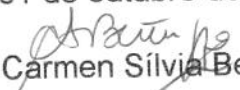


LAURA BRUNELLI DAS NEVES GRILLO

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área de Ciências Biomédicas.

Campinas, 01 de outubro de 2001.

Profª. Dra.  Carmen Sílvia Bertuzzo
Orientadora

**“A DEFICIÊNCIA DE MTHFR EM MÃES
DE PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN”**

CAMPINAS

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

LAURA BRUNELLI DAS NEVES GRILLO

**“A DEFICIÊNCIA DE MTHFR EM MÃES
DE PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN”**

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

ORIENTAÇÃO: PROF^a DR^a CARMEN SILVIA BERTUZZO

CAMPINAS

2001

ii

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	B.P.
Nº CHAMADA	T/UNICAMP
	G.879d
V	
TOM	48080
PRE	16.837102
	x
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM00165698-6

BIB ID 235744

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

G879d

Grillo, Laura Brunelli das Neves

A deficiência de mthfr em mães de portadores de síndrome de down
/ Laura Brunelli das Neves Grillo. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Retardamento mental. 2. Trombose. 3. Tumor. I. Carmen
Silvia Bertuzzo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profª Drª Carmen Silvia Bertuzzo

Membros:

1- Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo

2- Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves

3- Prof. Dr. Walter Pinto Júnior

Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 01/10/2001

2001/10/01

*Agradeço a Deus por ter colocado em meu
caminho pessoas que me ajudassem
a crescer.*

DEDICATÓRIA

*À minha família, pela compreensão e apoio
constantes.*

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Carmen Silvia Bertuzzo pela amizade, confiança e oportunidade de realizar este trabalho.

À Profª Drª Christine Hackel, pelo incentivo.

Aos colegas Marilza, Daniela Facchin, Francisca, Flávia, Tereza, Solange, Fábio, Erica e especialmente à Luciana, pelas diversas formas com que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu sobrinho Felipe, pela orientação na editoração.

	PÁG.
RESUMO.....	<i>xii</i>
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Síndrome de Down.....	15
1.2. Estudos Citogenéticos.....	19
1.3. O Mapeamento do Cromossomo 21.....	20
1.3.1. Região Crítica da Síndrome de Down (DSCR).....	20
1.4. Estudos sobre reações de metilações.....	22
1.5. A enzima MTHFR.....	24
1.6. As mutações mais frequentes na MTHFR.....	28
2. OBJETIVOS.....	30
3. CASUÍSTICA.....	32
4. METODOLOGIA.....	34
5. RESULTADOS.....	38
6. DISCUSSÃO.....	43
7. CONCLUSÃO.....	47
8. SUMMARY.....	49
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
10. ANEXOS.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

SD	Síndrome de Down
MTHFR	Metilenotetraidrofolato Redutase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RT-PCR	PCR do cDNA obtido da reação da enzima Transcriptase Reversa sobre RNA.
cDNA	DNA complementar
Taq	DNA polimerase extraída da bactéria <i>Thermophilus aquaticus</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
TRIS	Tris (hidroximetil) aminoetano
KCl	Cloreto de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
HCl	ácido clorídrico
M	Molar
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
rpm	rotações por minuto
ml	mililitro
μl	microlitro
SDS	Lauril sulfato de Sódio

mg	miligrama
mM	milimolar
pb	pares de base
SAM	5adenosilmetionina
SAH	S-adenosilhomocisteína
NTD	Defeito de Tubo Neural

	PÁG.
Tabela I: Resultados da análise de 36 mães de portadores de Síndrome de Down.....	39
Tabela II: Comparação Genotípica entre mães com idade superior a 30 anos e inferior a 30 anos.....	42
Tabela III: Comparação da distribuição dos genótipos entre mães analisadas e a amostra controle.....	42

	PÁG.
Figura I: Cariótipo de SD.....	16
Figura II: Portador de SD.....	17
Figura III: Esquema do cromossomo 1.....	25
Figura IV: Esquema do metabolismo do folato.....	26
Figura V: Foto de gel da Mutação C677T.....	40
Figura VI: Foto de gel da Mutação A1298C.....	41

RESUMO

A Síndrome de Down, ou Trissomia do 21 é uma aberração cromossômica numérica, sendo a causa genética mais freqüente de retardamento mental moderado. Em 95% dos casos de Síndrome de Down ocorre um processo de não-disjunção na meiose materna.

Estudos recentes associam o fenômeno de não-disjunção à hipometilação do DNA. A MTHFR atua no metabolismo do ácido fólico e tem como produto intermediário a formação do SAM que é o doador de grupos metil para o DNA. Assim, os indivíduos deficientes em MTHFR deveriam ter uma menor disponibilidade de grupamentos metil e assim estariam sujeitos a erros na divisão celular.

Em nosso estudo analisamos as duas mutações mais freqüentes no gene da MTHFR em 36 mães de portadores de Síndrome de Down e em 200 indivíduos controle. Os resultados demonstraram um acúmulo de mães heterozigotas compostas para as duas mutações, fenótipo que causa uma redução enzimática importante, sugerindo que a deficiência da MTHFR deve ser um fator de risco importante para a Síndrome de Down.

INTRODUÇÃO

1.1. SÍNDROME DE DOWN

A Síndrome de Down (SD), ou Trissomia do cromossomo 21, é sem dúvida o distúrbio citogenético e a causa genética mais freqüente de retardamento mental moderado. Cerca de 1 em cada 800 crianças, nasce com a Síndrome de Down, e entre crianças nativas ou fetos de mães com idade igual ou superior a 35 anos a incidência é ainda maior. A causa de 95% dos casos de trissomia do 21, que caracteriza a Síndrome de Down, resulta da não-disjunção dos cromossomos que ocorre na maior parte dos casos durante a meiose I materna. Porém, a trissomia livre do 21 não é a única forma de manifestação da SD. Em cerca de 5% dos pacientes, ocorre translocação para um outro cromossomo acrocêntrico, mais freqüentemente o 14 ou o 21 (Thuline e Pueschel, 1982; Hook, 1982). Em cerca de 2 a 4 % dos casos de trissomia livre, podem ser reconhecidos mosaicismo para linhagens de células trissômicas e normais (Mikkelsen, 1977).

A idade materna é um fator associado ao aparecimento da S. de Down, uma vez que a frequência dessa síndrome aumenta com a idade materna. Entretanto, observa-se um número significativo de ocorrência de Síndrome de Down em mães com idade inferior a 30 anos (James, SJ. e col., 1999). Como na reprodução predomina a fração jovem da população, fica fácil explicar o número maior de mães jovens, entre as crianças com a afecção em questão.

Langdon Down foi o primeiro a descrever clinicamente essa Síndrome em 1866, mas o fator etiológico permaneceu um mistério durante quase um século. Waardenburg sugeriu em 1932, que uma anormalidade cromossômica poderia explicar tais observações, mas naquela época ninguém estava preparado para acreditar que o homem pudesse ter anormalidades cromossômicas.

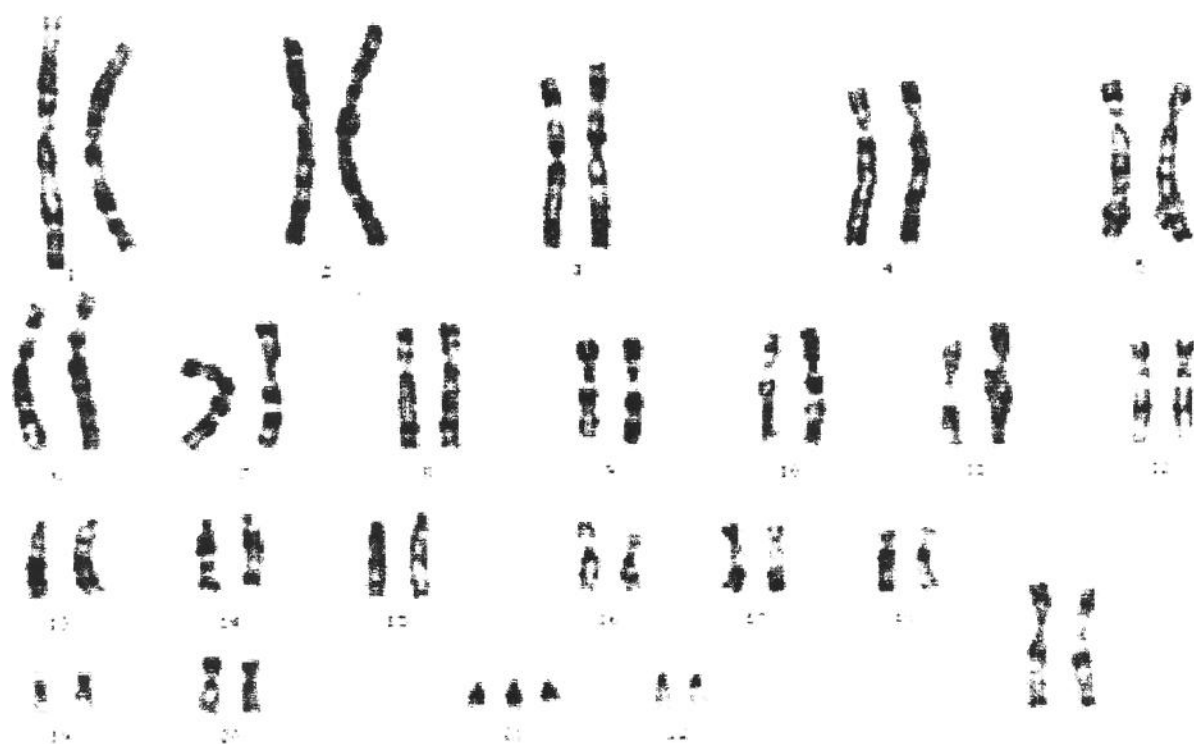


Figura I: Cariótipo de trissomia livre do cromossomo 21.

