



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

Analice Andreoli da Silva

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

São José do Rio Preto
2017

Analice Andreoli da Silva

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

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

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

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

São José do Rio Preto 2017

Silva, Analice Andreoli

Impacto de polimorfismos da região 3' não traduzida do gene *MTHFR* e de polimorfismo do microRNA hsa-mir-149 no risco materno para a síndrome de Down/ Analice Andreoli da Silva

São José do Rio Preto, 2017.

89p.

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

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

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

1. Síndrome de Down; 2. Ácido Fólico; 3. Polimorfismo Genético.

Analice Andreoli da Silva

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

BANCA EXAMINADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof^a. Dr^a. Érika Cristina Pavarino

1º Examinador: Prof^a. Dr^a. Patricia Matos Biselli Chicote

2º Examinador: Prof^a. Dr^a. Tatiane Iembo

1º Suplente: Prof^a. Dr^a. Ana Livia Galbiatti-Dias

2º Suplente: Prof^a. Dr^a. Rosa Sayoko Kawasaki-Oyama

São José do Rio Preto, 03 de fevereiro de 2017.

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos.....	ii
Epígrafe.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas e Quadros.....	ix
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	xi
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Síndrome de Down e metabolismo do folato.....	2
1.2. MicroRNA e gene <i>MTHFR</i>	7
1.3. Objetivo.....	10
2. Casuística e Métodos.....	11
2.1. Casuística.....	12
2.2. Métodos.....	13
2.2.1. Extração de DNA.....	13
2.2.2. Quantificação do DNA genômico.....	13
2.2.3. Análise molecular.....	14
2.2.4. Análise estatística.....	20
3. Resultados.....	22
3.1. Grupos de estudo e a relação com a idade materna.....	23
3.2. Análise genotípica e o risco materno para SD.....	23

4. Discussão.....	31
5. Conclusão.....	48
6. Referências Bibliográficas.....	50
7. Apêndices.....	78
Apêndice 1 – Termo de Consentimento livre e esclarecido.....	79
Apêndice 2 – Questionário padronizado.....	81
Apêndice 3 – Técnica de extração, segundo Miller.....	82
Apêndice 4 – Técnica de extração, segundo Salazar.....	84
8. Anexos.....	86
Anexo I – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP (CEP).....	87
Anexo II – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).....	88
Anexo III – Parecer Consubstanciado do CEP.....	89

DEDICATÓRIA

A Deus.

*Aos meus pais que incentivaram e
não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, saúde, bênçãos, coragem e força para superar os obstáculos e por me guiar e proteger em todos os momentos.

Aos meus pais, Alice e Jorge, por apoiarem e acreditarem que a educação sempre vale a pena. Obrigada por me ensinarem e educarem fazendo de mim o que sou hoje. Eu não seria nada sem vocês.

À professora Érika Cristina Pavarino pelos ensinamentos, competência, disposição, estímulos e orientação. Por ter me aceitado como sua aluna de mestrado mesmo sem me conhecer e ter acreditado no meu potencial. Seus ensinamentos contribuíram para meu amadurecimento profissional. Sou grata pela oportunidade concedida para desenvolver esse projeto. Obrigada por me orientar.

À professora Joice Matos Biselli Périgo por ter se dedicado e contribuído tanto nesse trabalho, por sanar minhas dúvidas mesmo em momentos e horários inoportunos, disponibilizar seu tempo, ajudar no meu crescimento permitindo que eu aprendesse tanto.

À professora Eny Maria Goloni Bertollo pela paixão à pesquisa científica que sempre a acompanha.

As professoras Márcia e Patrícia pela paciência e ajuda nas práticas laboratoriais e pela ajuda nas minhas muitas dúvidas para desenvolver esse projeto. Obrigada pela paciência e disponibilidade em explicar a mesma coisa alguma vezes.

Às enfermeiras Mariana, Miriam e Lílian do Serviço de Pediatria do Hospital de Base de São José do Rio Preto que estavam sempre dispostas a coletar nossos pacientes. Vocês nos disponibilizaram muito mais que tempo. Sem essa ajuda nos não teríamos conseguido desenvolver esse projeto. As terças-feiras nunca mais serão as mesmas.

Ao Victor Henrique pelo carinho, apoio, paciência, incentivo, dedicação, companheirismo e ajuda indispensável. Obrigada por compartilhar esse sonho comigo e me fazer acreditar que posso mais do que imagino. Você proporcionou coragem e força quando eu precisei.

À Mariana Fernanda que durante esse tempo compartilhou muito comigo. Foram conversas, risadas, choros, almoços, extrações de DNA e RNA, placas de diluição, placas ditadas para PCR, noites no laboratório que fizeram dessa caminhada muito

mais divertida. Espero que nossa relação de amizade se perpetue. Foi um prazer conhecê-la.

Aos colegas da UPGEM, pela ajuda, amizade, descontração e por fazerem dos meus dias mais alegres mesmo quando alguma coisa não saía bem. Ao Marlon companheiro de equipe Down, bancada, ambulatório e artigos baixados, a Camila pela diversão e distração quando necessário, Anelise por dividir seu conhecimento sobre as técnicas, a Daniela pela ajuda nos experimentos, a Glaucia pelas dicas sobre formatação, enfim, todos que indiretamente ou diretamente contribuíram. Foi um privilégio ter conhecido vocês.

À professora Thais Gastardelo pela amizade e por me fazer querer seguir o mesmo caminho acadêmico ao permitir que eu ajudasse a organizar sua tese. À Marystela pela ajuda nesses momentos finais.

A todos aqueles que foram meus professores e que fizeram parte da minha formação como indivíduo e profissional.

À Diretoria da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) e do Hospital de Base pelo incentivo e apoio para o desenvolvimento desse projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP e seus funcionários.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade, sugestões e colaboração na correção dessa dissertação.

*Aos amigos que compartilharam essa caminhada e que mesmo não entendendo sobre o projeto sempre tiveram uma palavra de apoio ou consolo para comigo. Vocês foram mais importantes do que imaginam. Obrigada pelo carinho, diversão, conversas, pelos ombros, conselhos, enfim, obrigada por estarem tão presentes mesmo quando eu não estava. Em especial, a **Raquel**, amiga de tantos anos e tantas risadas.*

E finalmente, as mães que aceitaram participar e viabilizaram a realização desse projeto. Por causa de vocês este trabalho se concretizou. Obrigada pelo tempo, paciência e compreensão.

Obrigada a todos que contribuíram com esse projeto porque sem ajuda eu não teria conseguido.

EPÍGRAFE

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática do metabolismo do folato e principais enzimas (modificada de acordo com Coppedè 2015).....	6
Figura 2. Representação esquemática da biogênese dos miRNAs (modificada de acordo com Meurer <i>et al.</i> , 2016).....	8
Figura 3. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo <i>MTHFR</i> (rs4846048 A→G).....	17
Figura 4. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo <i>MTHFR</i> (rs4846049 G→T).....	18
Figura 5. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo hsa-mir-149 (rs2292832 C→T).....	19

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 na casuística total de participantes.....25

Tabela 2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 nas mulheres com idade materna inferior a 35 anos.....25

Tabela 3. Resultados das análises de regressão logística múltipla, ajustados para a idade materna, comparando os grupos controle (n=296) e caso (n=167) nos modelos genéticos dominante e recessivo.....26

Tabela 4. Resultados das análises de regressão logística múltipla considerando somente mulheres com idade materna inferior a 35 anos, comparando os grupos caso controle (n=269) e caso (n=86), nos modelos genéticos dominante e recessivo.....27

Tabela 5. Resultados da análise de associação entre os haplótipos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 e o risco materno para prole com SD, ajustado para a idade materna das participantes, na casuística total (controle n=296 e caso n=167).....28

Tabela 6. Resultados da análise de associação entre os haplótipos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 e o risco materno para prole com SD considerando-se somente mulheres com idade materna inferior a 35 anos (controle n = 269 e caso n = 86).....28

Tabela 7. Resultados da análise de associação entre os genótipos combinados e o risco materno para prole com SD na casuística total (caso n = 162; controle n= 294)*.....29

Tabela 8. Resultados da análise de associação entre os genótipos combinados e o risco materno para prole com SD no subgrupo de mulheres com idade materna inferior a 35 anos, (controle n=267; caso n=81)*30

Tabela 9. Estudos sobre associação entre polimorfismos maternos em genes do metabolismo do folato e fator de risco para prole com síndrome de Down, segundo Coppedè 2015 com modificações.....	44
Quadro 1. Ensaios Taqman (<i>Applied Biosystems</i> ®) para genotipagem dos polimorfismos por discriminação alélica por PCR em tempo real.....	15
Quadro 2. Quantidade de reagentes utilizados nas reações de amplificação para os polimorfismos <i>MTHFR</i> rs4846048, <i>MTHFR</i> rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832.....	15
Quadro 3. Ciclagens das reações de amplificação por PCR em tempo real para genotipagem dos polimorfismos <i>MTHFR</i> rs4846048, <i>MTHFR</i> rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832.....	16
Quadro 4. Genótipos possíveis para cada polimorfismo avaliado.....	16

Lista de abreviaturas e símbolos

μL	Microlitro
10-formilTHF	10-Formiltetrahidrofolato (<i>10-formylTHF</i>)
5,10-metilenoTHF	5, 10-Metilenotetrahidrofolato (<i>5,10-methylenetetrahydrofolate</i>)
5,10-metnilTHF	5,10 – Metiniltetrahidrofolato (<i>5,10-methenylTHF</i>)
5-MTHFR	5-Metiltetrahidrofolato (<i>5-methyltetrahydrofolate</i>)
A	Adenina (<i>Adenine</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
B ₁₂	Vitamina B ₁₂ (<i>Vitamin B₁₂</i>)
B ₆	Vitamina B ₆ (<i>Vitamin B₆</i>)
BHMT	Betaína-homocisteína metiltransferase (<i>Betaine-homocysteine methyltransferase</i>)
C	Citosina (<i>Cytosine</i>)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CBS	Cistationina beta sintase (<i>Cystathionine beta-synthase</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CH ₃	Grupo metil (<i>methyl group</i>)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CpG	Dinucleotídeo citosina-fosfato-guanina
DCC	Doença cardíaca congênita
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DHF	Dihidrofolato (<i>Dihydrofolate</i>)
DHFR	Dihidrofolato redutase (<i>Dihydrofolate reductase</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Desoxirribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Et al.	<i>Et alia</i>
Exp-5	Exportina 5
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FUNFARME	Fundação Faculdade Regional de Medicina de São José do Rio Preto
G	Guanina (<i>Guanine</i>)
HB	Hospital de Base de São José do Rio Preto
Hcy	Homocisteína (<i>Homocysteine</i>)
IC 95%	Intervalo de confiança 95% (<i>Confidence interval</i>)
M	Molar
miRISC	Complexo de Silenciamento Induzido por miRNA
miRNA	MicroRNA
mL	Mililitro
MTHFD1	Metilenotetrahidrofolato desidrogenase 1 (<i>Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 1</i>)
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato redutase (<i>Methylenetetrahydrofolate reductase</i>)
MTR	Metionina sintase (<i>Methionine synthase</i>)
MTRR	Metionina sintase redutase (<i>Methionine synthase reductase</i>)
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
ng/mL	<i>Nanogram / microlitre</i>
nm	Nanômetro
OD	Densidade óptica
OD	<i>Odds ratio</i>
pb	Pares de base (<i>Base pair</i>)
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Pré-miRNA	miRNA precursor
Pri-miRNA	miRNA primário
RNAm	RNA mensageiro
rpm	Rotações por minuto
SAH	S-adenosilhomocisteína (<i>S-adenosylmethionine</i>)
SAM	S-adenosilmetionina (<i>S-adenosylmethionine</i>)
SD	Síndrome de Down (<i>Down syndrome</i>)

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHMT	Serina hidroximetiltransferase (<i>Serine hydroxymethyltransferase</i>)
SLC19A1	Carreador de folato reduzido 1 (<i>Reduced folate carrier</i>)
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
T	Timina (<i>Thymine</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCN2	Transcobalamina 2 (<i>Transcobalamin II</i>)
TE	Tampão de eluição
THF	Tetrahydrofolato (<i>Tetrahydrofolate</i>)
TYMS	Timidilato sintase (<i>Thymidylate Synthase</i>)
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
UTR 3'	Região 3' não traduzida
χ^2	Qui-quadrado (<i>Chi-square</i>)

Resumo

Introdução: A síndrome de Down (SD) é uma condição genética caracterizada pela presença de três cópias do cromossomo 21. Na maioria dos casos, o cromossomo 21 extra é de origem materna e é originado devido a erros na segregação cromossômica durante a meiose. A idade materna avançada no momento da concepção representa o principal fator de risco para SD. Entretanto, estudos sugerem que alterações em genes envolvidos no metabolismo do folato, como o *MTHFR* (*Metilenotetrahidrofolato redutase*), podem aumentar o risco materno para prole com SD, independente da idade, por resultarem em hipometilação do DNA e, conseqüentemente, em segregação cromossômica anormal. A expressão de *MTHFR* é mediada por microRNAs (miRNAs), assim polimorfismos em miRNAs também podem alterar esse metabolismo com conseqüências na disjunção cromossômica. **Objetivo:** Avaliar se a presença dos polimorfismos do gene *MTHFR* rs4846048 e rs4846049 e do pré-miRNA hsa-mir-149 rs2292832 está associada com o risco materno para a ocorrência de prole com SD.

Casuística e métodos: Foram avaliadas 167 mães de indivíduos com trissomia livre do cromossomo 21 e 296 mulheres sem história de aborto prévio, mães de indivíduos sem a síndrome e sem malformação. Os polimorfismos foram avaliados pela técnica de discriminação alélica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando-se os ensaios comerciais TaqMan® SNP Genotyping Assays (AppliedBiosystems®). As análises de regressão logística múltipla foram realizadas para os polimorfismos nos modelos dominante e recessivo utilizando o programa Minitab v. 16.0. A análise de combinação genotípica foi realizada utilizando o teste exato de Fisher, no modelo dominante. A análise dos haplótipos dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048 e rs4846049 foi realizada utilizando o programa Haploview v. 5.0.

A idade materna maior ou igual a 35 anos como fator de risco para a SD foi analisada por meio de regressão logística binária. **Resultados:** A idade materna igual ou maior que 35 anos foi considerada um fator de risco para prole com SD ($P < 0,0001$; $OR = 9,38$; $IC\ 95\% = 5,70-15,45$). Os polimorfismos rs4846048 e rs4846049 do gene *MTHFR* não foram associados com a ocorrência de prole com SD, independente da idade materna. As análises de genótipos combinados dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832, bem como dos haplótipos do gene *MTHFR*, também não evidenciaram associação com risco materno para SD. Um risco aumentado para a ocorrência de prole com SD foi observado para mulheres com idade abaixo de 35 anos no momento da concepção, portadoras do genótipo TT do polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832 ($OR = 2,02$; $IC\ 95\% = 1,06 - 3,83$). **Conclusão:** Na casuística avaliada não há evidências de associação entre os polimorfismos maternos *MTHFR* rs4846049 e rs4846048 e risco para a ocorrência de prole SD. Entretanto, um risco materno aumentado para SD é observado em mulheres com idade materna abaixo de 35 anos portadoras do genótipo materno TT do polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832.

Palavras chave: Síndrome de Down, Ácido Fólico, Polimorfismo Genético.

Abstract

Introduction: Down syndrome (DS) is a genetic condition characterized by the presence of three copies of chromosome 21. In most cases, the extra chromosome 21 is of maternal origin due to errors in chromosomal segregation during meiosis. Advanced maternal age at conception is the main risk factor for DS. However, studies suggest that alterations in genes involved in folate metabolism, such as *MTHFR* (*Methylenetetrahydrofolate reductase*), may increase the risk for DS regardless maternal age, due to DNA hypomethylation and, consequently, abnormal chromosomal segregation. *MTHFR* expression is regulated by microRNAs (miRNAs), and polymorphisms in miRNAs may also modify this metabolism with consequences on chromosome disjunction. **Objective:** To assess whether the presence of *MTHFR* rs4846048 and rs4846049 and precursor hsa-mir-149rs2292832 polymorphisms is associated with maternal risk for the occurrence of offspring with DS. **Casuistic and Methods:** In the present study, 167 mothers of individuals with free trisomy 21, and 296 women without previous history of abortion, mothers of individuals without syndrome and without malformation were examined. Polymorphisms were evaluated by real-time polymerase chain reaction (PCR) using the TaqMan® SNP Genotyping Assays (AppliedBiosystems®) commercial assays. Multiple logistic regression analyzes were performed for the polymorphisms in the dominant and recessive models using the Minitab v. 16.0 program. Genotypic combination analysis was performed using the Fisher exact test in the dominant model. Analysis of the haplotypes of the *MTHFR* polymorphisms rs4846048 and rs4846049 was performed using the Haploview v. 5.0 program. Maternal age equal or greater than to 35 years old as a risk factor for DS was analyzed using binary logistic regression. **Results:** Maternal age equal to 35 years old

or greater was considered a risk factor for offspring with DS ($P < 0.0001$; OR = 9.38; 95% CI = 5.70-15.45). The maternal polymorphisms rs4846048 and rs4846049 of the *MTHFR* gene were not associated with the occurrence of offspring with DS, regardless of maternal age. Analyses of combined genotypes of the *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 and hsa-mir-149 rs2292832 polymorphisms, as well as the *MTHFR* gene haplotypes, also showed no association with maternal risk for DS. An increased risk for the occurrence of offspring with DS was observed for women under 35 years old at the time of conception and carriers of the TT genotype of hsa-mir-149 rs2292832 polymorphism (OR = 2.02, 95% CI = 1.06 - 3.83). **Conclusion:** There is no evidence of association between maternal polymorphisms *MTHFR* rs4846049 and rs4846048 and risk for the occurrence of SD offspring. However, an increased maternal risk for DS is observed in women with maternal age under 35 years old and carriers of the TT genotype of the hsa-mir-149 rs2292832 polymorphism.

Key words: Down Syndrome, Folic Acid, Genetic Polymorphism.

1.INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Síndrome de Down e metabolismo do folato

A Síndrome de Down (SD) é uma doença genética com incidência aproximada de 1:800 nascidos vivos^(1, 2). Esta condição genética foi descrita pela primeira vez pelo médico britânico John Langdon Down, o qual apresentou minuciosa descrição clínica da SD em 1866⁽¹⁾.

