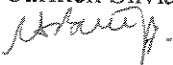


LUCIANA CARDOSO BONADIA

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 do(a) aluno(a) **Luciana Cardoso Bonadia**.

Campinas, 31 de agosto de 2004.

Prof(a). Dr(a). Carmen Sílvia Bertuzzo.

Orientador(a) 

***ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM
GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS PARTICIPANTES DO
METABOLISMO DO FOLATO E A FORMAÇÃO DE
EMBRIÕES COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS***

APOIO CNPq

CAMPINAS

2004

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

LUCIANA CARDOSO BONADIA

***ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM
GENES QUE CODIFICAM ENZIMAS PARTICIPANTES DO
METABOLISMO DO FOLATO E A FORMAÇÃO DE
EMBRIÕES COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS***

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

ORIENTADORA: PROF^a. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO

CAMPINAS

2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	B64P
V	EX
TOMBO B	61979
LIBR	16 P.0086-05
PRIÇO	11,00
DATA	10/02/05
Nº CPD	

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

B64e

Bonadia, Luciana Cardoso

Estudo de associação entre polimorfismos em genes que codificam enzimas participantes do metabolismo do folato e a formação de embriões com aberrações cromossômicas / Luciana Cardoso Bonadia . Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo

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

1. Aborto. 2. Mutação. I. Carmen Silvia Bertuzzo. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

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

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Marilda de Souza Gonçalves

2. Prof(a). Dr(a). Íscia Lopes Cendes

3. Prof(a). Dr(a). Carmen Silvia Bertuzzo

200504409
Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2004

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Braz e Cinira, e aos meus irmãos, Fábio, Graziella e Maurício, por todo apoio, toda a torcida, todo o esforço e todo amor que possibilitaram a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, que mais que orientadora, foi minha amiga, acreditando em mim e me passando tranquilidade mesmo nos momentos mais conturbados.

Ao Prof. Dr. Walter Pinto Júnior, por todo apoio científico, por fornecer a infra-estrutura adequada para a realização da pesquisa e principalmente por me mostrar que quem trabalha com paixão faz com que obrigação e diversão se confundam.

À Dra. Adriana Buhner Alves do Nascimento, à Sílvia, à Seleni e a toda equipe da GENÉTICA MÉDICA E FORENSE, que se disponibilizaram para realização da coleta da amostra, análise citogenética e separação das amostras.

À Profa. Dra. Íscia Lopes Cendes pela disponibilidade em me ajudar e pelo incentivo.

À Dra. Daniela Faroro Giovannetti e ao Dr. Sérgio Simões pelo envio de amostras.

À Cyntia 'Letícia' e Paty Aline pelo apoio incondicional, por terem me ajudado mesmo quando estavam muito atarefadas e pela amizade sincera.

À Ana Carolina Paiva que não mediu esforços em ajudar na parte prática, dando suporte técnico essencial para conclusão dessa pesquisa.

Aos estagiários e alunos que fizeram um mutirão de extração de DNA e que contribuíram muito para a pesquisa.

Aos amigos Lelé, Rafa e Cris cujas contribuições para a pesquisa e para a vida pessoal ultrapassam qualquer forma de agradecimento.

À Eri, pelas longas conversas sobre o metabolismo do ácido fólico que me fizeram apaixonar pelo tema.

Ao Hugo por estar sempre 'aí' quando preciso e por numa simples conversa, organizar as minhas idéias quando a bagunça cerebral está tão grande que parece não ter mais salvação.

À Marilza, Lilli, Fábio, Mr. Anderson, Lucila, Kelly, Cláudia, Neide, Isabel, Elis, Rafa Marckezine e tantas outras pessoas que não foram citadas, que estão nos bastidores da pesquisa e que formam essa grande equipe que é o Laboratório de Genética Molecular da FCM.

À todos os membros da minha família por me apoiarem em todas as minhas decisões e por se desdobrarem para eu terminar essa pesquisa.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À Deus, por eu estar aqui fazendo o que gosto.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxix</i>
ABSTRACT	<i>xxxiii</i>
1 - INTRODUÇÃO	<i>37</i>
1.1 - Aberrações Cromossômicas.....	<i>39</i>
1.2 - Metilação do DNA.....	<i>40</i>
1.3 - Metabolismo do Folato e a Metilação do DNA.....	<i>42</i>
1.4 - Aspectos Genéticos.....	<i>45</i>
1.4.1 - MTHFR.....	<i>45</i>
1.4.2 - CBS.....	<i>48</i>
1.4.3 - TYMS.....	<i>50</i>
1.5 - Polimorfismos e Outras Manifestações Clínicas.....	<i>52</i>
1.5.1 - Defeito do tubo neural (DTN).....	<i>52</i>
1.5.2 - Câncer e Leucemia.....	<i>53</i>
1.5.3 - Trombose.....	<i>53</i>
2 - OBJETIVO	<i>55</i>
2.1 - Objetivo Geral.....	<i>57</i>

2.2 - Objetivos Específicos.....	57
3 - JUSTIFICATIVA.....	59
4 - SUJEITOS E MÉTODOS.....	63
4.1 - Desenho do Estudo.....	65
4.2 - Seleção dos Sujeitos de Pesquisa.....	65
4.3 - Tamanho Amostral.....	66
4.4 - Técnica.....	66
4.4.1 - Extração de DNA do sangue periférico.....	66
4.4.2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	67
4.4.3 - Digestão com enzima de restrição e análise do polimorfismo.....	69
4.5 - Análise dos Dados.....	74
5 - RESULTADOS.....	75
5.1 - Caracterização da Amostra.....	77
5.2 - Distribuição dos Alelos na Amostra.....	78
5.3 - MTHFR.....	82
5.4 - CBS.....	86
5.5 - TYMS.....	87
5.6 - Interação entre os Genes <i>MTHFR</i> , <i>TYMS</i> e <i>CBS</i>	91
5.6.1 - <i>MTHFR</i> X <i>TYMS</i>	91

5.6.2 - <i>MTHFR</i> X <i>CBS</i>	94
5.6.3 - <i>TYMS</i> X <i>CBS</i>	96
6 - DISCUSSÃO	99
6.1 - Aspectos Gerais.....	101
6.2 - <i>MTHFR</i>	101
6.3 - <i>CBS</i>	103
6.4 - <i>TYMS</i>	104
6.5 - Interação entre as enzimas <i>MTHFR</i> , <i>TYMS</i> e <i>CBS</i>	105
6.6 - Considerações Finais.....	106
7 - CONCLUSÕES	109
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
9 - ANEXOS	131

LISTA DE ABREVIATURAS

5' UTR	Região 5' não traduzida
AdoMet	S-adenosil L-metionina
ARG	Arginina
CBS	Proteína cistationina β -sintetase
<i>CBS</i>	Gene codificador da CBS
CH₃	Radical metil
CYS	Cisteína
<i>DNMT3B</i>	Gene codificador da <i>de novo</i> metil-transferase
DHF	dihidrofolato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
DTN	Defeito do tubo neural
dUMP	Desoxiuracila monofosfato
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
GLN	Glicina
Hci	Homocisteína

ICF	Síndrome caracterizada por <u>I</u> munodeficiência variável, instabilidade <u>c</u> entromérica e anomalias <u>f</u> aciais
KDa	quilodalton
Kb	Quilobase
MeCP2	<i>Methylated CpG binding protein 2</i>
Met	Metionina
MTHFR	Proteína metilenotetrahidrofolato redutase
<i>MTHFR</i>	Gene que codifica a MTHFR
MTR	Metileno sintetase
MTRR	Proteína metileno sintetase redutase
<i>MTRR</i>	Gene que codifica a MTRR
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLP	Piridoxal 5'fosfato
SAH	S-adenosil-homocisteína
SD	Síndrome de Down
TYMS	Proteína timidilato sintetase
<i>TYMS</i>	Gene que codifica a TYMS

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Algumas variantes alélicas do gene <i>MTHFR</i>	46
Tabela 2 - Variantes alélicas freqüentes do gene <i>CBS</i>	49
Tabela 3 - Distribuição do cariótipo das gestações do grupo CASO.....	66
Tabela 4 - Concentração dos reagentes utilizada na análise dos polimorfismos de <i>MTHFR</i> , <i>CBS</i> e <i>TYMS</i>	68
Tabela 5 - Descrição dos “ <i>primers</i> ” utilizados em cada reação.....	68
Tabela 6 - Condições da reação de digestão.....	73
Tabela 7 - Tamanhos dos fragmentos esperados para a análise dos polimorfismos após digestão enzimática específica.....	73
Tabela 8 - Caracterização da amostra, com relação à idade (CASO e CONTROLE).....	77
Tabela 9 - Distribuição genotípica dos indivíduos CASO.....	79
Tabela 10 - Distribuição genotípica dos indivíduos CONTROLE 1.....	81
Tabela 11 - Distribuição das variantes 677T e 1298C do gene <i>MTHFR</i> entre os indivíduos do CONTROLE 2.....	82
Tabela 12 - Comparação dos genótipos de <i>MTHFR</i> entre indivíduos CASO e CONTROLE 1.....	83
Tabela 13 - Comparação dos genótipos de <i>MTHFR</i> entre indivíduos CASO e CONTROLE 2.....	84

Tabela 14 -	Comparação dos genótipos de <i>MTHFR</i> entre casais com gestação com trissomia 21 (CASO) e indivíduos CONTROLE 1.....	85
Tabela 15 -	Comparação dos genótipos de <i>CBS</i> entre indivíduos CASO e CONTROLE 1.....	86
Tabela 16 -	Comparação dos genótipos de <i>CBS</i> entre casais com gestação com trissomia 21 (CASO) e indivíduos CONTROLE 1.....	87
Tabela 17 -	Comparação dos genótipos de <i>TYMS</i> entre indivíduos CASO e CONTROLE 1.....	88
Tabela 18 -	Comparação dos genótipos de <i>TYMS</i> entre casais com gestação com trissomia 21 (CASO) e indivíduos CONTROLE 1.....	89
Tabela 19 -	Análise de regressão logística univariada comparando CASO e CONTROLE 1.....	90
Tabela 20 -	Análise de regressão logística multivariada comparando CASO e CONTROLE 1.....	91
Tabela 21 -	Comparação dos genótipos de <i>TYMS</i> e <i>MTHFR</i> entre casais CASO e CONTROLE 1.....	92
Tabela 22 -	Comparação dos genótipos de <i>TYMS</i> e <i>MTHFR</i> entre casais CASO e CONTROLE 1, levando em consideração todos os genótipos possíveis.....	93
Tabela 23 -	Comparação dos genótipos de <i>CBS</i> e <i>MTHFR</i> entre casais CASO e CONTROLE 1.....	95
Tabela 24 -	Comparação dos genótipos de <i>TYMS</i> e <i>CBS</i> entre casais CASO e CONTROLE 1.....	97

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - Esquema do metabolismo do folato.....	43
Figura 2 - Exemplo de eletroforese em gel de acrilamida 7% após análise do gene <i>MTHFR</i>	70
Figura 3 - Exemplo de eletroforese em gel de acrilamida 7% após análise do gene <i>TYMS</i>	71
Figura 4 - Análise dos polimorfismos do gene <i>CBS</i>	72

RESUMO

As aberrações cromossômicas, principalmente aneuploidias, são de grande interesse clínico, já que são responsáveis por síndromes clinicamente importantes, perdas gestacionais e têm relação com a patogenia do câncer. Os processos que dão origem a elas são a não-disjunção ou perda cromossômica durante a divisão celular. Muitos esforços têm sido realizados para encontrar fatores que influenciam na taxa de não-disjunção. Estudos recentes têm demonstrado que o padrão de metilação do DNA está ligado a instabilidade cromossômica. O metabolismo do folato está relacionado a metilação do DNA. Nesse estudo foi determinada a frequência de polimorfismos dos genes que codificam enzimas que participam do metabolismo do folato em casais que apresentavam gestações com aberrações cromossômicas como trissomias do 13, 18 e 21, monossomia do X e outras aneuploidias (n=63) e num grupo controle (n=67). Os polimorfismos estudados foram 677C→T e 1298A→C (MTHFR), 1278T, G307S e 844ins68 (CBS) e 5'UTR tr (TYMS). O método utilizado foi PCR seguida de digestão com enzimas de restrição, quando necessário. Foi encontrada uma associação significativa entre o genótipo paterno 677T/1298C do gene *MTHFR* e o surgimento das aberrações cromossômicas ($p<0,001$), bem como uma influência significativa do genótipo 2R/2R do gene *TYMS* como fator de proteção em variantes patogênicas da MTHFR ($p=0,04$) e CBS ($p=0,04$), entre mães. Foi encontrada também uma associação do genótipo materno 2R/3R do gene *TYMS* com o surgimento de aneuploidias ($p=0,04$). Esse genótipo parece estar associado a um aumento de 3,2 vezes no risco de desenvolvimento de aneuploidias.

ABSTRACT

Chromosomal aberrations, mainly aneuploidies, are of clinical interest, since they are responsible for clinical important syndromes, fetal loss and for the relationship with cancer pathogeny. The process that gives rise to aneuploidy is the non-disjunction and chromosomal loss during cell division. Recent reports have shown that methylation pattern is involved in chromosomal abnormalities. Folate metabolism is related with DNA methylation. In this research, the frequency of polymorphisms in genes that encodes enzymes of the folate metabolism was determined in couples with embryo with chromosomal abnormalities like trisomies 13, 18 and 21, monosomy X and in other aneuploidies (n=63) and in a control group (n=67). The polymorphisms investigated were 677C→T e 1298A→C (*MTHFR*), I278T, G307S and 844ins68 (*CBS*) and 5'UTR|TYMS). The method used was PCR follow by restriction enzyme digestion, when necessary. A significant association was detected between paternal 677T/1298C genotype of *MTHFR* and the origin of chromosomal aberrations ($p<0.001$), as well as a significative influence of *TYMS* genotype 2R/2R as protection factor in pathogenic maternal variants of *MTHFR* ($p=0.04$) and *CBS* ($p=0.04$). An association of maternal genotype 2R/3R with aneuploidy was also found ($p=0.04$). This genotype seems to be associated with an increase of 3.2 fold in the risk of aneuploidy development.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS

As aberrações cromossômicas constituem uma categoria importante das doenças genéticas, sendo responsáveis por uma grande proporção de malformações congênitas e retardamento mental, além de desempenhar papel importante na patogenia do câncer (THOMPSON et al., 1993). São classificadas em **numéricas**, quando existe uma diferença no número normal de cromossomos, ou **estruturais**, caracterizadas por apresentar alterações na estrutura do cromossomo (translocações, deleções, inserções).

As aberrações numéricas são as mais freqüentes entre abortos espontâneos, sendo representadas pelas **aneuploidias**, que correspondem a uma mudança no número de cromossomos na célula resultantes de ganho ou perda de um ou mais cromossomos durante a divisão celular e pelas **poliploidias**, caracterizadas por apresentar múltiplos do número haplóide de cromossomos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002). As aneuploidias são as mais comuns, ocorrendo em cerca de 50% dos abortos cromossomicamente anormais, 25% de todos os abortos e aproximadamente 4% de todas as gestações clinicamente reconhecidas (BOUÉ et al., 1985; HASSOLD e JACOBS, 1984). Em células somáticas, as aneuploidias estão associadas ao desenvolvimento de muitas formas de câncer (FEARON e VOGELSTEIN, 1990; CAVENEE et al., 1991).

Algumas trissomias autossômicas e alterações numéricas dos cromossomos sexuais são também a causa de síndromes clinicamente importantes. A monossomia do X, que leva a Síndrome de Turner, constitui um dos cariótipos mais freqüentes entre os abortos espontâneos, sendo responsável por cerca de 9% de todos os abortos e entre 15 e 25% daqueles que apresentam cariótipo anormal (CREASY et al., 1976; HASSOLD, 1980; CAVALCANTI, 1986). Em nativos, caracteriza-se classicamente por um fenótipo feminino associado à baixa estatura, infantilismo sexual com amenorréia primária e esterilidade. Dentre outras aneuploidias freqüentes, está a trissomia livre do cromossomo 21, uma das principais causas da Síndrome de Down (95%), que representa o distúrbio citogenético mais freqüente responsável por retardo mental moderado. Tem também grande importância em perdas gestacionais prematuras: estima-se que 1 em cada 150 conceptos apresente trissomia do 21 e que ao redor de 80% deles são perdidos no começo da gestação (BOUÉ et al., 1975; HASSOLD e JACOBS, 1984; FREEMAN et al., 1991). As trissomias

do cromossomo 13 e 18, relacionadas às síndromes cromossômicas de Patau e Edwards respectivamente, são também de grande importância clínica, apresentando geralmente uma sobrevivência pós-natal muito baixa (THOMPSON et al., 1993).

Existem dois processos clássicos que levam as aneuploidias: a **não-disjunção**, que causa uma segregação aberrante durante a divisão celular e a **perda cromossômica** ocasionada por atraso cromossômico, durante a separação na anáfase (KIRSCH-VOLDERS et al., 2002). Assim, a causa mecânica que leva a cariótipos aneuplóides já está bem estabelecida, mas pouco se sabe sobre mecanismos moleculares que possam estar associados a esse processo.

Muitas contribuições a respeito da origem do cromossomo extra em diversas trissomias foram geradas por estudos que utilizaram marcadores polimórficos. Esse método demonstrou que a não-disjunção materna é a causa mais comum das trissomias, ocorrendo com o dobro de frequência durante a meiose I, quando comparada à meiose II (ABRUZZO e HASSOLD, 1995). Um fator fortemente associado à não-disjunção cromossômica é a idade materna avançada. Entretanto, como na reprodução predomina a fração jovem da população, apenas 5 a 8% dos casos de nascimentos com aberrações cromossômicas acontece entre mães com idade superior aos 30 anos, sendo portanto, a maior parte dos casos de causa pouco conhecida (HOOK, 1982; HOOK et al., 1983).

Baseados na alta frequência de aberrações que envolvem cromossomos com região heterocromática polimórfica, MEULENBROEK e GERAEDTS (1982) sugeriram uma possível relação causal entre a presença desses polimorfismos e a ocorrência da não-disjunção. De fato, estudos têm associado o padrão de metilação do DNA nessas regiões à instabilidade cromossômica (LEYTON et al., 1995; MINIOU et al., 1997; HANSEN et al., 1999; XU et al., 1999; VIG e HALLET, 2000).

1.2 - METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA em mamíferos é uma modificação pós-replicação onde grupos metil (CH_3) se ligam predominantemente à posição 5' de citosinas da sequência dinucleotídica CpG (FRISO et al., 2002; JAENISCH e BIRD, 2003). É chamada de

característica epigenética (fora da genética convencional), já que são modificações hereditárias que não dependem de mudanças na sequência do DNA (STRACHAN e READ, 2002a; JAENISCH e BIRD, 2003).

Está envolvida em dois processos importantes: na **inativação gênica**, uma vez que as regiões promotoras são ricas em dinucleotídeos CpG (CEDAR, 1988) e nas **modificações na estrutura da cromatina** (NAN et al., 1996; NAN et al.; 1998; JONES et al., 1998).

O centrômero é requerido para assegurar a distribuição equitativa dos cromossomos replicados, às células filhas (KARPEN e ALLSHIRE, 1997). A estrutura secundária da heterocromatina pericentromérica, nas sequências-satélite repetitivas, está envolvida na ligação de proteínas ao DNA e na coesão entre cromátides irmãs (RENAULD e GASSER, 1997; CLARKE, 1998; COBB et al., 1999), portanto é uma estrutura de fundamental importância durante a divisão celular. Essas regiões são geralmente metiladas e proteínas como a MeCP2 se ligam a esses grupos metil num complexo com histonas-desacetilases, resultando numa desacetilação local e conseqüente condensação da cromatina (NAN et al., 1996; NAN et al.; 1998; JONES et al., 1998). Recentes evidências ligando a metilação do DNA com a desacetilação das histonas e a condensação da cromatina dão suporte a possibilidade de o padrão de metilação do DNA estar ligado a alterações epigenéticas na cromatina, requeridas para uma segregação cromossômica normal (BESTOR e TYCKO, 1996; GREWAL et al., 1998; VIG, 1998).

Estudos clínicos e experimentais têm mostrado que a metilação do DNA pericentromérico é necessária para a segregação cromossômica normal (HOBBS et al., 2000). Por exemplo, uma desordem autossômica rara, a síndrome ICF, cujo fenótipo é imunodeficiência, instabilidade centromérica e anomalias faciais, caracteriza-se por hipometilação do DNA pericentromérico (JI et al., 1997) e segregação anormal (JEANPIERRE et al., 1993). Essa síndrome é causada por uma mutação no gene que codifica uma metil-transferase (*DNMT3B*), enzima responsável pela transferência de grupos metil ao DNA, e dá suporte a uma associação causal entre a hipometilação do DNA, a descondensação pericentromérica e a segregação anormal dos cromossomos (HANSEN et al., 1999; XU et al., 1999).

