



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

TEREZA CRISTINA PINHEIRO DIÓGENES

**EM BUSCA DA ORIGEM DAS CARDIOPATIAS CONGÊNITAS EM PORTADORES
DE SÍNDROME DE DOWN**

RECIFE - PE

2017

TEREZA CRISTINA PINHEIRO DIÓGENES

EM BUSCA DA ORIGEM DAS CARDIOPATIAS CONGÊNITAS EM PORTADORES
DE SÍNDROME DE DOWN

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde da Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz De Lima Filho

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Da Silva Mattos

RECIFE - PE

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Diógenes, Tereza Cristina Pinheiro

Em busca da origem das cardiopatias congênitas em portadores de Síndrome de Down / Tereza Cristina Pinheiro Diógenes - Recife: O Autor, 2017.

91 folhas: il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Coorientadora: Sandra da Silva Mattos

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia em Saúde, 2017.

Inclui referências

1. Down, Síndrome de 2. Cardiopatias congênitas 3. Expressão Gênica I. Lima Filho, José Luiz de (orient.) II. Mattos, Sandra da Silva (coorient.) III. Título

616.858842

CDD (22.ED.)

UFPE/CB-2017-041

TEREZA CRISTINA PINHEIRO DIÓGENES

EM BUSCA DA ORIGEM DAS CARDIOPATIAS CONGÊNITAS EM PORTADORES
DE SÍNDROME DE DOWN

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde da Rede Nordeste de Biotecnologia-RENORBIO, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 18 agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Prof^a. Dr^a. Sandra da Silva Mattos
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Juliana Sousa Soares de Araujo
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua proteção, pois Ele está comigo em todos os momentos da minha vida, permitindo que eu possa atingir meus objetivos.

Agradeço a toda a equipe da Unidade de Cardiologia Materno Fetal do Hospital Português de Recife – PE, especialmente à Dra. Sandra Mattos, que viabilizou a execução deste projeto; à Dra. Lúcia Moser, pelo apoio incondicional, e ao Dr. Felipe Mourato, pela ajuda e pelo suporte científico que sempre me foi concedido. Agradeço, ainda, a todos que compõem esse serviço e que de alguma maneira muito me ajudaram.

Ao Prof. Dr. Enéas Ricardo fica o meu agradecimento especial, pela orientação que me foi dada; à prof. Dra. Juliana Soares e a toda sua equipe do Instituto Cândida Vargas, que me apoiou na coleta dos pacientes; e à profa. Dra. Renata Gregório pela realização na análise estatística dos dados

A toda equipe do Laboratório LIKA, em especial à prof. Dra. Danyelle Brunekae às doutorandas Katiane Ferreira e Fátima Cardoso, pela ajuda incansável na análise dos dados de laboratório

À minha família, em especial ao meu pai (*in memorian*) e à minha mãe, pelo estímulo dado em todos os momentos. Agradeço também a todos os outros membros da minha família, incluindo Eliane e suas filhas, pelo suporte e apoio incondicional em todos os momentos.

“O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas.”

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

A Síndrome de Down (SD) afeta 1 a cada 700 nascidos vivos, e as cardiopatias congênitas (CC) ocorrem em 40-60% desses pacientes. Os fatores que contribuem para a associação entre SD e CC não são totalmente compreendidos. O gênero pode ser um deles. Por outro lado, muitos estudos apontam que uma região do cromossomo 21 é responsável pela expressão do fenótipo SD (região crítica da Síndrome de Down - DSCR), incluindo a presença de CC. Investigamos de duas maneiras os fatores que influenciaram a origem das CC no SD. Na primeira, realizamos uma meta-análise da prevalência de CC na SD, separada por gênero. Foram utilizados três bancos de dados para pesquisa. Ademais, 578 artigos foram revisados. Destes, doze artigos foram incluídos. Na segunda fase, comparamos a expressão de sete genes (DYRK1A, DSCR3, HLCS, PIGP, RCAN1, RUNX1 e TTC3, todos presentes em DSCR) entre pacientes com Down, divididos por com CC e sem CC. Os pacientes com SD atendidos em uma clínica de cardiologia pediátrica foram incluídos neste estudo. A análise quantitativa da meta-análise mostrou maior prevalência de CC, particularmente defeitos do septo atrioventricular (DSAV), em pacientes do sexo feminino. Não foram encontradas diferenças em outras formas de CC. Verificou-se que o gene DYRK1A é sobre-expresso em pacientes com SD e CC. Concluímos que CC, particularmente DSAV, são mais comuns no sexo feminino dos pacientes com Síndrome de Down. DYRK1A é sobre-expressa em pacientes com SD e CC.

Palavras-chave: DYRK1A.PIGP.Síndrome de Down.CardiopatiaCongênita.Gênero. Expressão Gênica.

ABSTRACT

Down's syndrome (DS) affects one per 700 live births and congenital heart disease (CHD) occurs in 40-60% of these patients. Contributing factors to the association between DS and CHD are being unraveled. Gender could be one of them. In the other hand, many studies point out that a region of chromosome 21 is responsible for the expression of DS phenotype (Down syndrome critical region – DSCR), including the presence of CHD. We investigate the factors that influenced in the origin of CHD in DS by two ways. In the first we performed a meta-analysis of CHD prevalence in DS, separated by gender. Three search engines were used and 578 articles were reviewed. Twelve articles were included. In the second, we compare the expression of seven genes (DYRK1A, DSCR3, HLCS, PIGP, RCAN1, RUNX1 and TTC3, all of them present in DSCR) between DS patients with and without CHD. Patients with DS attended in a pediatric cardiology clinic were included in this study. Quantitative analysis showed a higher prevalence of CHD, particularly atrioventricularseptal defects (AVSD), in female patients. No differences were found in others forms of CHD. It was found that the gene DYRK1A is overexpressed in patients with DS and CHD.

CHD, we have concluded, particularly AVSD, are more common in the female gender of Down's syndrome patients. DYRK1A is overexpressed in patients with DS and CHD.

Keywords: DYRK1A.PIGP. Down Syndrome. Congenital Heart Disease.Gender.Gene Expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 1 - Atuação das enzimas MTHFR e MTRR no metabolismo do folato (Hobbs,2000)	24
Figure 2-Congenital heart defects.	33
Figure 3 - Heart development.....	39
Figure 4 - Origin and genetic aetiology of congenital heart disease.	42
Figure 5 - Modelling human congenital heart diseases in mice, and dosage- dependent regulation of cardiac morphogenesis.	43
Figure 6 - Narrowed DS-CHD candidate region and genes	48
Figure 7 - Genomic dissection od DS-associated heart defects in mice.....	51
Figure 8 - A threshold model for CHD.....	56
Figure 9 - Genomic dissection of DS associated heart defects in mice.....	58

CAPÍTULO I -GENDER DIFFERENCES IN THE PREVALENCE OF CONGENITAL HEART DISEASE IN DOWN'S SYNDROME: A BRIEF META-ANALYSIS.

Figure 1 -Flow chart of eligible studies for meta analysis.....	83
Figure 2 - Meta-analysis of all CHD and DSAV by gender in Down syndrome....	83
Figure 3 - Meta-analysis of ASD and VSD by gender in Down syndrome.....	84
Figure 4 - Meta-analysis of PDA and TOF by gender in Down syndrome.....	84

Capítulo II – DYRK1A and PIGP are more expressed in Down syndrome with CHD and AVSD

Figure 1 - Gene expression in Down syndrome: A-G divided by the presence of CHD and H by the presence of AVSD.....	93
---	----

Quadro 1- Genes localizados no cromossomo 21 que possivelmente exercem uma influência na estrutura ou função do sistema nervoso central e podem ter um papel na neuropatogênese	28
---	----

CAPÍTULO I-GENDER DIFFERENCES IN THE PREVALENCE OF CONGENITAL HEART DISEASE IN DOWN'S SYNDROME: A BRIEF META-ANALYSIS.

SUPPLEMENTARY FILE 2: RAW	85
---------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	Atresia Pulmonar
ASD	Atrial septal defect.
AVSD	Atrioventricular septal defect
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
CC	Cardiopatia Congênita
CHD	Congenital Heart Disease
CIA	Comunicação Interatrial
CIV	Comunicação Interventricular
CNV	Variação do Número de Cópias
CoAo	Coartação da aorta
DS	Down Syndrome
DSAVT	Defeito do septo atrioventricular total
DSCR	Down syndrome chromosomal region
DSCAM	Down syndrome cell adhesion molecule
DVSVD	Dupla via de saída do ventrículo direito
Est Sub Ao	Estenose subvalvar aórtica
Est Supra valvar pulmonar	Estenosesupravalvar pulmonar
EPV	Estenose valvar pulmonar
Hcy	Homocisteína
HOS	Síndrome de Holt – Oram
Hsa21	Cromossomo humano 21
HPP	Hipertensão pulmonar persistente
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
MiRNAS	MicroRNAs
MTHFR	Metileno tetraidrofolato redutase
MTRR	Metionina sintase redutase
Obstr Ao	Obstrução aórtica
PCA	Canal arterial pérvio
Posop	Pós-operatório
PFKL	Phosphofrutose-kinase liver
RFC1	Transportadora folato reduzido 1
RON	Região organizadora do nucléolo

SAM	Adenosilmetionina
SAH	Adenosil-homocisteína
SD	Síndrome de Down
SHCE	Síndrome do coração esquerdo hipoplásico
SHF	Segundo campo do coração
SH3BGR-SH3	<i>Domain binding glutamic acid rich protein</i>
SNPS	Polimorfismo de nucleotídeo único
TGA	Transposição dos vasos da base
T4F	Tetralogia de Fallot
TOF	Tetralogy of Fallot
VSD	Ventricular septal defect

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	SÍNDROME DE DOWN.....	16
2.1.1	Histórico	16
2.1.2	Origens da SD	17
2.1.3	Incidência da Síndrome de Down	20
2.1.3.1	Características clínicas	21
2.1.3.2	Anomalias associadas com SD.....	22
2.1.4	Síndrome de Down e padrões de metilação	22
2.1.5	Cromossomo 21	26
2.2	CARDIOPATIA CONGÊNITA.....	30
2.2.1	Definição	30
2.2.2	Incidência	30
2.2.3	Classificação das CC	32
2.2.4	Etiologia	34
2.2.5	Associação de CC com anomalias cromossômicas	34
2.2.6	Região crítica do cromossomo 21	46
2.3	CARDIOPATIA CONGÊNITA E SÍNDROME DE DOWN.....	51
2.3.1	Prevalência de CC na SD	51
2.3.2	Prevalência do gênero na SD	52
2.3.3	Complicações clínicas e tratamento cirúrgico da cc na SD	53
2.3.4	Etiologia da CC na SD	54
3	OBJETIVOS	58
3.1	GERAL	58
3.2	ESPECÍFICOS	58
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
	REFERÊNCIAS	60
	APÊNDICE - PUBLICAÇÕES	70
	<i>PUBLICAÇÃO I – GENDER DIFFERENCES IN THE PREVALENCE OF CONGENITAL HEART DISEASE IN DOWN'S SYNDROME: A BRIEF META-ANALYSIS.</i>	70

PUBLICAÇÃO 2 – *DYRK1A AND PIGP ARE MORE EXPRESSED IN DOWN SYNDROME WITH CHD AND AVSD* 85

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down (SD) é uma das síndromes genéticas mais comuns. Na maioria dos casos, é causada pela trissomia completa do cromossomo 21; no restante das situações, por translocação ou mosaicismo desse mesmo cromossomo. Atinge cerca de 1 a cada 700 nascidos vivos. Essa prevalência pode variar de acordo com a idade materna durante a gestação, podendo atingir 1 a cada 30 nascidos vivos em mães com mais de 45 anos de idade. Em 95% dos casos, ocorre por trissomia completa do cromossomo 21, conforme afirmado anteriormente. Cerca de 3,5% dos casos de SD ocorrem por translocação, ou seja, o cromossomo 21, ou parte dele, se encontra colado em outro, geralmente o cromossomo 14. Geralmente, as consequências orgânicas da translocação costumam ser similares às das trissomia simples, e a SD aparece com todas as suas manifestações — a menos que o pedaço translocado seja muito pequeno e de uma região do cromossomo pouco rica em genes (DEVLIN, 2004).

A característica mais importante da trissomia por translocação é que o pai ou a mãe se comportam como portadores, ou seja, eles não apresentam a trissomia porque têm somente duas unidades 21. Todavia, como uma se encontra colada a outro cromossomo, é possível que os fenômenos possam se repetir em mais óvulos ou espermatozoides, transmitindo essa diferença a outros filhos que também sejam portadores. Conseqüentemente, nesse caso, é possível que sejam gerados mais filhos com SD. Por isso é importante que — se o cariótipo do bebê com SD demonstra haver uma translocação — os pais e os irmãos façam também os seus cariótipos para avaliar se são portadores. Por último, cerca de 1,5% dos casos de SD ocorre por mosaicismo, isto é, o óvulo e o espermatozoide possuem os 23 cromossomos comuns, e, portanto, a primeira célula que se forma da fusão de ambos é normal e possui 46 cromossomos (OLIVEIRA, 2006).

No entanto, no curso das primeiras divisões dessa célula surge o mesmo fenômeno de não-disjunção ou não-separação do par de cromossomos 21, de modo que uma célula terá 47 cromossomos, três dos quais serão do par 21. A partir daí, todos os milhões de células que derivam dessa célula diferente terão 47 cromossomos (serão trissômicas), enquanto os outros milhões de células que derivem das células normais terão 46, portanto serão também normais. Dependendo de quando apareça a não-disjunção no curso das sucessivas divisões, a

porcentagem final das células trissômicas e normais naquele indivíduo será diferente. Quanto mais no início apareça a anomalia, maior será a porcentagem de trissômicas e vice-versa (OLIVEIRA, 2006).