A causa genética da SD foi descoberta em 1959 por Jérôme Lejeune e colaboradores. Seus estudos identificaram que pacientes com características parecidas às descritas por John Langdon Down apresentavam uma cópia do cromossomo 21 em excesso, caracterizando uma trissomia nesses indivíduos⁽³⁾.

O excesso de material genético proveniente do cromossomo 21 pode ocorrer por meio de translocações cromossômicas, mosaicismos e trissomia livre^(4, 5). A translocação consiste no rearranjo do material genético entre os cromossomos, mais frequentemente, o cromossomo 14 com o 21⁽⁴⁾. Nos casos de mosaicismos, algumas células somáticas apresentam o conjunto de 46 cromossomos e outras apresentam trissomia do cromossomo 21, contendo 47 cromossomos⁽⁴⁾. A trissomia livre acomete cerca de 95% dos casos e é caracterizada por um cromossomo 21 extra em todas as células, portanto, o indivíduo apresenta o cariótipo constituído por 47 cromossomos (47, XY, +21 ou 47, XX, +21)⁽⁴⁾. O mecanismo genético que resulta em trissomia livre é a não disjunção cromossômica durante a meiose^(4, 5).

Na maioria dos casos, indivíduos com SD possuem dois cromossomos 21 maternos e um paterno, o que pode ser atribuído à ocorrência mais frequente da não disjunção cromossômica na divisão meiótica nas mulheres em função da idade materna

avançada. Isso se deve ao fato de as mulheres nascerem com os folículos que darão origem aos óvulos e, quanto mais envelhecidas essas células, maior é a chance de ocorrer erros durante o processo de divisão dos cromossomos⁽⁵⁻⁸⁾.

Além da associação entre SD e a idade materna avançada, outros fatores podem estar relacionados com o nascimento de indivíduos com SD, pois mães jovens também têm filhos com SD^(9, 10). Em 1999, James e colaboradores sugeriram que, independente da idade materna, as interações genes-nutrientes envolvidas no metabolismo do folato poderiam resultar em hipometilação do DNA, aumentando o risco de não disjunção cromossômica⁽¹¹⁾.

O folato é obtido da ingestão dietética sob a forma de ácido fólico, uma vitamina hidrossolúvel do complexo B importante na síntese, regulação e metilação do DNA⁽¹²⁻¹⁴⁾. A metilação do DNA é uma reação que envolve a adição de um radical metil (CH₃) na posição 5' de resíduos de citosina localizados principalmente em dinucleotídeos citosina-guanina (CpG) e é responsável pelo controle da expressão gênica, pela manutenção da estabilidade genômica e da estrutura da cromatina⁽¹⁵⁻¹⁹⁾. Deficiência de folato pode resultar em hipometilação, causando uma instabilidade genética e facilitando a ocorrência de aneuploidias^(15, 20-24).

A principal forma de folato circulante no plasma, o 5-metiltetraidrofolato (5-MTHF), é transportado para o interior das células pela enzima carreadora de folato reduzido 1 (SLC19A1)⁽²⁵⁾. No interior das células, o 5-MTHF transfere um grupo metil para a homocisteína (Hcy), formando metionina e tetraidrofolato (THF). Na via da remetilação, a Hcy, aminoácido sulfurado, é reciclada à metionina por meio de duas reações diferentes. No fígado e nos rins, uma parte da Hcy é remetilada pela enzima Betainahomocisteína metiltransferase (BHMT)⁽²⁶⁾. Entretanto, na maioria dos outros

tecidos, a remetilação é catalisada pela enzima metionina sintase (MTR) com a vitamina B12 (cobalamina) como cofator essencial para essa reação^(27, 28). A enzima metionina sintase redutase (MTRR) é responsável por manter ativa a enzima MTR^(29, 30).

A metionina formada é então condensada com o trifosfato de adenosina (ATP), resultando na S-adenosilmetionina (SAM), que é desmetilada para formar S-adenosilhomocisteína (SAH), com posterior hidrólise para liberar adenosina e Hcy⁽³¹⁻³³⁾.

A Hcy pode não ser convertida em metionina e, então, participar da via de transulfuração onde é catabolizada pela ação da enzima cistationina β -sintetase (C β S), na presença de vitamina B6, e resulta na formação da cistationina, que é então hidrolisada à cisteína⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Além da sua influência sobre a metilação do DNA, a via do folato está envolvida na biossíntese de precursores de ácido nucléicos. O THF proveniente do processo de remetilação da Hcy, catalisado pela enzima MTR, pode ser convertido em 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metilenoTHF) pela enzima Serina hidroximetiltransferase (SHMT), uma reação dependente da presença de vitamina B6⁽³⁷⁾. Pela ação da enzima trifuncional Metilenotetrahidrofolato desidrogenase (MTHFD1), o THF também pode ser sequencialmente convertido em seus derivados 10-formilTHF, 5,10-metirilTHF, substratos para a síntese de DNA, e 5,10-metilenoTHF⁽³⁸⁾.

A enzima Timidilato sintase (TYMS) catalisa a conversão de 5,10-metilenoTHF em dihidrofolato, que, por sua vez, é reduzido para a THF pela ação da enzima Dihidrofolato redutase (DHFR)⁽³⁹⁾. Contudo, o 5,10-metilenoTHF também pode ser reduzido a 5-metiltetrahidrofolato (5-MTHF) pela ação da enzima Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR), enzima de grande importância para a

regulação de derivados de folato para as reações de metilação do DNA e remetilação da Hcy⁽⁴⁰⁾. A Figura 1 mostra o metabolismo do folato e principais enzimas envolvidas.

O risco materno para SD pode ser modulado por polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo do folato e da Hcy. James e colaboradores⁽¹¹⁾ investigaram a substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) no gene *Metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR)*, localizado no cromossomo 1, na posição 1p36.3, responsável por codificar a enzima MTHFR, em mães de indivíduos com SD e um grupo controle (mães com filhos sem a síndrome). Como resultado, a presença do alelo T, responsável pela substituição do aminoácido alanina por valina na proteína produzida, o que diminui sua atividade enzimática, foi associada ao risco materno aumentado para a ocorrência de prole com SD. Nesse mesmo estudo, os autores observaram concentrações elevadas de Hcy plasmática, aumento na formação de ácido metilmalônico (MMA) e concentrações reduzidas de folato sérico, indicativos de metabolismo anormal do folato, em mães de filhos com SD⁽¹¹⁾.

Desde então, o polimorfismo *MTHFR C677T* e outras variantes genéticas envolvidas na via do folato e da Hcy têm sido estudadas e apontadas como fatores de risco maternos para a SD em diferentes populações^(11, 41-62).

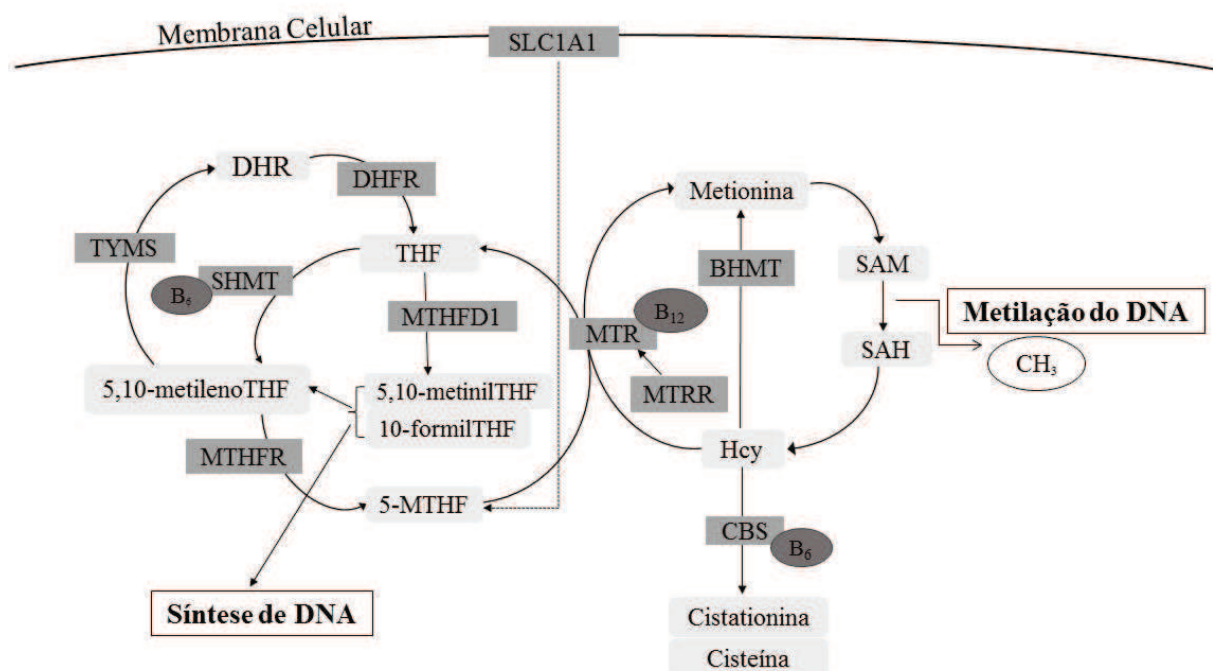


Figura 1. Representação esquemática do metabolismo do folato. SLC1A1: Carreador de folato reduzido 1; 5-MTHF: Metiltetrahydrofolato; THF: Tetrahydrofolato; 5,10-MetilenoTHF: 5,10-Metilenotetrahydrofolato; MTHFR: Metilenotetrahydrofolato redutase; MTHFD1: Metilenotetrahydrofolato desidrogenase; 5,10 - MetilTHF: 5, 10 - MetilTHF; 10-FormilTHF: 10-FormilTHF; SHMT: Serina hidroximetiltransferase; DHFR: Dihydrofolato redutase; DHR: Dihydrofolato; TYMS: Timidilato sintase; CH₃: Grupo metil; MTR: Metionina sintase; MTRR: Metionina sintase redutase; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína, Hcy: Homocisteína; BHMT: Betaína-homocisteína metiltransferase; CBS: Cistationina beta sintase. (Modificada segundo Coppedè 2015)⁽⁶³⁾.

1.2. MicroRNA e gene *MTHFR*

Estudos de Friedman e colaboradores realizados *in silico* predizem que aproximadamente 60% dos genes podem ser regulados por microRNAs (miRNA)⁽⁶⁴⁾, pequenas moléculas de RNAs não-codificantes de proteínas com cerca de 22 nucleotídeos, envolvidas na regulação gênica pós-transcricional⁽⁶⁵⁾.

Os miRNAs são transcritos pela enzima RNA polimerase II e são chamados de pri-miRNAs (miRNAs primários)^(66, 67). Os pri-miRNAs são clivados pelo complexo microprocessador formado por DROSHA, uma enzima nuclear do tipo RNase III, associada com a proteína acessória DGCR8 (Di George Syndrome Critical Region 8), gerando um miRNA precursor, chamado de pré-miRNA, em forma de *hairpin*^(68, 69). Essa estrutura tem aproximadamente 65 nucleotídeos⁽⁷⁰⁻⁷²⁾. O pré-miRNA é transportado do núcleo para o citoplasma pela proteína exportina5 (Exp-5) e processado pela enzima Dicer, resultando em um miRNA maduro com fita dupla (miRNA e miRNA*)⁽⁶⁸⁾. Uma das fitas (miRNA*) é degradada e a outra será acoplada ao complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC)⁽⁷³⁻⁷⁶⁾. A Figura 2 mostra a biogênese dos miRNAs.

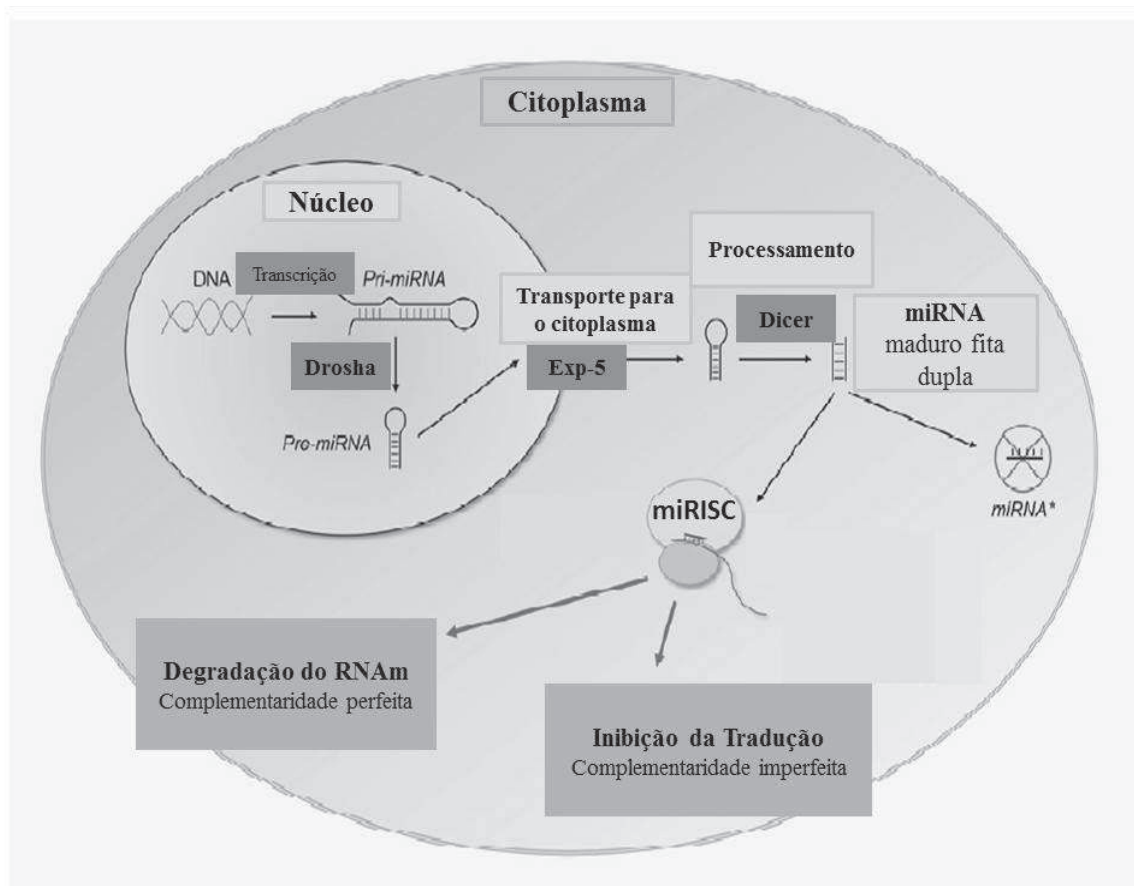


Figura 2. Representação esquemática da biogênese dos miRNAs. Pri-microRNA: transcrito primário; Pré-microRNA: miRNA precursor; Exp-5: Proteína Exportina 5; miRNA*: fita degradada; RNAm: RNA mensageiro; miRISC: Complexo de silenciamento induzido por miRNA. (Modificada segundo Meurer *et al.*, 2016)⁽⁷⁷⁾.

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs geralmente ocorre por interação na região 3' não traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro (RNAm) e depende do grau de complementaridade com o RNAm alvo⁽⁷⁸⁻⁸⁰⁾. Essa interação pode levar a inibição da tradução ou a degradação do RNAm⁽⁸¹⁻⁸³⁾. No entanto, alguns estudos observaram que os miRNAs têm outro mecanismo de atuação, por meio da ligação à região 5' UTR dos RNAm alvo⁽⁸⁴⁻⁸⁹⁾.

Um único miRNA pode regular vários genes com funções distintas e vários miRNAs podem, de forma conjunta, atuar em um único gene alvo^(64, 90, 91). Mesmo que suas funções não estejam totalmente esclarecidas, essas pequenas moléculas participam da regulação de diversos processos biológicos, como proliferação, migração e diferenciação celular, apoptose, tumorigêneses, resposta imune, doenças cardiovasculares e outros^(65, 92-97).

Polimorfismos em sítios de ligação de miRNAs localizados em regiões 3'UTR de genes alvos podem afetar o reconhecimento de genes e a regulação por meio dos miRNAs⁽⁹⁸⁾. Uma análise *in silico* mostrou que o gene *MTHFR* é um alvo do hsa-miR-149⁽⁹⁹⁾. Esse estudo mostrou que a variante rs4846049 (G→T) do gene *MTHFR* é localizada no sítio de ligação do hsa-miR-149, miRNA encontrado no cromossomo 2q37 e expresso em diversos tecidos⁽⁹⁹⁾. De acordo com esse estudo, a variante genética *MTHFR* rs4846049 foi associada com o aumento do risco para doenças coronarianas e o miRNA hsa-miR-149 pode estar envolvido na modulação desse risco por meio da regulação do gene *MTHFR*, cuja interação com o miRNA pode ser impossibilitada pelo polimorfismo⁽⁹⁹⁾.

Outro polimorfismo na região UTR 3' do gene *MTHFR* (rs4846048 A→G)⁽¹⁰⁰⁾ tem sido associado à massa corporal magra⁽¹⁰¹⁾, à modulação do início da menarca e da menopausa natural⁽¹⁰²⁾ e câncer de esôfago⁽¹⁰³⁾. Embora seja possível que esse polimorfismo possa também alterar a interação com miRNAs, ainda não há estudos que confirmem essa hipótese.

A regulação de genes alvos por miRNAs também pode ser alterada por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em miRNAs. Esses SNPs podem afetar a transcrição dos miRNAs primários, seu amadurecimento ou suas interações com seus

genes alvos, alterando processos biológicos⁽¹⁰⁴⁻¹⁰⁶⁾. A variante rs2292832 (C→T), localizada na sequência do pré-miRNA hsa-mir-149, tem sido associada à modulação de diversos tipos de câncer⁽¹⁰⁷⁻¹¹³⁾. Além disso, esse polimorfismo está envolvido no risco para acidente vascular cerebral isquêmico⁽¹¹⁴⁾, pneumoconiose em trabalhadores que atuam em minas de carvão⁽¹¹⁵⁾ e doença arterial coronariana⁽¹¹⁶⁾.