Outra evidência da associação entre o padrão de metilação do DNA e a instabilidade cromossômica vem de estudos realizados com a 5-azacitidina, um potente agente desmetilador. Culturas de células tratadas com esse agente apresentam descondensação pericentromérica e frequentes erros de segregação durante a divisão celular (LEYTON et al., 1995; VIG e HALLET, 2000).

Aneuploidias e instabilidades cromossômicas estão presentes na maior parte dos cânceres humanos e cada vez mais estudos têm relacionado essa instabilidade à extensão da hipometilação do DNA (VILAIN et al., 1999; EADS et al., 2001).

Esses dados sugerem fortemente que a metilação do DNA é um pré-requisito essencial para a segregação cromossômica normal (HOBBS et al., 2000).

1.3 - METABOLISMO DO FOLATO E A METILAÇÃO DO DNA

O metabolismo do folato está envolvido em dois processos importantes: a **síntese** e a **metilação** do DNA (Figura 1). Para que esses processos aconteçam de forma eficiente, é necessário que o suprimento de ácido fólico seja adequado e que as enzimas que participam das etapas bioquímicas estejam em perfeito funcionamento.

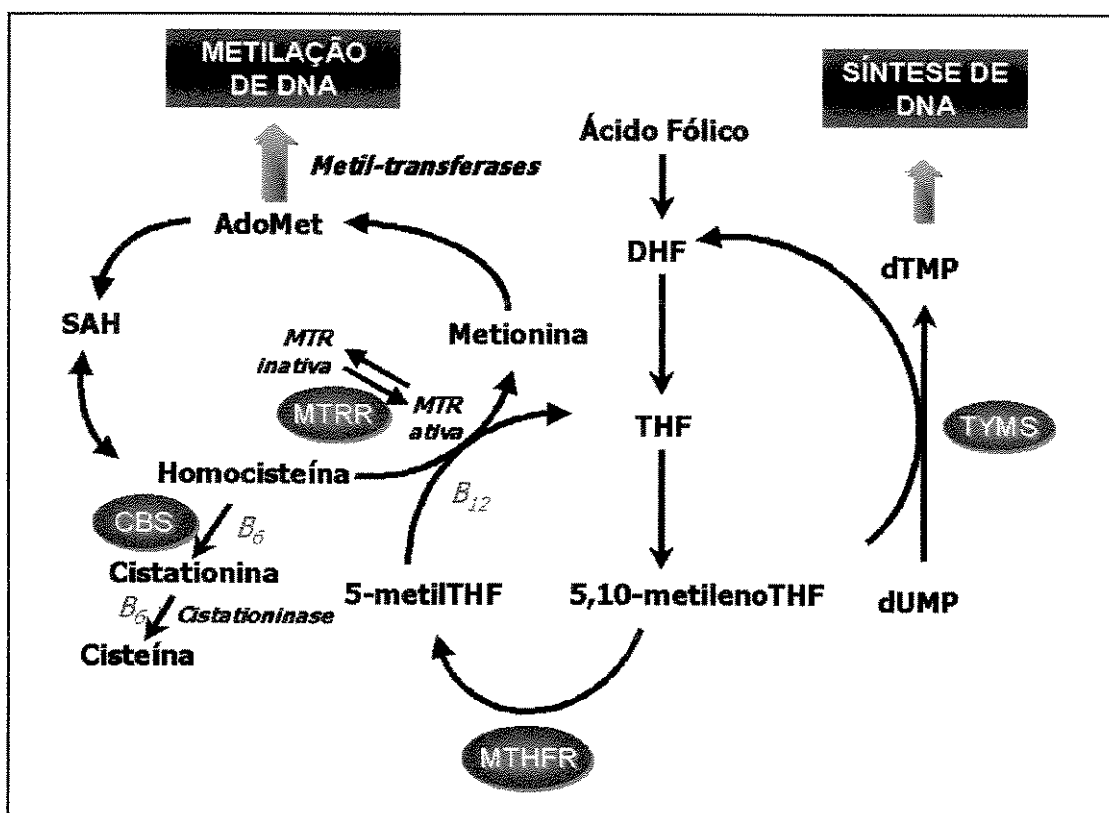


Figura 1 - Esquema do metabolismo do folato.

O ácido fólico é uma vitamina essencial já que deve ser adquirida através da dieta, sendo encontrada em carnes e vegetais, principalmente os de folhas verdes (MONTGOMERY et al., 1996). Após a absorção, o ácido fólico é rapidamente reduzido para dar origem primeiro ao ácido 7,8-dihidrofólico (DHF) e em seguida ao ácido tetrahidrofólico (THF) reduzido nas posições 5, 6, 7 e 8, que atua como aceptor de várias unidades monocarbônicas que se ligam preferencialmente nas posições 5 e 10, formando o 5,10-metilenoTHF (COOMES, 1998).

O ácido fólico normalmente se encontra associado à vitamina B₁₂ no metabolismo intracelular. Essa vitamina, também conhecida como cobalamina, apresenta-se em duas formas de coenzimas ativas: a metilcobalamina (CH₃B₁₂) e a desoxiadenosilcobalamina (CHANEY, 1998), porém é a metilcobalamina que desempenha papel importante no metabolismo do folato e conseqüentemente na metilação do DNA.

O padrão de metilação do DNA na célula é estabelecido e mantido por DNA metil-transferases (CLARK et al., 1995; OKANO et al., 1999; BESTOR, 2000; VILKAITIS et al., 2001) que utilizam a S-adenosil -L- metionina (AdoMet) como doadora de grupos metil (BESTOR, 2000). A maior fonte desses grupos utilizada pela AdoMet para as reações de metilação é a síntese *de novo* de unidades de um carbono, garantida pelo metabolismo do folato (SELHUB, 1999).

Como mostra a Figura 1, a AdoMet tem como precursora a metionina (Met) que, por sua vez, é obtida a partir da remetilação da homocisteína (Hci). Duas enzimas específicas estão envolvidas diretamente nesse processo: a **metionina sintetase (MTR)**, que usa o 5-metilTHF como doador de metil para a remetilação da Hci a Met, e a **metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)**, considerada uma enzima chave no metabolismo do folato, que disponibiliza o 5-metilTHF utilizado na reação supracitada a partir da conversão irreversível do 5,10-metilenoTHF (FRISO et al., 2002).

A **metionina sintetase redutase (MTRR)** é a enzima que mantém a MTR no estado ativo e por isso é de grande importância no metabolismo. Isso acontece porque a cobalamina, cofator da MTR que tem papel essencial na reação de transferência do grupo metil agindo como um carregador intermediário entre o 5-metilTHF e a Hci (FENTON e ROSENBERG, 1995; ROSENBLATT, 1995), torna-se oxidada, levando à inatividade da MTR. A regeneração dessa enzima é obtida por um sistema complexo de oxidação-redução dependente de NADPH catalisado pela MTRR (VILASECA et al., 2003).

A disponibilidade do 5-metilTHF garantida pela reação catalisada pela MTHFR é, portanto, fundamental para garantir o sucesso do processo de metilação. A enzima **timidilato sintetase (TYMS)**, que está envolvida na síntese de desoxitimidina necessária para síntese e reparo do DNA (BROWN et al., 2004; RAHMAN et al., 2004), compete com a MTHFR pelo substrato 5,10-metilenoTHF (Figura 1). Portanto alterações nas atividades dessas enzimas (MTHFR e TYMS), bem como na obtenção de folato pela dieta, afetam os níveis de 5-metilTHF e Hci plasmáticos (ROSENBLATT, 1999; FRISO et al., 2002; JAMES et al., 2002; TRINH et al., 2002).

Além da óbvia influência de variações da concentração de 5-metilTHF no metabolismo, o aumento de Hci no plasma está também ligado a hipometilação do DNA (JACOB et al., 1998; RAMPERSAUD et al., 1999). A Hci é obtida a partir da hidrólise da S-adenosilhomocisteína (SAH), através de uma reação reversível (Figura 1). Embora o equilíbrio dinâmico das reações favoreça fortemente a formação de SAH, a constante remoção da Hci do plasma, leva a síntese predominante da Hci (FINKELSTEIN, 1998). Contudo, o aumento dessa molécula provocada por uma falha no processo remoção, leva a uma formação preferencial de SAH, que tem uma alta afinidade de ligação com a região catalítica da maioria das metil-transferases que agem sobre a AdoMet, inibindo dessa forma, o processo de metilação (HOFFMAN et al., 1980; JAMES et al., 2002).

Como mostra a Figura 1, a homocisteína plasmática é removida de duas formas: por remetilação à metionina, catalisada pela MTR e com participação indireta da MTRR e MTHFR, ou por transulfuração à cisteína, reação que precisa numa etapa inicial da enzima **cistationina β -sintetase (CBS)** dependente de vitamina B₆.

Portanto existe uma forte interação gene-gene, gene-ambiente que regulam o metabolismo do folato. Deficiências crônicas em nutrientes como folato, vitamina B₆ e vitamina B₁₂, bem como polimorfismos que prejudicam o funcionamento de enzimas como MTHFR, MTRR, MTR, TYMS e CBS, podem independentemente ou interativamente desregular o funcionamento normal do metabolismo e aumentar os níveis de Hci, bem como alterar a extensão da metilação do DNA.

1.4 - ASPECTOS GENÉTICOS

1.4.1 - MTHFR

O gene que codifica a enzima MTHFR foi mapeado por GOYETTE et al. (1994), se localiza na região 1p36.3 e é composto por 11 exons (GOYETTE, 1998). A proteína composta de 656 aminoácidos é um homodímero e apresenta um peso molecular de aproximadamente 150KDa. Possui dois domínios espacialmente distintos: um domínio amino-terminal catalítico dependente de FAD e um domínio carboxi-terminal que contém o sítio de ligação para a AdoMet (SUMMER et al., 1986).

O gene *MTHFR* possui diversas variantes alélicas e algumas delas estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Algumas variantes alélicas do gene *MTHFR*.

MUTAÇÃO	MUDANÇA DE AMINOÁCIDO	SÍTIO DE RESTRIÇÃO ALTERADO	Referência:
482G→A	ARG158GLN	<i>PstI</i>	GOYETTE et al.,1994
559C→T	ARG184TER	<i>FokI</i>	GOYETTE et al.,1994
677C→T	ALA222VAL	<i>HinfI</i>	FROSST et al.,1995
983A→G	ASN324SER		KLUIJTMANS et al.,1998
1027T→G	TRP339GLY		KLUIJTMANS et al.,1998
1081C→T	ARG→CYS	<i>HhaI</i>	TONETTI et al., 2000
1084C→T	ARG→TER		KLUIJTMANS et al.,1998
1298A→C	GLU429ALA	<i>MboII</i>	VAN DER PUT et al.,1998
1711C→T	ARG→TER		KLUIJTMANS et al.,1998
1755G→A	MET581ILE		SELZER et al., 2003

Em negrito, as variantes alélicas utilizadas nessa pesquisa.

Dentre as variantes descritas do gene *MTHFR*, as principais e mais estudadas são a substituição de uma citosina por uma timina na posição 677 do transcrito (677C→T), levando a substituição de uma alanina por uma valina na posição 222 da proteína (FROSST et al., 1995) e a substituição de uma adenina por uma citosina na posição 1298 do transcrito (1298A→C), levando a troca de um ácido glutâmico por uma alanina, na posição 429 na proteína (VAN DER PUT et al., 1998).

Ensaio realizados '*in vitro*' demonstram que a variante polimórfica 677T leva a produção de uma enzima termolábil com atividade reduzida (FROSST et al., 1995; VAN DER PUT et al., 1998). Indivíduos heterozigotos apresentam uma redução de 35%, enquanto homozigotos para o polimorfismo apresentam redução de

70% na atividade enzimática (FROSST et al., 1995). Com relação à associação com os níveis plasmáticos de Hci, indivíduos homozigotos 677T apresentam concentração duas vezes superior à observada em indivíduos com outros genótipos (VAN DER PUT et al., 1995; VAN DER PUT et al., 1996). FRISO et al. (2002) encontraram também uma diminuição significativa da metilação do DNA (metil-citosinas), em indivíduos homozigotos 677T, quando comparado a outros genótipos, em caso de dieta pobre em folato.

O polimorfismo 1298A→C, também está associado à redução de atividade da MTHFR, mais pronunciada em homozigotos que em heterozigotos. Porém ensaios realizados '*in vitro*' não associam essa variante ao surgimento de uma enzima termolábil.

A ocorrência de nascimento de crianças com síndrome de Down (SD) tem sido ligada a enzimas que fazem parte do metabolismo do folato (JAMES et al., 1999; HOOBS et al., 2000). Alterações nos genes que codificam essas enzimas resultam, na maioria das vezes em diminuição da concentração de metionina e aumento nos níveis plasmáticos de Hci, dois fatores que individualmente e interativamente levam a deficiência na metilação do DNA (Seção 1.3). Recentemente JAMES et al. (1999) demonstraram que devido a essa deficiência enzimática existe um aumento de risco para nascimento de crianças com síndrome de Down. Nesse estudo, foi determinada a frequência da variante 677T da enzima MTHFR entre mães de crianças com SD e num grupo controle e a diferença encontrada foi estatisticamente significativa, identificando, portanto esse polimorfismo como fator de risco adicional para não-disjunção meiótica. Posteriormente, HOBBS et al. (2000) expandiram os estudos desenvolvidos por JAMES et al. (1999), reavaliando essa associação e analisando uma segunda enzima, a MTRR. O polimorfismo estudado, foi a substituição de uma adenina por uma guanina no nucleotídeo 66, que resulta na substituição de uma isoleucina por uma metionina, descrito por WILSON et al. (1999). Foi encontrado um aumento significativo de homozigotos 66G entre mães de crianças com SD. A associação entre o genótipo heterozigoto composto 677T/1298C do gene *MTHFR* e o aparecimento de gestações com SD também já foi encontrada por GRILLO et al. (2002) ($p < 0,001$). Nesse estudo realizado na região de Campinas foram analisadas 36 mães de indivíduos SD para os polimorfismos 677C→T e 1298A→C e as frequências encontradas foram comparadas com

200 indivíduos controles. Foi verificada uma proporção alélica significativamente diferente ($p < 0,02$), devida a um aumento na frequência das variantes polimórficas entre as mães de crianças com SD ($p < 0,01$).

Juntos, estes trabalhos evidenciam a existência de um componente genético na não-disjunção humana que, se confirmado, representa o primeiro contribuinte genético associado à segregação meiótica incorreta de cromossomos na espécie humana (HASSOLD et al., 2001). Para verificar se essa associação se limitava à não-disjunção do cromossomo 21, HASSOLD et al. (2001) testaram a frequência dos polimorfismos 677C→T do gene MTHFR e 66A→G do gene MTRR em trissomias dos cromossomos sexuais (47,XXX/47,XXY) e trissomias de cromossomos autossômicos (nos cromossomos 2, 7, 10, 13, 14, 15, 16, 18 e 22). Após comparar a distribuição destes genótipos, os autores encontraram um aumento significativo da variante 677T no gene da MTHFR entre mães de conceitos com trissomia do 18, e não encontraram nenhuma outra associação dentre as trissomias analisadas. No entanto, estudos subsequentes não encontraram essa relação (PETERSEN et al., 2001; CHADEFAUX-VEKEMAN et al., 2002; O'LEARY et al., 2002; STUIPPA et al., 2002).

1.4.2 - CBS

O gene que codifica a enzima CBS, se localiza no cromossomo 21 na região 21q22.3 (SKOVBY et al., 1984; MUNKE et al., 1985; MUNKE et al., 1988). Possui 23 exons, com tamanhos entre 42 e 299pb (KRAUSS et al., 1998).

Alterações no gene *CBS* estão relacionadas a duas anomalias até o momento descritas: a deficiência homozigótica é causa clássica de homocisteinúria (MUDD et al., 1995); a deficiência heterozigótica está envolvida em hiperhomocisteinemia (CLARKE et al., 1991; BOUSHEY et al., 1995).

O aumento de Hci plasmático está associado a uma série de fenótipos, como ao aumento do risco de doenças cardiovasculares precoces (CHRISTENSEN et al., 1997), câncer de cólon (LEVINE et al., 2000), malformações (ESKES, 1998; JAMES et al., 1999),

abortos recorrentes (HOLMES et al., 1999), desmielização do sistema nervoso central (SURTEES, 1998), doenças neuropsiquiátricas (BOTTIGLIERI, 1996; ARINAMI et al., 1997) e recentemente tem mostrado relação com a hipometilação do DNA (HOFFMAN et al., 1980; JAMES et al., 2002).

A maior parte das mutações nesse gene é de sentido trocado, levando à substituição de aminoácido. Algumas variantes alélicas estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Variantes alélicas freqüentes do gene *CBS*.

MUTAÇÕES	MUDANÇA DE AMINOÁCIDO	EXON	REFERÊNCIAS
341 C→T	A114V	3	KOZICH et al., 1993
374 G→A	G125A	3	SEBASTIO et al., 1995
374 G→A + 393 G→C	R125Q +E131D	3	MARBLE et al., 1994
434 C→T	P145L	3	KOZICH et al., 1993
T833C (I278T)	(I278T)	8	KOZICH e KRAUS, 1992
844ins68	-	8	SEBASTIO et al., 1995
G919A	G307S	8	HU et al., 1993

Em negrito, as variantes alélicas utilizadas nessa pesquisa.

Duas mutações são conhecidas como mais freqüentes entre pacientes com homocisteinúria: a substituição de uma timina por uma citosina na posição 833 do transcrito, levando à troca de uma isoleucina por uma treonina no códon 278 (I278T) e a substituição de uma guanina por uma adenina na posição 919 do transcrito, levando à troca de uma glicina por uma serina no códon 307 (G307S) (HU et al., 1993; TSAI et al., 1996). Juntas, essas mutações representam cerca de 40% de todos os alelos mutantes da CBS (MEIER et al., 2001).

A CBS humana possui um grupo heme que está relacionado à ligação com piridoxal 5' fosfato (PLP) (KERY et al., 1999). JANOSIK et al. (2001) publicaram observações sugerindo que a inabilidade de reconhecimento desse grupo, pode prejudicar a

formação da estrutura de tetrâmero da CBS, podendo ser esse o defeito primário que leva a hiperhomocisteinemia. Cinco mutações estão localizadas próximas ou no sítio heme (R58W, H65R, R224H, A226T e R266G/K), oito mutações afetam a região do sítio ativo da CBS que se liga ao cofator PLP (G148R, N228K, T257M, G259S, E302K, G305R, **G307S** e T353M) e seis mutações estão na interface do dímero (P88S, A114V, G116R, I152M, E176K e V180A). A maioria dessas mutações afeta a atividade da enzima através da desestabilização na estrutura da proteína.

Em um estudo realizado com um grupo de pacientes com doenças coronárias prematuras, TSAI et al. (1996) encontraram um aumento na frequência de uma inserção de 68pb na região codificadora do exon 8. Este polimorfismo (844ins68) foi descrito anteriormente por SEBASTIO et al. (1995) que assumiu que essa inserção introduzia um códon de parada prematuro que resultaria em uma CBS não funcional, levando desta forma, ao aumento de Hci no plasma. Por outro lado, TSAI et al. (1996) descobriram que essa inserção cria um sítio de '*splicing*' alternativo que elimina não só a sequência inserida, como também uma mutação muito grave que geralmente está associada em *cis* com essa inserção, a I278T, conferindo a este polimorfismo, uma ação corretora que garantiria os níveis de Hci. Dessa forma existe uma contradição sobre o papel desse polimorfismo na concentração plasmática de Hci.

1.4.3 - TYMS

O gene que codifica a enzima TYMS foi mapeado por TAKEISHI et al. (1985), de uma biblioteca de cDNA de fibroblastos humanos. A proteína de 313 aminoácidos apresenta um peso molecular de aproximadamente 35,7 KDa. Foram identificados dois sinais de poliadenilação que dão origem a duas formas de RNA mensageiro: de 1,6 e 1,4 kb (TAKEISHI et al., 1985). O gene *TYMS* localiza-se no cromossomo 18 na região 18p11.32 (HORI et al., 1990). Na região 5' não traduzida (5'UTR – 5'untranslated region), existe um polimorfismo de repetição em tandem de 28 pb (TAKEISHI et al., 1985; TAKEISHI et al., 1989) e o número de repetições afeta os níveis de atividade da TYMS, atuando sobre a eficiência translacional, sem alterar a expressão gênica

(KAWAKAMI et al., 2001). Alelos com 3 repetições (3R) e com 2 repetições (2R) são os mais frequentes (MARSH et al., 1999; TRINH et al., 2002), dos quais a variante 3R resulta numa maior atividade da TYMS (HORIE et al., 1995; KAWAKAMI et al., 2001).