O fenótipo da Síndrome de Down é bastante variado, sendo marcado pela hipotonia muscular, déficit cognitivo, fâcias característica, além das cardiopatias congênitas. As cardiopatias congênitas ocorrem em cerca de 40% a 60% dos portadores de Síndrome de Down, causando bastante impacto na morbimortalidade de tais pacientes, nos quais o mecanismo de produção das cardiopatias congênitas ainda não é plenamente compreendido. Entretanto, algumas alterações na expressão gênica do cromossomo 21 parecem ser as responsáveis por tais casos (GRANZOTTI *et al.*, 1995).

Como já foi relatado, a Síndrome de Down é um distúrbio comum, associado a vários fenótipos complexos clínicos. Embora várias hipóteses sejam propostas, não está claro se determinados loci gene no cromossomo 21 (HSA21) são suficientes para causar SD e seus recursos associados (KORBEL *et al.*, 2009).

Baseando-nos na elevada incidência de cardiopatias congênitas nos portadores de SD e tentando esclarecer algo que possa ajudar e interferir nas gerações futuras de crianças com SD, procuramos estudar níveis de expressão gênica com cardiopatias congênitas desses pacientes, especificamente.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 SÍNDROME DE DOWN

2.1.1 Histórico

O primeiro relato sobre a Síndrome de Down foi feito entre 1864 e 1866 pelo médico inglês John Langdon Haydon Down, que trabalhava em uma clínica para crianças com atraso neuropsicomotor em Surey, na Inglaterra. Ele listou com precisão as características físicas similares que observou em alguns filhos de mães acima de 35 anos de idade, descrevendo as crianças como “amáveis e amistosas”. Influenciado pela Teoria da Evolução de Charles Darwin, o médico explicou a síndrome estabelecendo uma teoria étnica, sugerindo que esta seria um “[...] estado regressivo da evolução” (OLIVEIRA, 2016).

Após a descrição de Down, os estudos atribuíram a causa da síndrome à tuberculose, à sífilis e ao hipotireoidismo, sendo os pacientes considerados como “crianças inacabadas”. Durante o período que antecedeu a identificação da alteração cromossômica, os pacientes foram rejeitados e mantidos sob regime hospitalar, em condições precárias. O fim desse primeiro período da história da Síndrome de Down foi marcado por uma intolerância de raízes religiosas e culturais, e coincidiu com o Holocausto judeu, uma das maiores e cruéis demonstrações do preconceito humano (OLIVEIRA, 2016).

Em 1959, quase um século depois da descrição do Dr. Down, os cientistas Jerome Lejune e Patricia Jacobs, trabalhando de forma independente, determinaram que a causa do até então “mongolismo” seria a trissomia do cromossomo 21. A trissomia do cromossomo 21 foi a primeira alteração cromossômica detectada na espécie humana, e nos primeiros anos da década seguinte seria rebatizada de Síndrome de Down. A descoberta da alteração cromossômica marca o segundo período da história da SD, trazendo consigo uma fase repaginada de interesse científico (VARELA, 2016).

Em 1960, Polani descreveu casos de translocação, isto é, o cromossomo 21 inteiros — ou parte dele — colado em um cromossomo qualquer. Em 1961, foi descrito o primeiro caso de mosaicismos, sendo duas linhagens celulares que possuem diferentes padrões de cromossomos — no caso da SD, uma linhagem

celular com 46 (normal) cromossomos e outra com 47 (com a trissomia 21). Nos Estados Unidos, após uma revisão de termos científicos realizada em 1970, a denominação “mongolismo” foi abolida, usando-se definitivamente o termo Síndrome de Down, em homenagem ao médico inglês que a descreveu pela primeira vez (VARELA, 2016).

O terceiro período da SD coincide com a onda de reconhecimento dos direitos da criança e do adolescente que foi tomando conta de grande parte do mundo a partir das últimas décadas do século XX, isto é, postulava-se que toda criança, independentemente de gênero, raça, cor, religião ou capacidade mental teria direito a cuidados médicos e educação. Começou, assim, a fase de interesse científico aliado ao interesse educacional. Dessa forma, a institucionalização, a marginalização e a ignorância vão cedendo lugar, paulatinamente, ao segmento interdisciplinar humanizado e especializado, assim como a programas educacionais pautados no reconhecimento de que as pessoas com SD têm inúmeras potencialidades, revelando-as quando são bem-integradas à família e à comunidade (OLIVEIRA, 2016).

2.1.2 Origens da SD

O trabalho de Hulten *et al.* de 2008 propôs que o mosaicismismo do ovário pode ser o fator causador para trissomia do 21. Ele utilizou, para chegar a tal conclusão, hibridização *in situ* fluorescente (FISH), com duas sondas específicas de cromossomo -21 para determinar o número de cópias do cromossomo 21 em células de ovário de oito fetos do sexo feminino na idade gestacional de 14 a 22 semanas. Todos os oito fetos femininos fenotipicamente normais eram mosaicos e continham células de ovário com um cromossomo extra 21.

Trissomia 21 ocorreu com a mesma frequência, aproximadamente, em células que tinham entrado em meiose, como células do estroma mesenquimalpré-meióticas e ovarianas. Os autores sugeriram, então, que a maioria dos fetos normais do sexo feminino eram mosaicos ovarianos da trissomia 21, e o efeito da idade materna é causado por seleção diferencial destas células durante o desenvolvimento fetal e pós-natal até a ovulação. A ocorrência excepcional de mosaicismismo no ovário pode explicar o motivo de algumas mulheres terem uma criança com Síndrome de

Down já em tenra idade, bem como o aumento da incidência associado a concepções subsequentes (HULTEN *et al.*, 2008).

Gardiner, em 2004, levantou a hipótese central na sua pesquisa de que a SD é o resultado de um aumento de 50% da dosagem de expressão de genes no cromossomo 21q (braço longo do cromossomo 21), e que isto altera, direta ou indiretamente, o momento, padrão ou grau de desenvolvimento, já que todos os pacientes sindrômicos têm algum nível de deficiência intelectual.

Uma das questões essenciais na pesquisa de SD é: todos os genes trissômicos são sobre-expressos em todos os tecidos e em todos os pontos? Se não, quais os genes são sobre-expressos, e quando e onde? As respostas a estas perguntas são fundamentais para determinar quais genes são relevantes para o desenvolvimento fenotípico e para a ligação de expressão de genes específicos para características fenotípicas específicas. Ademais, é preciso levar em conta a variabilidade fenotípica (GARDINER, 2004).

Embora os fatores etiológicos da SD ainda não estejam totalmente esclarecidos, a associação entre a idade materna avançada e a trissomia do 21 é o fator mais importante nas doenças cromossômicas humanas (BERTELLI *et al.*, 2005). Entre as mulheres com 25 anos de idade, aproximadamente, 2% de todas as gestações são trissômicas; naquelas com 36 anos, este valor aumenta para 10%; já na idade de 42 anos, é superior a 33% (HASSOLD; CHIU, 1985). A média da idade materna é mais elevada nos casos de trissomia simples do que naqueles casos de translocação (MOKHTAR *et al.*, 2003). Nestes últimos, o cromossomo 21 extra decorre, geralmente, da translocação envolvendo os cromossomos 14 e 21, que ocorre antes do *crossing-over* (processo onde acontece a troca de material genético entre cromossomos homólogos) na meiose I (SHAFFER *et al.*, 1992). Nos casos de translocação entre os cromossomos 21, o cromossomo anormal é, na maioria das vezes, resultante da duplicação do braço longo do cromossomo 21 (isocromossomo 21q), e resulta de uma falha de separação das cromátides na meiose II ou das cromátides irmãs no início da mitose — que é o processo de reprodução que ocorre em grande parte das células durante o processo do ciclo celular (SHAFFER *et al.*, 1991).

A grande maioria dos casos com trissomia simples do cromossomo 21 é decorrente de não disjunção cromossômica na meiose materna. Aproximadamente, 90% dos casos envolvem um cromossomo adicional materno e cerca de 10%

resultam da não disjunção meiótica paterna. Além disso, uma pequena proporção (1,8%) é atribuída a não disjunção mitótica pós-zigótica (SHERMAN *et al.*, 1991).

As trissomias cromossômicas têm sido associadas a alterações no processo de recombinação genética (troca de genes entre duas moléculas de ácido nucleico para formar novas combinações de genes em um cromossomo) que ocorre durante as divisões celulares (HASSOLD; SHERMAN, 2000). Warren *et al.*, em 1994, forneceram evidência dessa associação quando relataram níveis reduzidos de recombinação genética na região cromossômica proximal ao cromossomo 21 durante a meiose I (ou seja, a meiose 1 é reducional, pois reduz à metade o número de cromossomos), como na trissomia desse cromossomo. É possível que a ausência de recombinação nessa região estabeleça configurações “vulneráveis” que podem interferir na segregação tanto na meiose I como na meiose II (na meiose 2 existe uma divisão equacional e é semelhante à mitose) ou, possivelmente, nas duas divisões.

Assim, um modelo de dois eventos para a não disjunção cromossômica foi proposto. Nele, o primeiro passo envolve a redução da recombinação genética durante a meiose I e estabeleceria configurações cromossômicas suscetíveis a não disjunção. Nas mulheres, a meiose I e, conseqüentemente, este evento ocorre na fase fetal. O segundo, dependendo da idade, compreenderia o processamento anormal dessas configurações, levando a não disjunção cromossômica em decorrência da degradação do processo meiótico associado à idade materna elevada (HASSOLD; CHIU, 1985).

Stein *et al.*, em 1986, também já propuseram a existência de um mecanismo materno intrínseco de triagem de gestações com aneuploidias (célula aneuplóide é a célula que tem o seu material genético alterado, tendo portanto o número de cromossomos diferente do normal da espécie), ou seja, o mecanismo mais comum da aneuploidia é a não disjunção meiótica, na qual existe uma falha da separação de um par de cromossomos durante uma das duas divisões meióticas, e esta pode ocorrer tanto na meiose I quanto na meiose II, que escapam da detecção no estágio pré-zigótico. Esse processo ocorreria durante a primeira divisão mitótica do zigoto e se torna menos eficiente com a idade materna avançada.

Outras hipóteses relacionadas à etiologia da SD já foram levantadas. Zheng e Byers (1992) propuseram a existência de um mecanismo que favorece a maturação e a utilização de ovócitos normais no início da vida reprodutiva,

preferencialmente aos ovócitos aneuploides resultantes da não disjunção não mitótica. Assim, a frequência elevada da SD na idade materna avançada resultaria da utilização de uma pequena fração de ovócitos aneuploides nos estágios avançados da vida reprodutiva, remanescentes da seleção contra a maturação após muitos ciclos.

Em 1992, Gaudenet *al.* lançaram a hipótese da microcirculação comprometida para explicar a ocorrência de aneuploidias em ovócitos primários e secundários. Segundo esses autores, com um desequilíbrio hormonal haveria uma microvascularização deficiente ao redor dos folículos maduros e em processo de maturação. A resultante diminuição no tamanho dos capilares perifoliculares reduz o volume de sangue que circula na área, levando a uma oxigenação deficiente e a um aumento concomitante de dióxido de carbono e produtos anaeróbicos, como ácido láctico dentro do folículo. Isso provocaria uma diminuição do pH do ovócito, que diminui o tamanho do fuso, como o deslocamento e a não disjunção cromossômica. Isso poderia explicar a ocorrência de filhos com SD em mulheres de qualquer idade.

Um modelo proposto por Avramopoulou *et al.*, em 1996, examinou um possível papel dos alelos (alelos são segmentos homólogos de DNA, formas alternativas de um mesmo gene e afetam a mesma característica de modo diferente) da apolipoproteína (proteína existente no sangue que se liga a lipídeos) e no desenvolvimento dos ovócitos, complementando a hipótese de Gauden. Uma alta frequência de alelos e4 foi identificada em mães jovens com erros na meiose II. As portadoras desse alelo têm uma taxa de colesterol aumentada no plasma, que é fortemente associado à aterosclerose. Eles sugerem que nessas mães a aterosclerose se desenvolve na microvascularização em torno dos folículos em amadurecimento, levando a uma deficiência de oxigênio no interior do folículo.

2.1.3 Incidência da Síndrome de Down

A SD atinge 1:700 nascidos vivos, e essa incidência cresce com o aumento da idade materna durante a gestação. Como relatamos, a grande maioria dos casos (95%) ocorre por trissomia completa do cromossomo 21. Cerca de 3,5% dos casos de SD ocorre por translocação, ou seja, partes, ou todo o cromossomo 21, encontram-se coladas em outro cromossomo, geralmente o cromossomo 14. Geralmente, as consequências orgânicas da translocação costumam ser similares

às das trissomia simples, e a SD aparece com todas as suas manifestações (a menos que o pedaço translocado seja muito pequeno e de uma região do cromossomo pouco rica em genes) (DEVLIN *et al.*, 2004).

No entanto, o mais importante da trissomia por translocação é que o pai ou a mãe se comportam como portadores, isto é, não apresentam a trissomia porque têm somente duas unidades 21. Mas como uma se encontra colada a outro cromossomo, é possível que os fenômenos possam se repetir em mais óvulos ou espermatozoides, transmitindo essa diferença a outros filhos que também sejam portadores. Podem, ademais, ter mais filhos com SD. Por isso é importante que, se o cariótipo do bebê com SD demonstra haver uma translocação, os pais e os irmãos façam também os seus cariótipos para avaliarem se são portadores. Por último, cerca de 1,5% dos casos de SD ocorre por mosaïcismo, ou seja, o óvulo e o espermatozoide possuem os 23 cromossomos comuns e, portanto, a primeira célula que se forma da fusão de ambos é normal e possui 46 cromossomos (ALMEIDA, 2012).

Contudo, no curso das primeiras divisões dessa célula, e assim por diante, surge o mesmo fenômeno de não disjunção — ou não separação — do par de cromossomos 21, de modo que uma célula terá 47 cromossomos, três dos quais serão do par 21. A partir daí todos os milhões de células que derivam dessa célula diferente terão 47 cromossomos (serão trissômicos), enquanto os demais milhões de células que derivem das células normais terão 46, e serão também normais. Dependendo de quando apareça a não disjunção no curso das sucessivas divisões, a porcentagem final das células trissômicas e normais naquele indivíduo será diferente. Quanto mais no início apareça a anomalia, maior será a porcentagem de trissômicas e vice-versa (ALMEIDA, 2012).