Considerando que variantes em regiões 3'UTR do gene *MTHFR* podem alterar a interação com miRNAs⁽⁹⁹⁾ e que polimorfismos em regiões de pré-miRNA podem influenciar sua biogênese e alterar sua especificidade com seus genes alvo^(105-107, 117), é possível que as variantes *MTHFR* rs4846048 e rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 possam exercer influência no metabolismo do folato e modular o risco materno para a SD de forma independente da idade; entretanto, pelo nosso conhecimento, não há estudos na literatura que avaliam essas variantes na SD.

1.3. Objetivo

Avaliar se a presença dos polimorfismos genéticos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 está associada com o risco materno para a ocorrência de prole com SD.

2. CASUÍSTICA E MÉTODOS

2. Casuística e Métodos

2.1. Casuística

De acordo com Normas Regulamentares de Pesquisa em Seres Humanos, Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), parecer nº 427.757 (Anexo 1), CAAE nº 20113313.6.0000.5415.

Foram incluídas neste estudo 463 amostras de DNA, 167 provenientes de mães com filhos com SD (grupo caso) e 296 de mães com filhos sem a síndrome (grupo controle). Duzentas e cinquenta e uma amostras (80 casos e 171 controles) foram previamente coletadas e encontravam-se armazenadas na Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular – UPGEM com aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), parecer nº 2400/2004, para uso em outros estudos (Anexo 2). Outras 212 amostras (87 caso e 125 controles - Anexo 3) foram obtidas, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice 1), durante o andamento deste estudo.

O grupo caso foi proveniente do Serviço Ambulatorial de Genética e do Serviço Ambulatorial de Pediatria em Síndrome de Down do Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB), hospital-escola vinculado à FAMERP. As mães do grupo caso possuíam filhos com diagnóstico confirmado de trissomia livre do cromossomo 21, de acordo com o exame do cariótipo realizado pelo Serviço de Genética do HB por bandejamento GTG de cromossomos metafásicos, cujo resultado encontra-se disponível nos prontuários médicos dos pacientes. Em relação ao grupo controle, as mulheres são provenientes do campus da FAMERP de São José do Rio Preto e do hemocentro do HB.

Os critérios de exclusão para o grupo caso foram: filhos com SD com diagnóstico confirmado para mosaicismo ou translocação e ausência de exame de cariótipo. Em relação ao grupo controle, os critérios de exclusão foram: possuir filhos com alguma malformação e casos de aborto prévio.

Todas as informações foram obtidas por meio do preenchimento de um questionário padronizado e mantidas em sigilo (Apêndice 2).

2.2. Métodos

2.2.1. Extração de DNA

A extração DNA das amostras previamente coletadas foi realizada a partir de leucócitos de sangue periférico segundo a técnica de Miller *et al.* (1988)⁽¹¹⁸⁾ com modificações (Apêndice 3). O DNA das amostras de sangue periférico, coletadas durante o desenvolvimento deste projeto, foi extraído segundo a técnica de extração salina ou “salting-out” (Salazar, 1998)⁽¹¹⁹⁾ (Apêndice 4). As amostras de DNA foram estocadas em condições apropriadas para sua conservação, em freezer -20°C.

2.2.2. Quantificação do DNA genômico

Para a quantificação do DNA foi utilizada a espectrofotometria. O DNA absorve luz no comprimento de onda de 260nm e as proteínas em 280nm. Então, para estimar a pureza do DNA utilizou-se a relação OD260/OD280. Valor igual a 1,8, resultante dessa relação, indica amostra pura. O espectrofotômetro utilizado foi o NanoDrop ND-1000 (*Thermo Scientific*), que possui cobertura de espectro de 220 a 750nm e o volume de

DNA mensurado foi de 2µL. Todas as amostras tiveram suas concentrações ajustadas para 10ng/µL.

2.2.3. Análise molecular

A genotipagem dos polimorfismos foi realizada por meio técnica de discriminação alélica por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando-se os ensaios comerciais *TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems®)*, segundo instruções do fabricante. O quadro 1 apresenta a identificação dos ensaios específicos para cada polimorfismo. As quantidades de reagentes e as ciclagens das reações de amplificação estão apresentadas nos quadros 2 e 3, respectivamente.

O resultado das reações de PCR em tempo real ocorre por meio da captação pelo equipamento *StepOne Plus™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®)* da fluorescência emitida pelas sondas. Cada sonda é marcada com um fluoróforo diferente, determinando assim o genótipo de cada amostra por meio desta fluorescência emitida, que é visualizada no *StepOne™ Software (v2.3)* por meio de cores distintas. O quadro 4 mostra os possíveis genótipos para cada polimorfismo avaliado e as figuras 1, 2 e 3 apresentam os padrões de genotipagem dos polimorfismos *MTHFR (rs4846048)*, *MTHFR (rs4846049)* e *hsa-mir-149 (rs2292832)*, respectivamente.

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

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

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

Quadro 2. Quantidade de reagentes utilizados nas reações de amplificação para os polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832.

<i>MTHFR</i> rs4846048	<i>MTHFR</i> rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832
H ₂ O ----- 1,35µL	H ₂ O ----- 1,30µL
Master Mix (2x) ----- 2,50µL	Master Mix (2x) ----- 2,50µL
Assay (40x) ----- 0,15µL	Assay (40x) ----- 0,20µL
DNA (10 ng/ µL) ----- 1,00µL	DNA (10 ng/ µL) ----- 1,50µL

Quadro 3. Ciclagens das reações de amplificação por PCR em tempo real para genotipagem dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e *hsa-mir-149* rs2292832.

<i>MTHFR</i> rs4846048	<i>MTHFR</i> rs4846049 e <i>hsa-mir-149</i> rs2292832
95°C ----- 10 minutos	95°C ----- 10 minutos
95°C ----- 15 segundos	95°C ----- 15 segundos
60°C ----- 1 minuto	60°C ----- 1 minuto
40 ciclos	45 ciclos

Quadro 4. Genótipos possíveis para cada polimorfismo avaliado.

Polimorfismo	Homozigoto selvagem	Heterozigoto	Homozigoto polimórfico
<i>MTHFR</i> rs4846048	AA	AG	GG
<i>MTHFR</i> rs4846049	GG	GT	TT
<i>hsa-mir-149</i> rs2292832	CC	CT	TT

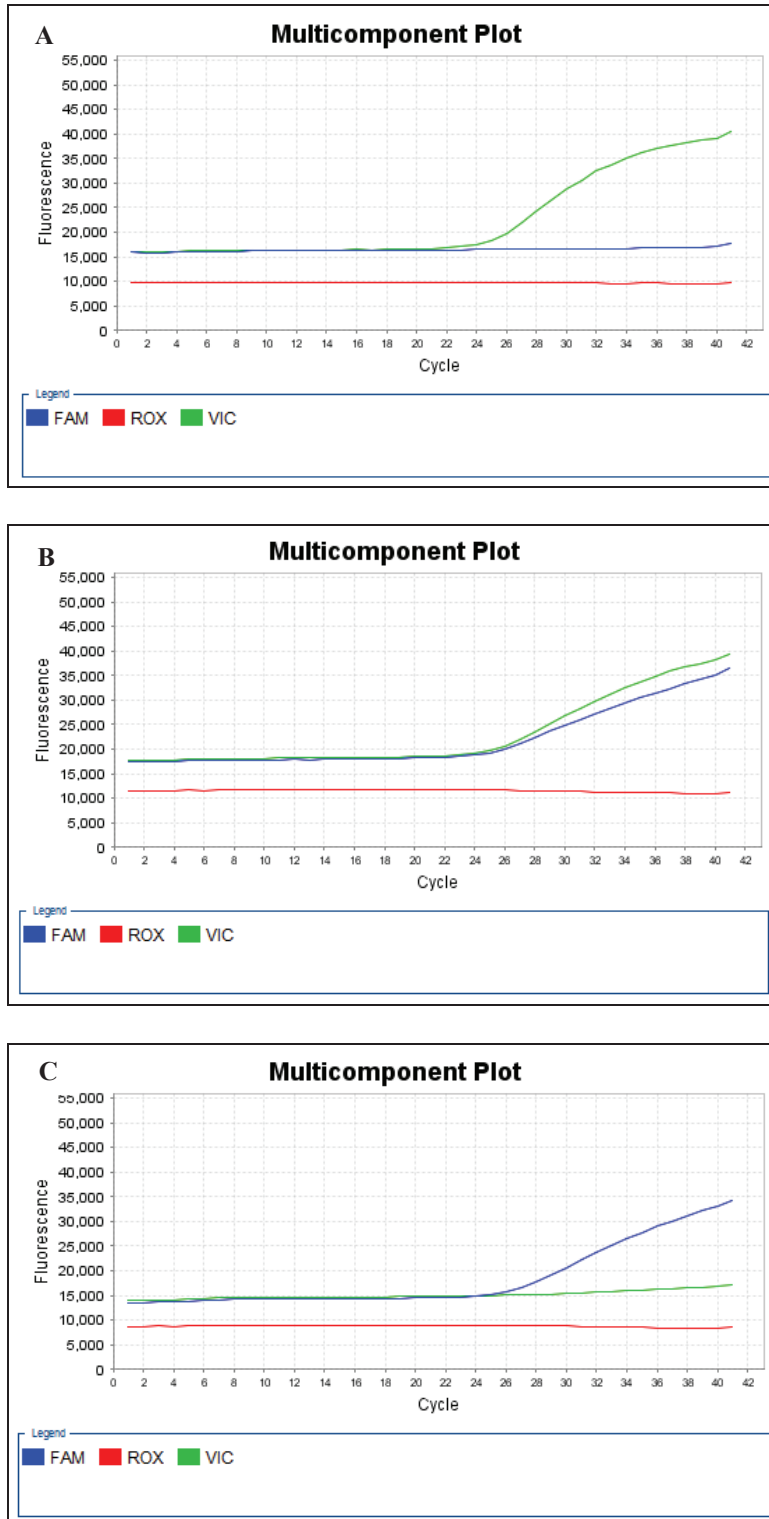


Figura 3. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo *MTHFR* (rs4846048 A→G). O fluoróforo VIC (verde) marca a sonda que reconhece o alelo selvagem e, o fluoróforo FAM (azul) a sonda que reconhece o alelo polimórfico. Desse modo, (A) representa o genótipo homocigoto selvagem AA, (B) genótipo heterocigoto AG e (C) genótipo homocigoto polimórfico GG.

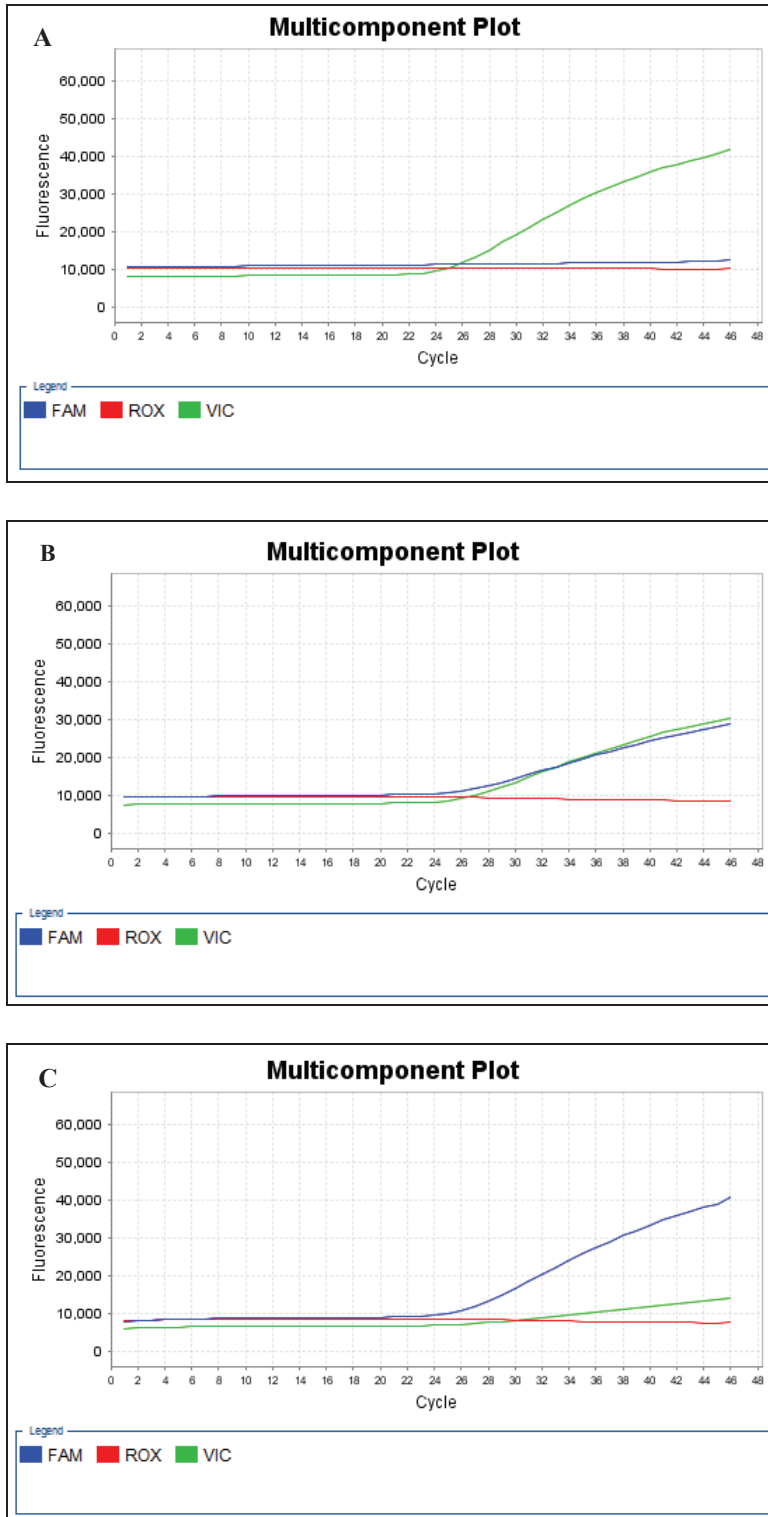


Figura 4. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo *MTHFR* (rs4846049 G→T). O fluoróforo VIC (verde) marca a sonda que reconhece o alelo selvagem e, o fluoróforo FAM (azul) a sonda que reconhece o alelo polimórfico. Desse modo, (A) representa o genótipo homocigoto selvagem GG, (B) genótipo heterocigoto GT e (C) genótipo homocigoto polimórfico TT.

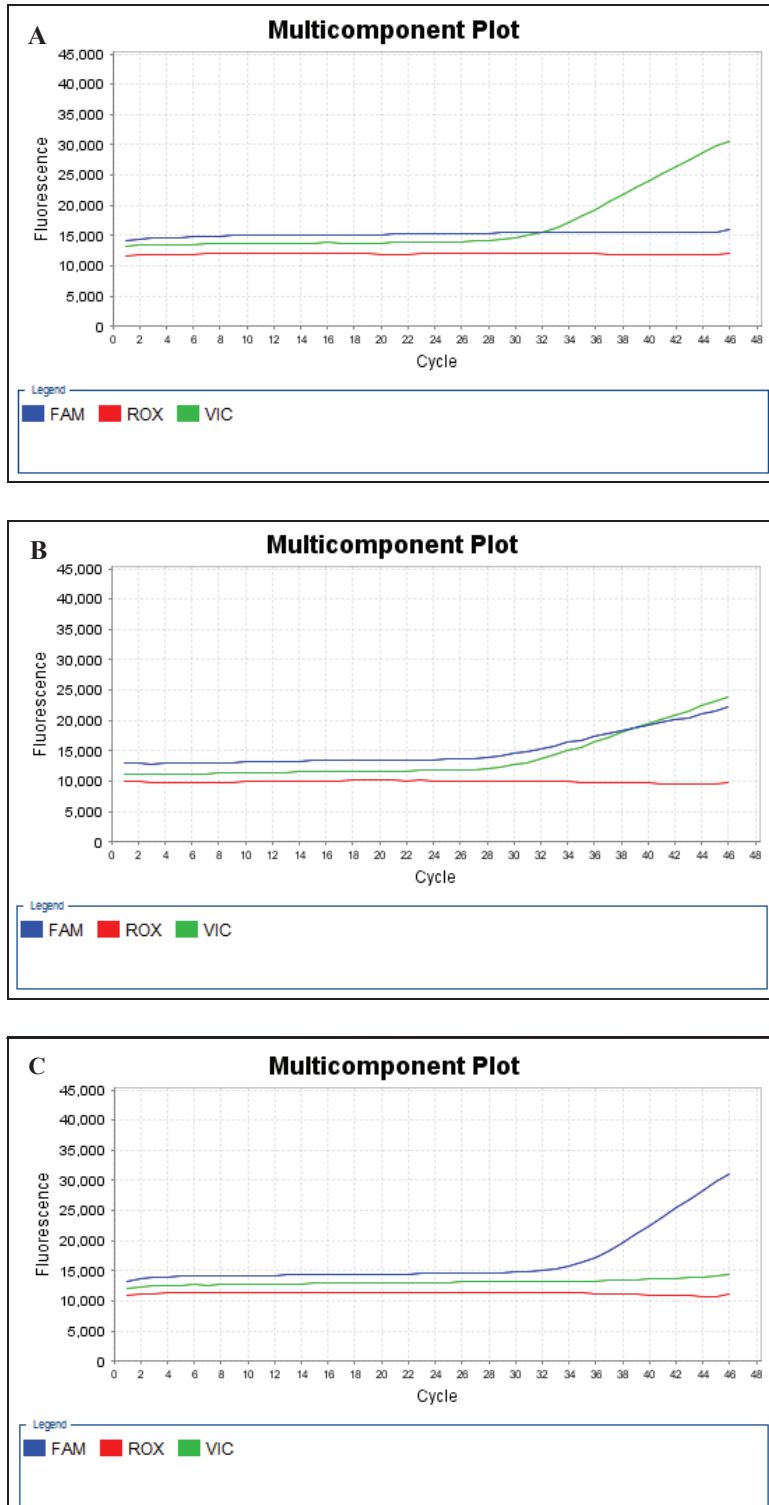


Figura 5. Discriminação alélica por PCR em tempo real do polimorfismo hsa-mir-149 (rs2292832 C→T). O fluoróforo VIC (verde) marca a sonda que reconhece o alelo selvagem e, o fluoróforo FAM (azul) a sonda que reconhece o alelo polimórfico. Desse modo, (A) representa o genótipo homocigoto selvagem CC, (B) genótipo heterocigoto CT e (C) genótipo homocigoto polimórfico TT.