Como a TYMS compete com a MTHFR pela disponibilidade de 5,10-metilenotHF, TRINH et al. (2002) lançaram a hipótese de que o polimorfismo que aumenta a atividade dessa enzima (3R), poderia afetar os níveis de folato plasmáticos, e conseqüentemente, os níveis de homocisteína (Figura 1). De fato, o estudo realizado com 505 chineses de Singapura revelou uma associação significativa entre o polimorfismo 3R, em homozigose, com níveis baixos de folato no plasma, em contraste com um aumento da homocisteína, porém não estatisticamente significativo. Outra associação significativa verificada nesse trabalho foi a interação do alelo 3R do gene *TYMS* com o alelo 677T do gene *MTHFR*, nos níveis plasmáticos de folato e Hci. Os níveis de folato encontrados no plasma foram mais baixos e os de Hci mais elevados se comparados às outras combinações de genótipos possíveis ($p < 0,001$). Como mostra a Figura 1, tal interação é previsível, já que a queda de 5,10-metilenotHF ocasionada por aumento da remoção desse substrato pela TYMS, por causa da ação da variante vantajosa 3R, combinada com a baixa atividade da MTHFR, conferida pela variante 677T, leva ao prejuízo de síntese de 5-metilTHF e conseqüentemente ao aumento de Hci. Interações com a dieta também eram esperadas, uma vez que o suprimento deficiente de ácido fólico, levaria a queda de 5,10-metilenotHF produzida. Essa queda combinada com uma remoção mais eficiente levaria ao prejuízo da via garantida pela MTHFR (Figura 1). De fato, indivíduos 3R/3R (*TYMS*) com dieta pobre em folato, mostraram um aumento significativo dos níveis de Hci plasmáticos, quando comparados com os outros genótipos do *TYMS* ($p = 0,009$). Assim, em caso de dieta pobre em folato, a variante 3R/3R mostrou ser mais um determinante genético do estado de folato e Hci do plasma, independente do genótipo do *MTHFR* (TRINH et al., 2002). Num estudo feito com jovens saudáveis do norte da Irlanda, a associação entre os polimorfismos do *TYMS* e os níveis de folato e Hci plasmáticos não foi verificada (BROWN et al., 2004).

1.5 - POLIMORFISMOS E OUTRAS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

1.5.1 - Defeito do tubo neural (DTN)

A ingestão inadequada de folato durante a gravidez tem sido relacionada com defeitos na formação do tubo neural (*spina bifida*) em recém-nascidos (MRC Vitamin Study Research Group, 1991).

Estudos da epidemiologia de DTN, mielomeningocele e anencefalia, sugerem que estas malformações têm uma gênese multifatorial, ou seja, com a influência de fatores genéticos e ambientais. Um dos fatores ambientais com maior importância na ocorrência de DTN é a administração periconcepcional de ácido fólico às mães. A suplementação com ácido fólico reduz significativamente a ocorrência (CZEIZE e DUDAS, 1992) e recorrência (MRC Vitamin Study Research Group, 1991) de DTN.

O polimorfismo 677C→T foi o primeiro fator de risco genético associado ao DTN descrito (FROSST et al., 1995). Num trabalho posterior VAN DER PUT et al. (1998) analisaram também o polimorfismo 1298 A→C e verificaram que heterozigotos compostos (677T/1298C) resultam em características similares às observadas em homozigotos 677T.

Com relação ao polimorfismo 844ins68, do gene CBS, alguns estudos foram realizados para determinar a sua participação no aparecimento do DTN. Num estudo realizado por BOTTO e MASTROIACOVA (1998), a presença da variante polimórfica em homozigose se apresentou ligada a um aumento de 5 vezes na chance de desenvolvimento de DTN. Essa relação todavia, não foi encontrada em outros estudos (RAMBSTON et al., 1997; GIUSTI et al., 1999; SPEER et al., 1997).

Uma vez que tanto a síndrome de Down como DTN estão relacionados a polimorfismos do metabolismo do folato, é interessante imaginar que em famílias que possuam indivíduos com a síndrome também apresentem casos de DTN e vice-versa. De fato, BARKAI et al. (2003) encontraram um aumento significativo nos casos de síndrome de Down em famílias que possuíam eventos de DTN ($p < 0,00001$), e um aumento significativo de casos de DTN em famílias que apresentavam casos de síndrome de Down ($p < 0,001$), demonstrando, portanto, uma relação forte na etiologia das duas manifestações clínicas.

1.5.2 - Câncer e Leucemia

A ingestão inadequada de folato, além de predispor o nascimento de crianças com DTN, tem demonstrado influenciar o desenvolvimento de câncer, devido à indução de ocorrência de alterações citogenéticas e mutações, que resultam na presença de aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos (DUTHIE, 1999).

Estudos têm mostrado que níveis adequados de folato em indivíduos que são homozigotos para a variante 677T da MTHFR, têm uma relação na incidência de câncer colorretal (CHEN et al., 1996; MA et al., 1997). Isso porque câncer colorretal e leucemia são derivados de tecidos de rápida proliferação que têm maior exigência para síntese de DNA, sendo, portanto afetados pelo destino metabólico de ácido fólico (SKIBOLA et al., 1999). A etiologia da leucemia ainda permanece desconhecida. As leucemias são causadas por uma interação gene-ambiente, sendo relacionada a polimorfismos em múltiplos genes, o que levou SKIBOLA et al. (1999) a suporem que poderia haver uma correlação com polimorfismos da enzima MTHFR devido à associação entre níveis de folato e suscetibilidade a danos em células em rápida divisão. Os dados levantados nesse trabalho demonstraram que níveis adequados de ácido fólico e a presença da variante 677T do gene MTHFR desempenham um papel protetor importante no desenvolvimento de leucemia linfoblástica aguda (LLA) em adultos, uma vez que aumenta a disponibilidade de 5, 10 metileno THF para a produção de desoxitimidina, o que melhora a qualidade de síntese e de reparo de DNA (BROWN et al., 2004; RAHMAN et al.; 2004).

1.5.3 - Trombose

A hipótese que a hiperhomocisteinemia poderia causar doenças cardiovasculares foi sugerida em 1969 por McCULLY (1969). Já era conhecido que crianças com homocisteinúria devido à deficiência homozigótica da CBS apresentavam doenças arterianas que freqüentemente resultavam em morte por oclusão trombótica em órgãos vitais. McCULLY (1969) demonstrou mudanças pós-morte idênticas em uma criança com defeito genético no metabolismo da cobalamina, que também leva a hiperhomocisteinemia, sugerindo assim que o dano provocado nas artérias poderia ser consequência do aumento de Hci.

O primeiro estudo caso-controle que demonstrou uma associação entre o metabolismo anormal de Hci e doenças coronárias foi realizado por WILCKEN e WICKEN (1976). Nesse estudo a concentração de Hci foi significativamente maior em pacientes com doenças coronárias prematuras quando comparado com um grupo controle. Num estudo multi-cêntrico que incluiu 750 pacientes e 800 controles foi verificada que o aumento de Hci plasmático o dobra o risco de desenvolvimento de infarto de miocárdio e doenças vasculares (ROBINSON, 1990).

Muitos trabalhos têm relacionado a deficiência da MTHFR com eventos de trombose (KEIJZER et al., 2002; QUEFFEULOU et al., 2002; TONETTI et al., 2002). A variante termolábil da MTHFR, conferida pelo genótipo homozigoto 677T se mostrou associada ao surgimento de doenças coronárias (KANG et al., 1991). Esse resultado foi confirmado num estudo realizado com pacientes Irlandeses (GALLAGHER et al., 1996).

Assim, essas evidências mostram que existe uma ligação definitiva entre o aumento de Hci plasmático e quadros de trombose (TOWNEND et al., 1998).

2 - OBJETIVO

2.1 - OBJETIVO GERAL

Verificar se existe associação entre polimorfismos nos genes que codificam enzimas participantes do metabolismo do folato e a ocorrência de aberrações cromossômicas.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência na amostra de casais (CASO e CONTROLE), dos polimorfismos:
 - 677C→T e 1298A→C do gene *MTHFR*;
 - 844ins68, I278T e G307S do gene *CBS*;
 - 5'UTR_{tr} (2R ou 3R) do gene *TYMS*.
- Verificar se a distribuição dos polimorfismos estudados difere significativamente entre CASO e CONTROLE.

3 - JUSTIFICATIVA

A fim de detectar fatores de risco para o surgimento de aneuploidias, fenótipo esse que possui grandes implicações clínicas como detalhado na seção 1.1, foi utilizado como modelo de estudo, casais que apresentavam gestações com esse tipo de aberração cromossômica.

Frente às recentes descobertas da influência da metilação do DNA e dos níveis plasmáticos de homocisteína na instabilidade cromossômica, foram escolhidos como foco deste estudo enzimas que participam do metabolismo do folato, uma via bioquímica importante na síntese e metilação do DNA.

A escolha dos polimorfismos dos genes que codificam essas enzimas foi baseada na alta frequência com que se apresentam na população e no seu efeito na formação de variantes enzimáticas que levam a alteração dos níveis de Hci do plasma.

Assim, esse estudo pretende contribuir para a descoberta de mecanismos moleculares que aumentem o risco de surgimento de aneuploidias.

4 - SUJEITOS E MÉTODOS

O presente estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Anexos 1 e 2).

4.1 - DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de associação, ou seja, do tipo caso-controle. O estudo de associação é um estudo poderoso para detectar fatores de predisposição (STRACHAN E READ, 2002b). Nesse tipo de estudo a maior possibilidade de aparecimento de resultados falso-positivos está relacionada à escolha errada do grupo controle (LANDER E SCHORK, 1994; ANDERSON et al., 2002). O grupo controle deve representar assim, o perfil do grupo caso.

4.2 - SELEÇÃO DOS SUJEITOS DE PESQUISA

A pesquisa consistiu numa comparação entre casais, já que o mecanismo que leva ao surgimento da aneuploidia acontece geralmente nos genitores por não-disjunção cromossômica durante a gametogênese (ABRUZZO e HASSOLD, 1995). Foram incluídos na pesquisa, casais cujas gestações apresentavam cariótipo com aneuploidias, provenientes da clínica GENÉTICA MÉDICA E FORENSE e da Clínica Dr. Luís Henrique Giovannetti. O grupo controle se constituiu de casais atendidos na GENÉTICA MÉDICA E FORENSE e na Clínica Dr. Luís Henrique Giovannetti que apresentavam pelo menos uma gestação normal e nenhum histórico de gestações com aberrações cromossômicas.

Informações como idade e etnia dos participantes foram levantadas em bancos de dados ou por entrevista.

4.3 - TAMANHO AMOSTRAL

O grupo caso consistiu em 55 casais, 7 mães e 1 pai, que apresentaram gestação com aneuploidia. Os indivíduos que participaram sem o outro genitor entraram na análise apenas quando a amostra foi agrupada em pais e mães. A distribuição dos cariótipos se encontra na Tabela 3 e Anexo 4. O grupo controle consistiu em 67 casais.

Tabela 3 - Distribuição do cariótipo das gestações do grupo CASO.

CARIÓTIPO	CASAIS (N)
Monossomia do X	9
Trissomia do 21	28
Trissomia do 13	6
Trissomia do 18	12
Outros	8

4.4 - TÉCNICA

Após o consentimento dos participantes (Anexo 3), foram coletados 7 mL de sangue periférico para a extração do DNA e subsequente análise molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) e, quando necessário, digestão com enzimas de restrição específicas para cada polimorfismo. Essa coleta foi realizada utilizando tubo vacunteiner contendo 54µL de EDTA a 15%, para impedir a coagulação sanguínea.

4.4.1 - Extração de DNA do sangue periférico

A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2.000 rpm a temperatura ambiente para a separação e retirada do plasma. Em seguida, uma alíquota de 500 µL do sedimento foi transferida para um tubo de reação de 1,5 mL. A essa alíquota foi adicionado 1,0 mL de tampão de lise celular (Sacarose 320mM, Tris-HCl pH7,5 10mM, MgCl₂ 5mM, Triton 100X 1%). A solução foi então homogeneizada por 10 a 15 segundos e centrifugada a 8000

rpm por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente descartado, por inversão do tubo. Esse processo foi repetido por duas vezes. Ao precipitado formado foram adicionados 395µL de tampão de digestão (Tris-HCl pH 7,5 10mM, 10mM, NaCl 10mM, SDS 0,5%) e 5 µL de proteinase K (20mg/mL). A reação então foi homogeneizada e incubada em banho-maria à temperatura de 55°C. Após 2 horas foram adicionados 200 µL de LiCl 7,5N em cada amostra e as soluções foram levadas a temperatura de -20°C, por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para tubos novos. Após a transferência, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e o tubo foi invertido até formação de um precipitado visível. Foi realizada uma centrifugação à 13000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo. Ao precipitado foi adicionado 1mL de etanol 70% e nova centrifugação foi realizada (13000 rpm/5 min). O sobrenadante foi novamente descartado. O DNA obtido foi então secado à temperatura ambiente e ressuspensionado em água estéril. A eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose a 0,8%.

4.4.2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A análise dos polimorfismos enfocados nesse estudo se baseou na técnica da reação em cadeia da polimerase descrita por SAIKI et al. (1989). O procedimento utilizado em cada uma das reações está resumido na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentração dos reagentes utilizada na análise dos polimorfismos de *MTHFR*, *CBS* e *TYMS*.

REAGENTES EM 50µL DE REAÇÃO	<i>MTHFR</i>		<i>CBS</i>	<i>TYMS</i>
	677C→T	1298A→C	844ins68/ I278T/ G307S	5'UTR _{tr}
DNA (µg)	0,2	0,2	0,2	0,2
Tris-HCl pH 8,4 (mM)	20	20	20	20
KCl (mM)	50	50	50	50
MgCl ₂ (mM)	2	2	2	1,5
dNTP (mM-cada)	0,4	0,4	0,4	0,2
"primers" (µM-cada)	0,1	0,1	0,4	0,1
DMSO (%)	-	-	-	10
<i>Taq</i> polimerase (U)	2,5	2,5	2,5	2,5

Os "primers" utilizados para cada polimorfismo estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Descrição dos "primers" utilizados em cada reação.

Gene	Polimorfismo	Seqüência	
<i>MTHFR</i>	677C→T	Senso	5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'
		Anti-senso	5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'
	1298A→C	Senso	5'-CTTTGGGGAGCTGAAGGACTACTA-3'
		Anti-senso	5'-CACTTTGTGACCATTCCGGTTTG-3'
<i>CBS</i>	844ins68/ I278T/G307S	Senso	5'-CTGCCTTGAGCCCTGAAGCC-3'
		Anti-senso	5'-CTGGACTCGACCTACCGTCCT-3'
<i>TYMS</i>	5'UTR _{tr}	Senso	5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCCC-3'
		Anti-senso	5'-CCAAGCTTGGCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCGCGG-3'

O volume final da PCR estabelecido foi de 50µL. Após a adição dos reagentes (Tabela 4), a reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, com 7 minutos de incubação final a 72°C. As temperaturas de anelamento foram de 58, 51, 60 e 63°C, para os polimorfismos 677C→T, 1298A→C, 5'UTR_{tr} e 844ins68/1278T/G307S, respectivamente.

4.4.3 - Digestão com enzima de restrição e análise do polimorfismo

A análise do polimorfismo 677C→T do gene *MTHFR* foi realizada como descrito por FROSST et al. (1995). A substituição de nucleotídeos leva à formação de um sítio de restrição para a endonuclease *Hinf I*. Já o polimorfismo 1298A→C do mesmo gene, leva a perda de um sítio de restrição para a enzima *MboII* (VAN DER PUT et al., 1998).

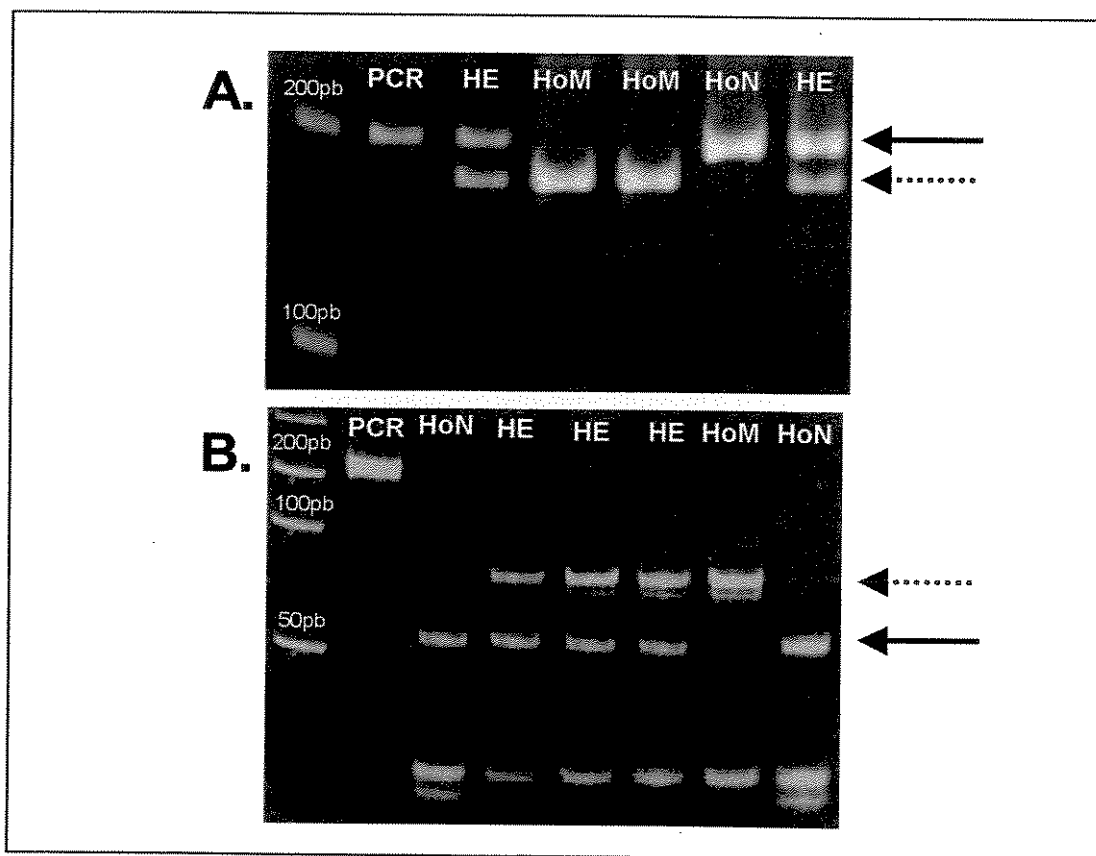


Figura 2: Exemplo de eletroforese em gel de acrilamida a 7% após análise do gene *MTHFR*. **A.** Polimorfismo 677C→T, onde (→) mostra o padrão C, e (···) mostra o padrão T; **B.** Polimorfismo 1298A→C, onde (→) mostra o padrão A, e (···) mostra o padrão C. *HoM*: homozigoto para o polimorfismo; *HoN*: homozigoto normal e *HE*: heterozigoto.

Para identificar o polimorfismo de repetição em tandem da região 5' não traduzida (5'UTRtr, 5' *untranslated region tandem repeat*) do gene *TYMS*, foi utilizado o método descrito por HORIE et al. (1995). O produto da PCR foi então submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida a 7%, onde a diferença de 28pb pôde facilmente ser visualizada.

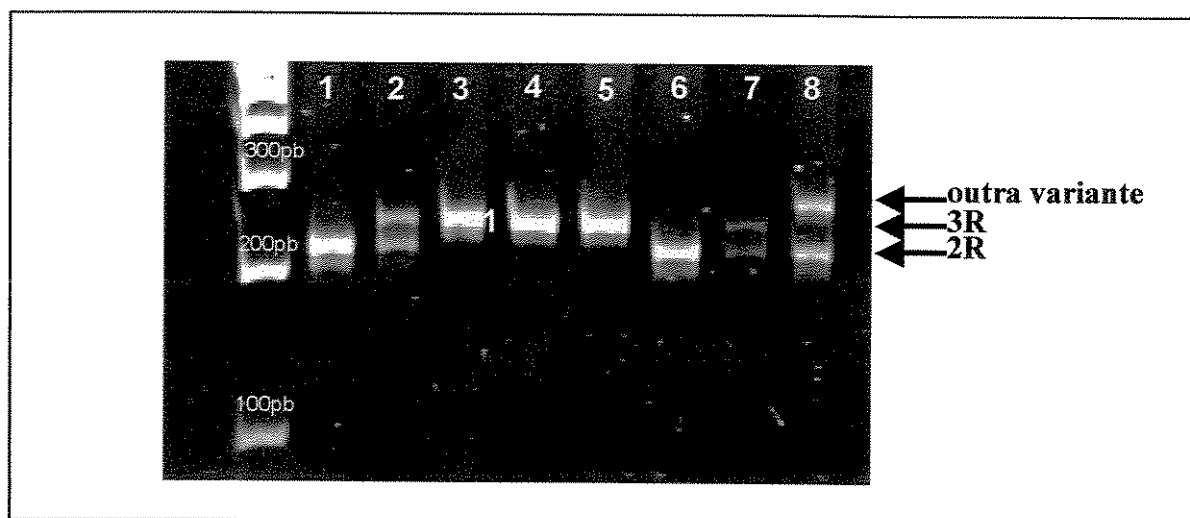
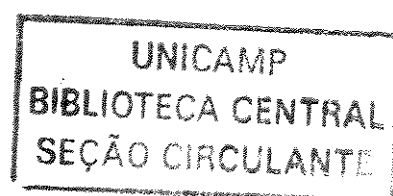


Figura 3 - Exemplo de eletroforese em gel de acrilamida a 7% após análise do gene *TYMS*. Linhas 1 e 6 apresentam indivíduos 2R/2R; linhas 2 e 7 apresentam indivíduos 2R/3R; linhas 3, 4 e 5 apresentam indivíduos 3R/3R e linha 8 apresenta indivíduo 2R/outra variante.

