadores do CPOM (Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular) do Hospital de Câncer de Barretos**

Pela essencial colaboração na realização do pirosequenciamento.

**À minha amiga e também companheira de laboratório por vários anos, Bruna**

Pelas fundamentais sugestões e pela colaboração na correção do inglês.

**À minha amiga e mais uma companheira de laboratório por vários anos, Ana Livia**

Pela disponibilidade em me ajudar a resolver alguns problemas que a distância não permitia.

**À professora Eny e a todos os colegas de laboratório**

Pela troca de conhecimentos, pela disponibilidade em ajudar e por tornarem os vários anos de laboratório mais alegres.



**Epígrafe**

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de  
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá

**Lista de figuras**

<i>Introdução</i>	<b>Figura 1.</b> Metabolismo do folato com as principais enzimas envolvidas.....	06
<i>Artigo 1</i>	<b>Figure 1.</b> Folate metabolism.....	36
	<b>Figure 2.</b> LINE-1 methylation in mothers of DS individuals and control mothers.....	37
<i>Artigo 3</i>	<b>Figure 1.</b> Folate metabolism.....	83

## Lista de tabelas

<i>Artigo 1</i>	<b>Table 1.</b> Primers sequences and PCR conditions used for pirosequencing.....	38
	<b>Table 2.</b> Percentage of LINE-1 and Alu methylation according to genotype and maternal age.....	39
<i>Artigo 2</i>	<b>Table 1.</b> Genotype distribution of thymidylate synthase ( <i>TYMS</i> ) 28-base pair (bp) repeats, <i>TYMS</i> 1494del6 and DNA methyltransferase 3B ( <i>DNMT3B</i> ) -579G>T polymorphisms in the case and control groups.....	64
	<b>Table 2.</b> Association between thymidylate synthase ( <i>TYMS</i> ) 28-base pair (bp) repeats, <i>TYMS</i> 1494del6 and DNA methyltransferase 3B ( <i>DNMT3B</i> ) -579G>T polymorphisms and Down syndrome maternal risk according to multiple logistic regression analyses.....	65
	<b>Table 3.</b> Distribution of serum folate and plasma homocysteine (Hcy) and methylmalonic acid (MMA) concentrations according to genotypes in the dominant and recessive models.....	66
<i>Artigo 3</i>	<b>Table 1.</b> Genotype distribution of DNA methyltransferase 3B ( <i>DNMT3B</i> ) -149C>T and <i>DNMT3B</i> -283T>C polymorphisms between the case and control groups.....	84
	<b>Table 2.</b> Haplotype frequencies of DNA methyltransferase 3B ( <i>DNMT3B</i> ) -149C>T and <i>DNMT3B</i> -283T>C polymorphisms in the case and control groups.....	85
	<b>Table 3.</b> Association between combined genotypes and Down syndrome maternal risk according to multiple logistic regression analyses.....	86
	<b>Table 4.</b> Distribution of serum folate and plasma homocysteine (Hcy) and methylmalonic acid (MMA) concentrations according to combined genotypes DNA methyltransferase 3B ( <i>DNMT3B</i> ) -149C>T/ <i>DNMT3B</i> -283T>C.....	87

**Lista de abreviaturas e símbolos**

$\mu\text{L}$	<i>microliter</i>
10-formilTHF	10-formiltetrahydrofolato ( <i>10-formyltetrahydrofolate</i> )
2R	Duas repetições ( <i>two repeats</i> )
3R	Três repetições ( <i>three repeats</i> )
4R	<i>Quadruple repeat</i>
5,10-metilTHF	5,10-metiltetrahydrofolato
5,10-MTHF	5,10-metilenotetrahydrofolato ( <i>5,10-methylenetetrahydrofolate</i> )
5-metilTHF	5-metiltetrahydrofolato ( <i>5-methyltetrahydrofolate</i> )
5R	<i>Quintuple repeat</i>
A	Adenina ( <i>adenine</i> )
B <sub>12</sub>	Vitamina B <sub>12</sub> ( <i>vitamin B<sub>12</sub></i> )
BHMT	Betaina-homocisteína metiltransferase ( <i>betaine-homocysteine methyltransferase</i> )
bp	Base pair
C	Citosina ( <i>cytosine</i> )
CBS	Cistationina beta-sintase ( <i>cystathionine beta-synthase</i> )
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa ( <i>Research Ethics Committee</i> )
CH <sub>3</sub>	Grupo metil ( <i>methyl group</i> )
CI	<i>Confidence interval</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CpG	Dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina
del	Deleção ( <i>deletion</i> )