Contudo, quando as técnicas de análise detalhada dos cromossomos humanos tornaram-se disponíveis, a Síndrome de Down foi uma das primeiras afecções a serem examinadas cromossomicamente. Em 1959, Lejeune e colegas, além de vários outros grupos, confirmaram que a maioria das crianças com a Síndrome de Down tem 47 cromossomos e que o membro extra é um cromossomo acrocêntrico pequeno, desde então designado como cromossomo 21 (Figura I).



Figura II: Portador de Síndrome de Down

A SD geralmente pode ser diagnosticada ao nascimento ou logo após por suas características dismórficas, que variam entre os pacientes, mas, apesar disso, produzem um fenótipo que os distinguem. Nos pacientes com SD, ao nascimento, pode ser observado uma icterícia prolongada e hipotonia ao lado de braquicefalia às custas de um occipício achatado. O pescoço é curto com pele redundante na nuca; ponte nasal plana, orelhas de

implantação baixa, com microtia típica. As fendas palpebrais têm obliquidade para cima acompanhadas de prega epicântica e se os olhos são claros exibem manchas de Brushfield ao redor da margem da íris; a boca é aberta, com protusão da língua (Figura II); as mãos e os dedos são curtos e largas, freqüentemente com uma única prega palmar transversa (prega simiesca) com clinodactilia dos quintos dedos a custa de uma hipoplasia da falange média e, as vezes, com uma única prega de flexão; os pés mostram um amplo espaço entre o primeiro e o segundo dedos, com um sulco estendendo-se nessa região, na face plantar. Os dermatóglifos (padrões de cristas dérmicas) são bastante típicos, com excesso de presilhas ulnares e triarrádios axiais na posição "t". A maior causa de preocupação na Síndrome de Down é o retardamento mental, que embora no início da lactância seja discreto, torna-se mais claro ao final do primeiro ano de desenvolvimento.

O quociente de inteligência costuma estar entre 25 e 50, quando a criança tem idade suficiente para fazer o teste. Entretanto, muitas crianças com SD tornam-se pessoas felizes e mesmo autoconfiantes a despeito de suas limitações.

Uma cardiopatia congênita está presente em um terço dos bebês nativos com a SD e numa proporção um pouco mais alta nos abortos com essa trissomia. Cerca de três quartos dos conceptos com a SD perdem-se por aborto espontâneo geralmente no primeiro trimestre da gravidez e muitos nativos morrem no início da vida pós-natal, principalmente devido as cardiopatias congênitas. Certas malformações são mais comuns nesta síndrome do que em outros distúrbios, como a atresia duodenal e a fistula traqueo-esofágica. Há um aumento de quinze vezes do risco de desenvolver leucemia. A senilidade prematura, associada aos achados neuropatológicos típicos da doença de Alzheimer (atrofia cortical, dilatação ventricular e emaranhados neurofibrilares), afeta os pacientes com SD numa idade precoce em relação à idade típica de manifestação na população em geral.

O estudo do cromossomo 21, o menor autossomo humano, é de grande interesse médico, uma vez que várias anomalias genéticas com grande incidência na população, foram mapeadas nesse cromossomo, tais como Síndrome de Down, Esclerose Amiotrófica Lateral Familiar (FALS), doença de Alzheimer, alguns casos de câncer como Sarcoma de Ewings, associados à translocações nesse cromossomo e outros tumores primitivos neuroectodérmicos, além de Leucemia Mielóide Aguda. (Kola e Hertzog, 1997).

1.2. ESTUDOS CITOGENÉTICOS

A origem da trissomia livre do 21 pode ser meiótica ou mitótica. Mais de 400 famílias foram estudadas (Antonarakis e col., 1991,1992; Antonarakis, 1993; Sherman e col., 1991, 1992), e os resultados foram os seguintes: 1- Erros na Meiose, que levam à trissomia do 21, são distribuídos em cerca de 95% na meiose materna e cerca de 5% na espermatogênese; 2- O maior número de casos de erro na meiose materna, ocorrem na meiose I e estão associados à idade mais avançada (cerca de 32 anos, sendo que a média da população era de 27), onde ocorrem em 76 a 80 % dos casos, sendo responsáveis por cerca de 67 a 73 % das trissomias; 3- Erros na meiose II materna constituem de 20 a 24% dos casos, e são responsáveis por 18 a 20 % de todos os casos de trissomia livre. 4- Nas raras famílias onde a origem era paterna, a frequência maior era na meiose II, e as idades maternas e paternas se encontravam na média da idade reprodutiva das sociedades ocidentais; 5- Em cerca de 5% das trissomias livres, o cromossomo extra originou-se em erro na mitose do indivíduo, não havendo correlação com a idade materna, pois a causa foi identificada como sendo erro mitótico de duplicação (Mosaico).

As origens das translocações do 21 **t (14;21)** estudadas, tinham origem nas células germinais maternas (Petersen e col., 1991; Shafer e col. 1992). A média da idade materna foi de 29,2 anos. Na translocação de novo **t(21;21)** (Grasso e col., 1989; Antonarakis e col., 1990; Shafer e col., 1992), em muitos casos era um isocromossomo (**dup21q**) resultante de uma Translocação Robertsoniana, causada por uma fusão de duas cromátides heterólogas, de origens tanto materna, quanto paterna, proporcionalmente. Nas translocações Robertsonianas verdadeiras de novo **t (21;21)**, o cromossomo extra era de origem materna.

1.3. O MAPEAMENTO DO CROMOSSOMO 21

O tamanho do cromossomo 21 é estimado em cerca de 50 Mb de DNA. A análise de seu braço longo revelou a presença de 225 genes, dos quais 127 correspondem a genes conhecidos e 98 a genes prognosticados, e, 59 pseudogenes, e seu tamanho estimado em 38 Megabases. Foram também mapeadas e clonadas, 281 kilobases do braço curto, o qual revelou diversas classes de seqüências repetitivas e variáveis entre os indivíduos. (The chromosome 21 mapping and sequencing Consortium, 2000)

Ele representa cerca de 1 a 1,5% do genoma humano.

Desde a descoberta em 1959, que uma cópia a mais deste cromossomo causa a Síndrome de Down (Lejeune, J. e col., 1959), ele foi intensamente estudado e, cerca de 20 *loci* relacionados a doenças foram mapeados no seu braço longo.

1.3.1. Região Crítica da Síndrome de Down (DSCR):

O mapeamento da região do cromossomo que, se triplicada, resulta nas características fenotípicas da Síndrome de Down, foi facilitado pelo uso de amostras de DNA de indivíduos que tinham trissomia parcial do 21 que as manifestavam ou não. (Rahmani e col., 1989; McCormick e col., 1989; Delabar e col., 1993; Korenberg, 1993)

Posteriormente, uma área de aproximadamente 5 Mb entre o loci D21S58 e D21S42, foi identificada e associada com retardamento mental e a maior parte dos traços peculiares à SD. Em particular, uma sub-região que inclui D21S55 e MX1 (interferon – induced protein p 78), e posteriormente localizada na Banda 21q22.3, foi associada com retardamento mental e vários traços morfológicos, incluindo olhos oblíquos, ponte nasal chata, hipotonia, baixa altura, clinodactilia no quinto dedo, características dermatológicas entre outras. (Delabar e col., 1993).

Através da análise de 3 gerações de uma família Japonesa, contendo 4 indivíduos com SD. com trissomia parcial do 21, Korenberg e col. (1990) e Ohira e col. (1996) definiram uma região de 1.6-Mb entre LA68 e ERG em 21q22 como a Região

Crítica da Síndrome de Down (DSCR). Eles construíram um mapa cobrindo mais de 95% dessa região.

Sendo a SD a maior causa de retardamento mental e defeitos cardíacos congênitos, descritos tanto em indivíduos com trissomia livre, quanto nos de trissomia parcial, através da clonagem de um segmento da DSCR, com cerca de 3 Mb em torno da D21S55, na região 21q22.1-q22.2, foi identificado o gene DSCR1 de alta expressão no cérebro e coração, e sugerido como candidato no envolvimento de patologias da SD, em particular o retardamento mental e/ou defeitos cardíacos. (Fuentes e col, 1995)

O gene DSCR4 identificado por clonagem de cDNA, consiste em três éxons de 1095 bp e 118 resíduos de aminoácidos e demonstrou ser predominantemente de expressão na placenta. (Nakamura e col, 1997)

O gene DSCR2 identificado entre o marcador de DNA D21S55 e MX1, tem expressão elevada *in testis* e na leucemia humana em células T da linhagem Jurkat. (Vidal-Taboada e col., 1998)

O gene DSCR3, identificado na região 21q22.2, consiste em oito éxons de 3,252 bp no total e 297 resíduos de aminoácidos. Apresentando homologia com Hbeta58, um gene essencial na embriogênese de ratos e PEP8 encontrado em *Arabidopsis thaliana*, sugere que esse gene tenha sido preservado no curso da evolução. DSCR3 é expresso em muitos tecidos, tais como, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim. (Nakamura e col, 1997)

Entretanto ainda é difícil selecionar o grupo de genes responsável por todas as manifestações fenotípicas que caracterizam a SD.

Mutações em 14 genes do cromossomo 21 já foram identificadas como causadoras de doenças monogênicas, incluindo uma forma da doença de Alzheimer (APP), Esclerose Amiotrófica Lateral (SOD1), Doença Poliglandular Autoimune (AIRE), Homocistinúria (CBS) e Epilepsia Myoclonus Progressiva (CSTB), e, um *locus* para a predisposição à Leucemia (AML1).

1.4. ESTUDOS SOBRE REAÇÕES DE METILAÇÕES

A Metilação da Citosina na posição do Carbono 5 dos dinucleotídeos CpG, ocorre em muitos eucariotas, sendo que em vertebrados ocorre entre 60-90 % dos CpGs totais. Uma pequena parte deles em que não ocorre metilação (aproximadamente 15% de todos CpGs do DNA humano), são encontradas nas denominadas ilhas de CpG, as quais freqüentemente incluem promotores funcionais.