Finalmente, para a determinação dos polimorfismos do gene *CBS*, foi realizada a PCR do *exon* 8 seguida de visualização direta em gel de agarose a 2% (SEBASTIO et al., 1995), para a detecção do polimorfismo 844ins68 e digestão com as endonucleases de restrição *BseNI* e *AluI*, para a detecção dos polimorfismos I278T e G307S, respectivamente (HU et al., 1993; TSAI et al., 1996).



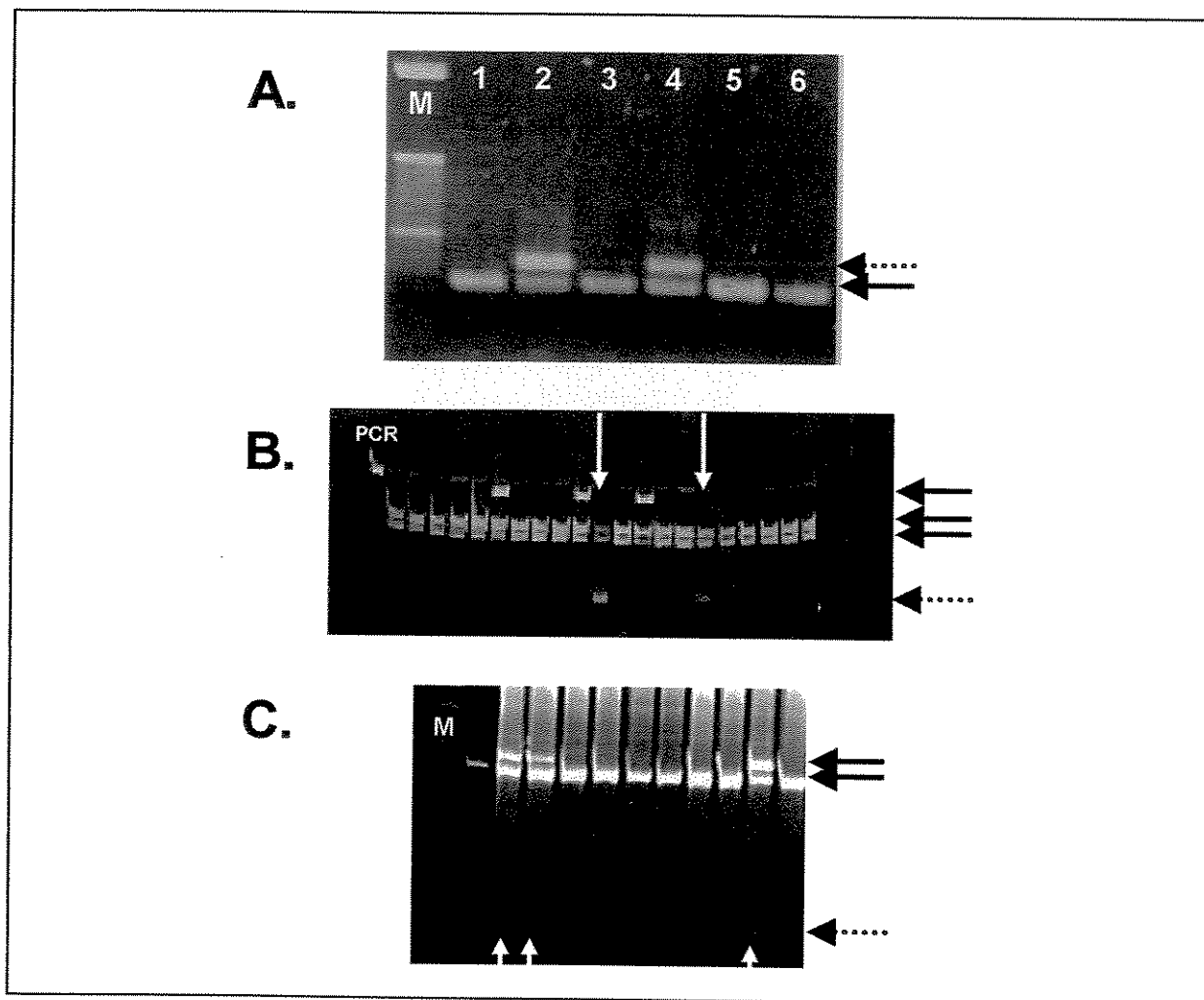


Figura 4 - Análise dos polimorfismos do gene *CBS*. *A.* Gel de agarose a 2% após análise do polimorfismo 844ins68. Linhas 1, 3, 5 e 6 apresentam indivíduos sem o polimorfismo; linhas 2 e 4 apresentam indivíduos heterozigotos para o polimorfismo 844ins68. *B.* Gel de acrilamida a 7% da análise do polimorfismo G307S, onde seta branca significa indivíduos heterozigotos para o polimorfismo. *C.* Gel de acrilamida a 7% da análise do polimorfismo I278T, onde seta branca significa indivíduos heterozigotos para o polimorfismo, (...▶) representa o fragmento característico do polimorfismo, enquanto (→) representa o fragmento característico de alelos normais e M=marcador de 100pb.

Todas as reações de digestão foram realizadas com incubação de 16 horas e as concentrações das enzimas, temperaturas de reação, bem como os tamanhos dos fragmentos esperados após análise de cada polimorfismo, estão resumidos na Tabela 6 e 7 (Figuras 2, 3 e 4).

Tabela 6 - Condições da reação de digestão.

Enzima de restrição	Quantidade (U) /15 µL de PCR	Temperatura °C
<i>MboII</i>	2,5	37
<i>HinfI</i>	5	37
<i>BseNI</i>	5	65
<i>Alu I</i>	5	37

Tabela 7 - Tamanhos dos fragmentos esperados para a análise dos polimorfismos após digestão enzimática específica.

TAMANHO (pb)					
Gene	Polimorfismo	PCR	Alelo 1	Alelo 2	Heterozigoto
MTHFR	677C→T	198	<u>198</u>	<u>175</u> e 23	198, 175 e 23
	1298A→C	163	<u>56</u> , 31, 30, 28 e 18	<u>84</u> , 31, 30 e 18	84, 56, 31, 30, 28 e 18
	844ins68	242 / 174	174	242	174 e 242
CBS		242	242	200 e 42	242, 200 e 42
	1278T	174	<u>174</u>	<u>132</u> e 42	174, 132 e 42
	G307S	174	<u>93</u> e 81	81, <u>49</u> e <u>44</u>	93, 81, 49 e 44
TYM	5'UTR _{tr}	248/220	248	220	248 e 220

Números sublinhados significam tamanhos utilizados para diferenciar alelo 1 do alelo 2.

4.5 - ANÁLISE DOS DADOS

Para comparar as variáveis categóricas (polimorfismos) entre os grupos CASO e CONTROLE, foram utilizados teste Qui-quadrado ou, quando necessário (presença de caselas vazias ou com valores inferiores a 5), o teste exato de Fisher e o teste *Odds Ratio* (OR), com intervalo de confiança (IC) de 95% (FLEISS, 1981). Esses testes foram realizados no programa computacional EpiInfo 2000™, versão 1.1.2.

Para analisar conjuntamente os polimorfismos entre os grupos, foi utilizada a análise de regressão logística (CONOVER, 1971; SIEGEL, 1975; HOSMER e LEMESHOW, 1989). Inicialmente foi realizada a análise univariada e em seguida, a análise multivariada usando o critério 'Stepwise' de seleção das variáveis. Essa análise foi realizada utilizando o programa *SAS System for Windows (Statistical Analysis System)*, versão 6.12.

Foram considerados significativos, resultados onde $p < 0,05$. Na realização de múltiplas comparações, por exemplo quando se compara dois genes, os valores de p significativos, foram corrigidos a fim de se evitar resultados falso-positivos. Essa correção consistiu na multiplicação do valor de p encontrado pelo número de comparações realizadas (SVEJGAARD e RYDER, 1994). Na análise de OR, foram consideradas significativas análises onde o IC não passavam pelo valor 1, pois nesse caso a frequência em que os alelos se apresentam em ambos os grupos é estatisticamente a mesma.

5 - RESULTADOS

5.1 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A média de idade entre os casais que apresentavam gestações com aberrações cromossômicas (CASO) foi de 36,07, com desvio padrão de 6,94 e de 35,25, com desvio padrão de 10,96 entre os casais que apresentavam gestações normais (CONTROLE 1), distribuídos como mostra a Tabela 8.

Tabela 8 - Caracterização da amostra, com relação à idade (CASO e CONTROLE).

		MÉDIA ($\bar{X}$)	DESVIO PADRÃO (s)
CASO	Mãe	35,52	6,34
	Pai	36,69	7,59
	CASAL	36,07	6,94
CONTROLE	Mãe	32,12	9,71
	Pai	38,39	11,31
	CASAL	35,25	10,96

Com relação à origem étnica, 98,08% dos CASOS eram caucasóides e 1,92% negróides, enquanto 92,78% dos CONTROLES 1 eram caucasóides, e 7,22% eram negróides.

Com a finalidade de explorar melhor os dados obtidos, foi também utilizado como outro parâmetro de comparação, um grupo controle (CONTROLE 2) composto de 388 doadores de sangue não relacionados, sendo 190 mulheres e 198 homens (BERTUZZO, 2003). A média de idade descrita nesse estudo foi de 47, 39 anos ($s=12,53$), sendo 79,9% representados por indivíduos caucasóides e 20,1%, negróides.

5.2 - DISTRIBUIÇÃO DOS ALELOS NA AMOSTRA

Entre os casais com aneuploidia analisados (CASO), as frequências encontradas das variantes 1298C e 677T do gene *MTHFR* foram de 0,26 e 0,33, respectivamente. Para o gene *TYMS*, a frequência das variantes 2R, 3R e 4R foi de 0,375, 0,62 e 0,005, respectivamente. Com relação ao gene *CBS*, as variantes I278T, G307S e 844ins68 atingiram as frequências de 0,078, 0,039 e 0,069, respectivamente. Esse grupo se encontra em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) com relação às variantes do gene *MTHFR* ($\chi^2_{(5)} = 5,47$; $p=0,36$), do gene *TYMS* ($\chi^2_{(3)} = 0,21$; $p=0,90$) e do gene *CBS* ($\chi^2_{(5)} = 2,32$; $p=0,68$). A distribuição genotípica se encontra resumida na Tabela 9 e listada no Anexo 4.

Tabela 9 - Distribuição genotípica dos indivíduos CASO.

<i>MTHFR</i>	<i>CBS</i>	1278T+844ins68/N	1278T+844ins68/G307S	1278T/G307S	G307S /N	N/N	TOTAL
	<i>TYMS</i>						
677T/677T	2R/2R	-	-	-	-	-	0
677T/677T	2R/3R	-	-	1	1	5	7
677T/677T	3R/3R	2	-	-	-	4	6
677T/N	2R/2R	1	-	-	-	2	3
677T/N	2R/3R	2	-	-	-	7	9
677T/N	3R/3R	-	-	-	-	15	15
677T/1298C	2R/2R	1	-	-	-	3	4
677T/1298C	2R/3R	3	-	-	1	8	12
677T/1298C	3R/3R	1	-	-	1	6	8
677T/1298C	3R/4R	-	-	-	-	1	1
1298C/1298C	2R/2R	-	-	-	-	-	0
1298C/1298C	2R/3R	-	-	-	1	-	1
1298C/1298C	3R/3R	-	-	-	-	1	1
1298C/N	2R/2R	-	-	-	-	7	7
1298C/N	2R/3R	2	-	-	1	11	14
1298C/N	3R/3R	2	-	-	-	6	8
N/N	2R/2R	-	-	-	-	2	2
N/N	2R/3R	1	1	-	-	7	9
N/N	3R/3R	-	-	-	1	7	8
TOTAL		15	1	1	6	92	115

N=alelo sem polimorfismo.

Entre os indivíduos do CONTROLE 1, as frequências encontradas das variantes 1298C e 677T do gene *MTHFR* foram de 0,27 e 0,34, respectivamente. Para o gene *TYMS*, a frequência das variantes 2R, 3R e 4R foi de 0,459, 0,534 e 0,007, respectivamente. Com relação ao gene *CBS*, as variantes I278T, G307S e 844ins68 atingiram as frequências de 0,097, 0,0 e 0,097, respectivamente. Esse grupo se encontra em EHW com relação às variantes do gene *MTHFR* ($\chi^2_{(5)} = 0,49$; $P=0,99$), do gene *TYMS* ($\chi^2_{(3)} = 4,80$; $p=0,18$) e do gene *CBS* ($\chi^2_{(5)} = 0,02$; $p=0,99$). A distribuição genotípica se encontra resumida na Tabela 10 e listada no Anexo 5.

Tabela 10 - Distribuição genotípica dos indivíduos CONTROLE 1.

<i>MTHFR</i>	CBS <i>TYMS</i>	1278T+844ins68/1278T+844ins68	1278T+844ins68/N	N/N	TOTAL
677T/677T	2R/2R	-	1	4	5
677T/677T	2R/3R	-	-	3	3
677T/677T	3R/3R	-	2	3	5
677T/N	2R/2R	-	2	8	10
677T/N	2R/3R	-	2	13	15
677T/N	3R/3R	-	2	11	13
677T/N	2R/4R	-	1	-	1
677T/1298C	2R/2R	-	2	4	6
677T/1298C	2R/3R	-	2	5	7
677T/1298C	3R/3R	-	2	9	11
677T/1298C	2R/4R	-	-	1	1
1298C/1298C	2R/2R	-	-	2	2
1298C/1298C	2R/3R	-	-	4	4
1298C/1298C	3R/3R	-	1	2	3
1298C/N	2R/2R	-	1	5	6
1298C/N	2R/3R	-	1	15	16
1298C/N	3R/3R	-	2	6	8
N/N	2R/2R	-	2	5	7
N/N	2R/3R	-	1	3	4
N/N	3R/3R	1	-	6	7
TOTAL		1	24	109	134

N=alelo sem polimorfismo.

Entre os indivíduos do CONTROLE 2, a frequência gênica encontrada foi de 0,29 para a variante 677T e de 0,22 para a variante 1298C do gene *MTHFR*. Esse grupo se encontra em EHW ($\chi^2_{(5)} = 2,66; p=0,75$). A distribuição genotípica está resumida na Tabela 11.

Tabela 11 - Distribuição das variantes 677T e 1298C do gene *MTHFR* entre os indivíduos do CONTROLE 2.

<i>MTHFR</i>	No.	%
677T/677T	37	9,6
677T/N	118	30,4
677T/1298C	37	9,5
1298C/1298C	22	5,7
1298C/N	87	22,4
N/N	87	22,4
Total	388	

N=alelo sem polimorfismo.

5.3 - *MTHFR*

Como mostra a Tabela 12, com relação à distribuição genotípica geral do *MTHFR*, não existe diferença significativa (mães - $\chi^2= 5,11$; $p=0,40$; pais - $\chi^2=6,96$; $p=0,22$; casais - $\chi^2= 5,71$; $p=0,33$). Porém, através da análise realizada para cada genótipo contra o restante dos indivíduos, foi verificado um aumento significativo do genótipo 1298C/N, entre as mães de indivíduos aneuplóides.

Tabela 12 - Comparação dos genótipos de *MTHFR* entre indivíduos CASO e CONTROLE
1.

<i>MTHFR</i>	MÃES		PAIS		CASAIS	
	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR
	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)
N/N	0,2 (0,65)	0,82	0,02 (0,89)	1,07	0,36 (0,55)	1,24
	11/14	(0,31-2,13)	8/9	(0,34-3,34)	19/18	(0,58-2,63)
677T/N	0,39 (0,53)	0,79	1,32 (0,25)	0,58	1,26 (0,26)	0,72
	19/24	(0,36-1,76)	8/15	(0,20-1,62)	27/39	(0,39-1,33)
677T/677T	0,66 (0,42)	0,59	1,44 (0,23)	1,95	0,12 (0,73)	1,15
	4/7	(0,14-2,41)	9/6	(0,58-6,70)	13/13	(0,48-2,79)
677T/1298C	0,09 (0,77)	0,86	1,45 (0,23)	1,65	0,44 (0,50)	1,23
	9/11	(0,30-2,48)	17/14	(0,67-4,06)	26/25	(0,64-2,38)
1298C/1298C	0,27 (0,61)	0,53	3,76 (0,05)	0,16	3,79 (0,05)	0,24
	1/2	(0,02-7,77)	1/7	(0,01-1,33)	31/30	(0,03-1,22)
1298C/N	4,70 (0,03)	2,64	0,01 (0,93)	0,96	0,52 (0,47)	1,24
	18/9	(1,00-7,08)	13/16	(0,38-2,41)	31/30	(0,67-2,29)
TOTAL	5,11		6,96		5,71	
	(0,40)		(0,22)		(0,33)	
	62/67		56/67		118/134	

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

N= ausência dos polimorfismos analisados

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Em itálico: valores limítrofes

Quando se compara o grupo CASO com um controle maior, como o CONTROLE 2, muitas associações podem ser verificadas. Existe uma diferença significativa da distribuição genotípica entre CASO e CONTROLE 2 detectada no grupo geral ($\chi^2= 18,66$; $p=0,002$) e entre pais ($\chi^2= 19,25$; $p=0,002$). Essa variação se deve a um aumento do genótipo heterozigoto composto (677T/1298C) e uma queda da frequência do genótipo 677T/N entre pais de indivíduos aneuplóides (Tabela 13). Segundo a análise de OR, o genótipo heterozigoto composto leva a um aumento de aproximadamente 2 vezes e meia no risco do aparecimento de aneuploidias. Esse risco pode variar de 1,5 a 4,8 vezes.

Tabela 13 - Comparação dos genótipos de *MTHFR* entre indivíduos CASO e CONTROLE 2.

	MÃES		PAIS		CASAIS	
<i>MTHFR</i>	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR
	N CASO/ N	(IC 95%)	N CASO/ N	(IC 95%)	N CASO/ N	(IC 95%)
	CONTROLE 1		CONTROLE 1		CONTROLE 1	
N/N	0,54 (0,46)	0,76	1,88 (0,17)	0,57	2,18 (0,14)	0,66
	11/42	(0,34-1,67)	8/45	(0,23-1,36)	19/87	(0,37-1,18)
677T/N	0,11 (0,74)	1,11	6,97 (0,008)	0,35	2,51 (0,11)	0,68
	19/54	(0,57-2,17)	8/64	(0,14-0,82)	27/118	(0,41-1,13)
677T/677T	0,54 (0,46)	0,66	1,87 (0,17)	1,80	0,22 (0,63)	1,17
	4/18	(0,18-2,18)	9/19	(0,70-4,55)	13/19	(0,57-2,39)
677T/1298C	2,38 (0,12)	1,98	12,44 (0,0004)	3,49	12,97(0,0003)	2,68
	9/15	(0,75-5,16)	17/22	(1,60-7,62)	26/37	(1,49-4,82)
1298C/1298C	3,10 (0,08)	0,19	0,44 (0,51)	0,50	3,16 (0,08)	0,29
	1/15	(0,01-1,43,)	1/7	(0,02-4,15)	2/22	(0,05-1,29)
1298C/N	0,57 (0,45)	1,28	0,16 (0,68)	1,16	0,75 (0,39)	1,23
	18/46	(0,64-2,54)	13/41	(0,54-2,48)	31/90	(0,75-2,03)
	6,48					
TOTAL	(0,26)		19,25 (0,002)		18,66 (0,002)	
	62/190		56/198		118/388	

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

N= ausência dos polimorfismos analisados

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Em itálico: valores limítrofes

Entre os 28 casais que apresentaram gestação de embriões com trissomia do cromossomo 21, a distribuição genotípica não difere significativamente do CONTROLE 1, como mostra a Tabela 14.

Tabela 14 - Comparação dos genótipos de *MTHFR* entre casais com gestação com trissomia 21 (CASO) e indivíduos CONTROLE 1.