---

DHF	Dihidrofolato ( <i>dihydrofolate</i> )
DHFR	Dihidrofolato redutase ( <i>dihydrofolate reductase</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucléico ( <i>desoxirribonucleic acid</i> )
DNMT1	<i>DNA methyltransferase 1</i>
DNMT3A	<i>DNA methyltransferase 3A</i>
DNMT3B	DNA metiltransferase 3B ( <i>DNA methyltransferase 3B</i> )
DNMTs	DNA metiltransferases ( <i>DNA methyltransferases</i> )
DS	Down syndrome
dTMP	Deoxitimidina monofosfato ( <i>deoxythymidine monophosphate</i> )
dUMP	Deoxiuridina monofosfato ( <i>deoxyuridine monophosphate</i> )
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
G	Guanina ( <i>guanine</i> )
Hcy	Homocisteína ( <i>homocysteine</i> )
HW	<i>Hardy-Weinberg Equilibrium</i>
Kb	Kilobases
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i>
LINE	Elemento nuclear intercalante longo ( <i>long interspersed elements</i> )
max	<i>Maximum</i>
min	<i>Minimum / minutes</i>
MMA	Ácido metilmalônico ( <i>methylmalonic acid</i> )

---

MTHFD1	Metilenotetrahidrofolato desidrogenase	1
	<i>(methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1)</i>	
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase	<i>(methylenetetrahydrofolate reductase)</i>
MtI	<i>Mean methylation index</i>	
MTR	Metionina sintase	<i>(methionine synthase)</i>
MTRR	Metionina sintase redutase	<i>(methionine synthase reductase)</i>
NaOH	<i>Sodium hydroxide</i>	
OR	<i>Odds ratio</i>	
pb	Pares de base	
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase	<i>(Polymerase Chain Reaction)</i>
RFC1	Carreador de folato reduzido 1	<i>(reduced folate carrier type 1)</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>	
s	<i>Seconds</i>	
SAH	S-adenosilhomocisteína	<i>(S-adenosylhomocysteine)</i>
SAM	S-adenosilmetionina	<i>(S-adenosylmethionine)</i>
SD	Síndrome de Down	
SHMT	Serina hidroximetiltransferase	<i>(serine hydroxymethyltransferase)</i>
SINE	Elemento nuclear intercalante curto	<i>(short interspersed elements)</i>
T	Timina	<i>(thymine)</i>
TCN2	Transcobalamina 2	<i>(transcobalamin 2)</i>
THF	Tetrahidrofolato	<i>(tetrahydrofolate)</i>
TYMS	Timidilato sintase	<i>(thymidylate synthase)</i>
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”	

UNICAMP	Universidade de Campinas
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
USA	<i>United States of American</i>
USP	Universidade de São Paulo
$\chi^2$	<i>Chi-square</i>

## RESUMO

**Introdução:** A síndrome de Down (SD) resulta de falhas na segregação cromossômica durante a meiose materna em cerca de 90-95 % dos casos. Embora a idade materna seja um fator de risco bem estabelecido, o nascimento de indivíduos com SD de mães jovens indica a existência de outros fatores etiológicos. Estudos sugerem que o metabolismo anormal do folato pode causar hipometilação do DNA pericentromérico, favorecendo a não disjunção cromossômica. Além disso, polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do folato tem sido apontados como fatores de risco materno para a SD. **Objetivos:** Comparar a metilação global do DNA entre mães de indivíduos com SD e mães controle; avaliar a influência de 18 polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do folato e das concentrações de folato, homocisteína (Hcy) e ácido metilmalônico (MMA) na metilação do DNA; investigar a contribuição dos polimorfismos timidilato sintase (*TYMS*) repetição 28 pb, *TYMS* 1494del6, DNA metiltransferase 3B (*DNMT3B*) -149C>T, *DNMT3B* -283T>C e *DNMT3B* -579G>T na modulação do risco materno para a SD e a associação entre esses polimorfismos e as concentrações de folato, Hcy e MMA. **Casuística e Métodos:** Foram incluídas 105 mães de indivíduos com trissomia livre do cromossomo 21 e 185 mães de indivíduos sem a síndrome. A metilação das sequências LINE-1 e Alu foram quantificadas por meio de pirosequenciamento. A análise do polimorfismo *TYMS* repetição 28 pb foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) por diferença de tamanho de fragmentos; os polimorfismos *TYMS* 1494del6 e *DNMT3B* -579G>T foram analisados por PCR seguida de digestão enzimática; e a PCR em tempo real foi utilizada para a genotipagem dos polimorfismos *DNMT3B* -149C>T e *DNMT3B* -283T>C. Os dados dos demais polimorfismos foram obtidos de artigos publicados