Hoje sabe-se que a expressão gênica é regulada por dois mecanismos globais: a metilação do DNA e a modificação da cromatina. Um grande corpo de evidências acumulado em anos de estudos, sugere que a metilação do DNA é incompatível com a atividade transcripcional (Ng, H.H. & Bird, A., 1999). A metilação diferenciada do DNA é um determinante da estrutura da cromatina e o grupo metil origina um sinal químico que é reconhecido pelos fatores que regulam a transcrição. Um gene hipometilado pode ser considerado como tendo maior potencial de expressão do que um gene hipermetilado (Goodman, J.I & Counts, J.L., 1993).

Acredita-se que todos os genes de um organismo sejam transcritos em alguma fase do seu ciclo vital, e um mais restrito número de genes é necessário na embriogênese para diferenciação originando células especializadas. A metilação seria essencial na seletividade dos genes corretos a cada estágio de vida do indivíduo, inativando-os quando necessário. A falha na repressão de genes apropriadamente tem sido relacionada a muitas doenças humanas, incluindo doenças neuroevolutivas e câncer.

A metilação do DNA se mostrou essencial na diferenciação celular, determinando a viabilidade de células, em estudos realizados em ratos. (Robertson, K.D e Wolfee, A. P., 2000)

Estudos recentes aprofundaram-se no mecanismo do silenciamento transcripcional por uma proteína de ligação-metil CpG, a MeCP2, que mostrou interagir no complexo co- repressor com a Sin3/histona deacetilase. Vários estudos mostraram que a inibição das histonas deacetilases por inibidor específico pode reativar genes endógenos ou informações sintetizadas previamente, silenciados pela metilação do DNA. (Ng,H.H. e Bird, A., 1999).

O DNA hipometilado, segundo estudos clínicos e experimentais, está associado à instabilidade cromossômica e segregações anormais. Por exemplo, uma desordem autossômica rara, a Síndrome ICF (Imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais), é caracterizada pela hipometilação pericentromérica (Ji, W.Z.; Hernandez, R.; Zhang, X.Y. e colaboradores, 1997) e segregação cromossômica prejudicada (Jeanpierre, M.; Turleau, C.; Aurius, A e colaboradores, 1993). Pacientes com a Síndrome ICF, apresentam uma coleção de anomalias cromossômicas, principalmente nos cromossomos 1 e 16 que vão desde a descondensação da heterocromatina na região pericentromérica; a presença de cromossomos com até 12 braços e deleções. (Tuck-Muller e col., 2000). Recentemente, incluíram-se nesse foco, a Síndrome do X-Frágil e a Síndrome de Rett que estariam ligadas à perda do controle epigenético durante o desenvolvimento neuronal. (Robertson, K.D. & Wolffe, A. P., 2000).

Em culturas de células, animais e vegetais, com hipometilação provocada quimicamente com 5-azacitidina, comprovou-se a indução à instabilidade cromossômica e Aneuploidias. Nessas culturas verificou-se que: as regiões teloméricas dos cromossomos durante a Anáfase permanecem no equador celular enquanto que os centrômeros migram para os pólos; os cromossomos não segregados são “puxados” para um dos pólos; em algumas células os cromossomos não segregados permanecem no equador celular, enquanto a divisão citoplasmática prossegue (Harrison, J.J.; Anisowicz, A.; Gadi, I.G.; Raffeld, M. e Sager, R., 1983; Leyton, C.; Mergundich, D.; de la Torre, C.; Sans, J., 1995). Em células humanas submetidas à 5-Azacitidina, demonstrou-se a desmetilação e descondensação da heterocromatina nos cromossomos 1, 9 e 16. Houve 80% de indução de rearranjos no cromossomo 1, sendo que 90% deles na região pericentromérica. Cromossomos 1 com até 7 braços e deleções foram as anomalias predominantes. Foram observados também Isocromossomos 1 e fusões na região pericentromérica dos cromossomos 1 e 16 ou de 1 e 9. (Hernandez R. e col., 1997). Rearranjos na heterocromatina pericentromérica dos cromossomos 1 e 16 ou de 1 e 9. (Hernandez R. e col., 1997). Rearranjos na heterocromatina pericentromérica dos cromossomos 1 e 16 são freqüentemente encontrados em muitos tipos de câncer, incluindo Tumores de Wilms (WT), sugerindo que contribuem para a progressão de tumores. (Qu, G.Z. e col., 1999).

Diversos pesquisadores têm sugerido que a instabilidade cromossômica e aneuploidia observadas em tumores humanos, relacionam-se com a diversidade de hipometilação do DNA genômico (Lengauer, C. e col., 1997), uma vez que o desbalanceamento provocado por rearranjos nos cromossomos, afeta a dosagem de genes supressores de tumores com a possível perda da heterozigose. (Qu, G.Z. e col., 1999)

1.5. A ENZIMA MTHFR

A vitamina ácido fólico executa funções importantes no organismo, participando na produção de moléculas de construção, desde proteínas até o DNA e RNA. Estas funções são assistidas por múltiplas enzimas, uma delas a MTHFR.

O 5-Metiltetrahidrofolato, é a maior forma de folato encontrada no plasma e é gerado pela ação de uma enzima, uma flavoproteína citosólica a Metilenetetrahidrofolato Redutase (MTHFR) sendo que a vitamina essencial ácido fólico é obtida exclusivamente através da dieta.

O gene da MTHFR foi localizado no cromossomo 1: 1p36.3 (Goyette e col., 1994) (Figura III), e é formado por 11 exons, sendo que o tamanho dos exons e dos íntrons e os limites intrônicos, são similares no homem e no rato. (Goyette, e col., 1998)

A MTHFR atua na regulação das reações de metilação celulares, catalisando a conversão do 5,10 metilenetetrahidrofolato para 5-metiltetrahidrofolato (Figura IV), onde o metil é doado para a re-metilação da homocisteína para metionina. Esta reação é importante para a síntese de 5-adenosilmetionina (SAM), o mais importante doador de metil para o DNA, proteínas de construção e reações de metilações de lipídios.

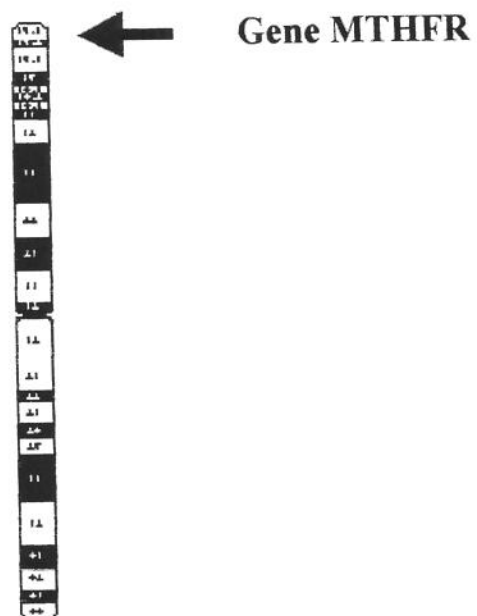


Figura III: Localização do gene da MTHFR no cromossomo (1p36.3)

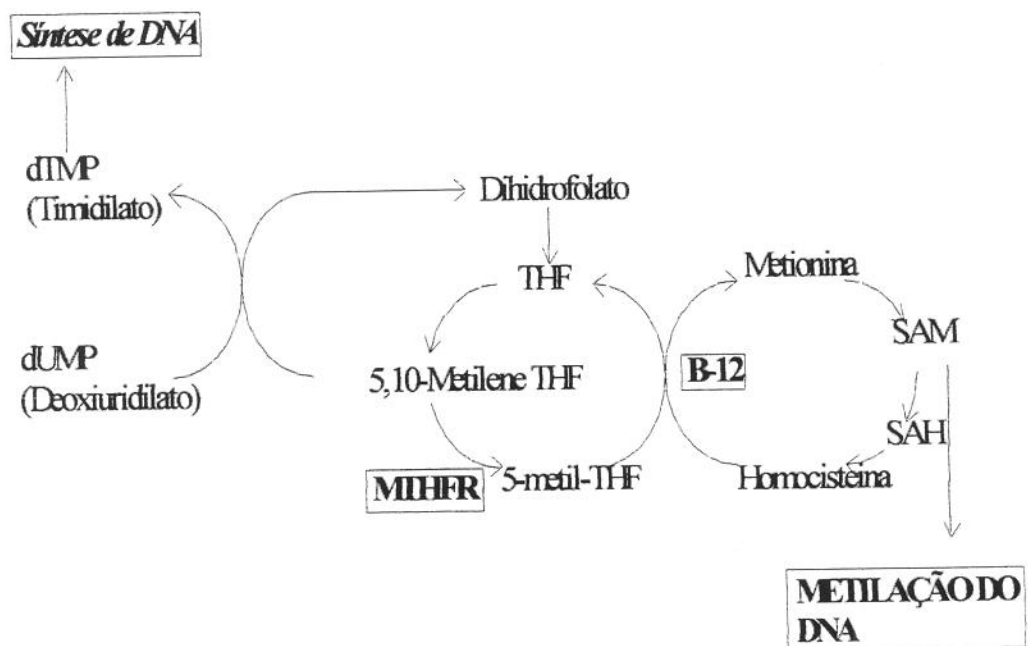


Figura IV: Esquema Metabólico da ação da MTHFR

Da atividade reduzida da MTHFR resulta o aumento da necessidade de consumo do ácido fólico, para manter normais as re-metilações de homocisteína para metionina. Na ausência de ácido fólico suficiente, a homocisteína intracelular se acumula e a re-síntese de metionina é reduzida, comprometendo as principais reações de metilação.

Um aumento de homocisteína com redução de metionina, resulta na diminuição da proporção entre a SAM e a S-adenosilhomocisteína (SAH), o que tem sido associado à hipometilação do DNA. (Frosst,P; Blom e col., 1995)

Diversas doenças, principalmente neurológicas, cardíacas e vasculares, podendo haver também homocistinúria e/ou homocistinemia, tem sido relacionadas à deficiência de enzimas que atuam na metilação, principalmente a MTHFR. Em alguns casos, alguns dos sintomas diminuam com a administração de piridoxina e ácido fólico (Freeman e col., 1972; Shih e col., 1972). Em outros casos porém, o comprometimento do sistema vascular levava precocemente à morte por trombose. (Narisawa e col., 1977). Já se sugeria na época, tratar-se de doença alélica.