2.2.4. Análise Estatística

A comparação das frequências de mães com idade menor e maior ou igual a 35 anos e da média de idade materna entre os grupos caso e controle foi realizada utilizando-se o Teste Exato de Fisher e o Teste T, respectivamente. A análise da idade materna maior ou igual a 35 anos como fator de risco para a SD foi realizada por meio de regressão logística binária.

A concordância das frequências genóticas com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada pelo teste Qui-quadrado (1 grau de liberdade) por meio do programa BioEstat (versão 5.3) e a análise de haplótipos dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048 e rs4846049 foi realizada utilizando-se o programa Haploview (versão 5.0).

Análises de regressão logística múltipla foram realizadas para todos os polimorfismos por meio do programa Minitab para Windows (versão 16) utilizando-se dois modelos genéticos, o dominante (homozigoto polimórfico+ heterozigoto *versus* homozigoto selvagem) e o recessivo (homozigoto polimórfico *versus* heterozigoto + homozigoto selvagem), ajustando-se para a idade materna das participantes, considerada a idade da mulher ao nascimento do filho com SD (grupo caso) ou do último filho (grupo controle).

A análise dos genótipos combinados considerando-se os três polimorfismos foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher, no modelo dominante, por meio do programa GraphPad Prism v.5.01, considerando o genótipo combinado *MTHFR* rs4846048 AA / *MTHFR* rs4846049 GG / hsa-mir-149 rs2292832 CC como referência (triplo homozigoto selvagem).

As análises estatísticas foram também realizadas considerando-se somente mulheres com idade materna inferior a 35 anos e, portanto, tais análises não foram

ajustadas para a idade materna das participantes. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3. RESULTADOS

3. Resultados

3.1. Grupos de estudo e a relação com a idade materna

Foi observada maior frequência de mulheres com idade materna igual ou maior que 35 anos no grupo caso (48,5%) do que no grupo controle (9,12%) ($P < 0,0001$). A média da idade materna em nosso estudo foi significativamente maior no grupo caso (32,23 anos) do que no grupo controle (27,35 anos) ($P < 0,0001$) e a idade materna igual ou maior que 35 anos foi considerada um fator de risco para SD ($P < 0,0001$; OR=9,38; IC 95%=5,70-15,45).

3.2. Análise genotípica e o risco materno para SD

As frequências genotípicas dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Por outro lado, para o polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832 foi observado desequilíbrio tanto no grupo caso ($p < 0,0001$) quanto no grupo controle ($p = 0,0038$). Considerando o subgrupo com idade materna inferior a 35 anos, o polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832 também se apresentou em desequilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo caso ($p < 0,0001$) e no grupo controle ($p = 0,0223$). O resultado das concordâncias das frequências genotípicas com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg está apresentado nas Tabelas 1 e 2.

Os resultados da análise de regressão logística múltipla dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 na casuística total de mulheres, independente da idade materna, mostraram que não houve associação entre os polimorfismos maternos e o risco para prole com SD. A Tabela 3 apresenta as frequências genotípicas e os valores de *Odds Ratio* (OR), ajustados para a idade

materna, quando comparados os grupos caso e controle nos modelos genéticos dominante e recessivo.

Considerando-se somente mulheres com idade materna inferior a 35 anos, o genótipo hsa-mir-149 rs2292832 TT foi associado ao risco materno aumentado para prole com SD em relação aos genótipos CC/CT no modelo recessivo (OR = 2,02; IC 95% = 1,06 - 3,83) (Tabela 4).

A análise dos haplótipos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 não evidenciou associação entre os haplótipos desses polimorfismos e o risco materno para a prole com SD (Tabelas 5 e 6).

A análise de genótipos combinados dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e hsa-mir-149 rs2292832 também não mostrou associação entre as combinações genotípicas e o risco materno para prole com SD, tanto na casuística total como no subgrupo de mulheres com idade materna inferior a 35 anos (Tabelas 7 e 8).

Tabela 1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e *hsa-mir-149* rs2292832 na casuística total de participantes.

Polimorfismo genético	X ²	P
<i>MTHFR</i> rs4846048		
Caso	0,0198	0,8880
Controle	1,0989	0,2945
<i>MTHFR</i> rs4846049		
Caso	2,0009	0,1572
Controle	1,6929	0,1932
<i>hsa-mir-149</i> rs2292832		
Caso	38,5795	< 0,0001
Controle	8,3669	0,0038

X²= qui-quadrado; P= valor de P.

Tabela 2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg dos polimorfismos *MTHFR* rs4846048, *MTHFR* rs4846049 e *hsa-mir-149* rs2292832 nas mulheres com idade materna inferior a 35 anos.

Polimorfismo genético	X ²	P
<i>MTHFR</i> rs4846048		
Caso	0,5816	0,4457
Controle	0,8244	0,3639
<i>MTHFR</i> rs4846049		
Caso	1,9180	0,1661
Controle	1,6534	0,1985
<i>hsa-mir-149</i> rs229283		
Caso	18,9112	< 0,0001
Controle	5,2243	0,0223

X²= qui-quadrado; P= valor de P.

Tabela 3. Resultados das análises de regressão logística múltipla, ajustados para a idade materna, comparando os grupos controle (n=296) e caso (n=167) nos modelos genéticos dominante e recessivo.

Polimorfismo	Modelo genético	Genótipo	Controle n=296	Caso n=167	OR (IC 95%)	p
<i>MTHFR</i> rs4846048 ^a	Dominante	AA	142 (48,3%)	83 (49,7%)	0,84 (0,51 - 1,40)	0,51
		AG/GG	152 (51,7%)	84 (50,3%)		
	Recessivo	AA/AG	272 (92,5%)	153 (91,6%)	1,43 (0,60 - 3,42)	0,42
		GG	22 (7,5%)	14 (8,4%)		
<i>MTHFR</i> rs4846049	Dominante	GG	133 (44,9%)	67 (40,1%)	1,20 (0,72 - 2,00)	0,48
		GT/TT	163 (55,1%)	100 (59,9%)		
	Recessivo	GG/GT	271 (91,5%)	151 (90,4%)	0,74 (0,31 - 1,73)	0,48
		TT	25 (8,4%)	16 (9,6%)		
hsa-mir-149 rs2292832 ^b	Dominante	CC	147 (50,3%)	94 (58%)	0,77 (0,50 - 1,19)	0,23
		CT/TT	145 (49,7%)	68 (42%)		
	Recessivo	CC/CT	252 (86,3%)	130 (80,2%)	1,54 (0,87 - 2,74)	0,14
		TT	40 (13,7%)	32 (19,8%)		

OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; P: valor de P; ^a: não foi possível a genotipagem de 2 amostras (controle n = 294); ^b: não foi possível a genotipagem de 9 amostras (controle n = 292/ caso n = 162).

Tabela 4. Resultados das análises de regressão logística múltipla considerando somente mulheres com idade materna inferior a 35 anos, comparando os grupos caso controle (n=269) e caso (n=86), nos modelos genéticos dominante e recessivo.

Polimorfismo	Modelo genético	Genótipo	Controle n=269	Caso n=86	OR (IC 95%)	P
<i>MTHFR</i> rs4846048 ^a	Dominante	AA	130 (48,6%)	42 (48,8%)	1,00 (0,56 - 1,79)	0,99
		AG/GG	137 (51,3%)	44 (51,2%)		
	Recessivo	AA/AG	247 (92,5%)	76 (88,4%)	2,23 (0,86 - 5,79)	0,09
		GG	20 (7,5%)	10 (11,6%)		
<i>MTHFR</i> rs4846049	Dominante	GG	122 (45,4%)	37 (43%)	1,00 (0,56 - 1,79)	0,79
		GT/TT	147 (54,6%)	49 (57%)		
	Recessivo	GG/GT	247 (91,8%)	80 (93%)	0,46 (0,14 - 1,44)	0,18
		TT	22 (8,2%)	6 (7%)		
<i>hsa-mir-149</i> rs2292832 ^b	Dominante	CC	133 (50,2%)	45 (54,9%)	0,84 (0,51 - 1,38)	0,48
		CT/TT	132 (49,8%)	37 (45,1%)		
	Recessivo	CC/CT	231 (87,2%)	64 (78%)	2,02 (1,06 - 3,83)	0,03*
		TT	34 (12,8%)	18 (21,9%)		

OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; P: valor de P; ^a: não foi possível a genotipagem de 2 amostras (controle n = 267); ^b: não foi possível a genotipagem de 8 amostras (controle n = 265/ caso n = 82); *p<0,05.

Tabela 5. Resultados da análise de associação entre os haplótipos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 e o risco materno para prole com SD, ajustado para a idade materna das participantes, na casuística total (controle n=296 e caso n=167).

Haplótipos		Frequência		X ²	P
<i>MTHFR</i> rs4846048	<i>MTHFR</i> rs4846049	Controle	Caso		
A	G	0,601	0,590	0,113	0,73
G	T	0,216	0,231	0,262	0,60
A	T	0,101	0,117	0,515	0,47
G	G	0,081	0,063	1,052	0,30

X²= qui-quadrado; P: valor de P.

Tabela 6. Resultados da análise de associação entre os haplótipos *MTHFR* rs4846048 e *MTHFR* rs4846049 e o risco materno para prole com SD considerando-se somente mulheres com idade materna inferior a 35 anos (controle n = 269 e caso n = 86).

Haplótipos		Frequência		X ²	P
<i>MTHFR</i> rs4846048	<i>MTHFR</i> rs4846049	Controle	Caso		
A	G	0,601	0,601	0,113	0,98
G	T	0,211	0,235	0,465	0,49
A	T	0,104	0,085	0,525	0,46
G	G	0,085	0,079	0,065	0,79

X²= qui-quadrado; P: valor de P.

Tabela 7. Resultados da análise de associação entre os genótipos combinados e o risco materno para prole com SD na casuística total (caso n = 162; controle n= 294)*.

Combinação genotípica	Grupos		OR (IC 95%)	P
	Controle (n)	Caso (n)		
<i>MTHFR</i> rs4846048 - <i>MTHFR</i> rs4846049 - <i>hsa-mir-149</i> rs2292832				
AA - GG - CC	55	30	1,00 (Referência)	---
AA - GT/TT - CC	18	16	1,63 (0,72 - 3,65)	0,29
AG/GG - GG - CC	13	09	1,26 (0,48 - 3,31)	0,62
AG/GG - GT/TT - CC	62	39	1,15 (0,63 - 2,09)	0,65
AA - GG - CT/TT	46	24	0,95 (0,49 - 1,85)	1,00
AA - GT/TT - CT/TT	21	10	0,95 (0,49 - 1,85)	0,82
AG/GG - GG - CT/TT	19	03	0,28 (0,07 - 1,05)	0,06
AG/GG - GT/TT - CT/TT	60	31	0,94 (0,50 - 1,76)	0,87

*: não foi possível a genotipagem de 2 amostras controle e 5 amostras caso; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; P: valor de P.

Tabela 8. Resultados da análise de associação entre os genótipos combinados e o risco materno para prole com SD no subgrupo de mulheres com idade materna inferior a 35 anos, (controle n=267; caso n=81)*.

Combinação genotípica	Grupos		OR (IC 95%)	P
	Controle (n)	Caso (n)		
<i>MTHFR</i> rs4846048 - <i>MTHFR</i> rs4846049 - hsa-mir-149 rs2292832				
AA - GG - CC	51	17	1,00 (Referência)	---
AA - GT/TT - CC	17	07	1,23 (0,43 - 3,48)	0,78
AG/GG - GG - CC	12	05	1,25 (0,38 - 4,06)	0,76
AG/GG - GT/TT - CC	54	16	0,88 (0,40 - 1,94)	0,84
AA - GG - CT/TT	41	12	0,87 (0,37 - 2,04)	0,83
AA - GT/TT - CT/TT	19	03	0,47 (0,12 - 1,80)	0,37
AG/GG - GG - CT/TT	18	02	0,33 (0,06 - 1,58)	0,21
AG/GG - GT/TT - CT/TT	55	19	1,03 (0,48 - 2,21)	1,00

*: não foi possível a genotipagem de 2 amostras controle e 5 amostras caso; OR: *Odds Ratio*; IC: intervalo de confiança; P: valor de P.

4. DISCUSSÃO

4. Discussão

No presente estudo foi observado que a idade materna igual ou maior que 35 anos é um fator de risco para prole com SD, corroborando com outros estudos da literatura⁽¹²⁰⁻¹²²⁾. A incidência de aneuploidias em mulheres aumenta após os 35 anos de idade e, esse aumento é intensificado após os 38 anos⁽¹²¹⁾.

Os mecanismos moleculares que associam a idade materna no momento da concepção a eventos de não disjunção não são completamente compreendidos, apesar disso, algumas hipóteses relacionadas à ocorrência de trissomias cromossômicas, dependente da idade, foram formuladas. Os oócitos primordiais entram em meiose I (MI) na 10-13^a semana de vida uterina e, após a replicação do DNA, permanecem em prófase I até a ovulação, que pode ocorrer muitos anos depois. A meiose II (MII) só é completada após a fertilização⁽⁵⁾. Assim, (a) eventos ocorridos no ovário fetal quando o oócito entra em prófase I, como erros de recombinação com conseqüentes configurações cromossômicas suscetíveis à não-disjunção; (b) eventos que ocorram durante a permanência prolongada do oócito em prófase I, como acúmulo de dano ou degradação do DNA relacionado à separação dos cromossomos homólogos ou cromátides-irmãs durante a meiose e (c) variações hormonais ou declínio na capacidade de detectar erros durante o ciclo celular poderiam resultar em oócitos mais suscetíveis à não disjunção. Além disso, a combinação de dois eventos ocorrendo em diferentes estágios do processo meiótico, onde o primeiro evento envolveria erros de recombinação nos estágios iniciais da ovogênese durante a meiose I, resultando em configurações cromossômicas suscetíveis à não-disjunção, e o segundo evento aconteceria com o envelhecimento do

ovário e processamento anormal destas configurações, aumentaria as chances desses oócitos não sofrerem disjunção corretamente⁽¹²³⁾.

Foi também levantada a hipótese por Hultén *et al.* (2008)⁽¹²⁴⁾, em especial para explicar a ocorrência da SD, de que o mosaïcismo ovariano para trissomia do cromossomo 21 pode ser a principal causa para a ocorrência da SD. Esses autores avaliaram o número de cópias do cromossomo 21 em células ovarianas de oito fetos com aspecto fenotípico normal na idade gestacional de 12-22 semanas, após interrupção da gravidez por razões sociais e observaram que a maioria dos fetos apresentava mosaïcismo para a trissomia do 21. Assim, sugeriram que mulheres com alto grau de mosaïcismo ovariano estão predispostas a ter filhos com trissomia 21 em idade precoce, enquanto para aquelas com baixo grau de mosaïcismo, o atraso na maturação do oócito trissômico com consequente acúmulo dessas células dentro da reserva ovariana, resultaria em ovulação tardia dos oócitos trissômicos e maior incidência de prole com SD em idades reprodutivas mais avançadas.

Outra hipótese proposta refere-se aos hábitos alimentares, estilo de vida, exposição a agentes genotóxicos e composição dos genótipos da avó materna. É possível que estes fatores possam predispor ao primeiro “evento”, referido acima, responsável pela não disjunção do cromossomo 21 em função de erros de recombinação na prófase da primeira divisão meiótica durante o desenvolvimento fetal da futura mãe de um indivíduo com SD, ainda no útero da avó materna, evidenciando que o nascimento de uma criança com SD é um evento complexo e que deve abranger desde a avó materna, a mãe e o desenvolvimento do indivíduo^(63, 125).

James e colaboradores sugeriram que a metilação aberrante do DNA, como resultado do metabolismo anormal do folato, poderia aumentar o risco de não disjunção

durante a meiose materna e representar um fator de risco para SD, independente da idade materna⁽¹¹⁾. Neste mesmo estudo foram observadas concentrações maiores de Hcy plasmática, um aminoácido derivado do metabolismo do folato, em mães de indivíduos com SD quando comparadas com mulheres com filhos sem a síndrome⁽¹¹⁾. Desde então, inúmeros polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas neste metabolismo têm sido associados ao risco materno para SD em estudos caso-controle^(11, 41-62, 126-130). Alguns estudos de metaanálise reforçam esta associação^(60, 131-138). Entretanto, outros estudos não evidenciam a associação entre genótipos polimórficos da via do folato e risco materno para SD^(40, 133, 139-156) e outros observaram um efeito protetor do genótipo polimórfico materno na ocorrência de prole com SD^(46, 53, 58, 62, 157-161). A Tabela 9 apresenta os resultados dos estudos que encontraram associação entre genes da via do folato e risco materno para a SD.

A variante rs1801133 (C→T), conhecida como C677T do gene *MTHFR*, é a mais estudada como fator de risco materno para a SD. Esse polimorfismo tem sido associado com uma diminuição da atividade enzimática de MTHFR e com o aumento das concentrações de Hcy plasmática⁽¹⁶²⁾. De acordo com os estudos, os indivíduos portadores do genótipo TT apresentam até 70% de atividade reduzida da enzima e os portadores do genótipo CT, apresentam uma redução de até 40% na atividade enzimática de MTHFR^(162, 163).

No Brasil, o estudo de Silva *et al.* (2005)⁽⁴⁴⁾, que avaliou 154 mães de indivíduos com SD e 158 controles, mostrou associação do alelo T do polimorfismo *MTHFR* C677T com o risco materno para SD. Um estudo do nosso grupo de pesquisa, também realizado com população brasileira, observou associação entre os genótipos *TCN2*

776GG, *BHMT* 742AA e *MTHFR* 677CT/TT e os haplótipos CAT (*MTHFR* C677T, *MTHFR* A1298C, *MTHFR* T1317C) como risco materno para SD⁽⁵⁸⁾.