previamente pelo grupo de pesquisa. O folato sérico foi quantificado por quimioluminescência, e Hcy e MMA plasmáticos foram determinados por cromatografia líquida/espectrometria de massas sequencial. **Resultados:** A metilação da sequência LINE-1 foi menor em mães de indivíduos com SD quando comparadas com as mães controle. Os genótipos *TCN2* 776 CG e GG foram associados com elevada metilação da sequência Alu, enquanto baixa metilação dessa sequência foram observadas em mães com os genótipos *BHMT* 742 GA e AA. O folato foi um preditor da metilação da sequência LINE-1. Mães com os genótipos *TYMS* 3R/3R ou *DNMT3B* -149TT/-283TC apresentaram maior risco de ter um filho com SD. Em relação aos metabólitos, baixa concentração de Hcy foi observada em mães com os genótipos *DNMT3B* -149CT/-283CC quando comparados com os demais genótipos combinados. **Conclusões:** A metilação reduzida da sequência LINE-1 é um fator de risco materno para a SD, assim como o genótipo *TYMS* 3R/3R e os genótipos combinados *DNMT3B* -149TT/-283TC. Os genótipos *TCN2* 776 CG e GG e *BHMT* 742 GA e AA modulam a metilação da sequência Alu. O folato sérico é um preditor da metilação da sequência LINE-1 e a concentração de Hcy é modulada pelos genótipos combinados *DNMT3B* -149CT/-283CC na população estudada.

**Palavras chave:** Síndrome de Down, Metilação do DNA, Polimorfismo Genético, Fatores de Risco.

# ***1. INTRODUÇÃO***

---

## 1. INTRODUÇÃO

A síndrome de Down é uma desordem de origem genética que causa deficiência intelectual e afeta um em cada 1000 nascidos vivos.<sup>(1)</sup> Os indivíduos com a síndrome apresentam características específicas, como hipotonia muscular, prega palmar única, braquicefalia, prega epicântica, ponte nasal achatada, entre outras,<sup>(1)</sup> além de maior suscetibilidade ao desenvolvimento de algumas doenças, como cardiopatias, problemas oftalmológicos e de audição, doenças respiratórias e gastrointestinais.<sup>(1-4)</sup>

A trissomia livre do cromossomo 21, caracterizada pela presença de uma cópia extra deste cromossomo, é responsável por cerca de 90-95 % dos casos de síndrome de Down e resulta de falhas na segregação cromossômica durante a meiose. A não disjunção cromossômica pode ocorrer tanto na formação do óvulo quanto do espermatozoide, mas a origem materna é a principal causa, ocorrendo, predominantemente, durante a primeira divisão meiótica. Somente 10 % da trissomia livre do cromossomo 21 apresentam origem paterna.<sup>(5-8)</sup> A trissomia parcial do cromossomo 21 causada por translocação Robertsonianas envolvendo, principalmente, os cromossomos 14 e 21 é a causa de cerca de 3 % dos casos.<sup>(9)</sup> O restante dos casos é resultante de mosaicismos e caracteriza-se pela presença de células com arranjo cromossômico normal e células trissômicas (contendo um cromossomo 21 extra).<sup>(10)</sup>

A idade materna avançada é um fator de risco bem estabelecido para a síndrome de Down e esse risco aumenta proporcionalmente com a idade. Enquanto a prevalência de síndrome de Down em mães com vinte anos é de 1:1476 nascidos vivos, com trinta e cinco anos, aumenta para 1:352 e, com cinquenta anos, para 1:25 nascidos vivos.<sup>(11)</sup> Na espécie humana, os oócitos primários entram em meiose I entre a décima e décima terceira semanas de gestação e permanecem na prófase I por vários anos até a

ovulação.<sup>(12)</sup> Embora os mecanismos celulares e moleculares que associam a idade materna avançada com a não disjunção cromossômica ainda não estejam totalmente esclarecidos, este risco pode estar associado com a perda da eficiência do processo meiótico, causado, por exemplo, por defeitos na coesão das cromátides irmãs ou por degradação de proteínas envolvidas na formação do fuso mitótico.<sup>(12-14)</sup> Entretanto, o nascimento de indivíduos com síndrome de Down de mães jovens sugere a existência de outros fatores etiológicos.