Uma outra forma de deficiência de MTHFR, é caracterizada pela presença de uma forma termolábil da enzima, inativada sob certas condições de calor, de herança autossômica recessiva, sem anormalidades neurológicas, porém associada a doenças vasculares (Kang e col., 1991). Em pacientes com hiperhomocistinemia branda ou normohomocistinemia, foi observado que cerca de 28% deles podem apresentar doença vascular prematura com metabolismo anormal de homocisteína (Engbersen e col., 1995).

Foi identificada no gene da MTHFR, a substituição de C por T no nucleotídeo 677 que converte uma alanina para um resíduo de valina, como sendo responsável pela produção da forma termolábil da MTHFR (Frosst e col., 1995), diminuindo a atividade específica enzimática em cerca de 35% nos genótipos C/T e cerca de 70% nos genótipos T/T. Essa mutação foi associada ao risco de nascimento de crianças com Defeito de Tubo Neural (NTD) (Van der Put e col., 1997) e frequência elevada dessa mutação foi encontrada em um grupo de adultos com doença arterial coronária no Japão. (Morita e col., 1997)

Estudos com pacientes com infarto do miocárdio entretanto não demonstraram diferença entre a distribuição do genótipo da MTHFR ou a frequência dos alelos entre pacientes e grupo controle (Adams e col., 1996)

Um estudo australiano também não confirmou relação entre essa mutação e doenças coronárias (Van Bockxmeer e col., 1997)

A segunda mutação mais freqüente no gene da MTHFR, a 1298 (A→C), altera o glutamato no resíduo da alanina, resultando numa diminuição da atividade da MTHFR, para cerca de 50-60%, mais pronunciadamente em indivíduos homozigotos, ou heterozigotos para ambas as mutações.

Através de RT-PCR do RNA de pacientes deficientes de MTHFR, seguida de análise por SSCP, foram identificadas 3 substituições no gene da MTHFR: 2 mutações missense e uma mutação nonsense, todas relacionadas a distúrbios neurológicos, precoces ou tardios (Goyette, e col., 1994). Foram ainda descritas, 7 mutações adicionais (Goyette e col., 1995). Posteriormente, 5 novas mutações foram identificadas como causando deficiências graves da MTHFR. (Goyette e col., 1996).

1.6. AS MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES NA MTHFR

As mutações no gene da MTHFR implicam em deficiência de folato. As mutações 677 (C→T) e a 1298 (A→C), de herança autossômica recessiva, tem sua expressão associada ao aumento do número de nascimentos de crianças com defeito de tubo neural (espinha bífida) e maior incidência da câncer colo-retal. Quando associada a outra mutação, a do fator V de Leiden, que ocorre no nucleotídeo 1691 (G→A), de herança autossômica dominante, onde uma Arginina é substituída por Glutamina, torna gestantes susceptíveis à Pre eclâmpsia, uma complicação que contribui para aumento de óbitos materno-fetais, devido à Hipertensão Arterial. A mutação do fator V de Leiden é também responsável pela trombofilia e trombose familiar.

A mutação **677(C→T)**, causa a substituição de uma alanina por valina na proteína MTHFR. Quanto à atividade específica da enzima, comparando-se os genótipos mutantes com o genótipo normal (C/C), temos que ocorre redução da especificidade de 35% no genótipo C/T) e de 70% no genótipo T/T).

Quanto à outra mutação mais freqüente no gene da MTHFR, a **1298(A→C)**, que altera o glutamato no resíduo da alanina, estudada em 1998 por van der Put e colaboradores, há indícios de que represente um fator de risco adicional, pois essa mutação diminui a atividade da MTHFR, que não se acompanha de um aumento plasmático de homocisteína nem de uma diminuição da concentração plasmática de folato.

Com a atividade reduzida da enzima MTHFR do gene mutado, aumenta a necessidade de ácido fólico para a manutenção dos níveis normais de remetilação de homocisteína para metionina. Na ocorrência de insuficiência do ácido fólico, ocorre um acúmulo de homocisteína intracelular, havendo redução da re-síntese de metionina e as reações essenciais de metilação ficam comprometidas.

Um aumento na homocisteína e diminuição de metionina, resulta na desproporção de SAM em relação a 5-adenosilhomocisteína (SAH), a qual está associada à hipometilação do DNA implicando em riscos de não-disjunção de cromossomos (Wainfan E. e col. 1992, Balaghi, M. e col. 1993, De Cabo e col. 1994), sugerindo que mães com deficiência em MTHFR e com insuficiência em ácido fólico estariam predispostas a ter não-disjunção na Meiose, originando oócitos com cromossomos em duplicata. Tais oócitos quando fecundados levam a trissomia do cromossomo 21, caracterizando a Síndrome de Down. (James, SJ e col., 1999).

OBJETIVOS

Há evidências de que a falha na disjunção do cromossomo 21 na meiose materna na concepção, possa ocorrer devido a fenômenos de hipometilação, que poderiam ser devido ao metabolismo anormal do folato, decorrente das mutações **677 (C→T)** e **1298(A→C)** do gene da METILENETETRAHIDROFOLATO REDUTASE, localizado no cromossomo 1. Isso pode representar fator de risco à não disjunção.

O objetivo deste estudo foi de avaliar a presença dessas mutações em mães que tiveram filhos com Síndrome de Down, verificando se há um acúmulo de mutantes entre elas, em comparação com a população normal.

CASUÍSTICA

O presente estudo teve risco mínimo para os indivíduos que dele participaram, uma vez que para a análise foi necessária somente uma punção venosa de sangue periférico. (Anexo I, Aprovação do CEP e CONEP)

Nossa amostra constitui-se de 36 mães de pacientes com SD, e 11 irmãos. Foram classificadas como sendo caucasóides 77,8 % , e negróides 22,2 %.

A idade das mães variam de 16 a 42, com uma média de 28,47, desvio padrão de 5,83.

A amostra controle constitui-se de 200 indivíduos negróides e caucasóides colhidos aleatoriamente na população, sendo 67 homens e 133 mulheres.

METODOLOGIA

As amostras de 10 ml de sangue foram submetidas a extração de DNA. O método de análise foi a Reação em Cadeia da Polimerase seguida de digestão enzimática específica.

Extração de DNA de leucócitos do sangue periférico

A extração de DNA foi procedida conforme o método descrito por Woodhead *et al.* (1986), com algumas modificações.

O sangue periférico foi coletado num tubo vacutainer com cerca de 5,0 ml de sangue, contendo, cada um deles, 54 µl de EDTA 15% para impedir a coagulação sangüínea. Após a coleta, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2000 rpm à temperatura ambiente para a separação do plasma. Em seguida, ao sedimento, foram adicionados 5 ml de tampão de lise I (Tris-HCl 10 mM pH8,9, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM) e 125 µl de Triton X-100. O sedimento contendo as células nucleadas foi obtido por centrifugação a 2000 rpm a 4 °C por 10 minutos.

O “pellet” formado devido ao processo de centrifugação foi ressuspenso com o auxílio de uma pipeta Pasteur em 5,0 ml do mesmo tampão (tampão de lise I), e nova centrifugação efetuada, seguindo as mesmas condições descritas acima. Este processo foi realizado continuamente até a obtenção de um “pellet” sem impurezas (esbranquiçado). Este foi ressuspenso em 800 µl de tampão de lise II (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, MgCl₂ 10 mM NaCl 0,4 M, EDTA 2 mM e 25 µl de SDS 20%), incubado a 55 °C por 10 minutos.

Após esta incubação foram adicionados 300 µl de NaCl 5M seguindo-se duas extrações com 0,5 volume de uma mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v), centrifugando-se sempre a 12000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.

A seguir, foram realizadas mais duas lavagens com mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA precipitou-se pela adição de 1 volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 2 volumes de etanol absoluto gelado, mantendo-se em freezer, a -20 °C, por uma hora. Após este período, a solução foi centrifugada a 12.000 rpm por 5 minutos à

temperatura ambiente. O sedimento foi lavado com 1 ml de etanol 70%. Após a retirada do etanol 70%, o “pellet” de DNA é deixado à temperatura ambiente para secagem. Uma vez seco, o DNA foi ressuspense em água Milli Q estéril, para uma concentração final de aproximadamente 100 ng/μl com o auxílio de espectofotômetro. Este DNA, foi colocado em banho-maria a 37°C “overnight” para que dissolvesse por completo. A seguir, o DNA dissolvido foi analisado em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio, em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X para subsequente visualização sob luz ultravioleta.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do fragmento do gene da MTHFR baseia-se na técnica da PCR (Saiki e col., 1989).

Para a mutação 677 (C→T):

Os primers específicos sense (5'- TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA- 3') e antisense (5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG – 3'), promovem a amplificação de um fragmento de 198 bp. A reação, realizada numa mistura de 54 mM Tris-HCl, 5,4 mM MgCl₂, 13,3 mM (NH₄)₂SO₄, 0,8 mM de cada nucleosídeo trifosfato, 400 ng de cada primer, DNA genômico e 2 U de Taq Polimerase, envolvendo 30 ciclos de incubação a 94 ° C (1 minuto). 55 °C (1 minuto) e 72 °C (2 minutos). Utilizando-se 15 μl do produto da PCR, numa reação de digestão com 0,5 U de Hinf I, seguida da eletroforese, num gel de poliacrilamida a 7%, corado com brometo de etídio, onde o gene com mutação é clivado em 2 fragmentos (175 e 23 bp) e o alelo normal permanece com 198 bp.

Para a mutação 1298 (A→C):

Foi utilizado o método descrito por Van Der Put e col. (1998). Essa mutação abole um sítio de restrição da MboII.

Os Primers utilizados foram: sense (5'CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA 3') e anti-sense (5' CACTTTGTGACCATTCGGTTTG 3').