Em 2014, Rai e colaboradores realizaram uma metaanálise com o objetivo de avaliar o efeito do polimorfismo *MTHFR* C677T e o risco materno para SD. Foram avaliados 34 estudos em um total de 3098 casos e 4852 controles e foi observado que o alelo T é um fator de risco para o nascimento de filho com SD⁽¹³⁷⁾. Outras metaanálises, incluindo a do nosso grupo de pesquisa também observaram associação entre a variante C677T e o risco materno para SD^(132, 134-137).

Outro polimorfismo do gene *MTHFR* também avaliado como fator de risco materno em SD é a substituição de adenina (A) para citosina(C) na posição 1298 do gene (rs1801131). Os portadores do genótipo CC têm uma diminuição de até 40% da atividade enzimática de *MTHFR*, quando comparados com indivíduos portadores do genótipo AA⁽¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾. Alguns estudos demonstraram associação do polimorfismo *MTHFR* A1298C com o risco materno para a SD^(47-49, 52) enquanto outros não^(40, 43, 44, 51, 56, 58, 62, 128, 129, 142, 143, 146, 151).

No presente estudo, nós avaliamos a influência de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) na região 3'UTR do gene *MTHFR* (rs4846048 A→G e rs4846049 G→T) no risco materno para não disjunção do cromossomo 21 e não encontramos associação desses polimorfismos maternos com a ocorrência de prole com SD. De acordo com nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que avalia esses polimorfismos como fatores de risco materno para SD.

Na literatura há evidências de associação desses SNPs (*MTHFR* rs4846048 e rs4846049) com outras doenças e/ou distúrbios. O polimorfismo rs4846048 foi associado com a perda de massa corporal magra⁽¹⁰¹⁾, que juntamente com o acúmulo de

massa gorda e perda de massa óssea⁽¹⁶⁶⁾, podem contribuir com a sarcopenia, obesidade e osteoporose. Liu *et al.* (2008)⁽¹⁰¹⁾ sugerem que o gene *MTHFR* regula o metabolismo energético dentro das mitocôndrias das células musculares e atua no processo de apoptose celular exercendo efeito sobre a massa corporal magra.

Estudo em câncer mostra redução no risco de câncer de esôfago na presença do genótipo GG do SNP rs4846048 A→G⁽¹⁰³⁾, mas nenhuma associação desse genótipo polimórfico (GG) com câncer colorretal e de mama^(167, 168).

Em relação ao polimorfismo rs4846049 G→T, os genótipos GT e TT foram associados com o risco aumentado de câncer colorretal⁽¹⁶⁷⁾. Um estudo realizado em indivíduos com mielomeningocele observou associação entre o alelo T do SNP *MTHFR* rs4846049 e presença de Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDAH), sugerindo que o gene *MTHFR* está envolvido na etiologia do TDAH nos indivíduos com mielomeningocele⁽¹⁶⁹⁾. Deficiências de folato e de vitamina B têm sido associada com déficit de atenção e depressão⁽¹⁷⁰⁾.

A análise de haplótipos de cinco polimorfismos do gene *MTHFR*, incluindo o polimorfismo rs4846049, também mostrou que a combinação haplotípica TTGGT (rs4846049, rs1476413, rs1801131, rs1801133 e rs9651118) é um fator de risco para paralisia cerebral (PC) em bebês com deficiência mental da população chinesa⁽¹⁷¹⁾. No presente estudo, a análise dos haplótipos *MTHFR* rs4846048 e rs4846049 não mostrou associação com o risco materno da SD.

Embora SNPs na região 3'UTR do gene *MTHFR* possam comprometer o metabolismo do folato, pois estudos mostram que o polimorfismo rs4846049 é funcional, devido a alterações na expressão do RNAm do gene *MTHFR*⁽⁹⁹⁾, a ausência de associação no presente estudo pode estar relacionada ao tamanho amostral reduzido,

o que poderia reduzir o poder da análise estatística. Para o polimorfismo rs4846048 (A→G) não há estudos de análise funcional até o presente.

Outro aspecto importante de SNPs em regiões 3'UTR é que os mesmos podem alterar a expressão de genes em um mecanismo mediado por miRNAs⁽¹⁷²⁻¹⁷⁵⁾. De acordo com análise *in silico*, a variante *MTHFR* rs4846049 (G→T) encontra-se dentro de uma região predita para ligação do hsa-miR-149 e essa ligação mostrou-se mais eficiente na presença do alelo T do gene *MTHFR* em ensaio *in vitro*⁽⁹⁹⁾. Pela técnica de *western blot* esses autores também demonstraram uma diminuição dos níveis da proteína *MTHFR* em indivíduos portadores do genótipo *MTHFR* TT, o que suporta a supressão do *MTHFR*, na presença do alelo T, pelo hsa-miR-149. No estudo de Wu *et al.* (2013)⁽⁹⁹⁾ e em outro, realizado na população chinesa em 2248 indivíduos⁽¹⁷⁶⁾, o alelo T da variante *MTHFR* rs4846049 foi associado com o aumento da suscetibilidade de doença arterial coronária (DAC). É possível, então, que o hsa-miR-149 possa estar envolvido com a DAC, por meio da interação com o gene *MTHFR*, que pode ser alterada pelo polimorfismo rs4846049.

Variantes genéticas na própria sequência de pri-miRNAs, pré-miRNAs e em miRNAs maduros podem influenciar a expressão de genes mediada pelos miRNAs e, assim alterar diversos processos biológicos⁽¹⁷⁷⁾ e contribuir para a suscetibilidade e prognóstico de doenças⁽¹⁷⁸⁾. Atualmente, existem 1881 miRNAs precursores no genoma humano (Banco de Dados miRBase– versão 21), que são exportados para o citoplasma onde serão clivados pela enzima Dicer gerando 2588 (Banco de Dados miRBase 21) diferentes miRNAs maduros⁽¹⁷⁹⁾.

No presente estudo, a influência do polimorfismo rs2229832 (C→T), localizado no precursor do miR-149, como fator de risco materno para a SD foi investigada uma

vez que esse miRNA tem como alvo genes da via do folato^(99, 180) e nossos resultados mostram evidências que o genótipo materno TT do polimorfismo rs2229832 é um fator de risco materno para SD para mulheres com menos de 35 anos de idade na casuística estudada. É esperado que esse polimorfismo altere a expressão e/ou maturação do miR-149, tendo em vista que análises *in vitro* demonstraram que a variante T na forma precursora possa alterar o processo de maturação de miR-149⁽¹⁰⁷⁾, influenciando a ligação com o gene *MTHFR*, o que resultaria em anormalidade no metabolismo do folato-Hcy e, conseqüentemente, possível instabilidade cromossômica.

Atualmente, não existem dados sobre o papel do polimorfismo rs2229832 do mir-149 e o risco materno para a SD. Por outro lado, há estudos que avaliam a associação entre este polimorfismo e o risco para diversos tipos de câncer. Liu e colaboradores encontraram associação desse polimorfismo e o risco para carcinoma hepatocelular na população chinesa com genótipo CT e TT, principalmente em pacientes infectados com o vírus da hepatite B⁽¹⁸¹⁾. Em outro estudo, realizado na Coréia do Sul, foi demonstrado que o risco de hepatocarcinoma foi mais baixo para os indivíduos portadores dos genótipos CT e CC, especialmente naqueles infectados com o vírus da hepatite B⁽¹⁸²⁾. Neste mesmo estudo também foi observado que pacientes com o alelo T do rs2292832 apresentavam uma menor sobrevida e os autores sugeriram que esse polimorfismo pode ser um biomarcador de prognóstico para o hepatocarcinoma na população coreana⁽¹⁸²⁾.

Um estudo em câncer de cabeça e pescoço, realizado em Taiwan, demonstrou que o genótipo TT do polimorfismo rs2292832 foi associado com a progressão mais avançada da doença e com um pior prognóstico dos pacientes acometidos por este tipo tumoral⁽¹⁰⁷⁾. Além disso, em experimentos *in vitro*, estes autores demonstraram que o

alelo T do hsa-mir-149, quando comparado ao alelo C, pode alterar o processamento de pré-mir-149 para a sua forma madura, resultando em uma alteração na quantidade do miR-149, que por sua vez, modula a progressão e a sobrevida do paciente. Os autores observaram que expressão de miR-149 suprimia a mobilidade das células tumorais e sugeriram que a variante T pode retardar o processamento de pré-mir-149 para miR-149 e resultaria na diminuição da forma madura, que conseqüentemente atenuaria o efeito de supressão de miR-149 na mobilidade celular⁽¹⁰⁷⁾. Outro estudo em câncer de cabeça e pescoço, em população branca não hispânica, observou que o genótipo CC do rs2292832, em pacientes que foram tratados por radiação e/ou quimioterapia e com ou sem cirurgia, foi associado com um menor risco de óbito e de recorrência de câncer de cavidade oral, hipofaringe e laringe⁽¹⁸³⁾.

Contrariamente, em um estudo realizado na China com indivíduos com carcinoma papilar de tireoide e indivíduos sem histórico de câncer, o genótipo CC do rs2292832 foi considerado fator de risco para câncer de tireoide (OR= 1,60; 95%IC = 1,72-2,20; p = 0,003). Os autores sugeriram que o polimorfismo altera a forma madura de miR-149, pois os indivíduos com genótipo CC apresentaram expressão reduzida do miRNA maduro quando comparados com os indivíduos portadores dos genótipos CT e TT⁽¹⁸⁴⁾.

Na população grega foi realizado um estudo que avaliou a associação de três polimorfismos em pré-miRNAs, incluindo o rs2292832, e foi observado um aumento no risco para câncer gástrico com a combinação CCC e GTC (rs2910164, rs2292832, rs11614913), entretanto, um efeito protetor para câncer gástrico foi observado com a combinação alélica CTT e CCT para os mesmos polimorfismos⁽¹¹⁰⁾. Em outro estudo

com câncer gástrico da população coreana do Sul, o alelo C do polimorfismo rs2292832 mostrou um efeito protetor para a doença no sexo masculino⁽¹⁸⁵⁾.

Um estudo realizado na China em mulheres com câncer de pulmão não fumantes e controles (mulheres sem histórico de câncer e não fumantes) não observou associação entre o polimorfismo rs2292832 e o risco para câncer de pulmão⁽¹⁸⁶⁾. Outro estudo, em população chinesa, também não encontrou associação com a variante rs2292832 e o risco para câncer de cabeça e pescoço⁽¹⁸⁷⁾. O efeito do polimorfismo rs2292832 também não foi observado em estudos com câncer colorretal⁽¹⁸⁸⁾, de pulmão⁽¹⁸⁹⁾, hepatocarcinoma⁽¹⁹⁰⁾ e de próstata⁽¹⁹¹⁾ em diferentes etnias.

Outras doenças também foram investigadas para o polimorfismo rs2292832. Um risco aumentado para DAC foi observado em pacientes com idade superior a 63 anos portadores do alelo T da variante rs2292832⁽¹¹⁶⁾ e genótipo TT foi associado com aumento do risco de pneumoconiose em trabalhadores que atuam em mina de carvão⁽¹¹⁵⁾. Nenhum efeito desse polimorfismo (rs2292832) foi observado na ocorrência de epilepsia em crianças⁽¹⁹²⁾ e um efeito protetor do alelo C foi observado para atresia biliar em crianças chinesas⁽¹⁹³⁾. Por outro lado, a combinação dos genótipos CT+CC com concentração de folato $\leq 3,43$ resultou em um aumento de risco para acidente vascular cerebral isquêmico (AVCI)⁽¹⁹⁴⁾. Uma metaanálise, realizada com a variante rs2292832, mostrou uma redução do risco para AVCI aos portadores do genótipo TT e do alelo T quando comparados com o genótipo CC e o alelo C⁽¹¹⁴⁾.

Embora no presente estudo tenha sido avaliado apenas o polimorfismo rs2292832 (C→T) no pré-miRNA 149, um estudo forneceu evidências que o SNP rs71428439 (A→G) também afeta o processamento do miR-149 maduro⁽¹⁰⁶⁾. De acordo com análises *in vitro*, os autores observaram em células mononucleares de sangue

periférico humano, que portadores do alelo G possuíam níveis mais baixos de miR-149 maduro, sugerindo que este alelo atenua o processo de maturação do miR-149. Os resultados também indicaram que essa variante G está associada com o risco aumentado de infarto do miocárdio quando comparada com indivíduos portadores do genótipo AA⁽¹⁰⁶⁾.

Por outro lado, o polimorfismo rs71428439 no pré-miRNA 149 foi associado a um menor risco de AVCI em indivíduos portadores do genótipo GG em relação aos portadores do genótipo AA; uma redução do risco também foi observada nos indivíduos portadores do alelo G em relação aos portadores do alelo A⁽¹⁸⁰⁾. Esses autores também demonstraram que pacientes que sofreram AVCI com genótipo GG ou AG apresentavam menores níveis de Hcy plasmática quando comparados com aqueles portadores de genótipos AG ou AA⁽¹⁸⁰⁾.

Há também evidências de associação entre variantes em regiões precursoras de outros miRNAs com diversas doenças. Os genótipos CT e TT do SNP rs2168518 do mir-4513 e o genótipo GG do rs3746444 do mir-499 foram considerados potenciais marcadores biológicos para o prognóstico da DAC, de acordo com estudo de Li e colaboradores⁽¹⁷⁸⁾. O genótipo GG do polimorfismo rs3746444, no precursor de miR-499, também foi associado com o aumento do risco para infarto do miocárdio na população chinesa⁽¹⁹⁵⁾ e os genótipos GG e AG estão associados ao aumento do risco de acidente vascular cerebral⁽¹⁹⁶⁾. Entretanto, um estudo com a população coreana do Sul, observou uma redução do risco para câncer hepatocelular em pacientes que apresentavam genótipo GG e AG do polimorfismo rs3746444⁽¹⁸²⁾.

O polimorfismo rs2910164 no precursor de mir-146a, que afeta a forma madura do miR-146a^(197, 198), tem sido associado ao câncer de mama^(199, 200), gástrico⁽²⁰¹⁾, melanoma⁽²⁰²⁾ e oral⁽²⁰³⁾, doenças autoimunes^(204, 205) e infarto do miocárdio⁽¹⁹⁵⁾.

Estima-se que a expressão de cerca de 60% dos genes humanos estejam sobre a influência de miRNAs⁽⁶⁵⁾, em função disso, os miRNAs desempenham papel importante em diversos processos biológicos e estudos têm associado esses pequenos RNAs em uma variedade de doenças⁽²⁰⁶⁾. SNPs localizados em sequências de genes de pré-miRNAs e genes alvo de miRNAs, podem perturbar a interação miRNA-RNA alvo e, portanto resultar em uma desregulação da expressão do gene alvo⁽²⁰⁷⁾.

Uma das limitações do presente estudo foi a ausência de análise dos níveis de expressão do gene *MTHFR*, bem como do hsa-mir-149. Entretanto, é o primeiro estudo que avalia polimorfismos na região 3'UTR e variante em pré-miRNAs como fatores de risco materno para SD e fornece evidências da influência do polimorfismo rs2229832 (C→T), localizado no precursor do miR-149, como fatores de risco maternos para o nascimento de prole com SD.

Em conclusão, sugere-se que o polimorfismo rs2229832 possa alterar a maturação de miR-149 e modificar a interação com o gene alvo *MTHFR*, resultando em alteração no metabolismo do folato e, conseqüentemente, aumento de risco materno para não disjunção do cromossomo 21, em mulheres com menos de 35 anos.

Tabela 9. Estudos sobre associação entre polimorfismos maternos em genes do metabolismo do folato e fator de risco para prole com síndrome de Down, segundo Coppedè (2015) com modificações.

Referência	País	Mães CA/CO	Associação com o risco materno para SD
James <i>et al.</i> , 1999 ⁽¹¹⁾	USA	57/50	↑ <i>MTHFR</i> 677CT ↑ <i>MTHFR</i> 677CT + TT
Hobbs <i>et al.</i> , 2000 ⁽⁴¹⁾	USA/ Canadá	157/144	↑ <i>MTHFR</i> 677CT ↑ <i>MTHFR</i> 677CT + TT ↑ <i>MTRR</i> 66GG ↑ <i>MTRR</i> 66AG + GG ↑ <i>MTHFR</i> 677TT ou CT + <i>MTRR</i> 66GG
O’Leary <i>et al.</i> , 2002 ⁽⁴²⁾	Irlanda	48/192	↑ <i>MTRR</i> 66AG ↑ <i>MTRR</i> 66GG ↑ <i>MTRR</i> 66AG + GG ↑ <i>MTHFR</i> 677CT ou TT + <i>MTRR</i> 66GG
Grillo <i>et al.</i> , 2002 ⁽¹²⁶⁾	Brasil	36/200	↑ <i>MTHFR</i> 677T ↑ <i>MTHFR</i> 1298C ↑ <i>MTHFR</i> 677CT + <i>MTHFR</i> 1298AC
Bosco <i>et al.</i> , 2003 ⁽⁴³⁾	Itália	63/72	↑ <i>MTR</i> 2756AG + GG ↑ <i>MTR</i> 2756AG + <i>MTRR</i> 66AG
da Silva <i>et al.</i> , 2005 ⁽⁴⁴⁾	Brasil	154/158	↑ <i>MTHFR</i> 677T ↑ <i>MTHFR</i> 677T, <i>MTHFR</i> 1298C, <i>MTR</i> 2756G, <i>MTRR</i> 66G e <i>CBS</i> 844ins68 (presença de números crescentes dos alelos variantes aumenta o risco)
Acácio <i>et al.</i> , 2005 ⁽⁴⁵⁾	Brasil	70/88	↑ <i>MTHFR</i> 677CT + <i>MTHFR</i> 1298AC
Coppedè <i>et al.</i> , 2006 ⁽⁴⁶⁾	Itália	80/111	↑ <i>MTHFR</i> 677TT + <i>SLC19A1</i> 80GG ↓ <i>MTHFR</i> 1298AA + <i>SLC19A1</i> 80GA/AA
Rai <i>et al.</i> , 2006 ⁽⁴⁷⁾	Índia	149/165	↑ <i>MTHFR</i> 677TT ↑ <i>MTHFR</i> 1298CC
Scala <i>et al.</i> , 2006 ⁽⁴⁸⁾	Itália	94/264	↑ <i>MTHFR</i> 1298C ↑ <i>SLC19A1</i> 80G ↑ <i>MTHFR</i> 1298CC ↑ <i>SLC19A1</i> 80GG ↑ <i>MTHFR</i> 677TT + <i>MTHFR</i> 1298CC ou CA ↑ <i>MTHFR</i> 1298CC ou CA + <i>SLC19A1</i> 80GG ou GA ↑ <i>SLC19A1</i> 80GG + <i>MTHFDI</i> 1958AA
Biselli <i>et al.</i> , 2008 ⁽⁵¹⁾	Brasil	72/194	↑ <i>MTHFR</i> 677T, <i>MTHFR</i> 1298C, <i>MTR</i> 2756G, e <i>SLC19A1</i> 80G (presença de 3 ou mais alelos polimórficos aumenta o risco)
Meguid <i>et al.</i> , 2008 ⁽⁴⁹⁾	Egito	42/48	↑ <i>MTHFR</i> 677CT + TT ↑ <i>MTHFR</i> 1298CC
Wang <i>et al.</i> , 2008 ⁽⁵⁰⁾	China	64/70	↑ <i>MTHFR</i> 677TT ↑ <i>MTRR</i> 66GG ↑ <i>MTHFR</i> 677TT/CT + <i>MTRR</i> 66GG
Brandalize <i>et al.</i> , 2009 ⁽⁵²⁾	Brasil	239/197	↑ <i>MTHFR</i> 677CT ou TT/ <i>MTHFR</i> 1298AA