Estudos mostram que mães de crianças com síndrome de Down com idade inferior a 35 anos apresentam instabilidade genômica e aumento na frequência de micronúcleos.<sup>(15,16)</sup> Os micronúcleos são originados a partir de fragmentos de cromossomo ou de cromossomos inteiros perdidos durante a divisão celular,<sup>(17)</sup> e sua elevada frequência está associada a suscetibilidade aumentada de danos e malsegregação cromossômica.<sup>(15,19)</sup> Recente estudo também mostrou que essas mães jovens apresentam alterações no padrão global de metilação do DNA.<sup>(19)</sup>

A metilação do DNA é uma reação que envolve a adição de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) na posição 5' de resíduos de citosina localizados principalmente em dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina (CpG), sendo considerada uma importante característica epigenética que afeta a expressão gênica, a estabilidade e a integridade do DNA.<sup>(20)</sup>

### **Metabolismo do folato e metilação global do DNA**

O folato pertence à família de vitaminas do complexo B e é encontrado em alimentos como vegetais de folhas verdes, feijão, fígado, cereais, kiwi e morango.<sup>(21)</sup> A ingestão desse nutriente é essencial para o crescimento e replicação celular, uma vez que desempenha importante papel na síntese de ácidos nucleicos, aminoácidos e S-

adenosilmetionina (SAM), o principal doador de grupo metil para as reações de metilação do DNA, RNA e proteínas.<sup>(20)</sup> A deficiência de folato está associada ao crescimento celular anormal, alterações na metilação do DNA, aumento de mutações pontuais, danos cromossômicos e aneuploidia.<sup>(22-24)</sup>

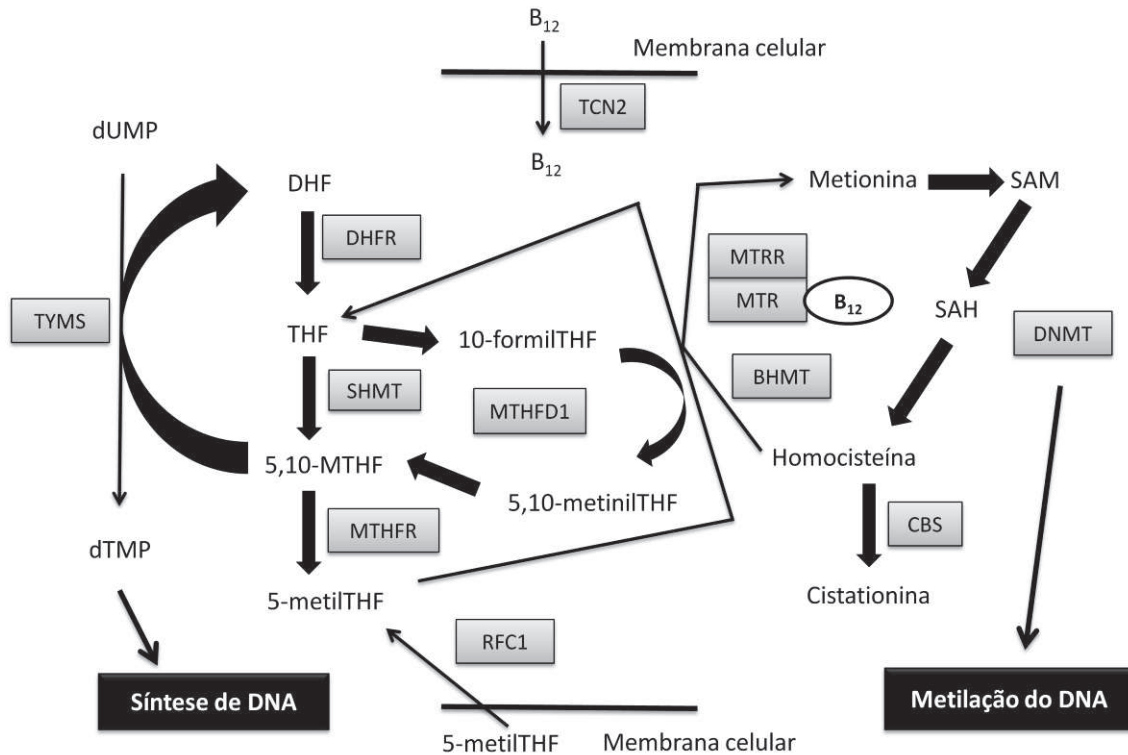
No fígado, o folato ingerido na dieta é reduzido e metilado em 5-metiltetrahydrofolato (5-metilTHF), a principal forma circulante do folato que é absorvida pelas células por meio de receptores, como, por exemplo, o RFC-1 (carreador de folato reduzido 1), também conhecido como SLC19A1.<sup>(25)</sup> No interior das células, o 5-metilTHF atua como doador de grupo metil para a remetilação da homocisteína (Hcy), reação catalisada pelo complexo enzimático MTR/MTRR (metionina sintase/metionina sintase redutase) que produz metionina e tetrahydrofolato (THF). A enzima MTRR é responsável pela manutenção do estado ativo da enzima MTR, enquanto a enzima MTR necessita da vitamina B<sub>12</sub>, que é transportada para o interior da célula pela enzima transcobalamina 2 (TCN2), como cofator para a reação de remetilação da Hcy.<sup>(26,27)</sup> O THF, produto dessa reação, funciona como cofator da síntese de ácidos nucleicos e a metionina é convertida em SAM, que atuará nas reações de metilação catalisadas pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). Estas enzimas transferem o grupo metil, resultante da transformação do SAM em S-adenosilhomocisteína (SAH), para citosinas localizadas, predominantemente, em dinucleotídeos CpG.<sup>(28,29)</sup>