A reação foi realizada utilizando-se 200 μ M dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50mM KCl, 3,0 mM MgCl₂ e uma Unidade de Taq Polimerase, numa denaturação inicial a 92°C (2 minutos), seguida de 35 ciclos de 92°C (60 Seg.), 51°C (60 Seg.) e 72°C (30 Seg.), sendo a extensão final feita a 72°C (7 minutos). O fragmento amplificado de 163 pb é digerido pela enzima MboII, numa reação de 15 μ l de amplificado, para 0, 5 U da enzima, com incubação a 37° C por seis horas. Em seguida a análise é feita num gel de poliacrilamida a 12%. O alelo normal é clivado em cinco fragmentos: 56, 31, 30, 28 e 18, enquanto que o alelo mutante, apresenta quatro fragmentos: 84, 31, 30 e 18.

RESULTADOS

Os dados referentes a cor , idade atual, idade ao nascimento com crianças com Síndrome de Down, genótipo da MTHFR e a informação referente a ingestão de ácido fólico e outros medicamentos durante a gestação encontram-se sumarizados na Tabela I.

Tabela I: Resultados da análise de 36 mães de portadores de Síndrome de Down.

Nº	Cor	Idade	Idade ao nasc. SD	Genótipo	Tomou ác. Fólico na gestação	Tomou outros medicamentos
01	Br	37	26	677 / 1298	Não	
02	Br	49	32	677 / 677	Não	
03	Br	37	23	677 / 677	Não	
04	Br	46	26	N / N	Não	
05	Br	45	33	677 / 1298		
06	N	45	29	677 / 1298	Não	
07	M	49	33	N / N	Não	
08	Br	39	37	677 / 1298	Não	
09	Br	30	26	677 / 1298		
10	Br	29	27	N / N	Não	
11	Br	44	42	N / 1298	Não	
12	M	46	35	677 / 1298	Não	
13	Br	34	32	677 / 1298	Não	
14	Br.	61	32	N / N	Não	
15	Br	37	24	677 / N		
16	Br	47	29	N / 1298		
17	Br	32	18	677 / N	Não	
18	Br	48	23	N / 1298	Não	
19	M	47	34	677 / 1298	Não	
20	Br	34	31	677 / 1298		Vitaminas (anti-abortivo)
21	Br	57	35	677 / 1298	Não	
22	Br	57	34	677 / 1298	Não	
23	Br	59	35	677 / 1298	Não	
24		23	16	N / 1298	Não	
25	N	57	28	N / 1298	Não	
26	Br	61	33	677 / 1298	Não	
27	Br	35	22	N / 1298	Não	
28	Br	60	30	677 / 1298	Não	
29	Br	61	25	1298 / 1298	Não	
30	Br	21	20	N / 1298	Não	
31	Br	36	21	677 / 677		
32	N	27	24	677 / 1298	Não	
33	Br	33	28	677 / N		
34	Br	28	24	677 / N	Não	
35	N	38	34	677 / 1298	Não	
36	Br	28	24	677 / 1298	Não	

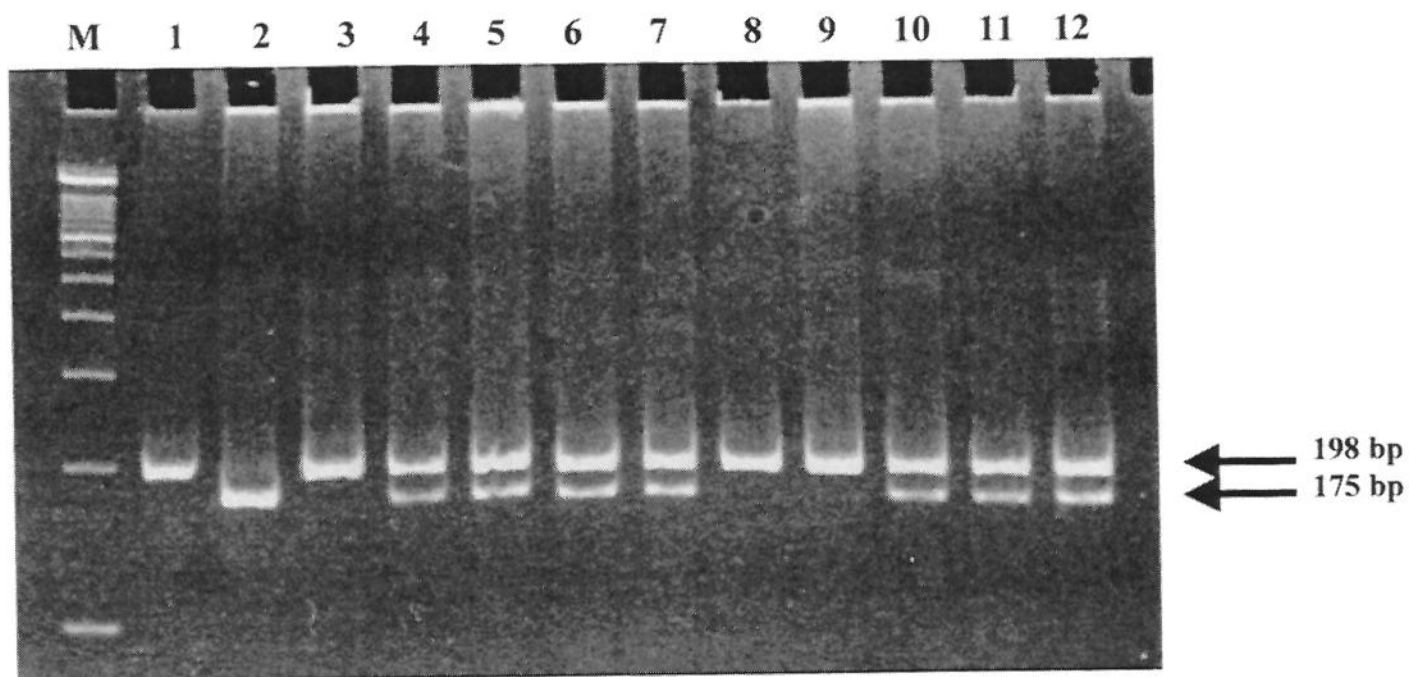


Figura V: Gel de poliacrilamida a 7% demonstrando a digestão do DNA amplificado para a pesquisa da mutação 677 (C→T). Em M= marcador de Peso molecular (leader 100bp); 1-controle não digerido; 2-presença de dois alelos para essa mutação; 3, 8 e 9=mutação ausente; 4 a 7 e 10 a 12= presença de um alelo para essa mutação.

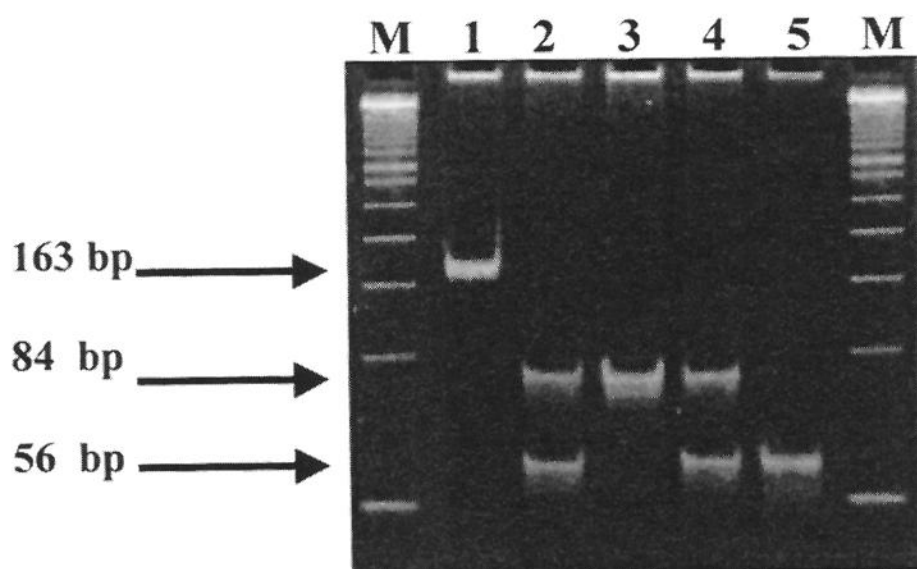


Figura VI: Gel de poliacrilamida a 12% demonstrando a digestão do DNA amplificado para a pesquisa da mutação 1298 (A→C). Em M= marcador de Peso molecular (leader 50 bp); 1-controle não digerido; 3-presença de dois alelos para essa mutação; 5=mutação ausente; 2 e 4= presença de um alelo para essa mutação

Separamos as mães levando-se em conta a idade materna no nascimento de crianças com SD, encontramos um $\chi^2_{(5)}$ de 9,63 com uma probabilidade de: $0.05 < P < 0.10$. (Tabela II).

Tabela II: Comparação Genotípica entre mães com idade Superior a 30 anos e Inferior a 30 anos.

Mutações						
Idade	67 7/1298	677/677	1298/1298	N / 677	N / 1298	N / N
Mães < 30 anos	06	02	01	04	06	02
Mães > 30 anos	11	01	--	--	01	02

$$\chi^2_{(5)} = 9,63, 0.05 < P < 0.10$$

Em comparação com a amostra controle obtivemos as seguintes distribuições observadas na tabela III.

Tabela III: Comparação da distribuição dos genótipos entre as mães analisadas e a amostra controle.

genótipo	amostra controle		mães de portadores de SD	X ²	P
677/1298	33	16,5 %	17	20,59	P<0,01
677/677	11	5,5%	03	0,5254	0,30<P< 0,50
1298/1298	15	7,5%	01	1,070	0,20<P< 0,30
677/N	62	31%	04	4,5936	0.02<P< 0,05
1298/N	39	19,5%	07	0,000056	P>0,99
N/N	40	20%	04	1,4222	0,20<P< 0,30
Total	200		36		

DISCUSSÃO

O desenvolvimento de técnicas da Biologia Molecular na última década, aliada às do estudo Citogenético, permitiram um amplo conhecimento de doenças genéticas.