2.1.3.1 Características clínicas

O fenótipo de pessoas com SD é bastante variado. Porém, de forma geral, é constituído basicamente por uma face com olhos oblíquos — semelhantes aos dos orientais —, rosto arredondado, mãos menores e com dedos mais curtos, prega palmar única e orelhas pequenas, hipotonia, ou seja, diminuição do tônus muscular — responsável pela língua protusa—, dificuldades motoras, atraso na articulação da fala, comprometimento intelectual e, conseqüentemente,

aprendizagem mais lenta. Além disso, cerca de 40% a 60% dos pacientes com SD têm cardiopatias congênitas. Essas características podem variar bastante de um indivíduo para outro, e os portadores de SD possuem maior propensão para o desenvolvimento de outras patologias, como a leucemia megarioblástica (VARELA, 2016).

2.1.3.2 Anomalias associadas com SD

A síndrome de Down (SD) é a anomalia congênita mais comumente estudada por pelo menos 150 anos. No entanto, o tipo e a frequência de anomalias congênitas associadas à SD ainda são controversos. Apesar do diagnóstico pré-natal e da interrupção eletiva da gravidez por anomalias fetais, na Europa, de 2008 a 2012, a prevalência de nascidos vivos de SD foi 10/10.000 (STOLL *et al.*, 2015).

Quatrocentos e sessenta e sete (64%) dos 728 casos com SD registrados tiveram pelo menos uma grande anomalia congênita associada. Os defeitos associados mais comuns foram anomalias cardíacas — 323 casos (44%) —, seguidos por anomalias do sistema digestivo — 42 casos (6%) —, anomalias do sistema musculoesquelético — 35 casos (5%) —, anomalias do sistema urinário — 28 casos (4%) —, anomalias do sistema respiratório — 13 casos (2%) — e anomalias de outros sistemas — 26 casos (3,6%) (STOLL *et al.*, 2015).

Entre os casos com SD com defeitos cardíacos congênitos, a anomalia cardíaca mais comum foi o defeito do septo atrioventricular (30%), seguido de comunicação interatrial (25%), defeito do septo ventricular (22%), persistência do canal arterial (5%), coarctação da aorta (5%) e tetralogia de Fallot (3%). Os autores observaram uma alta prevalência de anomalias congênitas e padrões específicos de malformações associadas com síndrome de Down, o que enfatiza a necessidade de avaliar cuidadosamente todos os casos com síndrome de Down para possíveis anomalias congênitas associadas (STOLL *et al.*, 2015).

2.1.4 Síndrome de Down e padrões de metilação

Alguns estudos sugerem que fatores envolvendo genótipos e nutrição podem ser a base da suscetibilidade a não disjunção e, portanto, da trissomia do 21.

Há evidências de que a hipometilação do DNA está associada à instabilidade cromossômica e à segregação anormal, e estudos *in vivo* têm relacionado a hipometilação à deficiência da ingestão de folato e metil (CHRISTMAN *et al.*, 1993; SHETH *et al.*, 2003; COPPEDE *et al.*, 2010).

O risco materno para a SD tem sido relacionado ao metabolismo anormal do folato, o que pode ser explicado, em parte, pela alteração no gene metilenotetraidrofolato-redutase (MTHFR) (SHETH *et al.*, 2003). A enzima MTHFR atua na regulação das reações de metilação celulares, catalisando a conversão do 5,10 metílenotetraidrofolato para 5-metiltetraidrofolato, a principal forma circulante do folato, exigida para a remetilação da homocisteína (Hcy) para metionina. Esta reação é importante para a síntese de S-adenosilmetionina (SAM), o maior doador de metil intracelular para reações de metilação do DNA, proteínas e lipídios. O aumento na Hcy e a diminuição da proporção de SAM para S-adenosil-homocisteína (SAH) — decorrente de alterações no gene MTHFR — têm sido associados à hipometilação do DNA. Assim, a hipometilação do DNA como resultado do metabolismo anormal do folato poderá aumentar a probabilidade de não disjunção cromossômica (JAMES *et al.*, 1999).

Um polimorfismo no gene MTHFR, a substituição de citosina para timina no nucleotídeo 677 (C677T), que resulta na alteração da alanina por valina, e está associado ao aumento da termolabilidade da enzima, o que leva a uma redução de 50% de sua atividade normal (SUNDER-PLASMANN *et al.*, 2000).

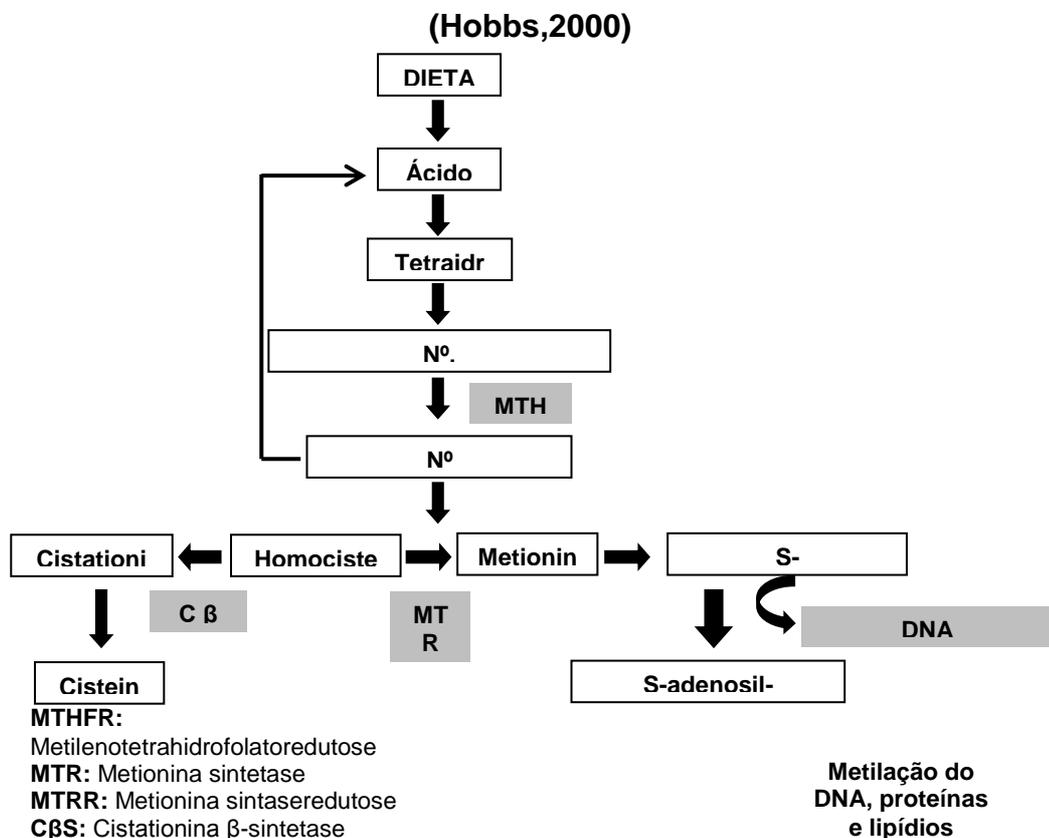
Alguns estudos têm mostrado frequência significativamente maior do alelo 677T em mães de crianças com SD se comparadas às mães-controle (JAMES *et al.*, 1999; HOBBS *et al.*, 2000; GRILLO *et al.*, 2002). Além disso, um aumento significativo na concentração de Hcy plasmática e citotoxicidade dos linfócitos aumentada ao metotrexato— indicadores do estado funcional do folato— sugerem que o metabolismo do folato é anormal nas mães de crianças com SD (JAMES *et al.*, 1999).

Importa ressaltar que a elevada prevalência do polimorfismo MTHFR na população e o baixo risco de ocorrência da SD sugerem que somente a alteração no gene MTHFR não é suficiente para causar a síndrome, isto é, alterações multifatoriais gene-ambiente podem estar envolvidas nesse processo. Desse modo, interações entre dieta e genótipo ou entre genótipos podem afetar negativamente o metabolismo do folato e a remetilação da homocisteína para metionina (JAMES *et*

al.,1999). Esta observação poderia explicar a ausência de associação entre o polimorfismo C677T e a SD em outros estudos realizados em diferentes populações (incluindo a francesa e a italiana), os quais afirmam que a alta ingestão de folato pode neutralizar o impacto metabólico do polimorfismo (SHETH *et al.*, 2003; CHADEFaux-VEKEMANS *et al.*, 2002; O' LEARY *et al.*, 2002; STUPPIA *et al.*, 2002).

Atuando também no metabolismo da Hcy, a enzima metionina sintaseredutase (MTRR), produzida pelo gene MTRR, catalisa a remetilação da Hcy para metionina. Este gene se apresenta polimórfico no nucleotídeo 66 do DNAC, uma substituição de adenina por guanina (A66G), causando a substituição de uma isoleucina para metionina na proteína (SHETH *et al.*, 2003 e O'LEARY *et al.*,2002). Este polimorfismo também tem sido associado ao risco aumentado para a SD, uma vez que a enzima MTRR fornece grupos metil para a metilação do DNA e, segundo Hobbset *al.*, a presença combinada de MTHFR mutante e mutação homozigota em MTRR aumentam tal risco (SHETH *et al.*, 2003; HOBBS *et al.*, 2000).

Figura1 - Atuação das enzimas MTHFR e MTRR no metabolismo do folato



Fonte: Editora Moreira Jr. Recentes avanços moleculares e aspectos genético-clínicos em síndrome de Down, p.405.

Uma vez que as enzimas MTHFR e MTRR requerem folato e vitamina B12, respectivamente, para manter a reação da metionina sintase, o impacto metabólico de ambos os polimorfismos é aumentado por baixos níveis de folato ou vitamina B12. A associação entre os polimorfismos nesses genes e SD sugere que estratégias preventivas relativamente simples, como suplementação com ácido fólico e vitamina B12, poderiam superar o risco de não disjunção associado a genótipos suscetíveis (HASSOLD *et al.*, 2000).

No entanto, em caso de erros na meiose I, os resultados da suplementação seriam visíveis somente na segunda geração, uma vez que estes erros ocorrem no ovário fetal. Diferentemente da meiose I, os possíveis benefícios trazidos pela suplementação em caso de erros na meiose II seriam perceptíveis já na primeira geração, uma vez que estes ocorrem entre o término da meiose I e o final da fertilização (HASSOLD *et al.*, 2000; RAY *et al.*, 2003).

Desde 1992, a suplementação de 0,4 mg de ácido fólico diários é recomendada para mulheres no período periconcepcional, a fim de reduzir o risco de defeitos do tubo neural na prole (CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 1992). Estudo realizado por WALD *et al.* em 2001 demonstrou que dosagens maiores poderiam conferir um benefício mais amplo na redução deste risco, atingindo 85% quando utilizados 5 mg diários, comparado a uma redução de 36% com a suplementação de 0,4 mg/dia.

Em famílias com risco para esta malformação, foi evidenciada frequência elevada de casos com SD e vice-versa (BARKAI *et al.*, 2003). De acordo com estes autores, é provável que 5 mg de ácido fólico diários sejam, então, necessários para a redução do risco da ocorrência da SD. Além disso, foi demonstrado que a instabilidade genômica é minimizada quando valores de folato plasmático estão acima de 34 nmol/L e de Hcy menores que 7,5 mmol/L, concentrações atingidas somente com ingestão de doses superiores a 0,4 mg de ácido fólico diários (FENECH, 2001).

Uma diminuição dos níveis de Hcy plasmático total também foi observada por Liu *et al.* (2004) em pacientes com doença cardiovascular sob suplementação diária de 5 mg de ácido fólico, com duração de oito semanas. No grupo de pacientes que apresentavam o genótipo CT e naqueles portadores do alelo T (grupo combinado de pacientes que apresentavam os genótipos TT e CT) para o polimorfismo C677T no gene MTHFR, a redução dos níveis de Hcy foi significativa, o

que indica que este polimorfismo pode estar envolvido na diminuição dos níveis de Hcyplasrnática, como efeito da suplementação com altas doses de ácido fólico.

Em 2008, Biselliet *al.* investigaram o efeito dos polimorfismos C677T e A1298C no gene metilenotetrahidrofolatoredutase (MTHFR); A2756G no gene metionina sintaseredutase (MTR); A80G no gene transportador folato reduzido 1 (RFC1); e homocisteína plasmática (Hcy). Tais efeitos poderiam trazer risco materno para a SD. Foram analisadas 72 mães com crianças com SD e 194 mães com crianças sem SD. Os autores verificaram que o número médio de alelos polimórficos para os quatro loci testados foram maiores nas mães com crianças com SD, em comparação com o grupo controle. Observou-se, ainda, a presença de três ou mais alelos polimórficos para MTHFR C677T, MTHFR A1298C, MTR A2756G e RFC1 A80G. Além disso, concentrações plasmáticas de homocisteína superiores a 4,99 mmol/l aumentaram o risco em 1,74 vezes de ser gerada uma criança com SD.

Jones *et al.*, em 2013, estudaram o padrão de metilação em células epiteliais bucais de 10 adultos com SD e 10 controles, com o objetivo de determinar se os padrões de metilação do DNA estavam correlacionados com SD e/ou comprometimento cognitivo. Além disso, nesse estudo foi analisada a metilação do DNA no gene APP (o gene APP fornece instruções para elaborar uma proteína chamada proteína precursora amiloide, encontrada em muitos tecidos e órgãos, incluindo o cérebro, e na medula espinhal do sistema nervoso central), a fim de verificar se havia mudanças na metilaçãoocentral do DNA dessa população.

Sabe-se que presença de um ou parte de um cromossomo 21 extra em pacientes com SD é associada a várias alterações neurológicas, incluindo envelhecimento patológico. Estas alterações que muitas vezes preenchem os critérios para a doença de Alzheimer. Os autores concluíram que tanto a trissomiado 21 como o déficit cognitivo foram associados a padrões distintos de metilação do DNA (JONES *et al.*, 2013).