<i>MTHFR</i>	MÃES		PAIS		CASAIS	
	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR
	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)
N/N	0,00 (0,95)	1,03	0,61 (0,43)	1,61	1,55 (0,21)	1,69
	6/14	(0,31-3,39)	5/	(0,41-6,16)	11/18	(0,68-4,15)
677T/N	1,05 (0,30)	0,60	2,50 (0,11)	0,30	2,93 (0,09)	0,50
	7/24	(0,20-1,77)	2/15	(0,04-1,56)	9/39	(0,20-1,19)
677T/677T	0,00 (0,97)	1,03	0,02 (0,88)	0,88	0,0 (0,96)	0,97
	3/7	(0,19-4,96)	2/6	(0,11-5,42)	5/13	(0,28-3,14)
677T/1298C	0,07 (0,79)	0,85	0,52 (0,47)	1,47	0,11 (0,74)	1,14
	4/11	(0,20-3,31)	7/14	(0,45-4,73)	11/25	(0,48-2,69)
1298C/1298C	0,02 (0,88)	1,20	0,12 (0,72)	0,75	0,07 (0,79)	0,83
	1/2	(0,0-18,07)	2/7	(0,10-4,39)	3/9	(0,17-3,55)
1298C/N	1,89 (0,16)	2,15	0,16 (0,68)	1,24	0,34 (0,56)	1,24
	7/9	(0,62-7,39)	7/9	(0,34-3,90)	14/30	(0,56-2,75)
	2,36		3,21		3,90 (0,56)	
TOTAL	(0,80)		(0,67)		53/134	
	28/67		25/67			

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

N= ausência dos polimorfismos analisados

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Em itálico: valores limítrofes

5.4 - CBS

Com relação ao gene CBS, a distribuição genotípica difere significativamente entre CASO e CONTROLE 1 ($\chi^2 = 12,28$; $p = 0,03$). Essa diferença se deve a um aumento da variante G307S entre mães de embriões com aneuploidias. Esse polimorfismo não foi detectado no grupo CONTROLE 1. Como mostra a Tabela 15, foi detectada uma diminuição do genótipo I278T+844ins68/N entre as mães CASO ($\chi^2 = 4,22$; $p = 0,04$).

Tabela 15 - Comparação dos genótipos de CBS entre indivíduos CASO e CONTROLE 1.

CBS	MÃES		PAIS		CASAIS	
	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR
	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)
I278T+844ins68/	-	-	0,80 (0,55)*	0,0	0,87 (0,53)*	0,0
I278T+844ins68			0/1	(0,0-22,12)	0/1	(0,0-2013)
I278T+844ins68/	4,22 (0,04)	0,33	0,28 (0,60)	1,30	1,84 (0,18)	0,62
N	5/14	(0,10-1,08)	10/10	(0,45-3,74)	15/24	(0,29-1,31)
I278T+844ins68/	1,09 (0,48)*	-	-	-	1,16 (0,46)*	-
G307S	1/0				1/0	
I278T/ G307S	1,09 (0,48)*	-	1,25 (0,44)*	-	2,33 (0,21)*	-
	1/0		1/0		2/0	
G307S/N	4,46 (0,05)	-	2,52 (0,19)*	-	7,10 (0,009)*	-
	4/0*		2/0		6/0	
N/N	0,20 (0,65)	1,22	1,10 (0,29)	0,62 (0,23-1,66)	0,16 (0,69)	0,88
	51/53	(0,47-3,22)	41/56		92/109	(0,45-1,72)
	10,12		4,98		12,28	
TOTAL	(0,04)		(0,30)		(0,03)	
	62/67		54/67		116/134	

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

N= ausência dos polimorfismos analisados

*=exato de Fisher

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Em itálico: valores limítrofes

Entre casais que apresentavam gestações de embriões com trissomia do 21, nenhuma associação significativa foi detectada (Tabela 16).

Tabela 16 - Comparação dos genótipos de *CBS* entre casais com gestação com trissomia 21 (CASO) e indivíduos CONTROLE 1.

	MÃES		PAIS		CASAIS	
	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR
<i>CBS</i>	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)
I278T/N	2,67 (0,10)	0,29	0,34 (0,56)	1,42	0,61 (0,44)	0,70
	2/14	(0,04-1,51)	5/10	(0,18-2,21)	7/24	(0,25-1,86)
N/N	1,39 (0,24)	2,20	0,69 (0,40)	0,62	0,07 (0,79)	1,12
	25/53	(0,52-10,66)	19/56	(0,23-1,66)	44/109	(0,45-2,83)
TOTAL	4,86		3,47		5,97	
	(0,09)		(0,32)		(0,11)	

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

N= ausência dos polimorfismos analisados

5.5 - TYMS

Como mostra a Tabela 17, a distribuição genotípica do gene *TYMS* é significativamente diferente entre mães (CASO e CONTROLE 1) ($\chi^2 = 7,98$; $p = 0,046$). Isso acontece por causa do aumento de mães com genótipo 2R/3R ($\chi^2 = 4,20$; $p = 0,04$) e diminuição de mães com genótipo 2R/2R ($\chi^2 = 4,60$; $p = 0,03$) no grupo caso. Como mostra o teste de OR, o genótipo homozigoto 2R, confere proteção (0,5; IC 0,25-0,98). Essa proteção também é verificada quando são analisadas apenas as mães com gestação de embriões com trissomia do 21 ($\chi^2 = 4,93$; $p = 0,026$) (Tabela 18).

Tabela 17 - Comparação dos genótipos de *TYMS* entre indivíduos CASO e CONTROLE 1.

	MÃES		PAIS		CASAIS	
<i>TYMS</i>	$\chi^2 (p)$ N CASO/ N CONTROLE 1	OR (IC 95%)	$\chi^2 (p)$ N CASO/ N CONTROLE 1	OR (IC 95%)	$\chi^2 (p)$ N CASO/ N CONTROLE 1	OR (IC 95%)
2R/2R	4,60 (0,03)	0,40	0,82 (0,36)	0,64	4,73 (0,03)	0,5
	10/22	(0,16-1,01)	8/14	(0,22-1,83)	18/36	(0,25-0,98)
2R/3R	4,20 (0,04)	2,14	0,11 (0,74)	0,89	1,42 (0,23)	1,36
	28/19	(0,97-4,77)	23/30	(0,40-1,94)	51/49	(0,79-2,34)
3R/3R	0,05 (0,83)	1,08	0,72 (0,40)	1,38	0,56 (0,45)	1,22
	23/24	(0,50-2,37)	23/23	(0,62-3,07)	46/47	(0,70-2,10)
2R/4R	1,85 (0,27)*	0,0	-	-	1,75 (0,28)*	0,0
	0/2	(0,0-4,51)			0/2	(0,0-4,71)
3R/4R	-	-	1,23 (0,45)	-	1,16 (0,28)*	-
			1/0		1/0	
	7,98		2,40		7,80	
TOTAL	(0,046)		(0,49)		(0,10)	
	61/67		55/67		116/134	

*=exato de Fisher

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Tabela 18 - Comparação dos genótipos de *TYMS* entre casais com gestação com trissomia 21 (CASO) e indivíduos CONTROLE 1.

	MÃES		PAIS		CASAIS	
<i>TYMS</i>	χ^2 (<i>p</i>) <i>N</i> CASO/ <i>N</i> CONTROLE 1	OR (IC 95%)	χ^2 (<i>p</i>) <i>N</i> CASO/ <i>N</i> CONTROLE 1	OR (IC 95%)	χ^2 (<i>p</i>) <i>N</i> CASO/ <i>N</i> CONTROLE 1	OR (IC 95%)
2R/2R	4,93 (0,026)	0,25	0,28 (0,60)	0,72	4,00 (0,04)	0,41
	3/22	(0,05-0,99)	4/14	(0,18-2,74)	7/36	(0,15-1,07)
2R/3R	2,89 (0,09)	2,19	0,00 (0,94)	0,97	1,21 (0,27)	1,44
	13/19	(0,80-6,03)	11/30	(0,35-2,69)	24/49	(0,72-2,88)
3R/3R	0,42 (0,51)	1,34	0,25 (0,61)	1,28	0,68 (0,41)	1,31
	12/24	(0,51-3,63)	10/23	(0,45-3,63)	22/47	(0,65-2,65)
	6,68		2,40		5,04	
TOTAL	(0,08)		(0,49)		(0,17)	
	28/65		25/67		53/132	

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Em itálico: valores limítrofes

A Tabela 19 apresenta resultados da análise de regressão logística univariada para CASO em relação ao CONTROLE 1, considerando cada uma das variáveis maternas e paternas separadamente. Pela análise univariada verifica-se que apenas o genótipo materno heterozigoto 2R/3R, foi significativo para diferenciar os grupos. O genótipo materno homozigoto 3R, apesar de não ser estatisticamente significativo, mostra um valor de *p* limítrofe.

Tabela 19 - Análise de regressão logística univariada comparando CASO e CONTROLE 1.

	VARIÁVEL	NÍVEIS DE COMPARAÇÃO ¹	VALOR de <i>p</i>	OR (IC 95%)
MÃES	<i>MTHFR</i>	677T 1 alelo/ nenhum alelo	0,593	0,82 (0,40-1,70)
		2 alelos/ nenhum alelo	0,353	0,53 (0,14-2,03)
		1298C 1 alelo/ nenhum alelo	0,919	1,04 (0,51-2,13)
		2 alelos/ nenhum alelo	0,621	0,54 (0,05-6,21)
	<i>TYMS</i>	2R 1 alelo/ nenhum alelo	0,421	1,39 (0,62-3,11)
		2 alelos/ nenhum alelo	0,120	0,47 (0,19-1,22)
		3R 1 alelo/ nenhum alelo	0,008	3,54 (1,38-9,05)
		2 alelos/ nenhum alelo	<i>0,080</i>	2,30 (0,90-5,85)
	<i>CBS</i>	4R 1 alelo/ nenhum alelo	0,987	0,00 (0,00-999,0)**
		844ins68 1 alelo/ nenhum alelo	<i>0,085</i>	0,41 (0,15-1,13)
		I278T 1 alelo/ nenhum alelo	0,145	0,48 (0,18-1,29)
		G307S 1 alelo/ nenhum alelo	0,977	999,0 (0,00-999,0)**
PAIS	<i>MTHFR</i>	677T 1 alelo/ nenhum alelo	0,317	1,47 (0,69-3,14)
		2 alelos/ nenhum alelo	0,356	1,78 (0,52-6,03)
		1298C 1 alelo/ nenhum alelo	0,844	1,08 (0,52-2,25)
		2 alelos/ nenhum alelo	0,189	0,33 (0,06-1,73)
	<i>TYMS</i>	2R 1 alelo/ nenhum alelo	0,507	0,77 (0,35-1,68)
		2 alelos/ nenhum alelo	0,179	0,48 (0,16-1,40)
		3R 1 alelo/ nenhum alelo	0,341	1,67 (0,58-4,77)
		2 alelos/ nenhum alelo	0,207	2,00 (0,68-5,86)
	<i>CBS</i>	4R 1 alelo/ nenhum alelo	0,991	999,0 (0,00-999,0)**
		844ins68 1 ou 2 alelos/ nenhum alelo	0,762	1,16 (0,45-2,97)
		I278T 1 ou 2 alelos/ nenhum alelo	0,576	1,30 (0,52-3,29)
		G307S 1 alelo/ nenhum alelo	0,984	999,0 (0,00-999,0)**

¹ nível de comparação / nível de referência

** divisão por zero, variável com baixa frequência ou com alto poder de separação (caselas com zeros)

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Em itálico: valores limítrofes

A Tabela 20 apresenta resultados da análise de regressão logística multivariada comparando CASO e CONTROLE 1, considerando cada uma das variáveis maternas e paternas e usando o critério 'Stepwise' de seleção das variáveis. Pelos resultados dessa análise, verifica-se que o único fator mais significativo para diferenciar CASO de CONTROLE 1, ou o fator que melhor discrimina os grupos conjuntamente, foi o genótipo materno heterozigoto 3R: os com um alelo com 3,2 vezes mais chance de pertencer ao CASO que ao controle, entre mães.

Tabela 20 - Análise de regressão logística multivariada comparando CASO e CONTROLE 1.

VARIÁVEL		NÍVEIS DE COMPARAÇÃO ¹	VALOR de <i>p</i>	OR (IC 95%)
<i>TYMS</i>	3R	1 alelo/ nenhum alelo	0,019	3,23 (1,21-8,58)
		2 alelos/ nenhum alelo	0,106	2,22 (0,84-5,86)

¹ nível de comparação / nível de referência. Critério 'Stepwise' de seleção das variáveis.

Em negrito: valores estatisticamente significativos

5.6 - INTERAÇÃO ENTRE OS GENES *MTHFR*, *TYMS* E *CBS*

5.6.1 - *MTHFR* X *TYMS*

Quando se analisa a distribuição genotípica de *TYMS*, com relação à presença ou ausência dos polimorfismos de *MTHFR*, é verificada uma associação do genótipo 2R/2R e do 677T/677T ($\chi^2 = 4,41$; $p = 0,04$) entre mães CONTROLE. Assim, a variante 2R quando em homozigose, pode agir como um fator de proteção contra o aparecimento de aneuploidias (Tabelas 21 e 22). Foi detectado também um aumento significativo do genótipo 2R/3R em mães que possuem dois alelos polimórficos para a *MTHFR* ($\chi^2 = 6,48$; $p = 0,01$).

Tabela 21 - Comparação dos genótipos de *TYMS* e *MTHFR* entre casais CASO e CONTROLE 1.

MTHFR							
		2		1		Ausência de polimorfismos	
		polimorfismos		polimorfismo			
	TYMS	$\chi^2 (p)$ N CASO/ N CONTROLE 1	OR (IC 95%)	$\chi^2 (p)$ N CASO/ N CONTROLE 1	OR (IC 95%)	$\chi^2 (p)$ N CASO/ N CONTROLE 1	OR (IC 95%)
MÃES	2R/2R	4,41 (0,04)* 1/7	0,14 (0,01-1,18)	0,76 (0,38) 7/11	0,64 (0,20-1,95)	0,57 (0,37)* 2/4	0,52 (0,06-3,46)
	2R/3R	6,48 (0,01) 10/2	6,18 (1,19-42,87)	0,06 (0,81) 13/15	0,90 (0,36-2,27)	1,57 (0,19)* 5/2	2,81 (0,46-21,89)
	3R/3R	3,73 (0,05) 3/10	0,28 (0,06-1,21)	1,62 (0,20) 16/11	1,75 (0,68-4,52)	0,23 (0,46)* 4/3	1,45 (0,26-861)
	TOTAL	13,15 (0,003)		1,94 (0,38)		1,91 (0,38)	
	PAIS	2R/2R	0,46 (0,38)* 3/6	0,61 (0,11-2,94)	0,15 (0,50)* 3/5	0,74 (0,13-3,82)	2,43 (0,17)* 0/3
2R/3R		0,02 (0,89) 10/12	1,07 (0,38-2,96)	0,44 (0,51) 10/16	0,74 (0,28-1,96)	1,30 (0,24)* 4/2	2,65 (0,39-21,86)
3R/3R		1,74 (0,19) 12/4	1,89 (0,66-5,42)	0,07 (0,80) 7/10	0,87 (0,27-2,73)	0,12 (0,50)* 4/4	1,29 (0,25-6,52)
TOTAL		1,54 (0,46)		0,04 (0,98)		3,62 (0,16)	
CASAI		2R/2R	3,82 (0,05) 4/13	0,33 (0,09-1,14)	0,73 (0,39) 10/16	0,70 (0,18-1,72)	2,19 (0,12)* 2/7
	2R/3R	2,47 (0,12) 20/14	1,79 (0,81-398)	0,39 (0,53) 23/31	0,82 (0,43-1,58)	2,89 (0,09) 9/4	2,74 (0,74-10,92)
	3R/3R	0,08 (0,78) 15/19	0,90 (0,41-1,98)	0,76 (0,38) 23/21	1,34 (0,66-2,70)	0,31 (0,58) 8/7	1,35 (0,43-4,29)
	TOTAL	5,76 (0,18)		1,51 (0,47)		4,74 (0,27)	

*=Exato de Fisher

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Em itálico: valores limítrofes

Tabela 22 - Comparação dos genótipos de *TYMS* e *MTHFR* entre casais CASO e CONTROLE 1, levando em consideração todos os genótipos possíveis.

<i>TYMS</i>						
<i>MTHFR</i>	2R/2R		2R/3R		3R/3R	
	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR	χ^2 (p)	OR
	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)	N CASO/ N CONTROLE 1	(IC 95%)
677T/677T	4,41 (0,04)*	0,0	2,35 (0,11)*	2,81	0,31 (0,58)	1,41
	0/5	(0,0-1,33)	7/3	(0,64-14-10)	6/5	(0,37-5,51)
677T/N	2,99 (0,08)	0,33	0,84 (0,36)	0,67	0,66 (0,42)	1,39
	3/10	(0,07-1,34)	9/15	(0,26-1,71)	15/13	(0,59-3,27)
677T/1298C	0,17 (0,46)*	0,76	2,34 (0,13)	2,10	0,15 (0,70)	0,83
	4/6	(0,18-3,16)	12/7	(0,74-6,16)	8/11	(0,29-2,33)
1298C/1298C	1,74 (0,28)*	0,0	1,42 (0,23)*	0,28	0,74 (0,37)*	0,38
	0/2	(0,0-4,72)	1/4	(0,01-2,74)	1/3	(0,02-4,17)
1298C/N	0,31 (0,58)	1,37	0,0 (0,96)	1,01	0,09 (0,76)	1,17
	7/6	(0,40-4,78)	14/16	(0,44-2,32)	8/8	(0,38-3,57)
N/N	2,19 (0,13)*	0,32	2,89 (0,09)	2,74	0,31 (0,58)	1,35
	2/7	(0,04-1,72)	9/4	(0,74-10,92)	8/7	(0,43-4,29)
TOTAL	7,43 (0,19)		8,19 (0,15)		1,76 (0,88)	

*=Exato de Fisher

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

N= ausência dos polimorfismos analisados

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Em itálico: valores limítrofes

5.6.2 - *MTHFR* X *CBS*

Quando se analisa a distribuição genotípica de *MTHFR*, com relação à presença ou ausência dos polimorfismos de *CBS*, foi verificado um aumento da frequência do homozigoto 1298C/1298C em indivíduos CONTROLE sem polimorfismo da *CBS* ($\chi^2 = 4,56$; $p = 0,03$) (Tabela 23).

Tabela 23 - Comparação dos genótipos de *CBS* e *MTHFR* entre casais CASO e CONTROLE 1.

<i>CBS</i>				
1 polimorfismo			Ausência de polimorfismos	
<i>MTHFR</i>	$\chi^2 (p)$ N CASO/ N CONTROLE 1	OR (IC 95%)	$\chi^2 (p)$ N CASO/ N CONTROLE 1	OR (IC 95%)
MÃES	677T/677T	0,24 (0,54)* 1/2	0,33 (0,42)* 3/5	0,65 (0,12-3,33)
	677T/N	2,36 (0,13)* 1/5	0,04 (0,84) 18/19	1,08 (0,47-2,50)
	677T/1298C	0,24 (0,54)* 1/2	0,00 (0,99) 8/9	0,99 (0,32-3,07)
	1298C/1298C	1,13 (0,47)* 1/0	1,82 (0,27)* 0/2	0,00 (0,0-4,58)
	1298C/N	0,29 (0,44)* 4/3	0,57 (0,45) 13/11	1,41 (0,53-3,76)
	N/N	0,24 (0,54)* 1/2	0,60 (0,44) 9/7	1,51 (0,47-4,91)
	TOTAL	3,91 (0,56)	2,97 (0,71)	
PAIS	677T/677T	0,61 (0,42)* 2/1	0,49 (0,35)* 6/5	1,56 (0,69-6,35)
	677T/N	0,05 (0,60)* 2/2	1,54 (0,22) 6/13	0,52 (0,16-1,63)
	677T/1298C	1,06 (0,24)* 6/4	0,29 (0,60) 10/10	1,30 (0,45-3,77)
	1298C/1298C	0,81 (0,55)* 0/1	2,76 (0,40)* 1/6	0,19 (0,01-1,70)
	1298C/N	0,02 (0,70)* 1/1	0,07 (0,80) 11/15	0,89 (0,34-2,33)
	N/N	0,02 (0,70)* 1/1	0,19 (0,66) 7/7	1,28 (0,37-4,44)
	TOTAL	1,56 (0,91)	4,65 (0,46)	
CASAIS	677T/677T	0,04 (0,58)* 3/3	0,02 (0,90) 9/10	1,06 (0,38-2,97)
	677T/N	1,07 (0,24)* 3/7	0,28 (0,60) 24/32	0,85 (0,45-1,62)
	677T/1298C	0,35 (0,56) 7/6	0,13 (0,72) 18/19	1,14 (0,53-2,42)
	1298C/1298C	0,01 (0,70)* 1/1	4,56 (0,03)* 1/8	0,14 (0,01-1,12)
	1298C/N	0,35 (0,40)* 5/4	0,11 (0,74) 24/26	1,11 (0,57-2,16)
	N/N	0,07 (0,58)* 2/3	0,75 (0,39) 16/14	1,40 (0,61-3,22)
	TOTAL	1,80 (0,88)	5,48 (0,36)	

*=Exato de Fisher

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

N=ausência dos polimorfismos estudados

Em negrito: valores estatisticamente significativos

5.6.3 - *TYMS* X *CBS*

Na comparação entre *TYMS* e *CBS*, foi detectada uma diferença significativa na distribuição dos genótipos da *TYMS*, com relação às mães com 1 alelo polimórfico para a *CBS* ($\chi^2 = 8,56$; $p=0,03$). Essa diferença ocorreu devido a uma diminuição da frequência do homozigoto 2R em mães de indivíduos com aneuploidias, associado a um polimorfismo da *CBS* ($\chi^2 = 4,73$; $p=0,04$) (Tabela 24).