As manifestações fenotípicas que caracterizam a Síndrome de Down ainda não foram todas elucidadas, mas, já se sabe muito sobre a DSCR (Região Crítica da Síndrome de Down), isto é, região do cromossomo 21, que devido à cópia extra deste cromossomo, seria responsável pelas manifestações mais severas. Em cerca de 95% dos casos de trissomia livre, a causa é a não-disjunção cromossômica na meiose materna. No entanto os fatores que levariam a não disjunção não são conhecidos. O único fator até agora incontestável é a idade materna. De fato, entre mães com menos de 30 anos, o risco de gerar uma criança com SD é menor do que 1/1.000, já entre mulheres com 35 anos o risco sobe para 1/400 e indo até 1/50 ou mais após os 45 anos. A maioria das outras síndromes, incluindo aquelas nas quais o feto não sobrevive a termo, a prevalência também aumenta a medida que a idade materna aumenta. Este risco é uma das indicações primárias para diagnóstico pré-natal entre mulheres com mais de 35 anos.

Várias hipóteses foram desenvolvidas para explicar este aumento, incluindo a idéia de que mulheres com mais idade são menos sujeitas a abortos de trissômicos. Os estudos diretos da frequência de anomalias cromossômicas nos espermatozóides e óvulos mostraram um aumento de não-disjunção entre mães mais velhas. Todos os ovócitos de uma mulher são formados durante o período embrionário, parados em prófase I até serem liberados durante a ovulação. Assim, um ovócito produzido por uma mulher de 45 anos tem- o próprio ovócito- cerca de 45 anos. Este período longo de parada da divisão celular no final da prófase I pode prejudicar a disjunção normal. No entanto, não foi esclarecida a natureza exata desse mecanismo.

Muitos fatores foram examinados para verificar se afetariam a frequência de não-disjunção em mulheres, como: níveis hormonais, fumo, doenças auto-imunes tireoidianas, consumo de álcool e radiação. Em animais experimentais verificou-se que doses altas de radiação levavam a um aumento de não disjunção cromossômica. Entretanto, nenhum deles mostrou correlação consistente com não-disjunção em seres humanos, e a idade materna continua sendo o incontestável fator conhecido.

Estudos com 5 azacitidina, um agente que inativa irreversivelmente a DNA citosina-5-metiltransferase, mostraram instabilidade cromossômica e aneuploidias, o que indica que a hipometilação poderia ser um fator importante na não disjunção (Hernandez e col., 1997).

Estudos recentes mostraram que a estabilidade da região centromérica pode depender da herança de um padrão específico de metilação centromérica onde se ligariam proteínas sensíveis a metilação. Essa estrutura é que manteria a arquitetura necessária para a formação do cinetocoro (Karpen e col., 1997). Sendo assim, em 1999, James e col., lançou a hipótese de que a atividade reduzida da MTHFR promoveria a hipometilação por decréscimo do SAM, o substrato da DNA citosina 5 metiltransferase, ou por aumento da SAH, um inibidor por competição da DNA citosina 5 metiltransferase, ou por ambos mecanismos. Em seu estudo, James encontrou um número estatisticamente significativo maior de mulheres heterozigotas para a mutação 677 entre mães de crianças com SD, já a quantidade de mães homozigotas 677 não diferiu da população normal. Esse achado foi diferente do encontrado em pais de crianças com defeito de fechamento de tubo neural, onde prevaleceu o homozigoto 677 (Van der Put e col., 1995). Uma possível explicação dada por James para esse fato foi a de que a viabilidade fetal poderia ser menor em mães homozigotas e que poderia variar com o genótipo do feto com SD. James refere em seu

estudo que reavaliações de mães de crianças com defeito de fechamento de tubo neural, mas heterozigotas 677, ou naquelas em que essa mutação não foi encontrada, observou-se um aumento de homocisteína plasmática, sugerindo que uma segunda mutação pudesse estar envolvida.

Em nosso estudo verificamos um acúmulo de mães heterozigotas compostas para as mutações 677/1298. Considerando-se que a atividade enzimática do heterozigoto composto é de cerca de 50-60%, teríamos um acúmulo de 5,10 MetilenoTHF, com prejuízo da re-metilação da homocisteína que viabiliza a síntese do 5-adenosilmetionina (SAM), o principal doador de grupos metil, implicando em hipometilação do DNA e levando a aumento plasmático de homocisteína. Assim, nossos dados vem de encontro com as observações de James e adicionam a informação que a segunda mutação envolvida seria a 1298 (A→C). Sendo portanto, o genótipo 677/1298 um fator de risco para a SD.

Um fator importante a ser lembrado é que a deficiência da MTHFR não seria o único fator envolvido no nascimento de crianças com Síndrome de Down, senão com a prevalência dessas mutações na população geral, esperaríamos encontrar um número muito maior de crianças com SD e mesmo naquelas mães com genótipo 677/1298 encontraríamos vários filhos com SD. Com isso, acreditamos que o fenótipo SD seja multifatorial com muitas variáveis envolvidas.

No caso da MTHFR, ainda temos que considerar a ingestão de ácido fólico. Se a portadora da deficiência tiver uma alta ingestão de alimentos ricos em ácido fólico, ou mesmo fizer uma ingestão de ácido fólico via oral, teríamos um aceleração da via metabólica e conseqüentemente teríamos uma maior disponibilidade de SAM e com isso a

metilação do DNA não estaria comprometida. Desse modo, a baixa ingestão de ácido fólico seria um segundo fator de risco associada a presença das mutações.

Sendo assim, programas que propõem a adição de ácido fólico a determinados alimentos, bem como a conduta médica de indicar às mulheres a ingestão de ácido fólico antes da fertilização e durante a gestação, a fim de diminuir os riscos de nascimentos de crianças com defeitos de fechamento de tubo neural, estariam também diminuindo a incidência da SD.

CONCLUSÃO

O presente estudo constatou que:

- Há um acúmulo de heterozigotas compostas (677/1298) entre as mães de portadores de SD.
- Em nossa amostra não foi possível verificar se há correlação com a idade materna no nascimento da criança com SD.

A deficiência da MTHFR parece ser um dos fatores de risco para o nascimento de criança com Síndrome de Down.

SUMMARY

The Syndrome of Down, or Trissomia the 21 it is an aberration numeric cromossômica, being the more frequent genetic cause of moderate mental retardation. In 95% of the cases of Syndrome of Down it happens a process of no-disjunção in the maternal meiose.

Recent studies associate the phenomenon of no-disjunção to the hipometilação of the DNA. MTHFR acts in the metabolism of the acid fólico and she has as intermediary product the formation of SAM that is the donor of groups methyl for the DNA. Thus, the faulty individuals in MTHFR should have a smaller readiness of grupamentos methyl and they would be like this subject to mistakes in the cellular division.

In our study we analyzed the two more frequent mutations in the gene of MTHFR in 36 mothers of carriers of Syndrome of Down and in 200 individuals control. The results demostraram an accumulation of mothers heterozigotas composed for the two mutations, phenotype that it causes an important enzymatic reduction, suggesting that the deficiency of MTHFR should be a factor of important risk for to Syndrome of Down.

Keywords: Down Syndrome, meiosis, abnormal segregation chromosomal, MTHFR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, M.; SMITH, P. D.; MARTIN, D.; THOMPSON, J. R. ; LODWICK, D.; SAMANI, N. J. Genetic analysis of thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for myocardial infarction. **Quart. J. Med.** 89: 437-444, 1996.
- ARRUDA ,V.R.; SIQUEIRA, L.H., GONÇALVES, M.S. et al Prevalence of the mutation 677 C->T in the methylenetetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **Am J Med Genet** 78:332-335, 1998.
- ARRUDA ,V.R; VON ZUBEN, P.M; CHIAPARINI , L.C. et al. The mutation Ala677->Val in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: a risk factor for arterial disease and venous thrombosis. **Tromb Haemost** 77:818-821, 1997.
- ANTONARAKIS, S. E.; ADELSBERGER, P. A.; PETERSEN, M. B.; BINKERT, F.; SCHINZEL, A. Analysis of DNA polymorphism suggests that most de novo dup(21q) chromosomes in patients with Down syndrome are isochromosomes and not translocations. **Am. J. Hum. Genet.** 47: 968-972, 1990.
- ANTONARAKIS, S. E.; LEWIS, J. G.; ADELSBERGER, P. A.; PETERSEN, M. B.; SCHINZEL, A. A.; BINKERT, F.; SCHIMID, W.; PANGALOS, C.; RAOUL, O.; CHAKRAVARTI, A.; HAFEZ, M.; COHEN, M. M.; ROULSTON, D.; SCHUWARTZ, S.; MIKKELSEN, M.; TRANEBJAERG, L.; GREENBERG, F.; HOAR, D.I.; RUDD, N.L.; WARREN, A.C.; METAXOTOU, C.; BARTSOCAS, C.; DOWN SYNDROME COLLABORATIVE GROUP. Parental origin of the extra chromosome en trisomy 21 using DNA polymorphism analysis. **New Eng. J. Med.** 324:872-876, 1991.
- ANTONARAKIS, S.E.; PETERSEN, M.B.; McINNIS, M.G. et al. The meiotics stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. **Am. J. Hum. Genet.** 50: 544-50, 1992.
- ANTONARAKIS, S. E. Human chromosome 21: genome mapping and exploration circa 1993. **Trends Genet.** 9: 142-148, 1993.