Sob a ação da enzima serina hidroximetiltransferase (SHMT), o THF transforma-se em 5,10-metilenotetrahydrofolato (5,10-MTHF) ou pode sofrer a ação da enzima trifuncional metilenotetrahydrofolato desidrogenase 1 (MTHFD1), que o converte em 10-formiltetrahydrofolato (10-formilTHF), 5,10-metinitetrahydrofolato

(5,10-metilTHF) e 5,10-MTHF.<sup>(30)</sup> O 5,10-MTHF é transformado em 5-metilTHF, substrato para a remetilação da Hcy em metionina, pela ação da enzima metileno-tetra-hidrofolato redutase (MTHFR).<sup>(31)</sup>

Outra via de remetilação da Hcy é catalisada pela enzima betaína-homocisteína metiltransferase (BHMT), na qual o aminoácido betaína atua como doador de grupo metil para esta reação.<sup>(32)</sup> A Hcy pode também ser transformada em cistationina em uma via denominada de transulfuração, catalisada pela enzima cistationina beta-sintase (CBS).<sup>(33)</sup>

A enzima dihidrofolato redutase (DHFR) é responsável pela conversão de dihidrofolato (DHF) em THF, a forma metabolicamente ativa do folato no organismo humano.<sup>(34)</sup> A enzima timidilato sintase (TYMS) catalisa a conversão de deoxiuridina monofosfato (dUMP) em deoxitimidina monofosfato (dTMP), utilizando o 5,10-MTHF como doador de grupo metil. Essa reação é essencial para o fornecimento de nucleotídeos para a síntese e reparo do DNA.<sup>(35)</sup> O metabolismo do folato e suas enzimas estão apresentados na Figura 1.