Tabela 24 - Comparação dos genótipos de *TYMS* e *CBS* entre casais CASO e CONTROLE 1.

		<i>CBS</i>			
		1		Ausência de	
		polimorfismo		polimorfismos	
<i>TYMS</i>	χ^2 (<i>p</i>) <i>N</i> CASO/ <i>N</i> CONTROLE 1	OR (IC 95%)	χ^2 (<i>p</i>) <i>N</i> CASO/ <i>N</i> CONTROLE 1	OR (IC 95%)	
MÃES	2R/2R	4,73 (0,04)* 0/5	0,0 (0,0-1,25)	1,54 (0,21) 10/17	0,58 (0,22-1,50)
	2R/3R	2,19 (0,12)* 7/3	2,78 (0,60-14,4)	1,78 (0,18) 21/16	1,69 (0,73-3,96)
	3R/3R	2,42 (0,13)* 1/5	0,21 (0,01-1,92)	0,31 (0,58) 20/19	1,24 (0,54-2,84)
	TOTAL	8,56 (0,03)		2,51 (0,29)	
PAIS	2R/2R	0,04 (0,61)* 2/3	0,84 (0,09-6,51)	2,22 (0,14) 4/11	0,41 (0,10-1,51)
	2R/3R	2,02 (0,14)* 6/3	2,74 (0,57-14,71)	0,84 (0,36) 17/27	0,70 (0,31-1,60)
	3R/3R	0,12 (0,50)* 4/4	1,29 (0,25-6,56)	1,16 (0,28) 19/18	1,54 (0,65-3,62)
	TOTAL	1,03 (0,60)		2,98 (0,23)	
CASAI	2R/2R	2,86 (0,08)* 2/8	0,28 (0,04-1,46)	3,33 (0,07) 14/28	0,53 (0,25-1,11)
	2R/3R	3,31 (0,07) 12/6	2,50 (0,83-7,79)	0,03 (0,85) 38/43	1,05 (0,59-1,86)
	3R/3R	0,04 (0,85) 7/9	0,90 (0,29-2,76)	1,22 (0,27) 39/37	1,36 (0,76-2,42)
	TOTAL	5,77 (0,18)		3,60 (0,17)	

*=Exato de Fisher

N= número de indivíduos utilizados para cada análise.

Em negrito: valores estatisticamente significativos

Em itálico: valores limítrofes

6 - DISCUSSÃO

6.1 - ASPECTOS GERAIS

A instabilidade cromossômica é de grande interesse não só por estar ligado a síndromes clinicamente importantes e perdas gestacionais, como também por desempenhar um papel importante na patogenia do câncer. Desde a identificação da primeira trissomia humana, a mais de 40 anos, muitos esforços têm sido feitos para elucidar fatores que influenciam a taxa de não-disjunção cromossômica na espécie humana.

Exceto pela bem estabelecida relação entre a idade materna avançada e a não-disjunção, pouco se sabe sobre fatores que possam estar associados à instabilidade cromossômica.

Estudos recentes têm relacionado à extensão da metilação do DNA com a instabilidade cromossômica. O DNA utiliza a AdoMet como doadora de grupos metil e a disponibilidade dessa molécula é garantida pelo metabolismo do folato. Assim, estudos relacionando o metabolismo com o surgimento de aberrações cromossômicas têm trazido muitas contribuições. A associação da instabilidade com o metabolismo, tanto no nível nutricional como genético, tem sido demonstrada em células somáticas no estudo de cânceres e em células germinativas no estudo de mães de indivíduos com aneuploidias.

6.2 - MTHFR

A enzima MTHFR é uma enzima chave do metabolismo já que disponibiliza o 5-metilTHF, substrato importante na formação da Met e conseqüentemente da AdoMet. Dois polimorfismos que levam à queda da atividade dessa enzima, o 677C→T e o 1298 A→C, têm sido relacionados com o nascimento de indivíduos com síndrome de Down (SD). Num estudo realizado por JAMES et al. (1999) utilizando mães de crianças com SD, foi encontrada uma associação com a variante 677T. Essa associação foi significativa quando comparado o genótipo heterozigoto entre as mães e controles. JAMES et al. (1999) concluíram que a associação com o genótipo homozigoto para o polimorfismo não foi verificada por causa do tamanho da amostra e sugeriram que a possível explicação para a predominância do genótipo heterozigoto seria que a viabilidade fetal poderia ser menor em

mães homozigotas 677T/677T. Um estudo realizado por GRILLO et al. (2002) com mães de indivíduos com SD, verificou que o genótipo heterozigoto composto (677T/1298C) tem uma associação significativa com o surgimento dessa aneuploidia. Esse achado completa o estudo de JAMES et al. (1999), uma vez que pode explicar a alta frequência de heterozigotos 677T encontrados em sua amostra. Outras aneuploidias foram associadas à variante 677T do *MTHFR*, como a Síndrome de Edwards (trissomia do 18) (HASSOLD et al., 2001) e a síndrome de Turner (SANTOS, 2002).

A utilização de mães como modelo é bastante difundida uma vez que em cerca de 95% dos casos de trissomia livre, a não-disjunção é de origem materna. Neste estudo, a associação entre polimorfismos da *MTHFR* e o surgimento de aberrações cromossômicas não foi detectada entre mães, porém foi significativa entre pais de genótipo heterozigoto composto (677T/1298C). Esse resultado contrasta com os previamente publicados que implicam uma contribuição substancial do polimorfismo materno nas aberrações cromossômicas (JAMES et al., 1999; HASSOLD et al., 2001; GRILLO et al., 2002).

Foi verificado em nossa amostra através do cálculo de '*odds ratio*' que existe uma chance 2,5 vezes maior de se encontrar o genótipo heterozigoto composto (677T/1298C) entre pais de indivíduos com aneuploidias que em pais de indivíduos normais. Em outras palavras, há aumento de 2,5 vezes no risco de aparecimento de gestação com aberração cromossômica entre pais que possuam esse genótipo.

É importante ressaltar que essa associação foi detectada em grupos de origem étnica diferentes. Enquanto no CASO a porcentagem de negróides é de 1,92%, no CONTROLE 2 essa porcentagem é de 20,1%, ou seja, aproximadamente 10 vezes maior. Assim essa diferença pode estar refletindo uma variação étnica. Um estudo realizado por ARRUDA et al. (1998), identificou uma importante diferença na prevalência do alelo 677T em diferentes grupos étnicos brasileiros. Esse alelo é significativamente mais frequente em brasileiros de origem caucasóide, quando comparado aos de origem negróide ($p < 0,001$). Porém o alelo 1298C não fez parte desse estudo limitando o conhecimento sobre a distribuição do genótipo heterozigoto composto nos diferentes grupos étnicos brasileiros. Em nossa amostra, contudo, foi verificado um aumento significativo do genótipo heterozigoto 677T (677T/N) no grupo CONTROLE 2, cuja frequência de caucasóides é

menor que no grupo CASO, dados esses que de certa forma não corroboram os resultados encontrados por ARRUDA et al. (1998). Assim, uma vez que essa associação pode de fato significar uma contribuição paterna importante na etiologia das aberrações cromossômicas, maior atenção deve ser tomada ao genótipo paterno em estudos subsequentes.

Foi também verificado um aumento significativo do genótipo 1298C/N entre mães de embriões aneuplóides. Essa associação mostra uma influência do polimorfismo no aparecimento de gestação com aberrações cromossômicas, que deveria ser mais acentuada em indivíduos homozigotos. É provável que o tamanho amostral tenha prejudicado essa verificação.

Quando analisamos separadamente casais cujas gestações apresentavam trissomia do 21, nenhuma associação significativa como os genótipos do *MTHFR* foi detectada.

6.3 - CBS

A CBS é outra enzima importante, pois tem papel fundamental na remoção da Hci plasmática, levando a preservação da metilação do DNA. Uma vez que alguns polimorfismos no gene *CBS* levam a uma deficiência da enzima e conseqüente aumento da Hci no plasma, POLLICE (2003) estudou a participação desses polimorfismos no surgimento de aberrações cromossômicas. Nesse estudo utilizando mães de portadores de SD e portadoras de síndrome de Turner, foi levantada a prevalência de 3 polimorfismos freqüentes da CBS (844ins68, I278T e G307S), bem como uma possível associação com as variantes 677T e 1298C da *MTHFR*. POLLICE (2003) não detectou associação significativa entre polimorfismos da CBS e o surgimento dessas anormalidades cromossômicas bem com não identificou contribuição interativa entre as variantes das duas enzimas. Em nossa amostra foi detectado um aumento significativo do polimorfismo G307S entre casais cujas gestações apresentavam aneuploidias ($p<0,01$). Esse polimorfismo não foi encontrado entre os indivíduos do grupo controle. Porém esse alelo foi pouco freqüente e um aumento do tamanho amostral podem trazer maior confiabilidade nesse resultado.

Neste estudo, o polimorfismo 844ins68 sempre se apresentou com '*cis*' com o polimorfismo I278T, tanto em CASO como em CONTROLE. Segundo TSAI et al. (1996), tal fato faz com que esse alelo não cause alteração na atividade da enzima, uma vez que a inserção leva a formação de um sítio de '*splicing*' alternativo que acaba por remover o polimorfismo I278T. Como o polimorfismo I278T isolado foi pouco freqüente na nossa amostra, esse efeito não pôde ser verificado. Porém foi detectada uma diminuição do genótipo I278T+844ins68/N entre as mães CASO. Dessa forma, esse genótipo parece estar agindo como fator de proteção na nossa amostra. Assim, em nossa amostra, esse resultado parece reforçar a idéia de que esses polimorfismos organizados em '*cis*' de fato não levam à alteração da atividade da CBS, pois se isso ocorresse deveria ser encontrado com maior freqüência entre CASO do que entre CONTROLE.

Quando analisamos separadamente casais cujas gestações apresentavam trissomia do 21, nenhuma associação significativa como os genótipos do CBS foi detectada.

6.4 - TYMS

A TYMS é uma enzima que garante o processo de reparo e síntese de DNA, utilizando como substrato o 5,10-metilenotetrahidrofolato, competindo dessa forma com a MTHFR (TRINH et al., 2002). A variante polimórfica 3R da 5'UTR confere um aumento na atividade da enzima. Essa variante já foi previamente ligada ao aumento de Hci plasmática, porém estudos relacionando com aberrações cromossômicas não foram realizados.

No presente estudo foi detectado uma distribuição genotípica significativamente diferente entre mães de embriões com aneuploidias e o grupo controle ($p < 0,05$). Essa diferença é explicada nesse grupo por um aumento no genótipo heterozigoto 2R/3R ($p = 0,04$) e uma diminuição na freqüência do genótipo homozigoto 2R ($p = 0,03$). A análise de regressão logística demonstrou que o genótipo materno 2R/3R é um fator de risco importante no surgimento de aberrações cromossômicas uma vez que tem 3,2 vezes mais chance de ser encontrado em mães CASO que em mães CONTROLE. Assim, esse é o

primeiro estudo que relaciona as variantes da TYMS como fator de risco independente para o surgimento das aneuploidias. O aumento da atividade da enzima TYMS faz com que o 5, 10- metilenoTHF seja removido do plasma com maior eficiência (TRINH et al., 2002), fato que por um lado melhora a qualidade de síntese e reparo de DNA (EICHHOLZER et al., 2001; BROWN et al., 2004), mas por outro leva ao prejuízo da produção de 5-metilTHF pela MTHFR e conseqüentemente pode interferir nos níveis de homocisteína e na metilação do DNA. Assim, esperava-se encontrar uma frequência maior do genótipo 2R/2R entre controles, pois ele agiria como protetor e um aumento na frequência da variante 3R entre casais cujas gestações apresentavam aneuploidias. Os dados levantados nesse estudo corroboram essa hipótese, apesar de não ser detectado um esperado aumento na frequência do genótipo 3R/3R que caracterizaria um aumento mais acentuado da atividade da enzima ($p=0,08$). Isso pode ser explicado pelo tamanho da amostra que pode não ter sido suficiente para detectar tal variação.

Quando mães de embriões com trissomia do cromossomo 21 foram analisadas separadamente, o efeito protetor do genótipo 2R/2R também foi detectado ($p<0,03$).

6.5 - INTERAÇÃO ENTRE AS ENZIMAS MTHFR, TYMS E CBS

As enzimas TYMS e MTHFR competem pelo mesmo substrato. Dessa forma, quando a MTHFR está com atividade baixa, uma variante vantajosa da TYMS provocaria um efeito mais acentuado nos níveis plasmáticos de Hci e AdoMet e conseqüentemente na etiologia das aneuploidias. Neste estudo, foi verificado um aumento significativo na frequência do genótipo 2R/2R em mães CONTROLE com dois polimorfismos no gene *MTHFR* ($p<0,05$). Esse resultado pode ser entendido da seguinte forma: o genótipo que confere a TYMS um caráter menos vantajoso (2R/2R) pode ser um fator protetor em mães que possuam a MTHFR de baixa atividade. De fato, uma remoção menos eficiente de 5, 10-metileno-THF pela TYMS faz com que aumente a disponibilidade de substrato para a reação da MTHFR.

O genótipo 2R/2R parece também conferir proteção em mulheres que possuem um polimorfismo no gene *CBS* em nossa amostra, uma vez que essas condições foram verificadas com maior frequência no CONTROLE ($p < 0,05$).

Outra associação detectada foi entre o homozigoto 1298C da *MTHFR* e a ausência de polimorfismo da *CBS*. Foi identificado um aumento na frequência desses indivíduos no grupo CONTROLE. Teoricamente a combinação de genótipos que levam à queda da atividade da *MTHFR* e à deficiência da *CBS* deveria estar associada ao surgimento de aneuploidias, porém a amostra pode ter sido pequena para detectar essa variação.

Não foi possível detectar a interação entre todos os polimorfismos analisados uma vez que a vasta distribuição genotípica acaba por diminuir muito o poder da análise. Assim uma amostra maior que aumente a incidência em cada genótipo pode aumentar o poder de detecção de interações.

6.6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como a metilação do DNA está relacionada a um metabolismo regido por várias etapas bioquímicas catalisadas por diferentes enzimas, com participação de nutrientes obtidos através da dieta, é de se esperar que exista uma interação gene-gene, gene-ambiente que confere a esse processo um caráter multifatorial. Pode existir, portanto, fatores que contribuam mais e fatores de menor impacto. Sendo assim, o aumento do tamanho amostral pode aumentar o limite de detecção do método e pode trazer contribuições importantes no estudo da etiologia da não-disjunção cromossômica.

Em muitos estudos a associação de variantes das enzimas com o aumento de Hct plasmático e com o surgimento de aberrações cromossômicas, é somente detectada em indivíduos com dieta pobre em folato. Isso leva a sugerir uma forma simples de controlar os efeitos dos polimorfismos desvantajosos. É interessante citar sobre esse aspecto que no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em virtude dos benefícios já conhecidos do ácido fólico, publicou em dezembro de 2002, uma resolução que determina a

adição de 150 µg de ácido fólico para a fortificação das farinhas de trigo e milho, em um prazo de 18 meses. Assim, se de fato as variantes enzimáticas desvantajosas levam a não-disjunção cromossômica que é um mecanismo que gera embriões incompatíveis com a vida, o aumento de suprimento de ácido fólico que supriria o efeito dessas variantes pode em longo prazo alterar as frequências alélicas.

7 - CONCLUSÕES

As conclusões que chegamos através desse estudo, com relação à nossa amostra, foram:

1. As distribuições genotípicas do *MTHFR*, do *CBS* e do *TYMS* encontram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg entre indivíduos do grupo CASO e CONTROLE.
2. Foi encontrada uma associação significativa do genótipo paterno heterozigoto composto do gene *MTHFR* (677T/1298C) e o aparecimento de aneuploidias.
3. Foi encontrada uma associação significativa do genótipo homozigoto 2R/2R do *TYMS* e a proteção contra o aparecimento de gestações com trissomia do 21 e outras aneuploidias. Essa proteção é significativamente associada a genótipos homozigotos para os polimorfismos do *MTHFR* e é significativamente associada a genótipos heterozigotos para polimorfismos do *CBS*.
4. Foi encontrado um aumento de 3,2 vezes no risco de surgimento de gestações com aneuploidias entre mães com o genótipo 2R/3R do gene *TYMS*.

***8 - REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

ABRUZZO, M.A.; HASSOLD, T.J. Etiology of nondisjunction in humans. **Environ Mol Mutagen**, 25: 38-47, 1995.

ANDERSON, E.; BERKOVIC, S.; DULAC, O.; GARDINER, M.; JAIN, S.; LAUE-FRIIS, M. et al. ILAE genetics commission conference report: molecular analysis of complex genetic epilepsies. **Epilepsia**, 43 (10): 1262-7, 2002.

ARINAMI, T.; YAMADA, N.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; HAMAGUCHI, H.; TORU, M. Methylenetetrahydrofolate reductase variant and schizophrenia/depression. **Am J Hum Genet**, 74: 526-8, 1997.

ARRUDA, V.R.; SIQUEIRA, L.H.; GONÇALVES, P. M. V. Z.; SOARES, M. C. P.; MENEZES, R.; ANNICHINO-BIZZACCHI, J. M. et al. Prevalence of the mutation C677→T in the methylene tetrahydrofolate reductase gene among distinct ethnic groups in Brazil. **Am J Med Genet**, 78: 332-5, 1998.

BARKAI, G.; ARBUZOVA, S.; BERKENSTADT, M.; HEIFETZ, S.; CUCKLE, H. Frequency of Down's syndrome and neural-tube defects in the same family. **Lancet**, 361: 1331-5, 2003.

BERTUZZO, C. S. **Conseqüências da deficiência da 5,10 metilenotetrahidrofolato redutase na divisão celular** – Campinas, 2003. (Tese– Livre-docência - UNICAMP).

BESTOR, T. H.; TYCKO, B. Creation of genomic methylation patterns. **Nat Genet**, 12: 363-7, 1996.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, 9: 2395-402, 2000.

BLOUNT, B. C.; MACK, M. M.; WEHR, C. M.; MACGREGOR, J. T.; HIATT, R. A.; WANG, G. et al. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: Implications for cancer and neuronal damage. **Proc Natl Acad Sci USA**, 94: 3290-5, 1997.

BOTTIGLIERI, T. Folate, vitamin B12, and neuropsychiatric disorders. **Nutr Rev**, 54: 382-90, 1996.

- BOTTO, L. D.; MASTROIACOVA, P. Exploring gene-gene interactions in the etiology of neural tube defects. **Clin Genet**, 53: 456-9, 1998.
- BOUÉ, J.; BOUÉ, A.; LAZAR, P. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1,506 karyotyped spontaneous abortions. **Teratology**, 12: 11-26, 1975.
- BOUÉ, A.; BOUÉ, J.; GROPP, A. Cytogenetics of pregnancy wastage. **Adv Hum Genet**, 15: 1-57, 1985.
- BOUSHEY, C. J.; BERESFORD, S. A. A.; OMENN, G. S.; MOTULKY, A. G. A quantitative assessment of plasma homocysteine as risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. **JAMA**, 274: 1049-57, 1995.
- BROWN, K. S.; KLUIJTMANS, L. A. J.; YOUNG, I. S.; McNULTY, H.; MITCHELL, L. E.; YARNELL, J. W. G. et al. The thymidylate synthase tandem repeat polymorphism is not associated with homocysteine concentrations in healthy young subjects. **Hum Genet**, 114: 182-5, 2004.
- CAVALCANTI, D. P. **Estudo cromossômico em abortos espontâneos** – Riberão Preto, 1986. (Dissertação - Mestrado - USP).
- CAVENEY, W. K.; SCRABLE, H. J.; JAMES, C. D. Molecular genetics of human cancer predisposition and progression. **Mutat Res**, 247: 199-202, 1991.
- CEDAR, H. DNA methylation and gene activity. **Cell**, 53: 3-4, 1988.
- CHADEFAUX-VEKEMANS, B.; COUDE, M.; MULLER, F.; OURY, J.F.; CHABLI, A.; JAIS, J. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. **Pediatr Res**, 51(6):766-7, 2002.
- CHANEY, S. G. Princípios da Nutrição II: Micronutrientes. In: DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. Tradução da 4ª edição americana, São Paulo:Edgard Blucher, 1998. p.933-59.
- CHEN, J.; GIOVANNUCCI, E.; KELSEY, K.; RIMM, E. B., STAMPFER, M. J., COLDITZ, G. A. et al. A methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism And the risk of colorectal cancer. **Cancer Res**, 56 (21): 4862-4, 1996.