2.1.5 Cromossomo 21

O cromossomo 21 representa cerca de 1% a 1,5% do genoma humano (HATTORI *et al.*, 2000). Desde a descoberta, na década de 1950, de que a SD ocorre devido a três cópias do cromossomo 21 (LEJUNE *et al.*, 1959), cerca de 20 loci foram mapeados no braço longo deste cromossomo, e a estrutura do

cromossomo e o conteúdo dos genes têm sido intensamente investigados. No ano de 2000, Hattori *et al.* descreveram a sequência deste cromossomo, identificando 225 genes (127 conhecidos e 98 preditos) e 59 pseudogenes. O conteúdo de genes do cromossomo 21 está agora estimado em 329, incluindo 165 genes confirmados experimentalmente, 150 modelos de genes baseados em bancos de dados de sequências-alvo expressas (ESTs) e 14 predições computacionais (ROIZEN *et al.*, 2003).

Considerando que a translocação cromossômica responsável pela SD envolve o braço longo do 21 (21q), é provável que este braço em excesso caracterize a SD, não havendo, portanto, a necessidade de uma trissomia completa do cromossomo 21 para o desenvolvimento do fenótipo Down (VIGO, 1997). O segmento 21q22.2 é referido como região crítica para a SD (DSCR - *Down syndrome chromosomal region*), e contém genes relacionados ao fenótipo da síndrome (KORENBERG *et al.*, 1990). O braço curto deste cromossomo acrocêntrico (21p) consiste, basicamente, de uma região organizadora de nucléolo (RON), a qual contém várias cópias de genes que codificam RNA ribossômico e uma região mais proximal contendo sequências altamente repetitivas. Os poucos genes localizados no 21p não parecem ser essenciais para o desenvolvimento normal do indivíduo (CAPONE, 2001).

A síntese excessiva de múltiplos produtos derivados da expressão elevada de genes presentes no cromossomo 21 é considerada responsável pelas características dismórficas e pela patogênese de anormalidades neurológicas, imunológicas, endócrinas e bioquímicas, características da SD (POGRIBNA *et al.*, 2001).

Dados sobre camundongos transgênicos indicam que somente um grupo de genes pode estar envolvido no fenótipo da síndrome (KOLA *et al.*, 1997). Embora seja difícil selecionar genes candidatos para esses fenótipos, alguns produtos de genes podem ser mais sensíveis ao desequilíbrio na dosagem gênica do que outros (HATTORI *et al.*, 2000). O controle bem-sucedido de problemas clínicos e farmacológicos de pacientes com SD é o maior desafio médico e depende do entendimento do metabolismo desbalanceado, induzido pela expressão elevada desses genes que constituem o cromossomo 21 (POGRIBNA *et al.*, 2001).

Dentre os genes presentes no 21q, podem ser destacados alguns descritos na literatura e relacionados a vários fenótipos da síndrome, a maioria deles

exercendo influência na estrutura ou função do sistema nervoso central. Diversos estudos sugerem que pelo menos 15 desses genes podem ter um papel na neuropatogênese da síndrome, além de outros envolvidos nas cardiopatias, tais como o gene DSCAM (*Down syndrome cell adhesion molecule*) e o SH3BGR —SH3 domain binding glutamic acid-rich protein (SANDRI *et al.*, 2004) —, como se pode observar na quadro 1.

Quadro 1- Genes localizados no cromossomo 21 que possivelmente exercem uma influência na estrutura ou função do sistema nervoso central e podem ter um papel na neuropatogênese

Gene	Nome*	Localização	Possível efeito em SD	Referência
SIM2	<i>Single-m in ded homolog2</i>	21q22.2	Desenvolvimento do cérebro, necessário para a divisão celular sincronizada	Capone, 2001 ⁴⁴
DYRK1A	<i>Dual-specificity tyrosine- (Y)- phosphorylation regulated kinase 1A</i>	21q22.13	Deficiência de memória, atraso no desenvolvimento neural, anormalidades motoras, deficiência cognitiva	Capone, 2001 ⁴⁴ Cheonet <i>et al.</i> , 2003 ⁴⁷
GART	<i>Phosphoribosylglycine mide form yltransferase</i>	21q22.1	Expressão durante o desenvolvimento do cerebelo na fase pré-natal	Capone, 2001 ⁴⁴
PCP4	<i>Purkinjecellprotein4</i>	21q22.2	Etiologia do retardo mental e deficiência cognitiva	Capone, 2001 ⁴⁴
DSCAM	<i>Down syndrome cell adhesion molecule</i>	21q22.2	Patogênese do retardo mental	Saito <i>et al.</i> , 2000 ⁴⁸ Capone, 2001 ⁴⁴ Capone, 2001 ⁴⁴
APP	<i>Amyloid beta-peptide</i>	21q22.3	Formação de placas senis	Busciglio <i>et al.</i> , 2002 ⁴⁹ Capone, 2001 ⁴⁴
S100B	<i>S100 Calcium Binding Protein Beta</i>	21q22.3	Envelhecimento neuropatológico e degeneração	Shapiro, 2001 ⁵⁰
SOD1	<i>Superoxide Dismutase</i>	21q22.1	Aceleração do envelhecimento pela produção de peróxido de hidrogênio e oxigênio	Capone, 2001 ⁴⁴
CSTB	<i>Cystatin B</i>	21q22.3	Formação de placas senis	Cheonet <i>et al.</i> , 2003 ⁵¹
MxA	<i>Myxovirus (influenza vírus) resistance 1</i>	21q22.2	Patologia de Alzheimer	Cheonet <i>et al.</i> , 2003 ⁵²
ADAR2	<i>Adenosine deaminase</i>	21q22.3	Desordens neurológicas, como epilepsia	Higuchi <i>et al.</i> , 2000 ⁵³
TFF1	<i>Trefoil factor 1</i>	21q22.3	Deficiência de migração neuronal e crescimento dendrítico	Gulesserian <i>et al.</i> , 2002 ⁵⁴
C21orf2	<i>Chromosome 21 open Reading frame</i>	21q22.3	Deficiência mitocondrial no cérebro	Cheonet <i>et al.</i> , 2003 ⁵¹
OLIG2	<i>Oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>	21q22.2	Deficiência de aprendizagem	Hirayana <i>et al.</i> , 2003 ⁵⁶

Fonte: Recentes avanços moleculares e aspectos genético-clínicos em Síndrome de Down (Moreira Jr, 2005)).

Korbelet *et al.* (2009) apresentaram um mapa genético de alta resolução de fenótipos de SD baseado em uma análise de 30 indivíduos portadores trissomias segmentares raras de várias regiões do HSA21.

Os autores usaram tecnologias da genômica e mapearam trissomias segmentares susceptíveis de estar envolvidas no desenvolvimento de 8 fenótipos de SD, 4 dos quais são más-formações congênitas, incluindo leucemia megacariocítica aguda, doença mieloproliferativa transitória, doença de Hirschsprung, estenose duodenal, ânus imperfurado, retardo mental grave, doença SD-Alzheimer, SD e doença cardíaca congênita (DSCHD) (KORBEL *et al.*, 2009).

Nesse estudo, o mapa fenotípico da SD foi localizado DSCHD a um intervalo de <2 Mb. Além disso, o mapa permitiu aos autores apresentarem provas contra o necessário envolvimento de outros locais, bem como hipóteses específicas que foram apresentadas em relação à etiologia da SD, ou seja, o consenso da presença de uma única região de SD e a suficiência de *DSCR1* e *DYRK1A* podem causar vários fenótipos graves de SD (KORBEL *et al.*, 2009).

No ano de 2000, o grupo Shibuya *et al.*, no Japão, isolaram dois novos genes, designados *DSCR5* e *DSCR6*, região crítica (ICSD) da SD no cromossomo 21q22.2, região essa que tem sido definida como região mínima de sobreposição das parciais trissomia 21 pacientes e localizada entre t (4; 21) ponto de ruptura e ERG (aproximadamente 1,6 Mb). Os genes *DSCR5* e *DSCR6* consistem de 6 e 5 exons (partes do DNA que são convertidas em RNA mensageiro), respectivamente. O uso alternativo da transcrição dos sítios de início e de eventos de *splicing* alternativo pode produzir diferentes espécies de RNA e proteínas a partir de ambos os genes.

O gene *DSCR5* é expresso em vários tecidos humanos examinados, enquanto o gene *DSCR6* é expresso apenas nos tecidos limitados a baixo nível. Assim, *DSCR5* e *DSCR6* foram descritos como candidatos à patogênese de Síndrome de Down, embora a função destes genes continue sendo investigada (SHIBUYA *et al.*, 2000).

Tentando desvendar o retardamento mental da SD, Fernando-Miguel *et al.*, em 2004, decidiram avaliar o nível de expressão gênica avaliada de sete proteínas cujos genes são codificados no cromossomo 21: *DSCR4*, *DSCR5*, *DSCR6*, *KIR4.2*, *GIRK2*, *KCNE1* e *KCNE2* no córtex cerebral fetal de SD e controles no segundo trimestre de gravidez.

A quantificação destas proteínas codificadas no cromossomo 21 revelou que nem todos os produtos de gene de região crítica da DS são sobre-expressos no início da vida do indivíduo portador de SD, indicando que o fenótipo SD não pode ser simplesmente explicado pela hipótese de efeito de dosagem de gene. A sobre-expressão de Pig P (DSCR5) pode conduzir ou representar deficiência da glycosylphosphatidylinositol –N- acetilglucosaminiltransferase, mediadas por modificações e subsequente fixação de proteínas para a membrana plasmática (FERNANDO-MIGUEL *et al.*, 2004).

2.2 CARDIOPATIA CONGÊNITA

2.2.1 Definição

Anomalias congênitas (defeitos de nascimento ou malformações congênitas) estão presentes no momento do nascimento, e podem não ser diagnosticadas até meses ou anos mais tarde. Elas podem estar presentes desde a sua concepção, como é o caso de um defeito do cromossomo (por exemplo, Síndrome de Down) ou mutação do gene (como a acondroplasia), e também incluem os defeitos estruturais que ocorrem no período embrionário até o fim da sétima semana de gestação (por exemplo, espinha bífida) ou no início do período fetal, entre 8 e 16 semanas de gestação (por exemplo, fissuras orofaciais). Ou seja, a cardiopatia congênita geralmente se refere a anormalidades na estrutura ou função do coração que surgem antes do nascimento (BRUNEAU,2008).

2.2.2 Incidência

Cardiopatias congênitas ocorrem frequentemente e se manifestam de muitas formas. Como já foi dito por Hoffmann e outros autores, elas são encontradas em 19-75 a cada 1.000 nascidos vivos (HOFFMAN *et al.*, 2002), dependendo de quais tipos de defeito estão incluídas, e a incidência é maior se os fetos que não sobrevivem a termo estão incluídos (HOFFMAN *et al.*, 1995). Esse número exclui cardiomiopatia, doença do sistema de condução e defeitos de lateralidade que, embora herdada e presente no nascimento, é considerada separadamente, por sua apresentação clínica distinta.

Anomalias congênitas são um importante problema de saúde, devido ao seu impacto sobre a saúde e o bem-estar dos lactentes e crianças. No Canadá, Irvine *et al.* fizeram um estudo com famílias e constataram que cerca de 1 a cada 25 bebês canadenses é diagnosticado com 1 ou mais anomalias congênitas a cada ano. Entre 1998 e 2009, a taxa nacional de prevalência de anomalias congênitas diminuiu de 451 para 385 por 10.000 nascimentos totais, provavelmente devido a 3 fatores: (1) aumento do diagnóstico pré-natal e posterior interrupção da gravidez; (2) fortificação obrigatória de alimentos; e (3) mudanças nos comportamentos e práticas de saúde, tais como a redução do uso de tabaco durante a gravidez. Apesar da redução na taxa global de prevalência, anomalias congênitas estão perdendo apenas para a imaturidade como a principal causa de morte infantil (IRVINE *et al.*, 2015).

O estudo de Irvine fornece dados abrangentes sobre anomalias congênitas no Canadá e está centrado em 6 categorias de anomalias congênitas: Síndrome de Down, defeitos do tubo neural, defeitos cardíacos congênitos, fissuras orofaciais, defeitos de deficiência de membros e gastrosquise. O relatório apresenta, em âmbito nacional, dados de prevalência de nascimento. Fatores de risco conhecidos, os impactos relacionados com a prevalência do diagnóstico pré-natal e medidas preventivas também são discutidos (IRVINE *et al.*, 2015).

Esse relatório aponta a obesidade materna como um importante fator de risco emergente para algumas anomalias congênitas. Ele também observa que o uso de álcool e o tabagismo durante a gravidez permanecem sendo os principais fatores de riscos, e exigem medidas de saúde pública para a prevenção e redução da prevalência (IRVINE *et al.*, 2015).

O relatório também destaca a diferença entre a prevenção primária e secundária de anomalias congênitas. A prevenção primária envolve evitar a doença através de estratégias deliberadas que diminuem os riscos associados ao baixo *status* socioeconômico, obesidade e má-nutrição, contaminantes ambientais, doenças crônicas — como hipertensão e diabetes — e a influência da idade materna. A prevenção secundária envolve a identificação precoce de anomalias congênitas através de testes de pré-natal e posterior tratamento ou interrupção da gravidez com a finalidade de reduzir ou prevenir a morbidade (IRVINE *et al.*, 2015).