- AUSEBEL, F.M.; BRENT R, KINGSTON R.E., MOORE D.D., SEIDMAN J.G., SMITH J.Á. In: Current Protocols in molecular biology. New York. **Wiley-Interscience**. 2.3.1-2.3.3, 1989.
- BALAGHI, M.; WAGNER, C. DNA methylation in folate deficiency-use of CpG methylase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **193**: 1184-90, 1993.
- BROWN, A. S.; FEINGOLD, E.; BROMAN, K. W.; SHERMAN, S. L. Genome-wide variation in recombination in female meiosis: a risk factor for non-disjunction of chromosome 21. **Hum. Molec. Genet.** **9**: 515-523, 2000.
- CHEN J., GIOVANUCCI E., KELSEY K. et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism And the risk of colorectal cancer. **Cancer Res.** : 56:4862-4, 1996.
- De CABO, S.F.; HAZEN, M.J. MOLERO, M.L.; FERNANDEZ-PIQUERAS, J.S. Adenosyl-L-homocysteine: a non-cytotoxic hypomethylating agent. **Experientia** **50**: 658-9, 1994.
- DELABAR, J. M.; THEOPHILE, D.; RAHMANI, Z.; CHETTOUH, Z.; BLOUIN, J.L.; PRIEUR, M.; NOEL, B.; SINET, P. M. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. **Europ. J. Hum. Genet.** **1**: 114-124, 1993.
- DOWN, J. L. H. Observations on an ethnic classification of idiots. **London Hosp. Clin. Lect. Rep.** **3**:259 only, 1866.
- ENGBERSEN, A. M. T.; FRANKEN, D. G.; BOERS, G. H. J.; STEVENS, E. M. B.; TRIJBELS, F. J. M.; BLOM, H. J. Thermolabile 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase as a cause of mild hyperhomocysteinemia. **Am. J. Hum. Genet.** **56**: 142-150, 1995.
- EPSTEIN, C.J.; Down syndrome (trisomy 21). In: Stansbury, JB; Wyngarden, JB.; Fredrickson, DS., eds. **The metabolic and molecular bases of inherited disease**, 7th ed. New York: McGraw-Hill: 749-95, 1995.

- FREEMAN, J. M.; FINKELSTEIN, J. D.; MUDD, S. H.; UHLENDORF, B. W.
Homocystinuria presenting as reversible 'schizophrenia': a new defect in methionine metabolism with reduced methylene-tetrahydrofolate-reductase activity. **Pediat. Res.** 6:423, 1972.
- FROSST, P. et al, A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. **Nat. Genet.** : 10: 111-3, 1995.
- FUENTES, J.-J.; PRITCHARD, M. A.; PLANAS, A. M.; BOSCH, A.; FERRER, I.; ESTIVILL, X. A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. **Hum. Molec. Genet.** 4: 1935-44, 1995.
- GOODMAN, J.I.; COUNTS, J.L. Hipomethylathyon of DNA: a possible nongenotoxic mechanism underlying the role of cell proliferation in carcinogenesis. **Environ Health Perspect.**, Dec; 101 Suppl. 5: 169-72, 1993.
- GOYETTE, P.; FROSST, P.; ROSENBLATT, D.S.; ROSEN, R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Am. J. Hum. Genet.** 56: 1052-59, 1995.
- GOYETTE, P.; PAI, A.; MILOS, R.; FROSST, P.; TRANS, P.; CHEN, Z.; CHAN, M.; ROSEN, R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Mammalian Genome** 9: 652-656, 1998.
- GOYETTE, P.; SUMNER, J. S.; MILOS, R.; DUNCAN, A. M. V.; ROSENBLATT, D. S.; MATTHEWS, R. G.; ROZEN, R. human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nature Genet.** 7 : 195-200, 1994.
- GRANDONE, E.; MARGAGLIONE, M.; COLAIZZO, D.; CAPPUCCI, G.; PALADINI, D.; MARTINELLI, P.; MONTANARO, S.; PAVONE, G.; DI MINNO, G. Factor V Leiden, C>T MTHFR Polymorphism and Genetic Susceptibility to Preeclampsia. **Thromb Haemost** 77: 1052-1054, 1997.

- GRASSO, M.; GIOVANNUCCI, M. L.; PIERLUIGI, M.; TAVELLINI, F.; PERRONI, L.; DAGNA-BRICARELLI, F. Isochromosome, not translocation in trisomy 21q21q. **Hum. Genet.** 84: 63-65, 1989.
- GOODMAN, J. I.; COUNTS, J. L. Hypomethylation of DNA: a possible nongenotoxic mechanism underlying the role of cell proliferation in carcinogenesis. **Environ Health Perspect.** Dec., 101 Suppl. 5: 169-72, 1993.
- HARRISON, J.J.; ANISOWICZ, A.; GADI, I.G.; RAFFELD, M.; SAGER, R. Azacytidine-induced tumorigenesis of CHEF/18 cells: correlated DNA methylation and chromosome changes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA:** 80:6606-10, 1983.
- HERNANDEZ, R.; Frady, A.; Zang, X.Y.; Varela, M.; Ehrlich, M. Preferential induction of chromosome 1 multibranched figures and whole-arm deletions in a human pro-B cell line treated with 5-azacytidine or 5-azadeoxycytidine. **Cytogenet. Cell Genet.**, 76 (3-4): 196-201, 1997.
- HOOK, E.G.: Epidemiology of Down syndrome, In: Pueschel, S.M.; Rynders, J.E.: **Down Syndrome. Advances in Biomedicine and the Behavioral Sciences.** Cambridge: Ware press (publ.) 1982, Pp. 11 only.
- JAMES, S.J et al.: Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Clin Nutr** : 70: 495-501, 1999.
- JEANPIERRE, M.; TURLEAU, C.; AURIUS, A. et al. An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. **Hum. Mol. Genet. :** 2: 731-5, 1993.
- JI, W.Z.; HERNANDEZ, R.; ZHANG, X.Y. et al. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. **Mutat. Res.:** 379: 33-41, 1997.
- KANG, S.-S.; WONG, P. W. K.; SUSMANO, A.; SORA, J.; NORUSIS, M.; RUGGIE, N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: an inherited risk factor for coronary artery disease. **Am. J. Hum. Genet.** 48: 536-545, 1991.

- KOLA, I. and HERTZOG, P.J. Animal models in the study of biological function of genes on human chromosome 21 and their role in the pathophysiology of Down syndrome. **Human Mol. Gen.**, Vol.6, nº 10 Review: 1713-1727, 1997.
- KORENBERG, J.; KAWASHIMA, H.; PULST, S.; IKEUCHI, T.; OGASAWARA, N.; YAMAMOTO, K.; SCHONBERG, S.; KOJIS, T.; ALLEN, L.; MAGENIS, E.; IKAWA, H.; TANIGUCHI, N.; EPSTEIS, C. Molecular definition of the region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. **Am. J. Hum. Genet.** 47: 236-246, 1990.
- KORENBERG, J. R. Toward a molecular understanding of Down syndrome. In EPSTEIN, C.J.: **The Phenotypic Man Prog. Clin. Biol. Res.** 384, 1993
- KORENBERG, J. R.; CHEN, X.; SCHIPPER, R.; SUN, Z.; GONSKY, R.; GERWEHR, S.; CARPENTER, N.; DAUMER, C.; DIGNAN, P.; DISTECHE, C.; GRAHAM, J. M., Jr.; HUGDINS, L.; MCGILLIVRAY, B.; MIYAZAKI, K.; OGASAWARA, N.; PARK, J. P.; PAGON, R.; PUESCHEL, S.; SACK, G.; SAY, B.; SCHUFFENHAUER, S.; SOUKUP, S.; YAMANAKA, T. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91: 4997-5001, 1994.
- LAMB, N. E.; FEINGOLD, E.; SAVAGE, A.; AVRAMOPOULOS, D.; FREEMAN, S.; GU, Y.; HALLBERG, A.; HERSEY, J.; KARADIMA, G.; PETTAY, D.; SAKER, D.; SHEN, J.; TAFT, L.; MIKKELSEN, M.; PETERSEN, M. B.; HASSOLD, T.; SHERMAN, S. L. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. **Hum. Mol. Genet.** Sep.; 6 (9): 1391-9, 1997.
- LEJEUNE, J.; GAUTIER, M. & TURPIN, R. Etude des chromosomes somatique des neufs enfants mongoliens. **Cr. Acad. Sci. Paris** 248, 1721-22, 1959.
- LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Mar 18; 94(6): 2545-50, 1997.

- LEYTON, C.; MERGUDICH, D.; DE LA TORRE, C.; SANS J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. **Cell Prolif**: 28: 481-96, 1995.
- McCORMICK, M.; SCHINZEL, A.; PETERSEN, M.; STETTEN, G.; DRISCOLL, D.; CANTU, E.; TRANEBJAERG, L.; MIKKELSEN, M.; WATKINS, P.; ANTONARAKIS, S. Molecular genetic approach to the characterization of the Down syndrome region of chromosome 21. **Genomics** 5: 325-331, 1989.
- MIKKELSEN, M. Down's syndrome cytogenetic epidemiology. **Hereditas** 86: 45-59, 1977.
- MORITA, H.; TAGUCHI, J.; KURIHARA, H.; KITAOKA, M.; KANEDA, H.; KURIHARA, Y.; MAEMURA, K.; SHINDO, T.; MINAMINO, T.; OHNO, M.; YAMAOKI, K.; OGASAWARA, K.; AIZAWA, T.; SUZUKI, S.; YAZAKI, Y. Genetic polymorphism of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) as a risk factor for coronary disease. **Circulation** 95: 2032-36, 1997.
- NAKAMURA, A.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y. A novel gene isolated from human placenta located in Down syndrome critical region on chromosome 21. **DNA Res.** 4: 321-324, 1997.
- NARISAWA, K.; WADA, Y.; SAITO, T.; SUZUKI, H.; KUDO, M.; ARAKAWA, T.; KATSUSHIMA, N.; TSUBOI, R. Infantile type of homocystinuria with N5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene among the Japanese population. **Tohoku J. Exp. Med.** 121: 185-194, 1977.
- NG, H.-H.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin modification. **Genetics & Development**, 9: 158-163, 1999.
- OHIRA, M.; ICHIKAWA, H.; SUZUKI, E.; IWAKI, M.; SUSUKI, K.; SAITO-OHARA, F.; IKEUCHI, T.; CHUMAKOV, I.; TANAHASHI, H.; TASHIRO, K.; SAKAKI, Y. A 1.6 Mb P1-based physical map of the Down syndrome region on chromosome 21. **Genomics** 33: 65-74, 1996.