**Figura 1.** Metabolismo do folato e as enzimas envolvidas. 10-formilTHF = 10-formiltetrahydrofolato, 5-metilTHF = 5-metiltetrahydrofolato, 5,10-metilTHF = 5,10-metiltetrahydrofolato, 5,10-MTHF = 5,10-metilenotetrahydrofolato, B<sub>12</sub> = vitamina B<sub>12</sub>, BHMT = betaína-homocisteína metiltransferase, CBS = cistationina beta-sintase, CH<sub>3</sub> = grupo metil, DHF = dihydrofolato, DHFR = dihydrofolato redutase, DNMT = DNA metiltransferases, dTMP = deoxitimidina monofosfato, dUMP = deoxiuridina monofosfato, MTHFD1 = metilenotetrahydrofolato desidrogenase 1, MTHFR = metilenotetrahydrofolato redutase, MTR = metionina sintase, MTRR = metionina sintase redutase, RFC1 = carreadora de folato reduzido 1, SAM = S-adenosilmetionina, SAH = S-adenosilhomocisteína, SHMT = serina hidroximetiltransferase, TCN2 = transcobalamina 2, THF = tetrahydrofolato, TYMS = timidilato sintase.

Estudos mostram que o metabolismo anormal do folato e, conseqüentemente, falhas na metilação do DNA podem aumentar o risco de doenças, como cânceres, doenças cardiovasculares, defeitos de tubo neural e síndrome de Down.<sup>(19,36-38)</sup>

Em 1999, James et al.<sup>(39)</sup> publicaram o primeiro artigo que relacionava o metabolismo anormal do folato com o risco materno para a síndrome de Down. Os autores sugeriram que a presença do polimorfismo *MTHFR* C677T poderia ser um fator de risco para o nascimento de prole com síndrome de Down, independente da idade materna.<sup>(39)</sup> A presença do polimorfismo *MTHFR* C677T prejudica a estabilidade da enzima MTHFR e, conseqüentemente, reduz a síntese de SAM, causando hipometilação do DNA.<sup>(40)</sup> A formação do cinetócoro, complexo DNA-proteína que garante a divisão precisa de cromossomos entre as células-filhas por meio da ligação do centrômero aos microtúbulos do fuso mitótico, depende de padrões de metilação específicos e da ligação de proteínas sensíveis à metilação na cromatina centromérica.<sup>(13,41)</sup> Assim, a presença de polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do folato pode causar hipometilação do DNA pericentromérico, prejudicando a formação do cinetócoro e favorecendo a não disjunção cromossômica.<sup>(39)</sup>

De fato, Božović et al.<sup>(19)</sup> observaram que os níveis de metilação das sequências LINE-1, um marcador de metilação global do DNA, foram menores em mães de indivíduos com síndrome de Down quando comparadas com mães de indivíduos sem a síndrome. Sequências do tipo LINE (elemento nuclear intercalante longo) são elementos repetitivos que compreendem 15 % do genoma humano.<sup>(42)</sup> Esses elementos possuem cerca de 6 kilobases (Kb) de comprimento e são pobres em sequência GC, sendo a família LINE-1 a mais abundante.<sup>(43-44)</sup> Outro tipo de sequência repetitiva é o elemento nuclear intercalante curto (SINE). A principal família de SINE é a Alu, ocupando cerca



de 10 % do genoma humano.<sup>(42)</sup> As sequências Alu possuem comprimento de aproximadamente 300 pares de base (pb) e são ricas em sequências GC.<sup>(45-46)</sup> Os elementos LINE-1 e Alu são fortemente metilados e estima-se que mais de um terço da metilação do DNA ocorra nessas sequências.<sup>(45-47)</sup> Assim, a análise da metilação de elementos repetitivos pode servir como um marcador para a metilação global do DNA.

Os genes *MTHFR*, *MTRR* e *RFC1* são os mais investigados como fatores de risco materno para a síndrome de Down.<sup>(40)</sup> Estudos mostram que mães portadoras do polimorfismo *MTHFR* C677T apresentam risco aumentado de ter um filho com síndrome de Down.<sup>(21,48-53)</sup> Os genótipos *MTHFR* 677 CT e TT em pessoas com dieta pobre em folato apresentaram níveis de metilação global menores em comparação às pessoas com genótipo *MTHFR* 677CC e dieta rica em folato,<sup>(19)</sup> reforçando a influência desse polimorfismo na não disjunção do cromossomo 21.