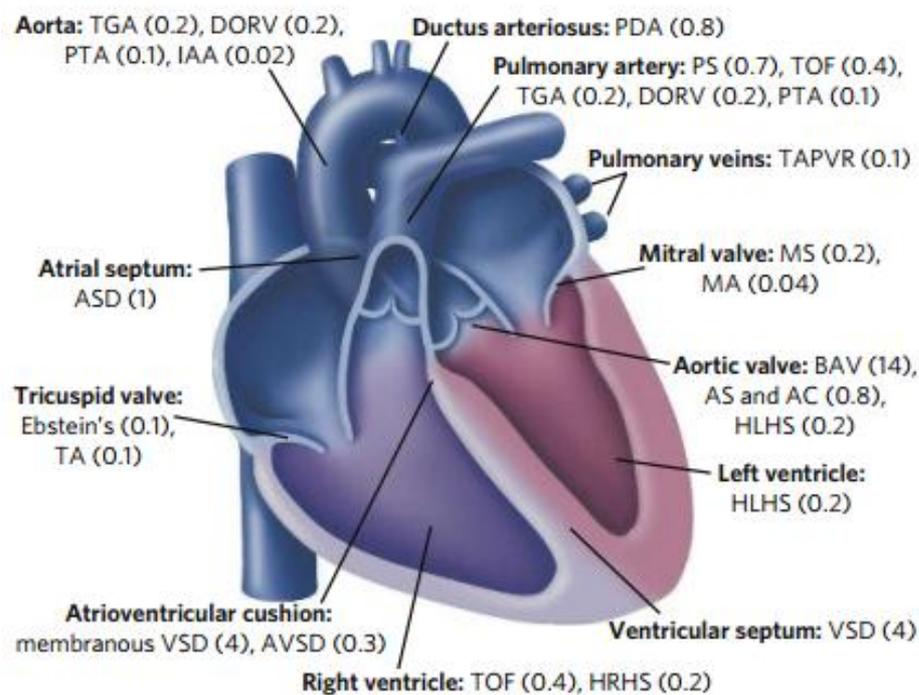
Também em 1997, foi visto por Hassan *et al.* que a doença cardíaca congênita é uma causa importante da mortalidade e incapacidade infantil. Os fatores

de frequência, espectro e risco que contribuem para más-formações cardiovasculares significativas entre os nascidos vivos foram retrospectivamente avaliados no Hospital Universitário Aga Khan. Esse grupo reviu um total de 8.331 nascidos vivos entre julho de 1987 e dezembro de 1992. 34 bebês foram diagnosticados com uma doença cardíaca congênita no período neonatal, revelando uma prevalência de 4 para cada 1000 nascidos vivos, sendo que o defeito do septo ventricular foi a alteração mais comum (n = 10, 29%). Oito casos apresentaram anomalia cromossômica associada, sendo a mais comum a trissomia do cromossomo 21. Abortos da mãe, consanguinidade ao nascimento e diabetes mellitus não foram encontrados para ser fatores de risco para doença cardíaca congênita nesta pesquisa.

2.2.3 Classificação das CC

Cardiopatias congênitas afetam a maioria das partes do coração e podem ser classificadas em três grandes categorias: cardiopatia cianótica, defeitos de obstrução do lado esquerdo e defeitos septação. Bebês com cardiopatia cianótica aparecem em azul, resultado da mistura de sangue oxigenado e não oxigenado. Defeitos que podem contribuir para esta condição incluem transposição das grandes artérias (TGA), tetralogia de Fallot (T4F), atresia tricúspide, atresia pulmonar, anomalia de Ebstein da valva tricúspide, dupla via de saída do ventrículo direito (DVSVD), tronco arterial comum e conexão anômala total das veias pulmonares (BRUNEAU, 2008).

Figure 2- Congenital heart defects. This diagram of the adult heart illustrates the structures that are affected by congenital heart diseases, with the estimated incidence of each disease per 1,000 live births indicated in parentheses. AC, aortic coarctation; AS, aortic stenosis; ASD, atrial septal defect; AVSD, atrioventricular septal defect; BAV, bicuspid aortic valve; DORV, double outlet right ventricle; Ebstein's, Ebstein's anomaly of the tricuspid valve; HLHS, hypoplastic left heart syndrome; HRHS, hypoplastic right heart; IAA, interrupted aortic arch; MA, mitral atresia; MS, mitral stenosis; PDA, patent ductus arteriosus; PS, pulmonary artery stenosis; PTA, persistent truncus arteriosus; TA, tricuspid atresia; TAPVR, total anomalous pulmonary venous return; TGA, transposition of the great arteries; TOF, tetralogy of Fallot; VSD, ventricular septal defect



Fonte: Image courtesy of F. Yeung, University of Toronto, Canada)Nature 2008;451:22.

Lesões obstrutivas do lado esquerdo, o segundo principal tipo de cardiopatia congênita, incluem a síndrome de hipoplasia do coração esquerdo (SHCE), estenose mitral, estenose aórtica, coarctação da aorta e interrupção do arco aórtico. Defeitos septação, o terceiro principal tipo de doença cardíaca congênita, podem afetar a formação de septos dos átrios (defeitos de septação atriais, CIAs), septação dos ventrículos (defeitos do septo ventricular, CIVs) ou formação de estruturas na parte central do coração (defeitos do septo atrioventricular, DSAVs). Outros tipos de defeito congênito que não se encaixam perfeitamente nas três categorias principais são válvula aórtica bicúspide e

persistência do canal arterial. A doença cardíaca congênita mais comum é valva aórtica bicúspide e, em seguida, os defeitos do septo (BRUNEAU, 2008).

2.2.4 Etiologia

Em 2009, na província de Shandong, na China, Liu *et al.* descreveram que a causa de aproximadamente 90% dos casos de CC é multifatorial. Pouco se sabe sobre os fatores de risco ambientais modificáveis ou diferenças regionais. Os autores investigaram fatores de risco ambientais para CC na província de Shandong da China, a fim de melhorar a prevenção de CC. O estudo foi realizado com um grupo de 164 pacientes com cardiopatias congênitas e outro grupo de 328 controles, os quais foram retrospectivamente entrevistados com o objetivo de tentar identificar fatores de risco ambientais para CC, cujos níveis foram escolaridade da mãe, asfixia neonatal ou hipóxia, número de gestações anteriores, infecção do trato respiratório superior materna, infecção materna e estresse mental materna durante o início da gravidez.

Liu *et al.* concluíram que aumentar a saúde mental materna, obter aconselhamento de saúde regular e testes durante a gravidez, prevenir infecções do trato respiratório superior, limitar a medicação no início da gravidez, oferecer a promoção da saúde e educação em saúde para mulheres em idade fértil (especialmente aquelas com menos educação formal) e melhorar as técnicas e os procedimentos obstétricos podem diminuir a ocorrência de cardiopatia congênita.

Isso é crucial para compreender a gênese da doença cardíaca congênita, porque a desregulação do desenvolvimento do coração está na raiz da doença. Esta avaliação incide sobre estudos genéticos nos últimos anos (CONSTANCE *et al.*, 2007), que apontaram as causas das doenças cardíacas congênitas herdadas. Juntamente com a recente visão sobre como o coração se desenvolve normalmente, esses estudos têm melhorado consideravelmente a compreensão de tais doenças.

2.2.5 Associação de CC com anomalias cromossômicas

Cardiopatias congênitas são frequentemente associadas a malformações não cardíacas e anomalias cromossômicas (FERENCZ *et al.*, 1989). Grechet

al.(1999) estudaram a associação de cardiopatias congênitas com anomalias extracardíacas na população relativamente fechada de Malta, na Europa, onde a seleção ecocardiográfica de todas crianças síndrômicas ou com malformações múltiplas é rotineiramente realizado. Malformações foram classificadas pela primeira vez. Durante 1990-1994, a prevalência de nascimento de cardiopatia congênita foi de 8,8:1000 nascidos vivos (n = 231). Destes, 21 (9%) tinham sido diagnosticados com anomalias cromossômicas; 4 (2%), diagnosticados com síndromes não cromossômicas; e 14 (6%) tinham outras malformações não cardíacas. As mais comuns anomalias não cardíacas eram as musculoesqueléticas. A Síndrome de Down foi responsável por 95% de toda a doença cardíaca congênita síndrômica, com uma prevalência de nascimento de 0,73:1000 nascidos vivos.

A comparação destes resultados com estudos anteriores mostrou grandes disparidades entre os estudos, o que foi atribuído às diferenças nos métodos, tais como critérios diversos de inclusão para ambos: doença cardíaca congênita, síndromes e malformações. A lesão mais comum encontrada em associação com a Síndrome de Down foi isolado defeito do septo ventricular isolado, e não o defeito do septo atrioventricular, e isso foi atribuído ao nosso processo de triagem que identifica pequenas lesões, que de outra forma teria sido clinicamente perdidas e/ou fechadas espontaneamente (GRECH *et al.*,1999).

Hartmann *et al.* (2011) também tiveram por objetivo avaliar a frequência de anomalias cromossômicas entre as crianças com CC, em uma análise de dados levantados. Os autores revisaram dados do Programa de Defeitos Congênitos de Atlanta, um sistema de vigilância de malformações congênitas, com o propósito de avaliar a frequência de anomalias cromossômicas entre recém-nascidos vivos e mortes fetais com CC entregues entre 1 de janeiro de 1994 e 31 de dezembro de 2005. Entre 4430 crianças com CC, 547 (12,3%) tiveram uma anomalia cromossômica. CC com maior probabilidade de serem associadas a uma anomalia cromossômica foram: interrupção do arco aórtico (tipo B 69,2%), defeito do septo atrioventricular (67,2%) e do ventrículo direito dupla via de saída do ventrículo direito (33,3%). As anormalidades cromossômicas mais comuns observadas foram trissomia 21 (52,8%), trissomia 18 (12,8%), deleção 22q11.2 (12,2%) e trissomia 13 (5,7%). Os autores concluíram, nesse estudo, que cerca de 1 a cada 8 crianças com CC teve uma anomalia cromossômica.

Digilio *et al.* (1999) estudaram especificamente a patologia Defeito do Septo Atrioventricular total (DSAVT), frequentemente associada a anomalias extracardíacas. A associação de DSAVT com Síndrome de Down e heterotaxia (*situs ambiguus*, ou seja, existe uma alteração congênita na distribuição dos órgãos torácicos e abdominais) que tem sido estudada extensivamente, porém existe pouca informação sobre a prevalência da síndrome genética e outras malformações cardíacas em pacientes com DSAVT sem SD. Os autores observaram que a forma total, ou seja, o DSAVT é mais prevalente quando existem alterações cromossômicas.

Bruneau (2008) relatou em seu estudo que a cardiopatia congênita é a principal causa de morbidade infantil no mundo ocidental, mas só nos últimos anos sua etiologia tem sido compreendida. Estudos recentes descobriram a base genética para algumas formas comuns da doença, proporcionando uma nova visão sobre como o coração se desenvolve e como a desregulação do desenvolvimento do coração leva à doença.

Mortalidade e morbidade variam de acordo com a gravidade da doença cardíaca congênita e podem ser graves. As múltiplas cirurgias necessárias para corrigir muitos defeitos anatômicos podem ser debilitantes, e a qualidade de vida é bastante comprometida. As crianças com cardiopatia congênita, frequentemente, desenvolvem distúrbios neurológicos, mesmo que a criança não seja submetida à cirurgia, indicando um importante efeito secundário das cardiopatias congênitas no útero (MILLER *et al.*, 2007). Portanto, é crucial compreendermos os efeitos das doenças cardíacas congênitas na fisiologia pré-natal e pós-natal.

Embora os principais defeitos subjacentes que causam a cardiopatia congênita sejam pensados enquanto mutações em reguladores de desenvolvimento do coração durante a embriogênese (PIERPONT *et al.*, 2007), os dados epidemiológicos também apontam para influências ambientais (JENKINS *et al.*, 2007). Por exemplo, a exposição pré-natal aos inibidores da angiotensina-enzima de conversão aumenta o risco de várias malformações congênitas, incluindo aqueles que causam doenças cardíacas (COOPER *et al.*, 2006). No entanto, estes estudos epidemiológicos têm sugerido, na maioria das vezes, o risco, em vez de identificar os mecanismos de doença subjacente.

Um componente genético para doenças cardíacas congênitas foi inicialmente implicado por sua recorrência em famílias. Existem estudos que

mostram uma associação de cardiopatias congênitas com síndromes de microdeleção hereditárias em que uma região cromossômica que contém muitos genes é excluída. Além dessas síndromes de microdeleção, pouco se sabe sobre a genética das doenças cardíacas congênitas. Na verdade, os geneticistas e médicos debateram se cardiopatias congênitas podem ser causadas por um defeito de um único gene (BRUNEAU, 2008).

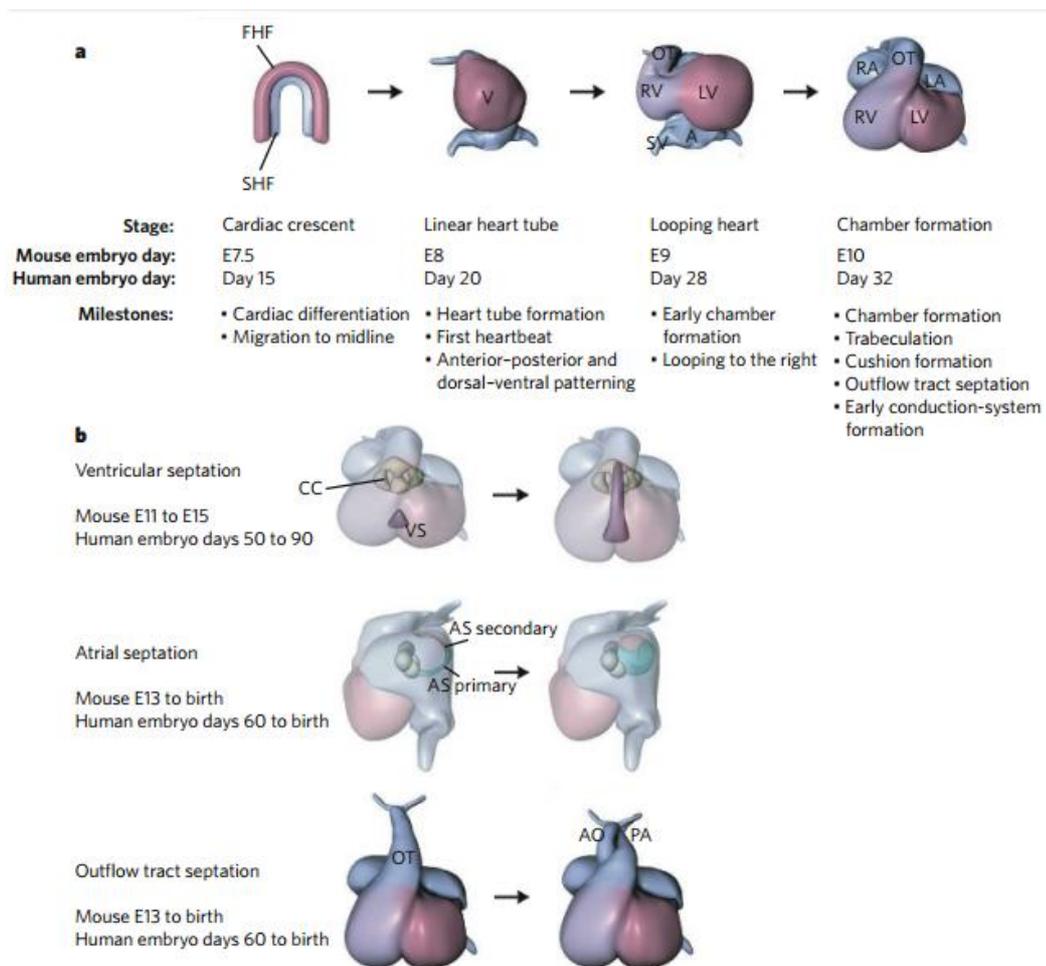
Essas discussões recrudesceram quando foram observados casos em que diferentes membros de uma família podem ter defeitos anatomicamente distintos (por exemplo, um membro com um CIA, um com T4F e um com uma CIV). Estes fenótipos clínicos aparentemente discordantes que surgem dentro de uma família eram difíceis de racionalizar. Além disso, defeitos leves ou intermediários (“forma-frusta”), tais como aneurismas do septo atrial, são, por vezes, descartados ou não diagnosticados; portanto o padrão de herança genética de doenças cardíacas congênitas muitas vezes não é claro (BRUNEAU, 2008).