Tabela 9. Continuação

Referência	País	Mães CA/ CO	Associação com o risco materno para SD
Coppedè <i>et al.</i> , 2009 ⁽⁵³⁾	Itália	94/113	↑ <i>MTHFR</i> 677TT + <i>MTR</i> 2756AA ↓ <i>MTHFR</i> 1298AC + <i>TYMS</i> 2R/2R
Pozzi <i>et al.</i> , 2009 ⁽⁵⁴⁾	Itália	74/184	↑ <i>MTRR</i> 66AG ↑ <i>MTRR</i> 66AG + GG
Fintelman-Rodrigues <i>et al.</i> , 2009 ⁽⁵⁵⁾	Brasil	114/110	↑ <i>MTR</i> 2756AG/ <i>TCN2</i> 776CC
Cyril <i>et al.</i> , 2009 ⁽⁵⁶⁾	Índia	36/60	↑ <i>MTHFR</i> 677CT+TT
Brandalize <i>et al.</i> , 2010 ⁽⁵⁷⁾	Brasil	239/197	↑ <i>MTR</i> A2756 G, <i>MTRR</i> A66G, <i>CBS</i> 844ins68 e <i>SLC19A1</i> A80G (genótipos combinados entre estes polimorfismos aumenta o risco de acordo com o número de alelos de risco considerados) ↑ <i>MTHFR</i> 677T + <i>MTRR</i> 66G
Coppede <i>et al.</i> , 2010 ⁽¹²⁷⁾	Itália	29/32	Frequência de micronúcleos, <i>MTHFR</i> 677TT, <i>SLC19A1</i> 80AA, <i>TYMS</i> 1494 6pb+/, <i>TYMS</i> 28pb 3R/3R e <i>MTR</i> 2756AA permitem discriminar mães SD e mães controles com uma acurácia de 90%.
Sadiq <i>et al.</i> , 2011 ⁽¹²⁸⁾	Jordânia	53/29	↑ <i>MTHFR</i> 677T
Marucci <i>et al.</i> , 2012 ⁽¹⁵⁷⁾	Brasil	105/185	↓ <i>SHMT</i> 1420CC ou CT
Zampieri <i>et al.</i> , 2012 ⁽¹⁵⁸⁾	Brasil	86/161	↓ <i>BHMT</i> 742 AA ↓ <i>BHMT</i> 742 (GA ou AA)
Zampieri <i>et al.</i> , 2012 ⁽⁵⁸⁾	Brasil	105/185	↑ <i>MTHFR</i> 677CT ou TT ↑ <i>TCN2</i> 776GG ↓ <i>BHMT</i> 742AA <i>MTHFR</i> 677C/1298A/1317T (haplótipo mais frequente no grupo controle)
Wang <i>et al.</i> , 2013 ⁽¹⁵⁹⁾	China	104/184	↓ <i>MTRR</i> 524TT ↓ <i>MTRR</i> 524CT + TT
Wang <i>et al.</i> , 2013 ⁽⁵⁹⁾	China	104/184	↑ <i>SLC19A1</i> 80G ↑ <i>CBS</i> 833C ↑ <i>SLC19A1</i> 80GG + <i>CBS</i> 833TC
Amorim <i>et al.</i> , 2013 ⁽¹⁶⁰⁾	Brasil	94/134	↓ <i>BHMT</i> 742A ↓ <i>BHMT</i> 742AA
Coppedè <i>et al.</i> , 2013 ⁽¹⁶¹⁾	Itália	172/157	↓ <i>DNMT3B</i> -579T ↓ <i>DNMT3B</i> -579GT ou GT + TT ↓ <i>DNMT3B</i> -579GT + <i>DNMT3B</i> -149CC
Coppedè <i>et al.</i> , 2014 ⁽⁶⁰⁾	Itália	253/298	↑ <i>MTR</i> 2756AG + <i>MTRR</i> 66AG
Liao <i>et al.</i> , 2014 ⁽⁶¹⁾	China	76/115	↑ <i>MTHFR</i> 677CT/TT + <i>MTHFD1</i> 1958AA/GA ↑ <i>TCN2</i> 776CG + <i>MTHFR</i> 677TT
Jaiswal <i>et al.</i> , 2015 ⁽²⁰⁸⁾	Índia	150/172	<i>DNMT3B</i> -579G/-149T e -579G/-149C (haplótipos mais frequentes no grupo caso)

Tabela 9. Continuação

Referência	País	Mães CA/ CO	Associação com o risco materno para SD
Izci Ay <i>et al.</i> , 2015 ⁽⁶²⁾	Turquia	47/49	↓ <i>MTHFR</i> 677C ↑ <i>MTHFDI</i> 1958A
Sukla <i>et al.</i> , 2015 ⁽¹²⁹⁾	Índia	186/200	↑ <i>MTHFR</i> 677T
Jaiswal <i>et al.</i> , 2016 ⁽¹³⁰⁾	Índia	288/200	↑ <i>BHMT</i> 742AA

CA: Mães de indivíduos com síndrome de Down; CO: mães com filhos sem Síndrome de Down; SD: indivíduos com síndrome de Down; ↑: risco aumentado; ↓risco diminuído.

5. CONCLUSÃO

5. Conclusão

1. Na casuística avaliada não há evidências de associação entre os polimorfismos maternos *MTHFR* rs4846049 e rs4846048 e risco para a ocorrência de prole SD; entretanto, um risco materno aumentado para SD é observado em mulheres com idade materna inferior a 35 anos portadoras do genótipo materno TT do polimorfismo hsa-mir-149 rs2292832.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Klug, W.S.; Cummings, M.R.; Spencer, C.A.; Palladino, M.A. Conceitos de genética. 9.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
2. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins e Cotran. Patologia: bases patológicas das doenças. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2010.
3. Megarbane A, Ravel A, Mircher C, Sturtz F, Grattau Y, Rethore MO, et al. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2009;11(9):611-6.
4. Jorde LB, Carey JC, White RL. Genética médica. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.
5. Griffiths AJF; Wesser SR; Carroll SB; Doebley J. Introdução a genética. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
6. Gusmao FA, Tavares EJ, Moreira LM. [Maternal age and Down syndrome in Northeast Brazil]. *Cadernos de saude publica*. 2003;19(4):973-8.
7. Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, et al. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Human genetics*. 2009;125(1):41-52.
8. Ghosh S, Bhaumik P, Ghosh P, Dey SK. Chromosome 21 non-disjunction and Down syndrome birth in an Indian cohort: analysis of incidence and aetiology from family linkage data. *Genetics research*. 2010;92(3):189-97.
9. Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav-Shah M, et al. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. *PLoS genetics*. 2008;4(3):e1000033.

10. Ghosh S, Feingold E, Chakraborty S, Dey SK. Telomere length is associated with types of chromosome 21 nondisjunction: a new insight into the maternal age effect on Down syndrome birth. *Human genetics*. 2010;127(4):403-9.
11. James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *The American journal of clinical nutrition*. 1999;70(4):495-501.
12. Liu JJ, Ward RL. Folate and one-carbon metabolism and its impact on aberrant DNA methylation in cancer. *Advances in genetics*. 2010;71:79-121.
13. Salbaum JM, Kappen C. Genetic and epigenomic footprints of folate. *Progress in molecular biology and translational science*. 2012;108:129-58.
14. Kok DE, Dhonukshe-Rutten RA, Lute C, Heil SG, Uitterlinden AG, van der Velde N, et al. The effects of long-term daily folic acid and vitamin B12 supplementation on genome-wide DNA methylation in elderly subjects. *Clinical epigenetics*. 2015;7:121.
15. Sciandrello G, Caradonna F, Mauro M, Barbata G. Arsenic-induced DNA hypomethylation affects chromosomal instability in mammalian cells. *Carcinogenesis*. 2004;25(3):413-7.
16. Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in biochemical sciences*. 2006;31(2):89-97.
17. DeAngelis JT, Farrington WJ, Tollefsbol TO. An overview of epigenetic assays. *Molecular biotechnology*. 2008;38(2):179-83.
18. Palou M, Pico C, McKay JA, Sanchez J, Priego T, Mathers JC, et al. Protective effects of leptin during the suckling period against later obesity may be associated with

changes in promoter methylation of the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene. *The British journal of nutrition*. 2011;106(5):769-78.

19. Lim U, Song MA. Dietary and lifestyle factors of DNA methylation. *Methods in molecular biology*. 2012;863:359-76.

20. Beetstra S, Thomas P, Salisbury C, Turner J, Fenech M. Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei. *Mutation research*. 2005;578(1-2):317-26.

21. Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene*. 2014;533(1):11-20.

22. Davidsson J. The epigenetic landscape of aneuploidy: constitutional mosaicism leading the way? *Epigenomics*. 2014;6(1):45-58.

23. Barua S, Kuizon S, Chadman KK, Flory MJ, Brown WT, Junaid MA. Single-base resolution of mouse offspring brain methylome reveals epigenome modifications caused by gestational folic acid. *Epigenetics & chromatin*. 2014;7(1):3.

24. Costa G, Barra V, Lentini L, Cilluffo D, Di Leonardo A. DNA demethylation caused by 5-Aza-2'-deoxycytidine induces mitotic alterations and aneuploidy. *Oncotarget*. 2016;7(4):3726-39.

25. Hou Z, Matherly LH. Biology of the major facilitative folate transporters SLC19A1 and SLC46A1. *Current topics in membranes*. 2014;73:175-204.

26. Obeid R. The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway. *Nutrients*. 2013;5(9):3481-95.

27. Finkelstein JD. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 2000;26(3):219-25.

28. Gueant JL, Caillerez-Fofou M, Battaglia-Hsu S, Alberto JM, Freund JN, Dulluc I, et al. Molecular and cellular effects of vitamin B12 in brain, myocardium and liver through its role as co-factor of methionine synthase. *Biochimie*. 2013;95(5):1033-40.
29. Yu CP, Wu MH, Chou YC, Yang T, You SL, Chen CJ, et al. Breast cancer risk associated with multigenotypic polymorphisms in folate-metabolizing genes: a nested case-control study in Taiwan. *Anticancer research*. 2007;27(3B):1727-32.
30. Hu J, Zhou GW, Wang N, Wang YJ. MTRR A66G polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2010;124(3):779-84.
31. Eldibany MM, Caprini JA. Hyperhomocysteinemia and thrombosis: an overview. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2007;131(6):872-84.
32. Weiwei Z, Liping C, Dequan L. Association between dietary intake of folate, vitamin B6, B12 & MTHFR, MTR Genotype and breast cancer risk. *Pakistan journal of medical sciences*. 2014;30(1):106-10.
33. Jiang-Hua Q, De-Chuang J, Zhen-Duo L, Shu-de C, Zhenzhen L. Association of methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase polymorphisms with breast cancer risk and interaction with folate, vitamin B6, and vitamin B 12 intakes. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(12):11895-901.
34. Girelli D, Friso S, Trabetti E, Olivieri O, Russo C, Pessotto R, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation, plasma homocysteine, and folate in subjects from northern Italy with or without angiographically documented severe coronary atherosclerotic disease: evidence for an important genetic-environmental interaction. *Blood*. 1998;91(11):4158-63.

35. Alessio AC, Siqueira LH, Bydlowski SP, Hoehr NF, Annichino-Bizzacchi JM. Polymorphisms in the CBS gene and homocysteine, folate and vitamin B12 levels: association with polymorphisms in the MTHFR and MTRR genes in Brazilian children. *American journal of medical genetics Part A*. 2008;146A(20):2598-602.
36. Noll C, Planque C, Ripoll C, Guedj F, Diez A, Ducros V, et al. DYRK1A, a novel determinant of the methionine-homocysteine cycle in different mouse models overexpressing this Down-syndrome-associated kinase. *PloS one*. 2009;4(10):e7540.
37. Stover PJ, Chen LH, Suh JR, Stover DM, Keyomarsi K, Shane B. Molecular cloning, characterization, and regulation of the human mitochondrial serine hydroxymethyltransferase gene. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(3):1842-8.
38. Christensen KE, Rohlicek CV, Andelfinger GU, Michaud J, Bigras JL, Richter A, et al. The MTHFD1 p.Arg653Gln variant alters enzyme function and increases risk for congenital heart defects. *Human mutation*. 2009;30(2):212-20.
39. Whitsett J, Rangel Filho A, Sethumadhavan S, Celinska J, Widlansky M, Vasquez-Vivar J. Human endothelial dihydrofolate reductase low activity limits vascular tetrahydrobiopterin recycling. *Free radical biology & medicine*. 2013;63:143-50.
40. Martinez-Frias ML. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2008;146A(11):1477-82.

41. Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *American journal of human genetics*. 2000;67(3):623-30.
42. O'Leary VB, Parle-McDermott A, Molloy AM, Kirke PN, Johnson Z, Conley M, et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? *American journal of medical genetics*. 2002;107(2):151-5.
43. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, et al. Methionine synthase (MTR) 2756 (A --> G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are three risk factors for having a child with Down syndrome. *American journal of medical genetics Part A*. 2003;121A(3):219-24.
44. da Silva LR, Vergani N, Galdieri Lde C, Ribeiro Porto MP, Longhitano SB, Brunoni D, et al. Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *American journal of medical genetics Part A*. 2005;135(3):263-7.
45. Acacio GL, Barini R, Bertuzzo CS, Couto EC, Annichino-Bizzacchi JM, Junior WP. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and their association with trisomy 21. *Prenatal diagnosis*. 2005;25(13):1196-9.
46. Coppede F, Marini G, Bargagna S, Stuppia L, Minichilli F, Fontana I, et al. Folate gene polymorphisms and the risk of Down syndrome pregnancies in young Italian women. *American journal of medical genetics Part A*. 2006;140(10):1083-91.
47. Rai AK, Singh S, Mehta S, Kumar A, Pandey LK, Raman R. MTHFR C677T and A1298C polymorphisms are risk factors for Down's syndrome in Indian mothers. *Journal of human genetics*. 2006;51(4):278-83.

48. Scala I, Granese B, Sellitto M, Salome S, Sammartino A, Pepe A, et al. Analysis of seven maternal polymorphisms of genes involved in homocysteine/folate metabolism and risk of Down syndrome offspring. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2006;8(7):409-16.
49. Meguid NA, Dardir AA, Khass M, Hossieny LE, Ezzat A, El Awady MK. MTHFR genetic polymorphism as a risk factor in Egyptian mothers with Down syndrome children. *Disease markers*. 2008;24(1):19-26.
50. Wang SS, Qiao FY, Feng L, Lv JJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in China. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2008;9(2):93-9.
51. Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Zampieri BL, Haddad R, Eberlin MN, Pavarino-Bertelli EC. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. *Genetics and molecular research : GMR*. 2008;7(1):33-42.
52. Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I, Schuler-Faccini L. Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *American journal of medical genetics Part A*. 2009;149A(10):2080-7.
53. Coppede F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. *Mutation research*. 2009;682(1):54-70.
54. Pozzi E, Vergani P, Dalpra L, Combi R, Silvestri D, Crosti F, et al. Maternal polymorphisms for methyltetrahydrofolate reductase and methionine synthetase reductase and risk of children with Down syndrome. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2009;200(6):636 e1-6.

55. Fintelman-Rodrigues N, Correa JC, Santos JM, Pimentel MM, Santos-Reboucas CB. Investigation of CBS, MTR, RFC-1 and TC polymorphisms as maternal risk factors for Down syndrome. *Disease markers*. 2009;26(4):155-61.
56. Cyril C, Rai P, Chandra N, Gopinath PM, Satyamoorthy K. MTHFR Gene variants C677T, A1298C and association with Down syndrome: A Case-control study from South India. *Indian journal of human genetics*. 2009;15(2):60-4.
57. Brandalize AP, Bandinelli E, Dos Santos PA, Schuler-Faccini L. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism as risk factors for Down syndrome offspring in Southern Brazil. *Disease markers*. 2010;29(2):95-101.
58. Zampieri BL, Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Vannucchi H, Carvalho VM, Cordeiro JA, et al. Maternal risk for Down syndrome is modulated by genes involved in folate metabolism. *Disease markers*. 2012;32(2):73-81.
59. Wang SS, Wang C, Qiao FY, Lv JJ, Feng L. Polymorphisms in genes RFC-1/CBS as maternal risk factors for Down syndrome in China. *Archives of gynecology and obstetrics*. 2013;288(2):273-7.
60. Coppede F, Bosco P, Lorenzoni V, Denaro M, Anello G, Antonucci I, et al. The MTRR 66A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome in Caucasian women: a case-control study and a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2014;41(9):5571-83.
61. Liao YP, Zhang D, Zhou W, Meng FM, Bao MS, Xiang P, et al. Combined folate gene MTHFD and TC polymorphisms as maternal risk factors for Down syndrome in China. *Genetics and molecular research : GMR*. 2014;13(1):1764-73.