- CHRISTENSEN, B.; FROSST, P.; LUSSIER-CACAN, S.; SELHUB, J.; GOYETTE, P.; ROSENBLATT, D. S. et al. Correlation of a common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene with plasma homocysteine in patients with premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17: 569-73, 1997.
- CLARK, S. J.; HARRISON, J.; FROMMER, M. CpNpG methylation in mammalian cells. *Nat Genet*, 10: 20-7, 1995.
- CLARKE, R.; DALY, L.; ROBINSON, K.; NAUGIEN, E.; CAHALANE, S.; FOWLER, B. et al. Homocysteinemia: a risk factor for vascular disease. *N Engl J Med*, 325: 967, 1991.
- CLARKE, L. Centromeres: proteins, protein complexes, and repeated domains at centromeres of simple eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, 8: 212-8, 1998.
- COBB, J.; MIYAIKE, M.; KIKUCHI, A.; HANDEL, M. A. Meiotic events at the centromeric heterochromatin: histone H3 phosphorylation, topoisomerase II alpha localization and chromosome condensation. *Chromosoma*, 108: 412-25, 1999.
- CONOVER, W. J. **Practical nonparametric statistics**. New York: John Wiley & Sons, 1971.
- COOMES, M. W. Metabolismo de aminoácidos. In: DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. Tradução da 4ª edição americana, São Paulo: Edgard Blucher, 1998. p.368-407.
- CREASY, M. R.; CROLLA, J. A.; ALBERMAN, E. D. A cytogenetic study of human spontaneous abortions using banding techniques. *Hum Genet*, 31: 177-96, 1976.
- CZEIZE, A. E.; DUDAS, I. Prevention of the first occurrence of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*, 327 (226): 1832-5, 1992.
- DUTHIE, S. J. Folic acid deficiency and cancer: mechanisms of DNA instability. *Br Med Bull*, 55: 578-92, 1999.
- EADS, C. A.; LORD, R. V.; WICKRAMASINGHE, K.; LONG, T. I.; KURUMBOOR, S. K. BERNSTEIN, L. et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Can Res*, 61: 3410-8, 2001.

- EICHHOLZER, M.; LUTHY, F.; MOSER, U.; FOWLER, B. Folate and risk of colorectal, breast and cervix cancer: the epidemiological evidence. *Swiss Med WKLY*, 131: 539-49, 2001.
- ESKES, T. K. A. B. Neural tube defects, vitamins and homocysteine. *Eur J Pediatr*, 157: S139-41, 1998.
- FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61:759-67, 1990.
- FENTON, W. A.; ROSENBERG, L. E. Inherited disorders of cobalamin transport and metabolism. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W.S.; VALLE, D. **The metabolic bases of inherited disease**. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1995. p. 3129-49.
- FINKELSTEIN, J. D. T. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr*, 157: S40-4, 1998.
- FLEISS, J. L. **Statistical methods for rates and proportions**, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1981.
- FREEMAN, S.; GRANTHAM, M.; HASSOLD, T.; HEBERT, M.; HERSEY, J.; NUCCIO, J. et al. Cytogenetic and molecular studies of human spontaneous abortions. *Am J Hum Genet Suppl*, A49: 916, 1991.
- FRISO, S.; CHOI, S. W.; GIRELLI, D.; MASON, J. B.; DOLNIKOWSKI, G. G.; BAGLEY, P. J. et al. A common mutation in the 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *PNSA*, 99 (8): 5606-11, 2002.
- FROSST, P.; BLOM, H.J.; MILOS, R.; GOYETTE, P.; SHEPPARD, C.A.; MATTHEWS, R.G. et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*, 10: 111-3, 1995.
- GALLAGHER, P. M.; MELEADY, R.; SHIELS, D. C. et al. Homocysteine and risk of premature coronary heart disease. Evidence for a common gene mutation. *Circulation*, 94: 1812-4, 1996.

- GIUSTI, B.; CAMACH-VANEGAS, O.; ATTANASIO, M.; COMEGLIO, P.; GORI, A. M.; BRUNELLI, T. et al. Microheterogeneity in the distribution of the 844ins68 in the cystathionine beta synthase gene in Italy. **Trob Res**, 94: 249-54, 1999.
- GOYETTE, P.; SUMMER, J. S.; MILOS, R.; DUNCAN, A. M. V.; ROSENBLATT, D. S.; MATTHEWS, R. G. et al. Human methylenetetrahydrofolate reductase: Isolation of cDNA, mapping and mutation identification. **Nat Genet**, 7:195-200, 1994.
- GOYETTE, P.; PAI, A.; MILOS, R.; FROSST, P.; TRAN, P.; CHEN, Z. et al. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). **Mammalian Genome** 9:652-656, 1998.
- GREWAL, S. I. S.; BONDUCE, M. J.; KLAR, K. J. Histone deacetylase homologs regulate epigenetic inheritance of transcriptional silencing and chromosome segregation in fission yeast. **Genetics**, 150: 563-76, 1998.
- GRILLO, L. B. N.; ACÁCIO, G. L.; BARINI, R.; PINTO JR, W.; BERTUZZO, C. S. Mutações no gene da metilenotetrahidrofolato redutase e síndrome de Down. **Cad Saúde Pública**, 18(6): 1795-7, 2002.
- HANSEN, R. S.; WIJMENGA, C.; LUO, P.; STANEK, A. M.; CANFIELD, T. K.; WEEMAES, C. M. et al. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96:14412-7, 1999.
- HASSOLD, T. J. A cytogenetic study of repeated spontaneous abortions. **Am J Hum Genet**, 32:723-30, 1980.
- HASSOLD, T. J.; JACOBS, P. Trisomy in man. **Ann Rev Genet**, 18:69-97, 1984.
- HASSOLD, J. T.; BURRAGE, L. C.; CHAN, E. R.; JUDIS, L. M.; SCHWARTZ, S.; JAMES, S.J. et al. Maternal folate polymorphisms and the etiology of human nondisjunction. **Am J Hum Genet**, 69: 434-9, 2001.
- HOBBS, C. A.; SHERMAN, S. L.; YI, P.; HOPKINS, S. E.; TORFS, C. P.; HINE, R. J. et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Hum Genet**, 67: 623-30, 2000.

- HOFFMAN, D. R.; MARION, D. W.; GOMATZER, W. E.; DUERRE, J. A. S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine metabolism in isolated liver. **J Biol Chem**, 22: 10822-7, 1980.
- HOLMES, Z. R.; REGAN, L.; CHILCOTT, I.; COHEN, H. The C677T MTHFR gene mutation is not predictive of risk for recurrent fetal loss. **Br J Haematol**, 105: 98-101, 1999.
- 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. p. 11.
- HOOK, E. B.; CROSS, P. K.; SCHREINEMACHERS, D. M. Chromosomal abnormality rates at amniocentesis and in live-born infants. **JAMA**, 249: 2034-8, 1983.
- HORI, T.; TAKAHACHI, E.; AYUSAWA, D.; TAKEISHI, K.; KANEDA, S.; SENO, T. Regional assignment of the human thymidylate synthase (TS) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. **Hum Genet**, 85: 576-80, 1990.
- HORIE, N.; AIBA, H.; OGURO, K.; HOJO, H.; TAKEISHI, K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. **Cell Struct Funct**, 20: 191-7, 1995.
- HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. L. **Applied Logistic regression**. New York: John Wiley & Sons, 1989.
- HU, F. L.; GU, Z.; KOZICH, V.; KRAUS, J. P.; RAMESH, V.; SHIH, V. E. Molecular basis of cystathionine beta synthase deficiency in pyridoxine responsive and nonresponsive homocysteinuria. **Hum Mol Genet**, 2: 1857-60, 1993.
- JACOB, R. A.; GRETZ, D. M.; TAYLOR, P. C.; JAMES, S. J.; POGRIBNY, I. P.; MILLER, B. J. et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. **J Nutr**, 128: 1204-12, 1998.
- JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet Suppl**, 33: 245-54, 2003.

JAMES, S. J.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I. P.; MELNYK, S.; HINE, R. J.; GIBSON, J. B. et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be a maternal risk factors for Down syndrome. **Am J Clin Nutr**, 70: 495-501, 1999.

JAMES, S. J.; MELNYK, S.; POGRIBNA, M.; POGRIBNY, I. P.; CAUDILL, M. A. elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA Hypomethylation: Potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology. **J Nutr**, 132: 2361S-6S, 2002.

JANOSIK, M.; OLIVERIUSOVA, J.; JANOSIKOVA, B.; SOKOLOVA, L.; KRAUSS, E.; KRAUSS, J. P. et al. Impaired heme binding and aggregation of mutant cystathionine beta-synthase subunits in homocystinuria. **Am J Hum Genet**, 68: 1506-13, 2001.

JEANPIERRE, M.; TURLEAU, C.; AURIUS, A.; PRIEUR, M.; LEDEIST, F.; FISCHER, A. et al. An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome. **Hum Mol Genet**, 2(6): 731-5, 1993.

Jl, W. Z.; HERNANDEZ, R.; ZHANG, X.Y.; QU, G.; FRADY, A.; VARELA, M. et al. DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. **Mutat Res**, 379: 33-41, 1997.

JONES, P. L.; VEENSTRA, G. J.; WADE, P. A.; VERMAAK, D.; KAS, S. U.; LANDSBERGER, N. et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nat Genet**, 19: 187-91, 1998.

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: 414-21, 1991.

KARPEN, G. H.; ALLSHIRE, R. C. The case for epigenetic effects on centromere identity and function. **TIG**, 13 (12): 489-96, 1997.

KAWAKAMI, K.; SALONGA, D.; PARK, J. M.; DANENBERG, K. D.; UETAKE, H.; BRABENDER, J. et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. **Clin Cancer Res**, 7: 4096-101, 2001.

KEIJZER, M. B. A. J.; DEN HEIJER, M. BLOM, H. J.; BOS, G. M. J.; WILLEMS, H. P. J.; GERRITS, W. B. J. et al. Interaction between hyperhomocysteinemia, mutated methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and inherited thrombophilic factors in recurrent venous thrombosis. **Thromb Hemost**, 88: 723-8, 2002.

KERY, V.; PONELEIT, L.; MEYER, J. D.; MANNING, M. C.; KRAUS, J. P. Binding of pyridoxal 5-prime-phosphate to the heme protein human cystathionine beta-synthase. **Biochemistry**, 38: 2716-24, 1999.

KIRSCH-VOLDERS, M.; VANHAUWAERT, A.; DE BOECK, M.; DECORDIER, I. Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations. **Mutat res**, 504: 137-48, 2002.

KLUIJTMANS, L. A. J.; WENDEL, U.; STEVENS, E. M. B.; VAN DER HEUVEL, L. P. W. J.; TRIJBELS, F. J. M.; BLOM, H. J. Identification of four novel mutations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **Europ J Hum Genet**, 6: 257-65. 1998.

KOZICH, V.; KRAUS, J. P. Screening for mutations by expressing patient cDNA segments in E.coli: homocystinuria due to cystathionine beta synthase deficiency. **Hum Mut**, 1: 113-23, 1992.

KOZICH, V.; DE FRANCHIS, J.; KRAUS, J. P. Molecular defect in a patient with pyridoxine-responsive homocystinuria. **Hum Mol Genet**, 2: 815-6, 1993.

KRAUS, J. P.; OLIVERIUSOVA, J.; SOKOLOVA, J.; KRAUS, E.; VLCEK, C.; DE FRANCHIS, R. et al. The human cystathionine beta-synthase (CBS) gene: complete sequence, alternative splicing, and polymorphisms. **Genomics**, 52: 312-24, 1998.

LANDER, E. S.; SCHORK, N. J. Genetic dissection of complex traits. **Science**, 256: 2037-48, 1994.

LEVINE, A. J.; SIEGMUND, K. D.; ERVIN, C. M.; DIEP, A.; LEE, E. R.; FRANKI, H. et al. The methylenetetrahydrofolate reductase 677C-T polymorphism and distal colorectal adenoma risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 9: 657-63, 2000.

- LEYTON, C.; MERGUDICH, D.; DE LA TORRE, D.; SANS, J. Impaired chromosome segregation in plant anaphase after moderate hypomethylation of DNA. **Cell Prolif**, 28:481-96, 1995.
- MA, J.; STAMPFER, M. J.; GIOVANNUCCI, E.; HUNTER, D. J.; FUCHS, C.; WILLETT, W. C. et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. **Cancer Res**, 57: 1098-102, 1997.
- MARBLE, M.; GERATHY, M. T.; DE FRANCHIS, R.; KRAUS, J. P.; VALLE, D. Characterization of CBS allele with B6 nonresponsive homocystinuria. **Hum Mol Genet**, 3: 1883-6, 1994.
- MARSH, S.; COLLIE-DUGUID, E. S.; LI, T.; LIU, X.; McLEOD, H. L. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. **Genomics**, 58: 310-2, 1999.
- McCULLY, K. S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. **Am J Pathol**, 56: 111-28, 1969.
- MEIER, M.; JANOSIK, M.; KERY, V.; KRAUS, J. P.; BURHARD, P. Structure of human cystathionine β -synthase: a unique pyridoxal 5'-phosphate-dependent heme protein. **Eur Mol Biol Org J**, 20: 3910-16, 2001.
- MEULENBROEK, G. H. M.; GERAEDTS, J. P. M. Parental origin of chromosome abnormalities in spontaneous abortions. **Hum Genet**, 62: 129-33, 1982.
- MINIOU, P.; JEANPIERRE, M.; BOURCHIS, D.; BARBOSA, A. C. C.; BLANQUET, V. VIEGAS-PEQUIGNOT, E. α -satellite DNA methylation in normal individuals and in ICF patients: heterogeneous methylation of constitutive heterochromatin in adult and fetal tissues. **Hum Genet**, 99:738-45, 1997.
- MONTGOMERY, R.; CONWAY, T. W.; SPECTOR, A. A.; CHAPPEL, D. Nutrition. In: MONTGOMERY, R.; CONWAY, T. W.; SPECTOR, A. A.; CHAPPEL, D. **Biochemistry – A case oriented approach**. 6^a ed., Sant Louis: Mosby, 1996. p. 1-30.

MRC Vitamins Study Research Group. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*, 327: 1832-5, 1991.

MUDD, S. H.; LEVY, H. L.; SKOVBY, F. Disorders of transsulfuration. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. **The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol 1.** 7^a ed., Nova Iorque: McGraw-Hill, 1995. p. 1279-327.

MUNKE, M.; KRAUS, J.; WATKINS, P.; TANZI, R.; GUSELLA, J. MILLINGTON WARD, A. et al. Homocystinuria gene on human chromosome 21 mapped with cloned cystathionine beta-synthase probe and in situ hybridization of other chromosome 21 probes. *Cytogenet Cell Genet*, 40: 706-7, 1985.

MUNKE, M.; KRAUS, J. P.; OHURA, T.; FRANCKE, U. The gene for cystathionine beta-synthase (CBS) maps to the subtelomeric region on human chromosome 21q and to proximal mouse chromosome 17. *Am J Hum Genet*, 4: 550-9, 1998.

NAN, X.; TATE, P.; LI, E., BIRD, A. DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol Cell Biol*, 16: 414-21, 1996.

NAN, X.; NG, H. H.; JONSON, C. A.; LAHERTY, C. D. Transcriptional repression by the methyl CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393: 386-9, 1998.

O'LEARY, V. B.; PARLE-McDERMOTT, A.; MOLLOY, A. M., KIRKE, P. N.; JOHNSON, Z.; CONLEY, M. et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *Am J Med Genet*, 107: 151-5, 2002.

OKANO, M.; BELL, D. W.; HABER, D. A.; LI, E. DNA methyltransferases DNMT3a and DNMT3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99: 247-57, 1999.

PETERSEN, M. B.; GRIGORIADOU, M.; MIKKELSEN, M. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is not a risk factor for Down syndrome in a population-based study. *Am J Hum Genet*, 69 (suppl): 323, 2001.

POLLICE, E. L. **Frequência das principais mutações no gene da cistationina beta sintetase em portadoras de síndrome de Turner e mães de portadores de síndrome de Down** – Campinas, 2003. (Dissertação - Mestrado - UNICAMP).

QUEFFEULOU, G.; MICHEL, C.; VRTOVSNIK, F.; PHILIT, J.-B.; DUPUIS, E.; MIGNON, F. Hyperhomocysteinemia, low folate status, homozygous C677T mutation of the methylenetetrahydrofolate reductase and renal arterial thrombosis. **Clin Nephrol**; 57: 158-62, 2002.

RAHMAN, L.; VOELLER, D.; RAHMAN, M.; LIPKOWITZ, S.; ALLEGRA, C.; BARRET, J. et al. Thymidylate synthase as an oncogene: A novel role for an essential DNA synthesis enzyme. **Cancer Cell**, 5 (4): 341-51, 2004.

RAMBOSTON, D.; SCOTT, J. M.; MOLLOY, A.; WEIR, D. G.; KIRKE, P. N.; MILLS, J. L. et al. Are common mutations of cistathionine beta synthase involved in the aetiology of neural tube defects? **Clin Genet**, 51: 39-42, 1997.

RAMPERSAUD, G.; KAUWELL, A.; HUTSON, A. D.; BAILEY, L. B. Effect of controlled folate intake on DNA methylation status in post-menopausal women. **Am J Clin Nutr**, 72: 998-1003, 1999.

RENAULD, H.; GASSER, S. M. Heterochromatin: a meiotic matchmarker? **Trends Biol Sci**, 7:201-5, 1997.

ROBINSON, K. **Homocysteinaemia and vascular disease**. Luxembourg: Commission of the European Community, 1990.

ROSENBLATT, D. S. Inherited disorders of folate transport and metabolism. In: SCRIVER, C. R.; BEAUDET, A. L.; SLY, W. S.; VALLE, D. **The metabolic bases of inherited disease**. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1995. p. 3111-28.

ROSENBLATT, D. S. Folate and homocysteine metabolism and gene polymorphisms in the etiology of Down syndrome. **Am J Clin Nutr**, 70: 429-30, 1999.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUSHI, R.; HORN, G.T. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, 239: 487-91, 1988.

SANTOS, K. **Frequência das mutações C677T e A1298C no gene da MTHFR em portadoras de síndrome de Turner**– Campinas, 2002. (Dissertação - Mestrado - UNICAMP).

SEBASTIO, G.; SPERANDEO, M. P.; PANICO, M.; DE FRANCHIS, R.; KRAUS, J.P.; ANDRIA, G. The molecular basis of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency in Italian families, and report of four novel mutations. **Am J Hum Genet**, 56: 1324-33, 1995.

SELHUB, J. Homocysteine metabolism. **Ann Rev Nutr**, 19: 217-46, 1999.

SELZER, R. R.; ROSENBLATT, D. S.; LAXOVA, R.; HOGAN, K. Adverse effect of nitrous oxide in a child with 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. **N Engl J Med**, 349: 45-50, 2003.

SIEGEL, S. **Estatística Não-paramétrica para as ciências do comportamento**. São Paulo: McGraw-Hill, 1975.

SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T.; KANE, E.; ROMAN, E.; ROLLINSON, S.; CARTWRIGHT, R. A. et al. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. **Proc Natl Acad Sci USA**, 96 (22): 12810-5, 1999.

SKOVBY, F.; KRASSIKOFF, N.; FRANCKE, U. Assignment of the gene for cystathionine beta synthase to human chromosome 21 in somatic cell hybrids. **Hum Genet**, 65: 291-4, 1984.

SPEER, M. C.; WORLEY, G.; MACKEY, J. F. et al. The thermolabile variant of MTHFR is not a major risk factor for NTDs in American Caucasians. **Neurogenetics**, 1: 490-510, 1997.

STUIPPA, L.; GATTA, V.; GASPARI, A. R.; ANTONUCCI, I.; MORIZIO, E.; CALABRESE, G. et al. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. **Europ J Hum Genet**, 10: 388-90, 2002.

STRACHAN, T.; READ, A. P. Patologia Molecular. In: STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética Molecular Humana**, 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002a. p. 377-400.

STRACHAN, T.; READ, A. P. Mapeamento genético de caracteres complexos. In: STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética Molecular Humana**, 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002b. p. 283-94.