O desenvolvimento anormal do coração durante a embriogênese levando a cardiopatia congênita e compreendendo assim como normalmente o coração se forma, é importante. Os mecanismos regulatórios envolvidos no estabelecimento do início coração e regular a sua morfogênese têm sido estudados extensivamente (OLSON *et al.*, 2006; SRISVASTAVA *et al.*, 2006). Os primeiros progenitores cardíacos resultam de mesoderme lateral, controlado por uma cascata de interagir fatores de transcrição. Entradas adicionais provêm de moléculas segregadas, tais como fatores de crescimento de fibroblastos, proteínas morfogenéticas ósseas, proteínas Wnt (são glicoproteínas secretadas que desempenham papéis essenciais no desenvolvimento embrionário e fetal e na manutenção dos tecidos) e outros.

Algumas descobertas esclareceram a origem dos precursores cardíacos e a sua regulação. A descoberta de uma "segunda" no campo do coração (SHF) levou a repensar a origem e padronização do coração embrionário (BUCKINGHAM *et al.*, 2005). O SHF é medial e dorsal para os cardiomiócitos de diferenciação precoces que compõem o “crescente cardíaca”, e dá origem a uma grande porção do coração, incluindo a via de saída, ventrículo direito e à maioria das aurículas. O SHF é subdividido em um número de piscinas de linhagem que contribuem tanto para estruturas anteriores (tais como a via de saída) quanto para componentes posteriores (como os átrios). Essas descobertas ajudam a explicar como mutações

associadas à cardiopatia congênita podem, por afetar apenas as linhagens de células específicas dentro da SHF, resultar em defeitos nas estruturas cardíacas específicas.

Figure3 - Heart development.a, Early steps in heart development. Diagrams of heart development are shown in ventral views. At the earliest stages of heart formation (cardiac crescent), two pools of cardiac precursors exist. The first heart field (FHF) contributes to the left ventricle (LV), and the second heart field (SHF) contributes to the right ventricle (RV) and later to the outflow tract (OT), sinus venosus (SV), and left and right atria (LA and RA, respectively). V, ventricle.b, Maturation of the heart. The cardiac cushions (CC) will give rise to the atrioventricular valves. The ventricular septum (VS) arises from myocardium from the left and right ventricles. Atrial septation (AS) occurs by the growth of two septa: the primary septum (green) and the secondary septum (pink). Outflow tract septation separates the common outflow tract (OT) into the aorta (AO, connected to the left ventricle) and the pulmonary artery (PA, connected to the right ventricle). (An interactive version of the figure can be found at <http://pie.med.utoronto.ca/HTBG/index.htm>.)



Fonte: Images courtesy of F. Yeung, University of Toronto, Canada.).Nature 2008;451:23.

Progressos também têm sido feitos na compreensão de como o lago de precursores cardíacos indiferenciados que contribuem para a SHF surge e como seu desenvolvimento posterior é regulado. Curiosamente, as linhagens cardiovasculares (miocárdio, endocárdio e do músculo liso) derivam de precursores comuns que se ramificam sequencialmente fora como tipos de células especializadas (WU *et al.*, 2006). Esta estratégia é semelhante ao utilizado pelo sistema hematopoiético. O regulamento da expansão e a alocação dos precursores cardíacos precoces têm sido atribuídos, em grande parte, à família Wnt de moléculas secretadas. No entanto, os Wnts são importantes, e ainda é preciso determinar a partir de onde eles sinalizam.

Um princípio importante no desenvolvimento do coração é que a regulação de diferentes linhagens celulares deve ser rigorosamente controlada para que a linhagem correta se diferencie na hora certa e no local correto. Trabalhos recentes no peixe-zebra têm mostrado que um nível-chave de regulação pode ser a repressão ativa do programa cardíaco na placa anteriorlateral do mesoderme adjacente aos precursores cardíacos, por imposição de um hematopoiético e programa do endocárdio (SCHOENEBECK *et al.*, 2007).

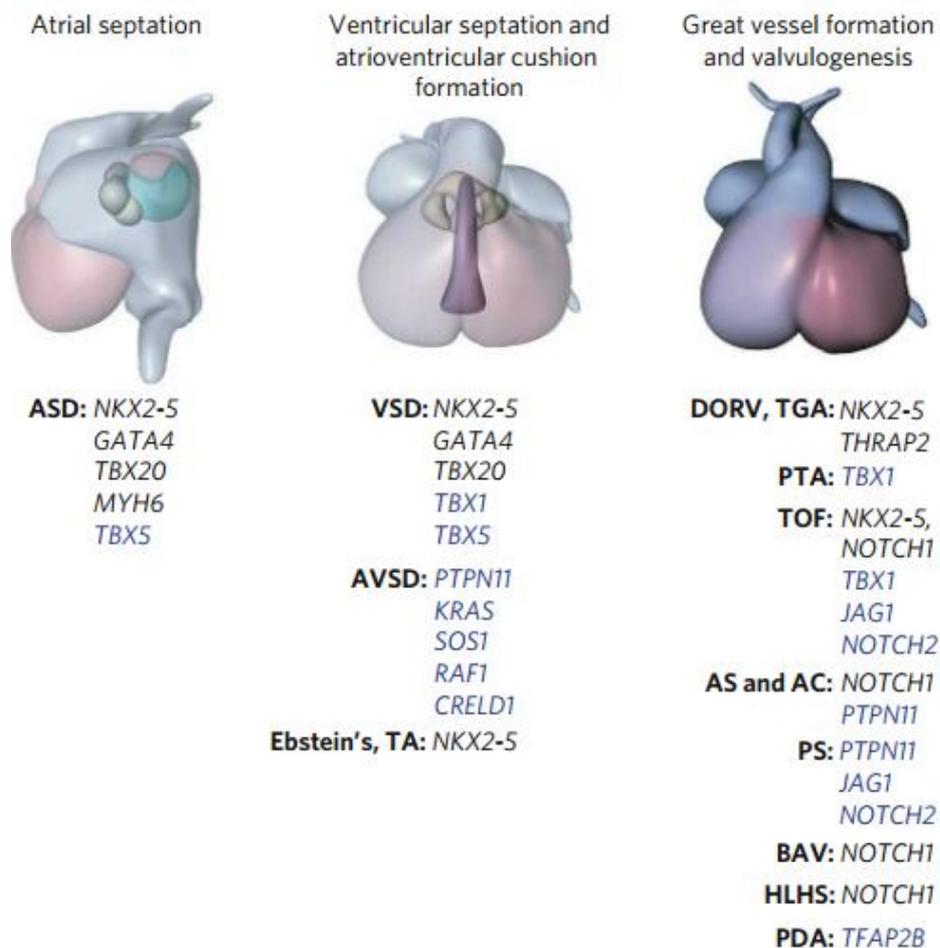
O tamanho do campo do coração no peixe-zebra é controlado negativamente por ácido retinóico; assim, é influenciado por ambos os determinantes específicos de células do tipo e pelas grandes pistas de padronização. No SHF em ratos, o fator de transcrição NKX2-5 limita a expansão de células progenitoras cardíacas e promove o seu potencial de diferenciação: em ratos sem NKX2-5, a superprodução precoce de células progenitoras é seguida pela proliferação diminuída de células SHF, resultando em uma via de saída menor, assim como o ventrículo direito (PRALL *et al.*, 2007).

O papel dos fatores de transcrição no desenvolvimento do coração está bem estabelecido (OLSON *et al.*, 2006), mas pouco se sabe sobre o papel dos fatores que modificam a estrutura da cromatina, isto é, as fibras de DNA e de proteínas (conhecidas como histonas) que formam cromossomos e cuja embalagem pode restringir ou permitir a ativação do gene. O BAF60C (também conhecido como SMARCD3), uma subunidade do Swi/SNF (como complexo-remodelação da cromatina BAF), liga fisicamente fatores de transcrição cardíacos ao complexo BAF. Perda de BAF60C resulta em graves defeitos na morfogênese cardíaca e ativação diminuída de um subconjunto de genes cardíacos.

Curiosamente, uma redução parcial dos níveis de BAF60C leva a defeitos mais restritos na formação via de saída, sugerindo que a regulação da dosagem de complexos de remodelação da cromatina é crucial para o desenvolvimento normal do coração. Considerando que os complexos BAF podem alterar a estrutura da cromatina, outras proteínas de remodelação da cromatina podem modificar histonas, e estas proteínas também são importantes para a formação do coração. A histona-metiltransferase restrito músculo SMYD1 (também conhecido como BOP) é um regulador importante do crescimento e de diferenciação das câmaras cardíacas. No que diz respeito ao coração, a histona-desacetilases, na sua maioria, tem sido caracterizada como tendo um papel na hipertrofia, mas também é importante no desenvolvimento do coração (MONTGOMERY *et al.*, 2007).

Estudos genéticos humanos identificaram vários genes que são responsáveis por doenças cardíacas congênitas hereditárias e esporádicas. A maioria destes genes codificam fatores de transcrição que regulam eventos específicos no desenvolvimento do coração, tais como a formação de septos ventricular ou morfogênese da via de saída. O primeiro identificou a mutação de um único gene, dando origem a uma doença cardíaca congênita hereditária que estava no gene fator de transcrição T-box *TBX5*, causador da síndrome de Holt-Oram (HOS) (BASSON *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1997). HOS inclui, predominantemente, CIAs, CIVs e defeitos do sistema de condução. Logo após essa primeira descoberta, mutações no *NKX2-5* foram identificadas em famílias com CIAs herdadas e bloqueio atrioventricular (SCHOTT *et al.*, 1998), e mutações no *NKX2-5* também foram encontradas em famílias com diversas lesões de doenças cardíacas congênitas, incluindo CIVs, anomalia de Ebstein e T4F (BENSON *et al.*, 1999).

Figure 4 - Origin and genetic aetiology of congenital heart disease. Three major classes of developmental defects are indicated: defects in atrial septation, in ventricular or atrioventricular septation, and in the great vessels. The types of congenital heart disease that occur within each class are indicated, with the associated mutated genes listed. Genes for which mutations result in discrete congenital heart diseases are indicated in black; genes that are mutated in congenital heart diseases that are part of a wider syndrome (also involving defects that are not associated with congenital heart disease) are indicated in blue. CRELD1, cysteine-rich with epidermal growth-factor-like domains 1; KRAS, ki-Ras; PTPN11, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11; SOS1, son of sevenless homologue 1

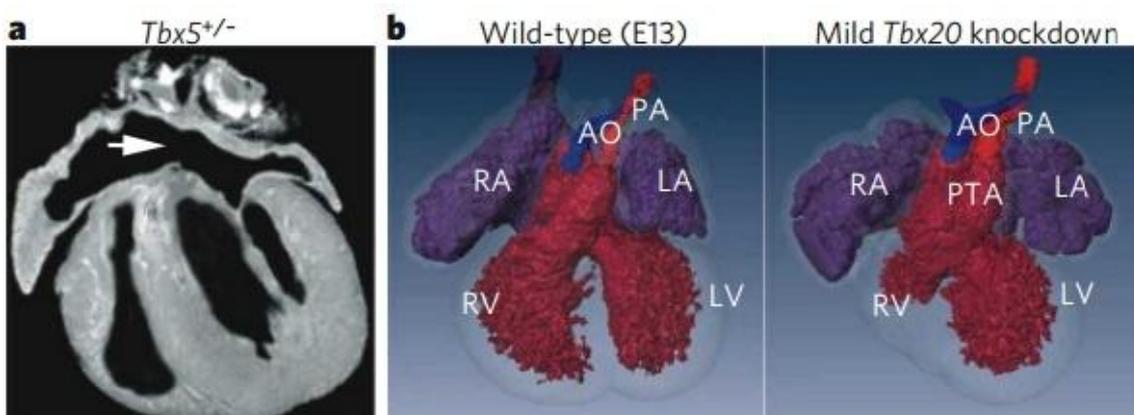


Fonte: Canada.)Nature 2008;451:24

Estes resultados forneceram a percepção de que a haploinsuficiência (variação do número de cópias de um gene que resulta em uma diminuição da

dosagem de genes devido a qualquer mutação de perda de função) de um fator de transcrição é importante no desenvolvimento e está na raiz da doença, podendo explicar o padrão de hereditariedade dominante e característico da doença. A importância da dosagem de fator de transcrição foi confirmada por meio de modelos de ratos realizados por Biben (2000) e Bruneau (2001). Um achado relevante deste trabalho é que TBX5 e NKX2-5 podem interagir fisicamente e sinergicamente para ativar seus alvos a jusante, fornecendo conhecimento sobre como mutações podem alterar qualquer uma destas proteínas, afetando a expressão genética cardíaca e levar à doença.