62. Izci Ay O, Ay ME, Erdal ME, Cayan F, Tekin S, Soylemez F, et al. Folate metabolism gene polymorphisms and risk for down syndrome offspring in Turkish women. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2015;19(4):191-7.
63. Coppede F. The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Frontiers in genetics*. 2015;6:223.
64. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*. 2009;19(1):92-105.
65. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
66. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*. 2004;23(20):4051-60.
67. Jeong G, Lim YH, Kim YK. Precise mapping of the transcription start sites of human microRNAs using DROSHA knockout cells. *BMC genomics*. 2016;17(1):908.
68. Mahgoub A, Steer CJ. MicroRNAs in the Evaluation and Potential Treatment of Liver Diseases. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(5).
69. Mondol V, Ahn BC, Pasquinelli AE. Splicing remodels the let-7 primary microRNA to facilitate Drosha processing in *Caenorhabditis elegans*. *Rna*. 2015;21(8):1396-403.
70. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*. 2003;17(24):3011-6.
71. Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna*. 2004;10(2):185-91.

72. Huppi K, Volfovsky N, Mackiewicz M, Runfola T, Jones TL, Martin SE, et al. MicroRNAs and genomic instability. *Seminars in cancer biology*. 2007;17(1):65-73.
73. Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes & development*. 2004;18(14):1655-66.
74. Tomari Y, Du T, Zamore PD. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell*. 2007;130(2):299-308.
75. Okamura K, Liu N, Lai EC. Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes. *Molecular cell*. 2009;36(3):431-44.
76. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2014;15(8):509-24.
77. Meurer S, Krüger K, Mooren FC. MicroRNAs and Exercise. *Dtsch Z Sportmed*. 2016;67(2):27-34.
78. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*. 2005;3(3):e85.
79. Zhu Y, Lu H, Huo Z, Ma Z, Dang J, Dang W, et al. MicroRNA-16 inhibits fetomaternal angiogenesis and causes recurrent spontaneous abortion by targeting vascular endothelial growth factor. *Scientific reports*. 2016;6:35536.
80. Jain CV, Jessmon P, Kilburn BA, Jodar M, Sandler E, Krawetz SA, et al. Regulation of HBEGF by Micro-RNA for Survival of Developing Human Trophoblast Cells. *PloS one*. 2016;11(10):e0163913.
81. Sood P, Krek A, Zavolan M, Macino G, Rajewsky N. Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(8):2746-51.

82. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*. 2010;466(7308):835-40.
83. Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, et al. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell*. 2014;56(1):104-15.
84. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-81.
85. Jopling CL. Targeting microRNA-122 to Treat Hepatitis C Virus Infection. *Viruses*. 2010;2(7):1382-93.
86. Lu J, Gao F, Wei Z, Liu P, Liu C, Zheng H, et al. A 5'-proximal stem-loop structure of 5' untranslated region of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genome is key for virus replication. *Virology journal*. 2011;8:172.
87. Da Sacco L, Masotti A. Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of microRNAs binding to 5' untranslated region. *International journal of molecular sciences*. 2012;14(1):480-95.
88. Li L, Gao F, Jiang Y, Yu L, Zhou Y, Zheng H, et al. Cellular miR-130b inhibits replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro and in vivo. *Scientific reports*. 2015;5:17010.
89. Thibault PA, Huys A, Amador-Canizares Y, Gailius JE, Pinel DE, Wilson JA. Regulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Xrn1 and MicroRNA-122 Binding to Individual Sites in the 5' Untranslated Region. *Journal of virology*. 2015;89(12):6294-311.

90. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003;115(7):787-98.
91. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15-20.
92. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350-5.
93. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene therapy*. 2011;18(12):1104-10.
94. Thum T, Condorelli G. Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular pathophysiology. *Circulation research*. 2015;116(4):751-62.
95. Garofalo M, Romano G, Di Leva G, Nuovo G, Jeon YJ, Ngankeu A, et al. EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. *Nature medicine*. 2011;18(1):74-82.
96. Fujii S, Sugiura T, Dohi Y, Ohte N. MicroRNA in atherothromobosis: is it useful as a disease marker? *Thrombosis journal*. 2016;14(Suppl 1):21.
97. Min PK, Chan SY. The biology of circulating microRNAs in cardiovascular disease. *European journal of clinical investigation*. 2015;45(8):860-74.
98. Lu J, Clark AG. Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome research*. 2012;22(7):1243-54.
99. Wu C, Gong Y, Sun A, Zhang Y, Zhang C, Zhang W, et al. The human MTHFR rs4846049 polymorphism increases coronary heart disease risk through modifying miRNA binding. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2013;23(7):693-8.

100. Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*. 2000;257(2):279-89.
101. Liu X, Zhao LJ, Liu YJ, Xiong DH, Recker RR, Deng HW. The MTHFR gene polymorphism is associated with lean body mass but not fat body mass. *Human genetics*. 2008;123(2):189-96.
102. Liu P, Lu Y, Recker RR, Deng HW, Dvornyk V. Association analyses suggest multiple interaction effects of the methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms on timing of menarche and natural menopause in white women. *Menopause*. 2010;17(1):185-90.
103. Tang W, Zhang S, Qiu H, Wang L, Sun B, Yin J, et al. Genetic variations in MTHFR and esophageal squamous cell carcinoma susceptibility in Chinese Han population. *Medical oncology*. 2014;31(5):915.
104. Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(1):13-21.
105. Wu M, Jolicoeur N, Li Z, Zhang L, Fortin Y, L'Abbe D, et al. Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis*. 2008;29(9):1710-6.
106. Ding SL, Wang JX, Jiao JQ, Tu X, Wang Q, Liu F, et al. A pre-microRNA-149 (miR-149) genetic variation affects miR-149 maturation and its ability to regulate the Puma protein in apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(37):26865-77.

107. Tu HF, Liu CJ, Chang CL, Wang PW, Kao SY, Yang CC, et al. The association between genetic polymorphism and the processing efficiency of miR-149 affects the prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *PloS one*. 2012;7(12):e51606.
108. Feng Y, Duan F, Song C, Zhao X, Dai L, Cui S. Systematic evaluation of cancer risk associated with rs2292832 in miR149 and rs895819 in miR27a: a comprehensive and updated metaanalysis. *Oncotarget*. 2016.
109. Huang GL, Lu Y, Pu XX, He YX, Chen ML, Li YZ, et al. Association study between miR-149 gene polymorphism and nasopharyngeal carcinoma. *Biomedical reports*. 2013;1(4):599-603.
110. Dikeakos P, Theodoropoulos G, Rizos S, Tzanakis N, Zografos G, Gazouli M. Association of the miR-146aC>G, miR-149T>C, and miR-196a2T>C polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Greek population. *Molecular biology reports*. 2014;41(2):1075-80.
111. Liu XX, Wang M, Xu D, Yang JH, Kang HF, Wang XJ, et al. Quantitative Assessment of the Association between Genetic Variants in MicroRNAs and Colorectal Cancer Risk. *BioMed research international*. 2015;2015:276410.
112. Li L, Liu T, Li Z, Zhang L, Zhang Z. The miR-149 rs2292832 T/C polymorphism may decrease digestive cancer susceptibility: an updated meta-analysis. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8(9):15351-61.
113. Xu Q, Liu JW, Yuan Y. Comprehensive assessment of the association between miRNA polymorphisms and gastric cancer risk. *Mutation research Reviews in mutation research*. 2015;763:148-60.

114. Xiao Y, Bao MH, Luo HQ, Xiang J, Li JM. A Meta-Analysis of the Association between Polymorphisms in MicroRNAs and Risk of Ischemic Stroke. *Genes*. 2015;6(4):1283-99.
115. Wang M, Ye Y, Qian H, Song Z, Jia X, Zhang Z, et al. Common genetic variants in pre-microRNAs are associated with risk of coal workers' pneumoconiosis. *Journal of human genetics*. 2010;55(1):13-7.
116. Sung JH, Kim SH, Yang WI, Kim WJ, Moon JY, Kim IJ, et al. miRNA polymorphisms (miR146a, miR149, miR196a2 and miR499) are associated with the risk of coronary artery disease. *Molecular medicine reports*. 2016;14(3):2328-42.
117. Ryan BM, Robles AI, Harris CC. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nature reviews Cancer*. 2010;10(6):389-402.
118. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):1215.
119. Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RD. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clinical chemistry*. 1998;44(8 Pt 1):1748-50.
120. Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *Journal of medical screening*. 2002;9(1):2-6.
121. Fragouli E, Alfarawati S, Goodall NN, Sanchez-Garcia JF, Colls P, Wells D. The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Molecular human reproduction*. 2011;17(5):286-95.

122. Sotonica M, Mackic-Djurovic M, Hasic S, Kiseljakovic E, Jadric R, Ibrulj S. Association of Parental Age and the Type of Down Syndrome on the Territory of Bosnia and Herzegovina. *Medical archives*. 2016;70(2):88-91.
123. Rowsey R, Kashevarova A, Murdoch B, Dickenson C, Woodruff T, Cheng E, et al. Germline mosaicism does not explain the maternal age effect on trisomy. *American journal of medical genetics Part A*. 2013;161A(10):2495-503.
124. Hulten MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, et al. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Molecular cytogenetics*. 2008;1:21.
125. Malini SS, Ramachandra NB. Influence of advanced age of maternal grandmothers on Down syndrome. *BMC medical genetics*. 2006;7:4.
126. Grillo LB, Acacio GL, Barini R, Pinto W, Jr., Bertuzzo CS. [Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome]. *Cadernos de saude publica*. 2002;18(6):1795-7.
127. Coppede F, Grossi E, Migheli F, Migliore L. Polymorphisms in folate-metabolizing genes, chromosome damage, and risk of Down syndrome in Italian women: identification of key factors using artificial neural networks. *BMC medical genomics*. 2010;3:42.
128. Sadiq MF, Al-Refai EA, Al-Nasser A, Khassawneh M, Al-Batayneh Q. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms C677T and A1298C as maternal risk factors for Down syndrome in Jordan. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2011;15(1-2):51-7.

129. Sukla KK, Jaiswal SK, Rai AK, Mishra OP, Gupta V, Kumar A, et al. Role of folate-homocysteine pathway gene polymorphisms and nutritional cofactors in Down syndrome: A triad study. *Human reproduction*. 2015;30(8):1982-93.
130. Jaiswal SK, Sukla KK, Chauhan A, Lakhota AR, Kumar A, Rai AK. Choline metabolic pathway gene polymorphisms and risk for Down syndrome: An association study in a population with folate-homocysteine metabolic impairment. *European journal of clinical nutrition*. 2016.
131. Zintzaras E. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and risk of Down syndrome offspring: a meta-analysis. *Journal of human genetics*. 2007;52(11):943-53.
132. Costa-Lima MA, Amorim MR, Orioli IM. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene 677C > T polymorphism and Down syndrome. *Molecular biology reports*. 2013;40(3):2115-25.
133. Coppede F, Bosco P, Lorenzoni V, Migheli F, Barone C, Antonucci I, et al. The MTR 2756A>G polymorphism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome: a case-control study and a meta-analysis. *Molecular biology reports*. 2013;40(12):6913-25.
134. Wu X, Wang X, Chan Y, Jia S, Luo Y, Tang W. Folate metabolism gene polymorphisms MTHFR C677T and A1298C and risk for Down syndrome offspring: a meta-analysis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 2013;167(2):154-9.
135. Yang M, Gong T, Lin X, Qi L, Guo Y, Cao Z, et al. Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism and the risk of having a Down syndrome offspring: a meta-analysis. *Mutagenesis*. 2013;28(6):661-71.

136. Victorino DB, Godoy MF, Goloni-Bertollo EM, Pavarino EC. Meta-analysis of Methylenetetrahydrofolate reductase maternal gene in Down syndrome: increased susceptibility in women carriers of the MTHFR 677T allele. *Molecular biology reports*. 2014;41(8):5491-504.
137. Rai V, Yadav U, Kumar P, Yadav SK, Mishra OP. Maternal methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and down syndrome risk: a meta-analysis from 34 studies. *PloS one*. 2014;9(9):e108552.
138. Balduino Victorino D, de Godoy MF, Goloni-Bertollo EM, Pavarino EC. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and maternal risk for down syndrome: a meta-analysis. *Disease markers*. 2014;2014:517504.
139. Chadefaux-Vekemans B, Coude M, Muller F, Oury JF, Chabli A, Jais J, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in the etiology of Down syndrome. *Pediatric research*. 2002;51(6):766-7.
140. Stuppia L, Gatta V, Gaspari AR, Antonucci I, Morizio E, Calabrese G, et al. C677T mutation in the 5,10-MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. *European journal of human genetics : EJHG*. 2002;10(6):388-90.
141. Takamura N, Kondoh T, Ohgi S, Arisawa K, Mine M, Yamashita S, et al. Abnormal folic acid-homocysteine metabolism as maternal risk factors for Down syndrome in Japan. *European journal of nutrition*. 2004;43(5):285-7.
142. Boduroglu K, Alanay Y, Koldan B, Tuncbilek E. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *American journal of medical genetics Part A*. 2004;127A(1):5-10.
143. Chango A, Fillon-Emery N, Mircher C, Blehaut H, Lambert D, Herbeth B, et al. No association between common polymorphisms in genes of folate and homocysteine

metabolism and the risk of Down's syndrome among French mothers. *The British journal of nutrition*. 2005;94(2):166-9.

144. Biselli JM, Brumati D, Frigeri VF, Zampieri BL, Goloni-Bertollo EM, Pavarino-Bertelli EC. A80G polymorphism of reduced folate carrier 1 (RFC1) and C776G polymorphism of transcobalamin 2 (TC2) genes in Down's syndrome etiology. *Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina*. 2008;126(6):329-32.

145. Kohli U, Arora S, Kabra M, Ramakrishnan L, Gulati S, Pandey RM. Prevalence of MTHFR C677T polymorphism in north Indian mothers having babies with Trisomy 21 Down syndrome. *Down's syndrome, research and practice : the journal of the Sarah Duffen Centre*. 2008;12(2):133-7.

146. Santos-Reboucas CB, Correa JC, Bonomo A, Fintelman-Rodrigues N, Moura KC, Rodrigues CS, et al. The impact of folate pathway polymorphisms combined to nutritional deficiency as a maternal predisposition factor for Down syndrome. *Disease markers*. 2008;25(3):149-57.

147. Kokotas H, Grigoriadou M, Mikkelsen M, Giannoulia-Karantana A, Petersen MB. Investigating the impact of the Down syndrome related common MTHFR 677C>T polymorphism in the Danish population. *Disease markers*. 2009;27(6):279-85.

148. Neagos D, Cretu R, Tutulan-Cunita A, Stoian V, Bohiltea LC. RFC - 1 Gene Polymorphism and the Risk of Down Syndrome in Romanian Population. *Maedica*. 2010;5(4):280-5.

149. Neagos D, Cretu R, Tutulan-Cunita A, Stoian V, Bohiltea LC. Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD) enzyme polymorphism as a maternal risk factor for trisomy 21: a clinical study. *Journal of medicine and life*. 2010;3(4):454-7.

150. Mendes CC, Raimundo AM, Oliveira LD, Zampieri BL, Marucci GH, Biselli JM, et al. DHFR 19-bp deletion and SHMT C1420T polymorphisms and metabolite concentrations of the folate pathway in individuals with Down syndrome. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2013;17(4):274-7.
151. Vranekovic J, Babic Bozovic I, Starcevic Cizmarevic N, Buretic-Tomljanovic A, Ristic S, Petrovic O, et al. Functional inference of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms on enzyme stability as a potential risk factor for Down syndrome in Croatia. *Disease markers*. 2010;28(5):293-8.
152. Mohanty PK, Kapoor S, Dubey AP, Pandey S, Shah R, Nayak HK, et al. Evaluation of C677T polymorphism of the methylenetetrahydrofolate reductase gene and its association with levels of serum homocysteine, folate, and vitamin B12 as maternal risk factors for Down syndrome. *Indian journal of human genetics*. 2012;18(3):285-9.
153. Tayeb MT. The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant (C677T) in risk mothers with Down syndrome among Saudi population. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2012;13:263-8.
154. Kaur A, Kaur A. Prevalence of methylenetetrahydrofolate reductase 677 C-T polymorphism among mothers of Down syndrome children. *Indian journal of human genetics*. 2013;19(4):412-4.
155. Cretu R, Neagos D, Radoi VE, Sfetea RC, Bohiltea LC. Clinical study regarding the link between cystathionine β -synthase 844ins68 polymorphism and maternal risk for Down syndrome. *GINECOeu*. 2013;9:15-8.

156. Rai V, Yadav U, Kumar P, Yadav SK. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism is not risk factor for Down syndrome in North India. *Indian journal of human genetics*. 2014;20(2):142-7.
157. Marucci GH, Zampieri BL, Biselli JM, Valentin S, Bertollo EM, Eberlin MN, et al. Polymorphism C1420T of Serine hydroxymethyltransferase gene on maternal risk for Down syndrome. *Molecular biology reports*. 2012;39(3):2561-6.
158. Zampieri BL, Biselli JM, Goloni-Bertollo EM, Pavarino EC. BHMT G742A and MTHFD1 G1958A polymorphisms and Down syndrome risk in the Brazilian population. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2012;16(6):628-31.
159. Wang SS, Feng L, Qiao FY, Lv JJ. Functional variant in methionine synthase reductase decreases the risk of Down syndrome in China. *The journal of obstetrics and gynaecology research*. 2013;39(2):511-5.
160. Amorim MR, Moura CM, Gomes AD, Barboza HN, Lopes RB, Ribeiro MG, et al. Betaine-homocysteine methyltransferase 742G>A polymorphism and risk of down syndrome offspring in a Brazilian population. *Molecular biology reports*. 2013;40(8):4685-9.
161. Coppede F, Bosco P, Tannorella P, Romano C, Antonucci I, Stuppia L, et al. DNMT3B promoter polymorphisms and maternal risk of birth of a child with Down syndrome. *Human reproduction*. 2013;28(2):545-50.
162. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature genetics*. 1995;10(1):111-3.
163. van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM, Smeitink JA, Trijbels FJ, Eskes TK, et al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an

additional risk factor for neural-tube defects? American journal of human genetics. 1998;62(5):1044-51.

164. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. Molecular genetics and metabolism. 1998;64(3):169-72.