SUMMER, J.; JENCKS, D. A.; KHANI, S.; MATTHEUS, R. G. Photoaffinity labeling of methylenetetrahydrofolate reductase with 8-azido-S-adenosylmethionine, **J Biol Chem**, 261: 7697-700, 1986.

SVEJGAARD, A.; RYDER, L. P. HLA and disease associations: detecting the strongest association. **Tissue Antigens**, 43: 18-27, 1994

SURTEES, R. Demyelination and inborn errors of the single carbon transfer pathways. **Eur J Pediat**, 157: S118-21, 1998.

TAKEISHI, K.; KANEDA, S.; AYUSAWA, D.; SHIMIZU, K.; GOTOH, O.; SENO, T. Nucleotide sequence of a functional cDNA for human thymidylate synthase. **Nucleic Acids Res**, 13: 2035-43, 1985.

TAKEISHI, K.; KANEDA, S.; AYUSAWA, D.; SHIMIZU, K.; GOTOH, O.; SENO, T. Human thymidylate synthase gene: isolation of phage clones which cover a functionally active gene and structural analysis of the region upstream from translation initiation codon. **J Biochem**, 106: 575-83, 1989.

THOMPSON, M. W.; McINNIS, R. R.; HUNTINGTON, F. W. Citogenética clínica: Princípios gerais e anormalidades autossômicas. In: THOMPSON, M. W.; McINNIS, R. R.; HUNTINGTON, F. W. **Genética Médica**, 5ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 115-37.

TONETTI, C.; BURTSCHER, A.; BORIES, D.; TULLIEZ, M.; ZITTOUN, J. Methylenetetrahydrofolate reductase deficiency in four siblings: a clinical, biochemical, and molecular study of the family. **Am J Med Genet**, 91: 363-7, 2000.

- TONETTI, C.; RUIVARD, M.; RIEU, V.; ZITTOUN, J.; GIRAUDIER, S. Severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency revealed by pulmonary embolism in a young adult. **Brit J Haemat**, 119: 397-9, 2002.
- TOWNEND, J.; O'SULLIVAN, J.; WILDE, J. T. Hyperhomocysteinaemia and vascular disease. **Blood Reviews**, 12: 23-34, 1998.
- TRINH, B. N.; ONG, C-N.; COETZEE, G. A.; YU, M. C.; LAIRD, P. W. Thymidylate synthase: a novel genetic determinant of plasma homocysteine and folate levels. **Hum Genet**, 111: 299-302, 2002.
- TSAI, M. Y.; BIGNELL, M.; SCHWICHTENBERG, K.; HANSON, N. Q. High prevalence of a mutation in the cystathionine beta-synthase gene. **Am J Hum Genet**, 59: 1262-7, 1996.
- VAN DER PUT, N. M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P.; FROSST, P.; TRIJBELS, F. J.; ESKES, T. K.; VAN DEN HEUVEL, L. P. et al. Mutated methylenetetrahydrofolate reductase as a risk factor for spina bifida. **Lancet**, 346: 1070-1, 1995.
- VAN DER PUT, N. M. J.; VANDEN HEUVEL, L. P.; STEEGER-THEUNISSEN, R. P. M.; TRIBLES, F. J. J. M. Decreased MTHFR activity due to the 677C-T mutation in families with spina bifida. **J Molec Med**, 74: 691-4, 1996.
- 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. et al. A second mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk for neural-tube defects? **Am J Hum Genet**, 62:1044-51, 1998.
- VILASECA, M. A.; VILARINHO, L.; ZAVADAKOVA, P.; VELA, E.; CLETO, E.; PINEDA, M. et al. CblE type of homocystinuria: Mild clinical phenotype in two patients homozygous for a novel mutation in the *MTRR* gene. **J Inherit Metab Dis**, 26: 361-9, 2003.
- VILKAITIS, G.; MEKIENE, E.; SERVA, S.; WEINHOLD, E.; KLIMASAUSKAS, S. The mechanism of DNA cytosine-5 methylation. Kinetic and mutational dissection of Hhai methyltransferase. **J Biol Chem**, 276: 20924-34, 2001.

- VIG, B. K. Centromere: a candidate for face-lift. **Environ Mol Mutagen**, 32: 197-9, 1998.
- VIG, B. K.; HALLET, W. H. 5-azacytidine-induced and Hoechst-induced aneuploidy in Indian muntjac. **Mutat Res**, 466:79-86, 2000.
- VILAIN, A.; VOGT, N.; DUTRILLAUX. B.; MALFOY, B. DNA methylation and chromosome instability in breast cancer cell lines. **FEBS Lett**, 460: 231-4, 1999.
- WILCKEN, D. E. L.; WICKEN, B. The pathogenesis of coronary artery disease. **J Clin Invest**, 57: 1079-82, 1976.
- WILSON, A.; PLATT, R.; WU, Q.; LECLERC. D.; CHRISTENSEN, B.; YANG, H. et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increases risk for spina bifida. **Molec Genet Metab**, 67: 317-23, 1999.
- XU, G. L.; BESTOR, T. H.; BOURCHIS, D. HSIEH, C. L.; TOMMERUP, N.; BUGGE, M. et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in DNA methyltransferase gene. **Nature**, 402:187-91, 1999.

9 - ANEXOS



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (019) 3788-8936
fax (019) 3788-8925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP: 15/04/03
(Grupo I)

PARECER PROJETO: Nº 067/2003

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE MUTAÇÕES EM ENZIMAS PARTICIPANTES DO METABOLISMO DO FOLATO NA FORMAÇÃO DE EMBRIÕES COM ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Luciana Cardoso Bonadia

INSTITUIÇÃO: Departamento de Genética Médica-FCM-UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/03/2003

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 15/09/03 e 15/04/04

II - OBJETIVOS

O objetivo dessa pesquisa é, através de um estudo de associação, determinar se a presença de algumas mutações nas enzimas metilenotetraidrofolato redutase (MTHFR) e Cistationina B sintase (CBS), participantes do metabolismo do folato, estão envolvidas na não-disjunção cromossômica durante a meiose ou mitose.

III - SUMÁRIO

Tendo como referência o Banco de Dados do dr. Walter Pinto Jr., sobre casos de aberrações cromossômicas, e com o grupo controle, casais com diagnóstico pré-natal ou exame citogenético em aborto, com resultados normais, os pesquisadores pretendem determinar se mutações presentes nos genes que codificam essas enzimas, podem ser um fator de risco para a não-disjunção cromossômica. Para isso, serão analisados pais cujas gestações apresentem anormalidades cromossômicas. O método utilizado será reação em cadeia da polimerase seguida de digestão enzimática. A amostra será de 200 casais.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trabalho bem estruturado, com os dois termos de consentimento claros e de acordo com as normas, procura juntar esforços a outras pesquisas na área, que objetivam determinar fatores que influenciam a taxa de não-disjunção.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.a), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

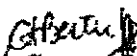
Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

Atenção: Projetos de Grupo I serão encaminhados à CONEP e só poderão ser iniciados após Parecer aprovatório desta.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de abril de 2003.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



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

PARECER N.º 1121/2003

Registro CONEP: 7659 (Este n.º deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 67/2003

Processo n.º 25000.038156/2003-45

Projeto de Pesquisa: "Determinação da influência de mutações em enzimas participantes do metabolismo do folato na formação de embriões com aberrações cromossômicas."

Pesquisador Responsável: Dr.ª Luciana Cardoso Bonadia

Instituição: UNICAMP / SP

Área Temática Especial : Genética Humana

Após se proceder à análise das respostas ao Parecer 856/2003, relativo ao projeto em questão, considerou-se que

- a) foram atendidas as solicitações do referido parecer;
- b) o projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 196/96 sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos;

c) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação : Projeto aprovado

Brasília 23 de junho de 2003


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Departamento de Genética Médica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: Estudo de associação entre mutações em genes que codificam enzimas participantes do metabolismo do folato e a formação de embriões com aberrações cromossômicas.

Pesquisadores: Luciana Cardoso Bonadia, Carmen Silvia Bertuzzo e Walter Pinto Júnior.

Telefones para contato: (019)3788 8904, 3788-8902, 3788-8907.

OBJETIVO DA PESQUISA:

Eu entendo que fui convidado (a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo casais que tiveram gestações cujos fetos apresentaram alterações no número e forma dos cromossomos. O objetivo geral do estudo é verificar o envolvimento de alterações em alguns genes responsáveis pelo metabolismo do folato (vitamina). Para o estudo serão avaliados casais que apresentaram gestações com alguma anormalidade cromossômica e casais que tiveram gestações normais. 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. Será colhida uma amostra de sangue venoso (7 ml, o equivalente a cinco colheres de sopa). A partir desse sangue, será extraído o meu DNA, que será guardado no Laboratório de Genética Molecular para eventuais projetos que ajudem a identificar possíveis causas de nascimentos de crianças com alterações cromossômicas. Qualquer estudo que venha a ser feito com esse material, deverá primeiro ser autorizado pelo Comitê de Ética e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Em eventuais novos projetos a serem realizados com material coletado, os resultados serão fornecidos aos sujeitos de pesquisa e a orientação genética será realizada pelos pesquisadores.

RISCO E DESCONFORTO:

Uma coleta de 7 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, caso eu a possua. 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 for indicação médica, poderão realizar o exame. Qualquer dúvida ou informação poderei contatar a UNICAMP no tel. (019) 3788-8902 (Luciana Cardoso Bonadia).

SIGILO:

Eu entendo que toda informação médica, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes desse projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do 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) 3788-8936.

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 ou desconfortos advindos 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 (ou responsável)

Assinatura do participante (ou responsável)

Data

Nome e RG participante (ou responsável)

Assinatura do participante (ou responsável)

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

Resultados encontrados após análise dos polimorfismos no grupo CASO, onde M=mãe; P=pai; 0=ausência do polimorfismo; 1=presença do polimorfismo em heterozigose e 2=presença do polimorfismo em homozigose.

Cariótipo		MTHFR		TYMS			CBS		
		677C>T	1298A>C	2 rep	3 rep	4 rep	844ins68	I278T	G307S
Monossomia X	M	0	1	2	0	0	0	0	0
	P	1	1	2	0	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	0	0	2	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	0	0	2	0	0	0	0
	M	0	1	1	1	0	0	0	0
	P	2	0	1	1	0	0	0	0
	M	0	0	1	1	0	1	1	1
	P	0	1	1	1	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	0	0	2	0	0	0	0
	M	1	0	2	0	0	0	0	0
	P	1	0	0	2	0	0	0	0
	M	0	1	1	1	0	1	1	0
	P	2	0	1	1	0	0	1	1
	M	0	0	1	1	0	0	0	0
	P	0	0	0	2	0	0	0	0
Trissomia 13	M	1	0	1	1	0	0	0	0
	P	1	1	1	1	0	1	1	0
	M	1	1	0	2	0	0	0	0
	P	0	1	2	0	0			
	M	1	0	1	1	0	0	0	0
	P	0	1	1	1	0	0	0	0
	P	1	1	0	2	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	0	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	0	1	1	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
Trissomia 18	M	1	1	1	1	0	0	0	0
	P	2	0	0	2	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	1	2	0	0	1	1	0
	M	1	0	1	1	0	0	0	0
	P	1	1	1	1	0	1	1	0
	M	0	0	2	0	0	0	0	0
	M	1	0	1	1	0	0	0	0
	M	2	0	1	1	0	0	0	1
	P	1	1						
	M	1	0	2	0	0	0	0	0

Trissomia 18 <i>(continuação)</i>	P	1	0	1	1	0	0	0	0
	P	1	1	0	2	0	1	1	0
	M	1	1	1	1	0	1	1	0
	M	0	0	2	0	0	0	0	0
	P	0	1	0	2	0	0	0	0
	M	0	1	0	2	0	1	1	0
	P	1	0	1	1	0	0	0	0
	M	0	1				0	1	1
	P	1	0	1	1	0	0	0	0
	P	2	0	0	2	0	0	0	0
	M	1	1	2	0	0	0	0	0
Trissomia 21	M	0	1	2	0	0	0	0	0
	P	1	1	0	2	0	0	0	1
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	1	0	2	0	0	0	0
	M	0	0	0	2	0	0	0	0
	P	2	0	0	2	0	1	1	0
	M	1	1	1	1	0	0	0	0
	P	0	1	0	2	0	0	0	0
	M	0	0	0	2	0	0	0	0
	P	0	1	1	1	0	1	1	0
	M	0	1	2	0	0	0	0	0
	P	0	0	1	1	0	1	1	0
	M	0	0	1	1	0	0	0	0
	P	0	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	1	1	1	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	M	1	1	0	2	0	0	0	0
	M	1	0	1	1	0	1	1	0
	P	0	1	2	0	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	0	2	0	0	1	1	0
	M	0	1	0	2	0	0	0	0
	P	1	1	1	1	0	0	0	0
	M	2	0	1	1	0	0	0	0
	M	0	1	2	0	0	0	0	0
	P	0	1	0	2	0	0	0	0
	P	0	2	0	2	0	0	0	0
	M	0	0	0	2	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	0	1	1	0	1	1	0
	M	0	2	1	1	0	0	0	1
	M	0	1	1	1	0	0	0	0
	P	2	0	1	1	0	0	0	0
	M	1	1	1	1	0	0	0	0
	P	0	0	0	2	0	0	0	0
	P	0	0	1	1	0	0	0	0
	M	0	1	1	1	0	0	0	0
	M	0	0	1	1	0	0	0	0
	P	0	1	1	1	0	0	0	0
	M	1	0	1	1	0	0	0	0

Trissomia 21 <i>(continuação)</i>	P	0	1	2	0	0	0	0	0
	P	1	1	0	2	0	0	0	0
	M	2	0	0	2	0	0	0	0
	M	0	1	0	2	0	1	1	0
	P	0	1	1	1	0	0	0	0
	M	2	0	1	1	0	0	0	0
	P	1	1	2	0	0	0	0	0
	M	0	0	1	1	0	0	0	0
	P	1	1	1	1	0	0	0	0
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	0	2	0	2	0	0	0	0
	P	0	0	1	1	0	0	0	0
	M	1	1	1	1	0	0	0	0
	M	0	1	1	1	0	0	0	0
Trissomia 14	P	1	1	0	2	0	0	0	0
	M	0	1	1	1	0	0	0	0
Trissomia 7	M	0	1	1	1	0	0	0	0
	P	0	0	1	1	0	0	0	0
	P	2	0	0	2	0	1	1	0
	M	0	1	1	1	0	0	0	1
Trissomia 16	P	1	0	1	1	0	0	0	0
	M	1	0	2	0	0	0	0	0
	M	0	0	0	2	0	0	0	1
	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	1	1	1	0	0	0	1
Trissomia 22	M	1	1	1	1	0	0	0	0
47,XX,+21, 22p-	M	1	0	0	2	0	0	0	0
	P	1	1	0	1	1	0	0	0

Resultados encontrados após análise dos polimorfismos no grupo CONTROLE, onde M=mãe; P=pai; 0=ausência do polimorfismo; 1=presença do polimorfismo em heterozigose e 2=presença do polimorfismo em homozigose.

	MTHFR		TYMS			CBS		
	677CT	1298AC	2 rep	3 rep	4 rep	844ins68	I278T	G307S
P	0	1	1	1	0	0	0	0
M	0	0	2	0	0	0	0	0
P	2	0	1	1	0	0	0	0
M	2	0	1	1	0	0	0	0
P	2	0	0	2	0	0	0	0
M	1	1	0	2	0	0	0	0
P	0	1	1	1	0	0	0	0
M	2	0	0	2	0	1	1	0
P	0	0	2	0	0	0	0	0
M	1	0	0	2	0	0	0	0
P	1	1	0	2	0	0	0	0
M	1	0	1	1	0	0	0	0
P	1	0	0	2	0	0	0	0
M	1	0	1	0	1	1	1	0
P	1	1	0	2	0	0	0	0
M	1	0	2	0	0	1	1	0
P	1	0	2	0	0	0	0	0
M	0	0	0	2	0	0	0	0
P	1	1	1	1	0	1	1	0
M	0	1	0	2	0	1	1	0
P	2	0	0	2	0	0	0	0
M	0	1	1	1	0	0	0	0
P	0	0	2	0	0	0	0	0
M	1	0	1	1	0	1	1	0
P	1	1	2	0	0	0	0	0
M	1	0	1	1	0	0	0	0
P	0	2	2	0	0	0	0	0
M	1	0	1	1	0	0	0	0
P	0	1	1	1	0	0	0	0
M	0	0	2	0	0	0	0	0
P	1	1	0	2	0	1	1	0
M	2	0	2	0	0	0	0	0
P	0	1	1	1	0	0	0	0
M	2	0	2	0	0	0	0	0
P	0	0	1	1	0	0	0	0
M	1	0	2	0	0	0	0	0
P	0	1	2	0	0	0	0	0

M	1	1	0	2	0	0	0	0
P	1	0	2	0	0	0	0	0
M	1	0	2	0	0	0	0	0
P	0	1	0	2	0	0	0	0
M	0	1	0	2	0	0	0	0
P	1	0	1	1	0	0	0	0
M	1	0	1	1	0	0	0	0
P	0	0	0	2	0	0	0	0
M	1	1	0	2	0	0	0	0
P	2	0	2	0	0	0	0	0
M	0	0	2	0	0	0	0	0
P	0	1	0	2	0	0	0	0
M	1	1	1	1	0	0	0	0
P	1	0	0	2	0	1	1	0
M	1	0	0	2	0	0	0	0
P	1	1	1	1	0	1	1	0
M	2	0	0	2	0	1	1	0
P	0	2	1	1	0	0	0	0
M	0	0	2	0	0	1	1	0
P	0	2	2	0	0	0	0	0
M	1	0	0	2	0	0	0	0
P	0	2	1	1	0	0	0	0
M	1	0	2	0	0	0	0	0
P	1	1	1	1	0	0	0	0
M	0	1	1	1	0	0	0	0
P	1	1	1	1	0	0	0	0
M	1	0	1	1	0	0	0	0
P	0	1	1	1	0	0	0	0
M	0	0	1	1	0	1	1	0
P	1	1	1	1	0	0	0	0
M	0	1	1	1	0	0	0	0
P	0	0	0	2	0	0	0	0
M	1	0	2	0	0	0	0	0
P	1	0	1	1	0	0	0	0
M	1	0	0	2	0	0	0	0
P	1	0	0	2	0	0	0	0
M	1	0	0	2	0	1	1	0
P	0	1	2	0	0	0	0	0
M	1	1	0	2	0	0	0	0
P	1	1	0	2	0	1	1	0
M	0	1	1	1	0	0	0	0
P	0	2	1	1	0	0	0	0
M	0	2	0	2	0	0	0	0
P	0	1	1	1	0	0	0	0
M	1	0	0	2	0	0	0	0
P	0	1	1	1	0	0	0	0
M	0	1	2	0	0	0	0	0
P	0	2	0	2	0	1	1	0
M	0	0	1	1	0	0	0	0

P	1	0	1	1	0	0	0	0
M	1	1	2	0	0	1	1	0
P	1	0	1	1	0	1	1	0
M	1	1	2	0	0	1	1	0
P	0	0	2	0	0	1	1	0
M	0	0	0	2	0	0	0	0
P	1	1	2	0	0	0	0	0
M	1	1	0	2	0	0	0	0
P	1	1	0	2	0	0	0	0
M	1	1	1	0	1	0	0	0
P	0	1	2	0	0	1	1	0
M	0	1	0	2	0	1	1	0
P	2	0	2	0	0	1	1	0
M	0	1	1	1	0	0	0	0
P	0	0	0	2	0	2	2	0
M	2	0	0	2	0	0	0	0
P	0	1	0	2	0	0	0	0
M	0	2	0	2	0	0	0	0
P	0	0	1	1	0	0	0	0
M	1	0	2	0	0	0	0	0
P	1	1	0	2	0	0	0	0
M	1	0	2	0	0	0	0	0
P	0	1	0	2	0	0	0	0
M	0	1	1	1	0	0	0	0
P	0	2	1	1	0	0	0	0
M	1	0	0	2	0	0	0	0
P	1	0	0	2	0	0	0	0
M	1	0	2	0	0	1	1	0
P	1	0	1	1	0	0	0	0
M	0	1	0	2	0	0	0	0
P	0	0	0	2	0	0	0	0
M	0	1	1	1	0	1	1	0
P	1	0	1	1	0	0	0	0
M	1	0	1	1	0	0	0	0
P	1	0	0	2	0	0	0	0
M	0	1	2	0	0	0	0	0
M	2	0	2	0	0	0	0	0
P	0	1	1	1	0	0	0	0
M	1	1	2	0	0	0	0	0
P	0	1	1	1	0	0	0	0
M	1	1	2	0	0	0	0	0
P	1	0	1	1	0	0	0	0
M	1	0	1	1	0	0	0	0
P	1	1	1	1	0	0	0	0
M	0	0	0	2	0	0	0	0
P	2	0	1	1	0	0	0	0
M	0	1	2	0	0	0	0	0
P	1	0	0	2	0	0	0	0