Figure 5 - Modelling human congenital heart diseases in mice, and dosage-dependent regulation of cardiac morphogenesis. a, Heart magnetic resonance imaging section of a mouse that is heterozygous for a *Tbx5* mutation, demonstrating an ASD (arrow), as also seen in humans heterozygous for a *TBX5* mutation. (Panel adapted, with permission, from ref. 25.) b, A partial (about 60%) reduction in *TBX20* levels leads to a hypoplastic right ventricle and PTA, as also seen in humans heterozygous for a *TBX20* mutation. The outline of the heart is translucent white; the fill of the atria is purple; the fill of the ventricles and outflow tract is dark red; the aorta is blue; and the pulmonary artery is light red. E, day of embryonic development. (Panel adapted from ref. 65.) Nature 2008;451:24



Fonte: Panel adapted from ref. 65. Nature 2008;451:24

A importância da interação dos fatores de transcrição foi enfatizada por estudos que demonstraram que as mutações no fator de transcrição do zinco que codifica o gene *GATA4* causa defeitos na formação de septos (GARG *et al.* 2003). O

GATA4, muito estudado como um regulador da expressão gênica cardíaca, interage fisicamente com NKX2-5 (OLSON *et al.*, 2006; SRIVASTAVA *et al.*, 2006). Interações defeituosas entre GATA4 e NKX2-5 e entre GATA4 e TBX5 podem levar a cardiopatias congênitas causadas por mutações no genes GATA4. Assim, com base na clonagem posicional em três tipos de cardiopatia congênita com defeitos que se sobrepõem, três fatores de transcrição cardíacos que interagem foram identificados como reguladores sensíveis à dosagem na formação do coração.

Kampet *al.* publicaram um estudo realizado em ratos, em 2010, em que foi descrita uma tentativa de elucidação da cardiopatia congênita. Para identificar novos genes relacionados à CC, foi realizado um rastreio genético para identificar linhas de rato mutante com cardiopatia congênita. Um aumento marcado da letalidade perinatal foi observado no grupo tratado com agente mutagênico em comparação com uma população de retrocruzamento—é um cruzamento de um híbrido com um de seus pais ou um indivíduo geneticamente similar aos seus pais com o intuito de alcançar descendentes com uma identidade genética mais próxima possível dos seus pais —não tratada.

Patologias cardíacas letais perinatais revelaram defeitos cardiovasculares em 79 filhotes de 47 de 321 linhas mutagenizados. Todas as anormalidades estruturais identificadas foram análogas a formas previamente descritas de CC em humanos. Além disso, padrões de recorrência fenotípicas e de variância em todas as linhas foram semelhantes aos padrões de prevalência CC e com recorrência em humanos. Os autores mapearam o locus responsável por defeitos do septo atrioventricular hereditárias em seis linhas (*avc1-6*). Nesse trabalho os autores demonstraram que CC “espóradica” pode ter grande componente genético e estabeleceram uma abordagem prática e eficiente para identificar os genes candidatos à CC (KAMP *et al.*, 2010).

Ainda em outro estudo em ratos, um outro gene, fator de transcrição *Tbx1*, foi apontado como o culpado de um único gene provável em 22q11 síndrome de microdeleção (também conhecida como síndrome de DiGeorge), que se caracteriza por doenças cardíacas congênitas como T4F, canal arterial e interrupção do arco aórtico (LINDSAY *et al.*, 2001; MERSCHER *et al.*, 2001). Esta conclusão foi apoiada pela identificação de mutações no gene TBX1 em pacientes com características de 22q11 com síndrome de microdeleção, mas sem uma

microdeleção (YAGI *et al.*, 2003). Gene *Tbx1* é expresso no SHF e é importante para a sua expansão normal (HU *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2004). Outros genes dentro da região crítica 22q11 provavelmente também podem contribuir para a síndrome. Assim, uma deficiência de um tal gene, *Crkl*, resulta em defeitos semelhantes em um modelo de ratinho e exacerba a eliminação de *Tbx1* (GURIS *et al.*, 2006; MOON *et al.*, 2006).

A rede conhecida por interagir os fatores de transcrição cardíacos continuou a crescer em tamanho e complexidade com a identificação do gene Spalt familiar *SALL4*, causador da síndrome Okihiro, que inclui doenças cardíacas congênitas e defeitos nos membros quase idênticos aos da síndrome de Holt Oram (AL-BARADIE *et al.*, 2002) – e a identificação de mutações no gene *TBX20* em famílias com CIAs, CIVs, defeitos nas válvulas e crescimento de câmara prejudicada (KIRK *et al.*, 2007).

O gene *SALL4* interage fisicamente e geneticamente com *TBX5* no padrão do septo interventricular em um modelo de rato (KASHIBA-TAKEUCHI *et al.*, 2006). Considerando *TBX5* e *SALL4*, eles podem funcionar em conjunto para reprimir ou ativar a expressão do gene (dependendo do gene-alvo); *TBX5*, *GATA4* e *NKX2-5* têm a função, juntos, apenas de ativar genes. Os padrões de expressão que se sobrepõem e as complexas interações destes fatores de transcrição permitem a regulação da expressão do gênica e da morfogênese cardíaca.

As mutações em *TFAP2B* — que codifica o fator de transcrição de ativação de ligação e potencializador da proteína-2 β (AP2 β) — são expressas por células da crista neural e têm sido associadas ao canal arterial em famílias com síndrome Char, fazendo com que a regulação da função da crista neural seja importante para o fechamento normal do canal arterial (SATODA *et al.*, 2000). No entanto, a função de AP2 β no desenvolvimento do coração é desconhecida. Além disso, as mutações no gene que codifica a proteína do hormônio da tireoide associada ao receptor 2 (*THRAP2*) — uma subunidade do complexo de mediador, o qual é essencial para a ativação da transcrição — têm sido relatadas em uma família com TGA e em casos esporádicos de TGA (MUNCKE *et al.*, 2003), mas pouco se sabe sobre este gene ou como ele funciona no desenvolvimento da via de saída.

Embora o conceito de que fatores de transcrição possam participar de um conjunto complexo de interações, tem sido importante para a compreensão da regulação da expressão gênica cardíaca, bem como a etiologia de doenças

cardíacas congênitas e seus padrões de herança, alguns alvos foram identificados, e estes podem explicar a base celular precisa para cardiopatias congênitas.

Existe uma classe recém-identificada de pequenos RNAs não codificantes chamada de microRNAs (miRNAs). Estas pequenas RNAs (21 de nucleotídeo) modulam a função da proteína através da ligação do RNA mensageiro, resultando em repressão da tradução ou na degradação do mRNA alvo (AMBROS, 2004). Recentemente, um número de miRNAs mostrou como funciona no coração (VAN ROOIJ *et al.*, 2007). Potencialmente de maior relevância para a doença cardíaca congênita, miR-1 demonstrou ser importante no desenvolvimento embrionário do referido órgão (ZHAO *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2007).

Dois genes separados, *miR-1-1* e *miR-1-2*, são expressos no coração em desenvolvimento, e experiências na expressão transgênica excessiva sugeriram que estes genes podem estar envolvidos na regulação da proliferação de cardiomiócitos. Ambos os genes estão sob o controle do fator de resposta do soro, indicando que eles fazem parte de um programa de desenvolvimento regulado por fatores de transcrição cardíaca (ZHAO *et al.*, 2005). Tem sido demonstrado que o miR-1 tem como alvo o fator de transcrição cardíaca HAND2, que está implicado no crescimento do coração embrionário, bem como vários outros reguladores de crescimento e desenvolvimento cardíaco.

Uma abordagem de metas de gene descobriu que a exclusão de *miR-1-2* resulta em defeitos cardíacos que incluem CIVs. Ratos sobreviventes têm defeitos do sistema de condução e aumento da proliferação de cardiomiócitos (ZHAO *et al.*, 2007). Assim, a desregulação de miR-1 ou outras alterações importantes no desenvolvimento do miRNAs podem resultar em doença cardíaca congênita em humanos.

2.2.6 Região crítica do cromossomo 21

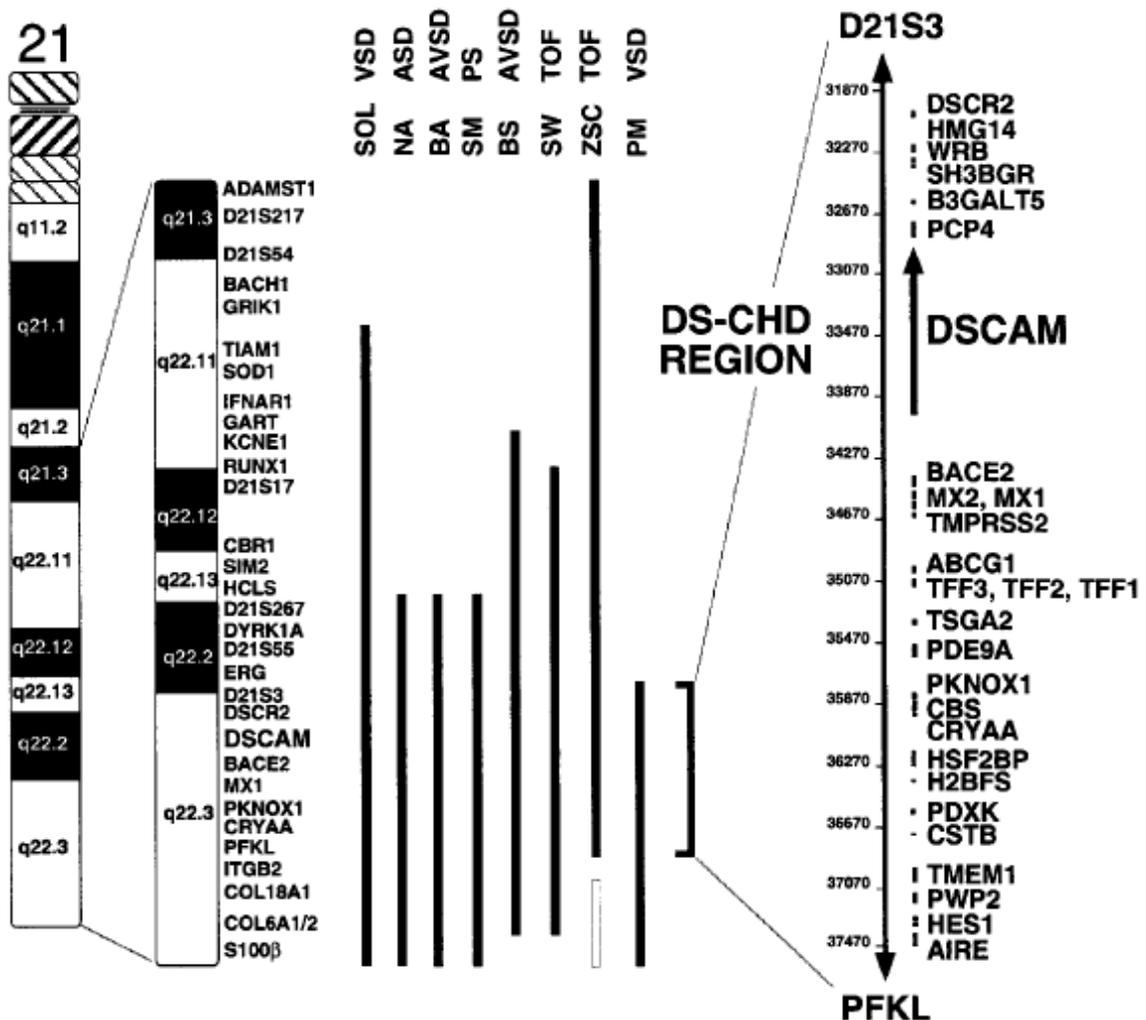
Barlow *et al.* (2001) propuseram uma região no cromossomo 21 denominada DSCAM (molécula de adesão celular da síndrome de Down) como região do cromossomo 21 relacionada à cardiopatia congênita. Um painel de 19 indivíduos com trissomia parcial 21 foi avaliado utilizando análise quantitativa de dosagem de Southern blot e hibridização fluorescente *in situ* (FISH), método que utiliza recursos moleculares para analisar os cromossomos. Ou seja, é o

mapeamento de um gene por hibridização molecular de uma sequência de DNA clonada (sonda ou probe), marcada por fluorescência em um cromossomo espalhado em lâmina, com subconjuntos de 32 BACs (*Bacterial artificial chromosome*), abrangendo a região definida por D21S16 (21q11.2) através do telômero, que é uma estrutura constituída por fileiras repetitivas de proteínas e DNA não codificante a qual forma as extremidades dos cromossomos.

Estes BACs abrangem os marcadores moleculares D21S55, ERG, ETS2, MX1 /2, colágeno XVIII e colágeno VI A1/A2. 14 indivíduos são duplicados para a região candidata, dos quais 8 (57%) têm o espectro característico de SD e CC. A combinação dos resultados destes oito indivíduos sugere que a região candidata para SD e CC é demarcada por D21S3 (definida por comunicação interventricular), através de PFKL (*phosphofrutose-kinase liver*) (definida pela tetralogia de Fallot). Estes dados sugerem que a presença de três cópias de gene(s) da região é suficiente para a produção de subconjuntos de SD e CC (BARLOW *et al.*, 2001).

Esta região não inclui genes localizados perto de D21S55, previamente propostos como uma região crítica de SD, ou os genes que codificam colágenos VI e XVIII. Dos candidatos a genes potenciais na região SD-CC, a DSCAM é notável, na medida em que codifica uma molécula de adesão celular, ultrapassando mais de 840 kb da região candidata e sendo expressa no coração durante o desenvolvimento cardíaco. Dadas estas propriedades, propomos DSCAM como um candidato a SD e CC (BARLOW *et al.*, 2001).