A presença do polimorfismo *MTRR* A66G foi associada com o aumento do risco de nascimento de prole com síndrome de Down<sup>(51,54,55)</sup> e Ishikawa et al.<sup>(56)</sup> mostraram a influência desse polimorfismo na hipometilação do DNA em indivíduos fumantes. Outro polimorfismo associado ao risco materno para a síndrome de Down é o *RFC1* A80G.<sup>(51,57)</sup> O gene *RFC1* codifica a enzima responsável pelo transporte de 5-metilTHF para o interior da célula e estudo mostra que mães de indivíduos com síndrome de Down portadoras do polimorfismo *RFC1* A80G apresentam concentrações reduzidas de folato sérico.<sup>(58)</sup>

Outros polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo do folato também tem sido investigados como fatores de risco materno para a síndrome de Down.<sup>(21,40,50,54,57-67)</sup> O gene *TYMS* apresenta um polimorfismo de repetição em tandem de 28 pb na região promotora, contendo, principalmente, duas (2R) ou três repetições

(3R),<sup>(68)</sup> e a quantidade de repetições afeta a expressão gênica.<sup>(69)</sup> Coppedè et al.<sup>(59)</sup> analisaram o polimorfismo *TYMS* repetição 28 pb como fator de risco materno para a síndrome de Down na população italiana, mas nenhuma associação foi observada. Por outro lado, neste mesmo estudo, o genótipo combinado *TYMS* 2R/2R / *MTHFR* 1298AC foi associado à diminuição do risco de prole com síndrome de Down. Em outro estudo que utilizou testes preditivos, Coppedè et al.<sup>(70)</sup> observaram que o genótipo *TYMS* 2R/3R permite discriminar mães de indivíduos com síndrome de Down e mães de indivíduos sem a síndrome.

O gene *TYMS* também apresenta um polimorfismo de deleção de 6 pb na posição 1494 da região 3' não traduzida, que pode alterar a estabilidade e expressão do RNAm, influenciando, assim, a atividade da enzima TYMS.<sup>(71)</sup> Estudos que avaliaram a influência do polimorfismo *TYMS* 1494del6 no risco materno para a síndrome de Down não observaram associação.<sup>(59,70)</sup>

O gene *DNMT3B* contém três polimorfismos (-149C>T, -283T>C e -579G>T) localizados na região promotora que podem influenciar a atividade da enzima DNMT3B na metilação do DNA, alterando a instabilidade centromérica.<sup>(72-75)</sup> Esta enzima é essencial para a metilação de sítios anteriormente não metilados ou hemimetilados, processo denominado metilação *de novo*.<sup>(28,76)</sup> Recentemente, Jaiswal et al.<sup>(67)</sup> avaliaram os polimorfismos *DNMT3B* -149C>T e -579G>T como fatores de risco materno para a síndrome de Down e observaram um aumento da frequência do haplótipo T-G em mães de indivíduos com síndrome de Down na população indiana. Na Itália, Coppedè et al.<sup>(63)</sup> verificaram que o genótipo *DNMT3B* -579GT e o genótipo combinado *DNMT3B* -149CC/-579GG foram associados com diminuição do risco materno para a síndrome de

Down. Não há estudos que avaliem a associação entre o polimorfismo *DNMT3B* -283T>C e a síndrome de Down.

Considerando a importância da metilação do DNA na não disjunção cromossômica, a investigação de fatores de risco materno para a síndrome de Down relacionados ao metabolismo do folato torna-se relevante.

### 1.1. OBJETIVOS

1. Detectar e comparar a metilação global do DNA, refletida nas sequências LINE-1 e Alu, entre mães de indivíduos com síndrome de Down e mães com filhos sem a síndrome;

2. Avaliar a influência dos polimorfismos genéticos *MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTR* A2756G, *MTRR* A66G, *RFC1* A80G, *CBS* 844ins68, *CBS* T833C, *TCN2* C776G, *TCN2* A67G, *BHMT* G742A, *MTHFD1* G1958A, *DHFR* del 19 pb, *SHMT* C1420T, *TYMS* repetição 28 pb, *TYMS* 1494del6, *DNMT3B* -149C>T, *DNMT3B* -283T>C e *DNMT3B* -579G>T envolvidos no metabolismo do folato, e das concentrações de folato, Hcy e ácido metilmalônico (MMA) na metilação global do DNA;

3. Investigar a contribuição dos polimorfismos *TYMS* repetição 28 pb, *TYMS* 1494del6, *DNMT3B* -149C>T, *DNMT3B* -283T>C e *DNMT3B* -579G>T na modulação do risco materno para a síndrome de Down e a associação entre esses polimorfismos e as concentrações de folato sérico e Hcy e MMA plasmáticos.