- PETERSEN, M. B.; ADELSBERGER, P. A.; SCHINZEL, A. A.; BINKERT, F.; HINKEL, G. K.; ANTONARAKIS, S. E. Down syndrome due to de novo Robertsonian translocation t14;21: DNA polymorphism analysis suggest that the origin of the extra 21q is maternal. **Am. J. Hum. Genet.** 49: 529-536, 1991.
- QU, J.Z., GRUNDY, P.; NARAYAN, A.; EHRLICH, M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. **Cancer Genet Cytogenet** Feb; 109 (1): 34-9, 1999.
- RAHMANI, Z.; BLOUIN, J.; CREAU-GOLDBERG, N.; WATKINS, P.; MATTEI, J.; POISSONNIER, M.; PRIEUR, M.; CHETTOUH, Z.; NICOLE, A.; AURIAS, A.; SINET, P.; DELABAR, J. Critical role of D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 86: 5958-5962, 1989.
- ROBERTSON, K. D.; WOLFFE, A. P. DNA methylations in Health and Disease. **Nature Reviews Genetics**, 1, 11-19, 2000.
- ROSENBLATT, D.S. Folate and homocysteine metabolism and gene polymorphisms in the etiology of Down syndrome. **Am J Clin Nutr.** 70: 429-30, 1999.
- SHAFFER, L. G.; JACKSON-COOK, C. K.; STASIOWSKI, B. A.; SPENCE, J. E.; BROWN, J. A. Parental origin determination in 30 de novo Robertsonian translocations. **Am. J. Med. Genet.** 43: 957-963, 1992.
- SHERMAN, S. L.; FREEMAN, S. B.; GRANTHAM, M.; PETERS, J.; JACOBS, P. A.; KURNIT, D. M.; UCHIDA, I.; PETERSEN, M. B.; MIKKELSEN, M.; HASSOLD, T. J. Non-disjunction of trisomy 21: comparison of centromere maps resulting from maternal meiosis I and II non-disjunction. **Am. J. Hum. Genet.** 51 (suppl.): A24 only, 1992.
- SHERMAN, S. L.; TAKAESU, N.; FREEMAN, S. B. GRANTHAM, M.; PHILLIPS, C.; BLACKSTON, R. D.; JACOBS, P. A.; COCKWELL, A. E. Association between reduced recombination and non-disjunction. **Am. J. Hum. Genet.** 49: 608-620, 1991.

- SHIH, V. E.; SALEM, M. Z.; MUDD, S. H.; UHLENDORF, B. W.; ADAMS, R. D. A new form of homocystinuria due to N(5,10)-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Pediat. Res.** 6: 395, 1972.
- THE CHROMOSOME 21 MAPPING AND SEQUENCING CONSORTIUM. The DNA sequence of human chromosome 21. **Nature**, vol. 405, May, 18; nº 6784: 311-319, 2000.
- THOMPSON M.W., MC INNES R.R., WILLARD H.F.- **Thompson & Thompson: Genética Médica**-Editora Guanabara Koogan, S.A., Rio de Janeiro, 1993.
- THULINE, H. C.; PUESCHEL, S. M. Cytogenetics in Down syndrome. In PUESCHEL, S.M.; RYNDERS, J. E.. : **Down Syndrome. Advances en Biomedicine and the Behavioral Sciences.** Cambridge: Ware Press 9pub.), Pp 133 only, 1982.
- TUCK-MULLER, C.M.; NARAYAN, A.; TSIEN, F.; SMEETS, D.F.; SAWYER, J.; FIALA, E.S.; SOHN, O.S.; EHRLICH, M. DNA hypomethylation and unusual chromosome instability in cell lines from ICF syndrome patients. **Cytogenet Cell Genet.**, 89 (1-2): 121-8, 2000.
- VAN BOCKXMEER, F. M.; MAMOTTE, C. D. S.; VASIKARAN, S. D.; TAYLOR, R. R. Methylenetetrahydrofolate reductase gene and coronary artery disease. **Circulation** 95: 21-23, 1997.
- VAN DER PUT, N.M.J.; STEEGERS - THEUNISSEN, R.P.M.; FROSST, P. et al. Mutated methylenete-trahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet** :346.1070-1071, 1995.
- VAN DER PUT, N.M.J.; ESKES ,T.K.; BLOM ,H.J. Is the common 677 C-> T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene a risk factor for neural tube defect? A meta-analysis. **Q J Med.** : 90: 111-5, 1998.
- VAN DER PUT, N. M. J.; GABREËLS, F.; STEVENS, E. M. B.; SMEITINK, J. A. M.; TRIJBELS, F. J. M.; ESKES, T. K. A. B.; VAN DEN HEUVEL, L. P.; BLOM, H. J. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for Neural-Tube Defects? **Am. J. Hum. Genet.** 62:1044-1051, 1998.

- VIDAL-TABOADA, J. M.; SANZ, S.; EGEÓ, A.; SCARTEZZINI, P.; OLIVA, R.
Identification and characterization of a new gene from human chromosome 21
between markers D21S343 and D21S268 encoding a leucine-rich protein. **Biochem.
Biophys. Res. Commun.** 250: 547-554, 1998.
- WAINFAN, E.; POIRIER, L. A. Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA
methylation and gene expression. **Cancer Res.** Apr. 1; 52 (7 Suppl.): 2071s-2077s,
1992.
- WARREN, A. C.; CHAKRAVARTI, A.; WONG, C.; SLAUGENHAUPT, S. A. ;
HALLORAN, S. L.; WATKINS, P. C.; METAXOTOU, C.; ANTONARAKIS, S. E.
Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down
syndrome. **Science** 237 : 652-654, 1987.
- WOODHEAD, J.L.; FALLON, R.; FIGUERED, H.; LONGDALE, J& MALCOM, A.D.B.
Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies, K.E. **Human genetic
diseases - a pratical approach**, Oxford, IRL Press limited, pp 51-64, 1986.

ANEXOS

**Foi utilizado Termo de Consentimento assinado pelos participantes, com
preenchimento de formulário com perguntas pertinentes
à pesquisa. (4 fls.)**



FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA PESQUISA MÉDICA

Título do projeto: DEFICIÊNCIA DE MTHFR EM MÃES DE PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidada a participar em um projeto de pesquisa envolvendo familiares de indivíduos com Síndrome de Down. O objetivo geral do estudo é o de procurar deficientes para essa enzima, a MTHFR, que pode estar contribuindo para o nascimento de crianças com Síndrome de Down. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número de código para a identificação dos indivíduos participantes.

PROCEDIMENTO:

Eu entendo que se concordar em participar desse estudo, os pesquisadores participantes farão perguntas a respeito dos meus antecedentes médicos e familiares. Uma amostra de sangue venoso será colhida (10 ml, o equivalente a quatro colheres de sopa). Hospitalização não será necessária.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 10 ml de sangue venoso será efetuada. Os riscos associados a esse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor e manchas roxas (equimoses) no local da coleta do sangue. O desconforto será mínimo pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço que será realizado por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento.

VANTAGENS:

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo, a não ser o aconselhamento genético para esta deficiência. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicado, sendo que todas as consequências serão devidamente explicadas e meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Em todos os indivíduos que forem detectadas alterações gênicas, será oferecida toda a orientação genética. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (019) 788-8909 (Profa.Dra.Carmen)

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do HC-UNICAMP referentes ao sigilo da informação médica. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:

Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações contatar a secretaria do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas-UNICAMP, tel. (019) 788-7232.

RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:

Eu entendo que a minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento (incluindo a retirada da amostra de sangue) sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro no HC-UNICAMP.

Eu confirmo que o (a) Dr. (a) _____ explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido e os riscos, desconforto advindas desse projeto de pesquisa. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e Rg participante

Assinatura do participante

Data

RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR:

Eu expliquei a _____

o objetivo do estudo, os procedimentos requeridos e os possíveis riscos que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia desse formulário de consentimento ao participante ou responsável.

Nome e RG do pesquisador

Assinatura do pesquisador

Data

DEFICIÊNCIA DE MTHFR EM MÃES DE PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN

IDENTIFICAÇÃO -- -----

Data:...../...../.....

Nome da criança:.....

Nome da mãe:.....

Cor.....Idade:.....Nasc:/...../..... Natural de

Idade da mãe ao nascimento da criança com SD.....

Endereço: Rua.....

n°.....Apto:.....Bairro:.....Cep:.....

Cidade:.....Estado:.....

F: residência ()...... F: serviço ().....

Recados:.....

Médico:.....

Endereço: Rua.....

n°.....Apto:.....Bairro:.....Cep:.....

Cidade.....Estado:.....

F: residência ()......F: serviço ().....

Especialidade:.....Fax:().....

ANTECEDENTES (MÃE) DURANTE A GESTAÇÃO

Enfermidades crônicas: Asma Brônquica ☐ Diabete Mellitus ☐ Tuberculose ☐ Insuficiência cardíaca ☐ Insuficiência renal ☐ Sífilis ☐ Toxoplasmose ☐ Epilepsia ☐

Reumatismo ☐ Outras ☐ Especificar: desde:/...../.....

Ingere medicamentos durante a gestação? não ☐ sim ☐ Qual(is) e quando:

Usou ácido fólico não ☐ sim ☐ durante quanto tempo?

Fatores físicos: Exposição freqüente a radiações ionizantes: não ☐ sim ☐

Teve pneumonias? Não ☐ Sim ☐ Quantas?

Problemas intestinais: Prisão de ventre ☐ Disenteria ☐ Outros ☐

ANTECEDENTES RELACIONADOS À FAMÍLIA

Epilepsia (convulsões ou disritmia cerebral) não ☐ sim ☐

Retardo mental na família: não ☐ sim ☐

Abortos na família: não ☐ sim ☐

Malformações na família: não ☐ sim ☐

Outras doenças importantes na família

Antepassados: Europeus latinos ☐ Europeus não latinos ☐ Judeus ☐ Índios ☐ Árabes ☐
Negros ☐ Orientais ☐ Outros ☐

País de nasc. dos avós do marido: avô paterno.....avó paterna.....

avo materno.....avo materna.....

País de nasc. dos avós da esposa: avô paterno.....avó paterna.....

avo materno.....avo materna.....

Consangüinidade entre marido e esposa: não ☐ sim ☐ Qual?.....

Consangüinidade entre os pais do marido: não ☐ sim ☐ qual?.....

Fez tratamento para esterilidade: não ☐ sim ☐

ÁRVORE GENEALÓGICA