165. Weisberg IS, Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Chen Z, Curtis Ellison R, et al. The 1298A-->C polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): in vitro expression and association with homocysteine. Atherosclerosis. 2001;156(2):409-15.

166. Song MY, Ruts E, Kim J, Janumala I, Heymsfield S, Gallagher D. Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. The American journal of clinical nutrition. 2004;79(5):874-80.

167. Jeon YJ, Kim JW, Park HM, Kim JO, Jang HG, Oh J, et al. Genetic variants in 3'-UTRs of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) predict colorectal cancer susceptibility in Koreans. Scientific reports. 2015;5:11006.

168. Lu Q, Jiang K, Li Q, Ji YJ, Chen WL, Xue XH. Polymorphisms in the MTHFR gene are associated with breast cancer risk and prognosis in a Chinese population. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. 2015;36(5):3757-62.

169. Spellicy CJ, Northrup H, Fletcher JM, Cirino PT, Dennis M, Morrison AC, et al. Folate metabolism gene 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) is associated with ADHD in myelomeningocele patients. PloS one. 2012;7(12):e51330.

170. Lakhan SE, Vieira KF. Nutritional therapies for mental disorders. Nutrition journal. 2008;7:2.

171. Cheng X, Li T, Wang H, Zhu D, Ma C, Ma B, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and cerebral palsy in Chinese infants. *Journal of human genetics*. 2011;56(1):17-21.
172. Chen Q, Qin R, Fang Y, Li H, Liu Y. A Functional Variant at the miR-214 Binding Site in the Methylenetetrahydrofolatereductase Gene Alters Susceptibility to Gastric Cancer in a Chinese Han Population. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2015;36(2):622-30.
173. Jiang H, Wang H, Ge F, Wu L, Wang X, Chen S. The Functional Variant in the 3'UTR of IGF1 with the Risk of Gastric Cancer in a Chinese Population. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2015;36(3):884-92.
174. Liu Y, Xu J, Jiang M, Ni L, Chen Y, Ling Y. Association between functional PSMD10 Rs111638916 variant regulated by MiR-505 and gastric cancer risk in a Chinese population. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2015;37(3):1010-7.
175. Wang B, Yang H, Shen L, Wang J, Pu W, Chen Z, et al. Rs56288038 (C/G) in 3'UTR of IRF-1 Regulated by MiR-502-5p Promotes Gastric Cancer Development. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2016;40(1-2):391-9.
176. Yu X, Liu J, Zhu H, Xia Y, Gao L, Dong Y, et al. Synergistic association of DNA repair relevant gene polymorphisms with the risk of coronary artery disease in northeastern Han Chinese. *Thrombosis research*. 2014;133(2):229-34.

177. Duan R, Pak C, Jin P. Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Human molecular genetics*. 2007;16(9):1124-31.
178. Li Q, Chen L, Chen D, Wu X, Chen M. Influence of microRNA-related polymorphisms on clinical outcomes in coronary artery disease. *American journal of translational research*. 2015;7(2):393-400.
179. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D68-73.
180. Chen QY, Liu N, Ma J, Fang Y, Cao Y, Li H, et al. Effect of a pre-microRNA-149 (miR-149) genetic variation on the risk of ischemic stroke in a Chinese Han population. *Genetics and molecular research : GMR*. 2015;14(1):2582-9.
181. Liu MF, Chen WQ, He YZ, Gu YL. Role of miR-149C>T polymorphisms on the risk of hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Genetics and molecular research : GMR*. 2014;13(3):7184-9.
182. Kim WH, Min KT, Jeon YJ, Kwon CI, Ko KH, Park PW, et al. Association study of microRNA polymorphisms with hepatocellular carcinoma in Korean population. *Gene*. 2012;504(1):92-7.
183. Wang C, Sturgis EM, Chen X, Zheng H, Wei Q, Li G. Pre-miRNA variants as predictors of clinical outcome in patients with squamous cell carcinomas of the nonoropharynx. *Oncotarget*. 2016;7(18):26444-53.
184. Wei WJ, Lu ZW, Li DS, Wang Y, Zhu YX, Wang ZY, et al. Association of the miR-149 Rs2292832 polymorphism with papillary thyroid cancer risk and

clinicopathologic characteristics in a Chinese population. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(11):20968-81.

185. Ahn DH, Rah H, Choi YK, Jeon YJ, Min KT, Kwack K, et al. Association of the miR-146aC>G, miR-149T>C, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with gastric cancer risk and survival in the Korean population. *Molecular carcinogenesis*. 2013;52 Suppl 1:E39-51.

186. Li H, Ren Y, Xia L, Qu R, Kong L, Yin Z, et al. Association of MicroRNA-149 Polymorphism with Lung Cancer Risk in Chinese Non-Smoking Female: A Case-Control Study. *PloS one*. 2016;11(9):e0163626.

187. Miao L, Wang L, Zhu L, Du J, Zhu X, Niu Y, et al. Association of microRNA polymorphisms with the risk of head and neck squamous cell carcinoma in a Chinese population: a case-control study. *Chinese journal of cancer*. 2016;35(1):77.

188. Vinci S, Gelmini S, Mancini I, Malentacchi F, Pazzagli M, Beltrami C, et al. Genetic and epigenetic factors in regulation of microRNA in colorectal cancers. *Methods*. 2013;59(1):138-46.

189. Fan X, Wu Z. Effects of four single nucleotide polymorphisms in microRNA-coding genes on lung cancer risk. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35(11):10815-24.

190. Pratedrat P, Sopipong W, Makkoch J, Praianantathavorn K, Chuaypen N, Tangkijvanich P, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in miR-149 (rs2292832) and miR-101-1 (rs7536540) Are Not Associated with Hepatocellular Carcinoma in Thai Patients with Hepatitis B Virus Infection. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015;16(15):6457-61.

191. Hashemi M, Moradi N, Ziaee SA, Narouie B, Soltani MH, Rezaei M, et al. Association between single nucleotide polymorphism in miR-499, miR-196a2, miR-146a and miR-149 and prostate cancer risk in a sample of Iranian population. *Journal of advanced research*. 2016;7(3):491-8.
192. Li Y, Wang J, Jiang C, Zheng G, Lu X, Guo H. Association of the genetic polymorphisms in pre-microRNAs with risk of childhood epilepsy in a Chinese population. *Seizure*. 2016;40:21-6.
193. Ke J, Zeng S, Mao J, Wang J, Lou J, Li J, et al. Common genetic variants of GPC1 gene reduce risk of biliary atresia in a Chinese population. *Journal of pediatric surgery*. 2016;51(10):1661-4.
194. Jeon YJ, Kim OJ, Kim SY, Oh SH, Oh D, Kim OJ, et al. Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ischemic stroke and silent brain infarction risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013;33(2):420-30.
195. Chen C, Hong H, Chen L, Shi X, Chen Y, Weng Q. Association of microRNA polymorphisms with the risk of myocardial infarction in a Chinese population. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2014;233(2):89-94.
196. Liu Y, Ma Y, Zhang B, Wang SX, Wang XM, Yu JM. Genetic polymorphisms in pre-microRNAs and risk of ischemic stroke in a Chinese population. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2014;52(4):473-80.
197. Jazdzewski K, Murray EL, Franssila K, Jarzab B, Schoenberg DR, de la Chapelle A. Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(20):7269-74.

198. Xu T, Zhu Y, Wei QK, Yuan Y, Zhou F, Ge YY, et al. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*. 2008;29(11):2126-31.
199. Lian H, Wang L, Zhang J. Increased risk of breast cancer associated with CC genotype of Has-miR-146a Rs2910164 polymorphism in Europeans. *PloS one*. 2012;7(2):e31615.
200. Upadhyaya A, Smith RA, Chacon-Cortes D, Revechon G, Bellis C, Lea RA, et al. Association of the microRNA-Single Nucleotide Polymorphism rs2910164 in miR146a with sporadic breast cancer susceptibility: A case control study. *Gene*. 2016;576(1 Pt 2):256-60.
201. Kogo R, Mimori K, Tanaka F, Komune S, Mori M. Clinical significance of miR-146a in gastric cancer cases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(13):4277-84.
202. Yamashita J, Iwakiri T, Fukushima S, Jinnin M, Miyashita A, Hamasaki T, et al. The rs2910164 G>C polymorphism in microRNA-146a is associated with the incidence of malignant melanoma. *Melanoma research*. 2013;23(1):13-20.
203. Hung PS, Chang KW, Kao SY, Chu TH, Liu CJ, Lin SC. Association between the rs2910164 polymorphism in pre-mir-146a and oral carcinoma progression. *Oral oncology*. 2012;48(5):404-8.
204. Li C, Fu W, Zhang Y, Zhou L, Mao Z, Lv W, et al. Meta-analysis of microRNA-146a rs2910164 G>C polymorphism association with autoimmune diseases susceptibility, an update based on 24 studies. *PloS one*. 2015;10(4):e0121918.

205. Park R, Lee WJ, Ji JD. Association between the three functional miR-146a single-nucleotide polymorphisms, rs2910164, rs57095329, and rs2431697, and autoimmune disease susceptibility: A meta-analysis. *Autoimmunity*. 2016;49(7):451-8.
206. Tao K, Yang J, Guo Z, Hu Y, Sheng H, Gao H, et al. Prognostic value of miR-221-3p, miR-342-3p and miR-491-5p expression in colon cancer. *American journal of translational research*. 2014;6(4):391-401.
207. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, et al. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(7):2600-8.
208. Jaiswal SK, Sukla KK, Kumari N, Lakhotia AR, Kumar A, Rai AK. Maternal risk for down syndrome and polymorphisms in the promoter region of the DNMT3B gene: a case-control study. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*. 2015;103(4):299-305.

APÊNDICES

FAMERP FACULDADE DE MEDICINA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
AUTARQUIA ESTADUAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Obrigatório para Pesquisas Científica em Seres Humanos – Resolução n.º 466/12 – CNS)

I. Dados de Identificação do sujeito da pesquisa

Nome: _____

Documento de identidade n.º: _____

Endereço: _____ n.º: _____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone para contato: _____

II. Dados sobre a pesquisa científica/pesquisador:

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

Pesquisadora responsável: Profª Drª Érika Cristina Pavarino

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

Cargo/Função: Professor Adjunto

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

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

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

III. Avaliação do Risco da Pesquisa

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

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

IV. Esclarecimentos sobre a pesquisa científica:

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

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

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

- **Benefícios que poderão ser obtidos:** Não há benefícios diretos para os participantes da pesquisa. Entretanto, os dados gerados a partir do presente estudo contribuirão para a compreensão dos mecanismos envolvidos no risco materno para a síndrome de Down.
- O sujeito da pesquisa/responsável legal consente ao pesquisador utilizar os resultados advindos da pesquisa apenas para divulgação em reuniões de caráter científico e/ou publicações em meios especializados, sendo, portanto, mantido sigilo das informações.
- O sujeito da pesquisa/responsável legal pode consultar a pesquisadora responsável pelo telefone (17) 32015904 ou a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, telefone: (17) 32015813, para esclarecimento de qualquer dúvida.
- O sujeito da pesquisa está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa e não precisa apresentar justificativas para isso.
- O sujeito da pesquisa legal autoriza o armazenamento do material coletado e será contatado (a) para conceder ou não a autorização para o uso deste material em futuros projetos.
- O sujeito que concordar em participar desta pesquisa e com a retirada e uso do material, do modo descrito acima, não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes desta pesquisa e também não terá qualquer tipo de despesa para participar do estudo.

V. Consentimento pós-esclarecimento:

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

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

Sujeito de Pesquisa

Érika Cristina Pavarino
Pesquisadora Responsável

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

Questionário

Grupo: Caso () Controle ()

Código: _____

Prontuário: _____

Nome: _____

Documento de identidade n.º: _____ Data de nascimento: _____

Endereço: _____ n.º: _____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone para contato: _____

Idade na concepção: _____ Idade ao nascimento do filho: _____ Prematuridade: () Sim () Não

Ingestão de Ácido fólico: () Sim () Não – Mg: _____ Único: _____ Duração: _____

Ingestão de vitaminas: _____ Início: _____ Duração: _____

Número de filhos: _____ Abortos prévios: _____

Caso de Cardiopatia Congênita na família? () Sim () Não Tipo: _____

Protocolo de Extração de DNA, segundo Miller et al. (1988)⁽¹¹⁸⁾, com modificações.

- Coletar 7mL de sangue periférico em tubo de centrífuga com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA);
- Transferir o sangue para um tubo estéril, contendo 7mL de gradiente de concentração (Ficoll-Paque);
- Centrifugar o tubo a 1.500 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos em temperatura ambiente;
- Transferir os leucócitos para um novo tubo com a utilização de uma pipeta Pasteur estéril;
- Adicionar ao material tampão fosfato salino (PBS 10x) (1,3M de NaCl; 70mM de Na₂HPO₄.2H₂O; 30mM de KH₂PO₄, pH 7,2 - 7,4) até completar o volume de 15 ml;
- Centrifugar a 1.200 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante e adicionar novamente PBS 10x até completar o volume de 15mL;
- Centrifugar novamente a 1.200 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente;
- Após descartar o sobrenadante, adicionar 3mL de tampão de lise (Tris-HCl 90mM; NaCl 400mM; Na₂ EDTA 2mM), 200µL de sódio dodecil sulfato (SDS) 10% e 50 µL de proteinase K (20 mg/mL);
- Incubar a solução a 37°C por 16 horas (*overnight*);
- Após o período de incubação, adicionar 1mL de NaCl 5M;
- Agitar o tubo por 15 segundos e mantê-lo no gelo por 15 minutos;
- Centrifugar a 2.000 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente;

- Transferir o sobrenadante para um tubo estéril de 15mL, descartando-se o *pellet*;
- Adicionar ao sobrenadante etanol absoluto gelado e homogeneizar o tubo por inversão;
- Transferir o DNA precipitado para um microtubo contendo 500 μ L de etanol 70%;
- Centrifugar o microtubo a 1.2000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Descartar o etanol por inversão do microtubo;
- Manter o microtubo, contendo o DNA, invertido em temperatura ambiente para a secagem completa do etanol;
- Após secagem, ressuspender o DNA em 200 μ L de tampão de eluição (TE) (1 M Tris-HCl pH8, 0,5 M EDTA);
- Armazenar o DNA em freezer -20°C.

Protocolo de Extração de DNA salina ou “salting-out”, segundo Salazar et al. (1998)⁽¹¹⁹⁾, com modificações.

- Coletar 1mL sangue periférico em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA);
- Transferir o sangue para um microtubo estéril e centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Descartar o plasma e adicionar 900µL de Tampão 1 (1x) [5 ml do Tampão 10x (100mM Tris-HCl; 100mM de KCl; 100mM de MgCl₂ e 20mM EDTA) e 45 ml de água ultrapura] contendo 2,75% de Triton.
- Homogeneizar o microtubo por 40 segundos e centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante e adicionar ao pellet 1mL do Tampão 1 (1x)
- Homogeneizar o microtubo por 40 segundos e centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante;
- Repetir esse procedimento por três vezes;
- Após, adicionar 200µL de Tampão 2 (1x) (10 mM Tris-HCl; 10 mM KCl; 10 mM, MgCl₂; 2 mM EDTA; 0,4 M NaCl);
- Homogeneizar o microtubo por 15 segundos;
- Adicionar 20µL de solução de SDS 10%;
- Incubar a solução em banho-maria a 56°C por 15 minutos;
- Após esse período, adicionar 100µL de NaCl 5M e homogeneizar o microtubo por 15 segundos;

- Centrifugar a 1.2000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Transferir o sobrenadante para um microtubo de 1,5 mL estéril;
- Adicionar 1mL de etanol absoluto gelado;
- Inverter o microtubo várias vezes, vagorosamente;
- Incubar as amostras em freezer -20°C por 16 horas (*overnight*);
- Após esse período, centrifugar o microtubo a 1.2000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Remover o etanol absoluto por inversão;
- Adicionar 1mL de etanol 70% gelado;
- Centrifugar a 1.2000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente e descartar o etanol;
- Repetir esse procedimento por mais duas vezes;
- Deixar o microtubo em posição invertida para secagem completa do etanol;
- Após, ressuspender o DNA em 100µL de TE (1 M Tris-HCl pH8, 0,5 M EDTA);
- Incubar o DNA a 56°C por 15 minutos e após, armazenar a -20°C.

ANEXOS



Comitê de Ética em
Pesquisa em Seres Humanos
CEP/FAMERP

Parecer n.º 427.757

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto de pesquisa CAAE 20113313.6.0000.5415 sob a responsabilidade de Érika Cristina Pavarino com o título "Impacto de polimorfismos da região 3 não traduzida do gene MTHFR e de polimorfismo do microRNA hsa-miR-149 no risco materno para a síndrome de Down" está de acordo com a resolução do CNS 466/12 e foi aprovado por esse CEP.

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

São José do Rio Preto, 17 de outubro de 2013.

Prof.ª. Dr.ª. Maria Rita Rodrigues Vieira
Vice-Presidente do CEP/FAMERP



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

PARECER Nº2400/2004

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

Registro CEP: 3340/04

Processo nº 25000.106488/2004-41

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

Pesquisador Responsável: Dra. Érika Cristina Pavarino Bertelli

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

Área Temática Especial: Genética Humana

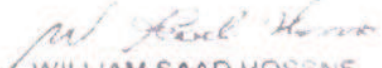
Ao se proceder à análise das respostas ao parecer CONEP nº 2001/2004, relativo ao projeto em questão, considerou-se que:

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

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

Situação: Projeto aprovado com recomendação

Brasília, 29 de Novembro de 2004


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS



FACULDADE DE MEDICINA DE
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO-
FAMERP - SP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Érika Cristina Pavarino

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 20113313.6.0000.5415

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Ampliação de casuística

Justificativa: Inicialmente foi proposta a avaliação dos polimorfismos genéticos MTHFR

Data do Envio: 03/04/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 650.612

Data da Relatoria: 06/04/2014

Apresentação da Notificação:

Trata-se de uma notificação de ampliação da amostra dos participantes da pesquisa CAAE: 20113313.6.0000.5415 de título: "Impacto de polimorfismos da região 3 não traduzida do gene MTHFR e de polimorfismo do microRNA hsa-miR-149 no risco materno para a síndrome de Down".

Objetivo da Notificação:

Ampliar a casuística.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não fere em nada os princípios éticos.