Figure 6 - Narrowed DS-CHD candidate region and genes. Solid lines indicate regions of known duplication; open boxes indicate deleted regions. The candidate region is defined as the minimal region of molecular overlap between the individual duplications. Abbreviations denote atrial septal defect (ASD), ventricular septal defect (VSD), atrioventricularseptal defect (AVSD), pulmonic stenosis (PS), and tetralogy of Fallot (TOF). The candidate region is denoted by a line with arrows at both ends, with the extent of the region in kilobasepairs indicated at the left of this line. The locations of known genes mapping within the candidate region are indicated by black bars to the left of the gene symbols. Genes mapping within the candidate region include but are not limited to: Down syndrome Critical Region 2 (DSCR2), high mobility group protein 14 (HMG14), tryptophan-rich basic protein (WRB), SH3-binding domain glutamic acid-rich protein (SH3BGR), GlcNAc-beta-1,3-galactosyltransferase 5 (B3GALT5), Purkinje cell protein 4 (PCP4), Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM), beta-site APP-cleaving enzyme 2 (BACE2), myxovirus resistance 1/2 (MX1/2), transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2), white protein homolog 1 (ABCG1), trefoil factor 3 (TFF3), trefoil factor 2 (TFF2), trefoil factor 1 (TFF1), human homolog to mouse testis specific gene 2 (TSGA2), cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase type 9 (PDE9A), PBX/knotted-1 homeo box-1 (PKNOX1), cystathionine beta-synthase (CBS), alpha crystallin A chain (CRYAA), heat shock transcription factor 2 binding protein (HSF2BP), H2B histone family S member (H2BFS), human pyridoxal kinase (PDXK), cystatin B (CSTB), transmembrane protein 1 (TMEM1), periodic tryptophan protein 2 (PWP2), ES1 protein homolog (HES1), autoimmune regulator (AIRE), and phosphofructo-kinase liver type (PFKL). A complete list of the genes mapping within the region is presented in Hattori et al.20 and at .Barlow.GM., 2001:3(2): 97



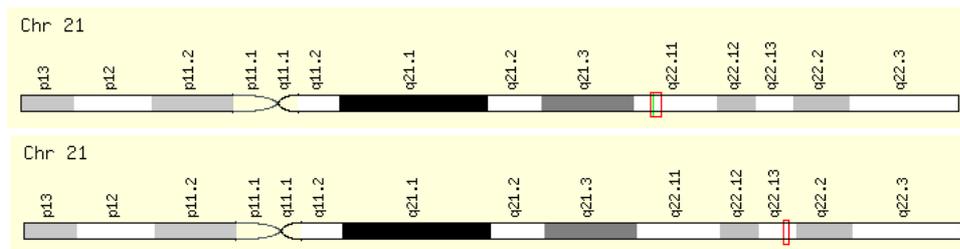
Fonte: Barlow.GM., 2001:3(2): 97

Em 2011, Liu *et al.* viram que regiões no cromossomo humano 21 (Hsa21) são sinteticamente comparadas (ou seja, existe similaridade no conteúdo e na organização entre os cromossomos de diferentes espécies), com três regiões localizados no cromossomo do rato 10 (Mmu10), Mmu16 e Mmu17. No estudo feito pelos autores, eles analisaram o impacto de duplicações de cada região sintênica no desenvolvimento cardiovascular em ratos e descobriram que somente a duplicação de Mmu16, ou seja, Dp (16) 1Yey, está associada a defeitos cardíacos.

Além disso, geraram dois modelos de ratos novos que levam a uma duplicação 5,43 Mb e a uma eliminação recíproca entre Tiam1 e Kcnj6; e utilizando engenharia cromossômica Dp (16Tiam1-Kcnj6) Yey / + e Df (16Tiam1-Kcnj6) Yey/+, respectivamente, dentro do 22,9 Mb, região sintênica, em Mmu16. Descobriram que a DP (16Tiam1-Kcnj6) Yey / +, mas não de Pd (16) 1Yey / DF (16Tiam1-Kcnj6) Yey, resultou em defeitos cardíacos, indicando que triplicação da região de Tiam1-Knj6 é

necessária e suficiente para fazer com que a SD tenha CC. Portanto, os autores estabeleceram a menor região genômica crítica para defeitos cardíacos em pacientes com SD e estabeleceram as bases para a identificação do gene causal para este fenótipo (LIU *et al.*, 2011).

Figure 7 - Genomic dissection of DS-associated heart defects in mice



Fonte: LIU, C. *et al.*, p. 623–32, nov. 2011.

Genetic dissection of DS associated heart defects in mice.

Em 2015, Ramachandran *et al.* fizeram um estudo para identificar a contribuição de variantes genéticas comuns ao defeito do septo atrioventricular associado à Síndrome de Down. Em comparação com a população euplóide, os bebês com Síndrome de Down, ou trissomia 21, têm um risco aumentado de 2000 vezes de apresentar defeitos do septo atrioventricular. A causa deste risco aumentado permanece indescritível. Os autores apresentaram dados do maior estudo cardíaco realizado em pacientes trissômicos, usando uma coleção cuidadosamente caracterizada de indivíduos de extremidades do espectro fenotípico.

Realizaram um estudo em 452 indivíduos com Síndrome de Down, constituídos por 210 casos com defeito septoatrioventricular completo, e 242 controles com corações estruturalmente normais. Nenhuma variante individual conseguiu significância para todo o genoma. Foram identificadas quatro regiões dissômicas (1p36.3, 5p15.31, 8q22.3 e 17q22) e duas regiões trissômicas no cromossomo 21 (ao redor dos genes PDXK e KCNJ6), as quais mereceram uma investigação mais aprofundada em grandes estudos de replicação.

Os dados desse estudo mostraram que algumas variantes genéticas comuns com defeito de tamanho grande não contaram para o elevado risco de Síndrome de Down associada a defeitos septo atrioventricular. Em vez disso, múltiplas variantes de tamanhos de efeito de baixo a moderado podem contribuir

para esse risco elevado, destacando a arquitetura genética complexa de defeitos do septo atrioventricular, mesmo na população de Síndrome de Down altamente suscetível (RAMACHANDRAN *et al.*, 2015).

2.3 CARDIOPATIA CONGÊNITA E SÍNDROME DE DOWN

2.3.1 Prevalência de CC na SD

Cerca de 50% a 60% dos portadores de SD apresentam algum tipo de cardiopatia congênita ao nascimento (STOLL *et al.*, 2015). Trabalhos na literatura realizados por vários grupos, como Paula *et al.* (2014), De Rubens Figueroa *et al.* (2003) e Weijerman *et al.* (2010), dentre outros, relatam a prevalência da CC em portadores de SD. O tipo de CC varia muito, podendo ser encontradas desde simples comunicações interventriculares (FREEMAN *et al.*, 1998; GUITTI, 2000; ALABDULGADER, 2001; BASPINAR *et al.*, 2006; NARAYANAN *et al.*, 2014; NAZARI *et al.*, 2016) ou comunicações interatriais (NISLI *et al.*, 2008; ELMAGRBY *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2014; MOURATO *et al.*, 2014; BERMUDEZ *et al.*, 2015; MORSY *et al.*, 2016) até cardiopatias mais complexas. Dentre as cardiopatias complexas, os vários tipos de defeitos do septo atrioventricular (WELLS *et al.*, 1994; NISLI *et al.*, 2008; SCOTT; THAME, 2014) podem ser encontrados nesses pacientes, sendo esta a cardiopatia clássica nessa população.

Bergstrom *et al.* (2016) estudaram crianças nascidas com cardiopatia congênita e SD no período de 1992 e 2012, na Suécia. Os autores observaram que anomalia cardíaca congênita foi diagnosticada em 54% das crianças com Síndrome de Down. Os autores ainda observaram que o risco de defeitos congênitos complexos diminuiu ao longo do tempo.

Em comparação com 1992 a 1994, o risco em 2010 para 2012 foi reduzido em quase 40%. Em contraste, os riscos para isolado defeito do septo ventricular ou defeito do septo atrial apresentaram aumentos significativos nos últimos anos. No geral, os 3 diagnósticos mais comuns foram defeito do septo atrioventricular, CIV e CIA, sendo responsável por 42%, 22% e 16% dos defeitos cardíacos congênitos, respectivamente (BERGSTROM *et al.*, 2016).

Embora o defeito do septo atrioventricular tenha sido muito mais comum do que CIV em 1992 e 1994, eles eram igualmente comuns entre os anos de 2010 e

2012. **Dessa forma**, os autores concluíram que as cardiopatias congênitas complexas tornaram-se menos comuns em crianças com diagnóstico de Síndrome de Down, e essa mudança fenotípica pode ter sido resultado de aborto seletivo de fetos com Síndrome de Down de melhorias gerais no diagnóstico pré-natal de cardiopatias congênitas complexas (BERGSTROM *et al.*,2016).

Em 2009, um grupo de autores na Arábia Saudita estudou se o fato de consanguinidade entre os pais influenciaria na incidência de cardiopatia congênita em crianças com SD, já que naquele país existe um alto índice de casamento com consanguinidade. Foi um estudo prospectivo em todas as crianças com SD, comprovado por pesquisas clínicas e citogenéticas. Importa ressaltar que a consanguinidade dos pais também foi documentada. Os autores encontraram uma frequência ligeiramente maior de CC em crianças com SD nesse grupo de pacientes com elevada taxa de casamento consanguíneo, sendo a lesão mais comum a comunicação interventricular e uma baixa incidência de cardiopatia cianogênica (AL-JARALLAH,2009).

2.3.2 Prevalência do gênero na SD

Pinto *et al.* (1990) investigaram as razões pelas quais pacientes do sexo feminino com Síndrome de Down prevalecem no ambulatório de Pediatria Cardiologia em comparação com a maior incidência de Síndrome de Down entre as crianças do sexo masculino nascidas vivas. Os autores revisaram 277 casos de Síndrome de Down, sendo 119 do sexo masculino (42,96%) e 158 do sexo feminino (57,04%), de 1970 a 1987. Um diagnóstico final do tipo da doença cardíaca congênita foi realizado entre os 210 casos, sendo 85 do sexo masculino (40,47%) e 125 do sexo feminino (59,38%). Esta distribuição diferente entre os sexos foi significativa (P inferior a 0,01), quando comparada com a da população em geral (4.150 pacientes, 2.108 homens e 2.042 mulheres). A lesão dominante foi o defeito do septo atrioventricular (130 casos; 46 homens [54,11%] e 84 do sexo feminino [67,20%]). A incidência desta lesão cardíaca (DSAV) foi semelhante entre os pacientes sem Síndrome de Down.

Os autores sugeriram que existiriam fatores determinantes moleculares da Síndrome de Down poderiam influenciar na preponderância de defeito do septo atrioventricular em mulheres, aumentando sua incidência, enquanto tais fatores

pareceriam agir de forma negativa no que diz respeito a presença de cardiopatias congênitas, onde existiria prevalência do sexo masculino (PINTO *et al.*, 1990).

2.3.3 Complicações clínicas e tratamento cirúrgico da CC na SD

Adicionalmente, os portadores de Síndrome de Down têm maior sensibilidade e uma tendência a desenvolver hipertensão arterial pulmonar mais precocemente (MOURATO *et al.*, 2014), o que torna as cardiopatias que evoluem com hiperfluxo pulmonar um problema ainda maior. Em 2015, Espinola-Zavaleta, num estudo em pacientes com SD, concluiu que a SD tem uma alta prevalência de CC e hipertensão pulmonar. Quando comparado à população geral, o risco de hipertensão pulmonar aumenta 2,4 vezes quando a CC está presente.

Ainda em relação à hipertensão arterial pulmonar, foi visto por alguns autores (WELLS *et al.*, 1994; WEIJERMAN *et al.*, 2010) a persistência de hipertensão arterial pulmonar no recém-nascido cardiopata é aumentada em pacientes com SD. O estudo de Weijerman teve por objetivo avaliar a prevalência de CC e hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido (HPP) em crianças com SD e para avaliar o seu impacto sobre fatores neonatais. Foi um estudo prospectivo de crianças com SD nascidos entre 2003 e 2006 registrados pela Unidade Dutch Paediatric Surveillance (DPSU), na Holanda.

A CC ocorreu em 43% das 482 crianças com trissomia 21. Defeito do septo atrioventricular foi encontrado em 54%, defeito do septo ventricular em 33,3% e persistência do canal arterial em 5,8%. A incidência de HPP em SD foi de 5,2%, o que é significativamente maior do que a população em geral ($P < 0,001$). A mortalidade relatada em recém-nascidos com Síndrome de Down foi geral (3,3%), e ainda foi significativamente maior em crianças com CC *versus* crianças sem CC. A presença de cardiopatia congênita em crianças com SD não influenciou o peso ao nascer, idade gestacional e índice de Apgar. Em recém-nascidos com Síndrome de Down, encontramos não só uma prevalência de 43% de CC, mas também uma alta incidência de HPP em 5,2%, por isso, segundo os autores, o reconhecimento precoce da condição cardíaca dos neonatos com SD se faz necessário (WEIJERMAN *et al.*, 2010).

No que diz respeito à correção cirúrgica da CC, muitos estudos epidemiológicos têm relatado que a Síndrome de Down não aumenta a

morbimortalidade cirúrgica durante a correção do defeito do septo atrioventricular total (DSAVT). A sobrevivência em cinco anos é quase 70% para os pacientes corrigidos cirurgicamente do DSAVT em pacientes com Síndrome de Down, não sendo diferente de pacientes sem Síndrome de Down (CHAMPAGNE *et al.*,2014). Porém, tem sido considerado que pacientes com SD têm um significativo risco maior para desenvolvimento de bloqueio atrioventricular no pós-operatório.

2.3.4 Etiologia da CC na SD

Apesar da importância das cardiopatias congênitas na Síndrome de Down, ainda não foi desvendado o mecanismo que leva a uma maior incidência dessas malformações nessa população. Uma das teorias mais aceitas é a de que a trissomia 21 leva os portadores de tal síndrome a serem mais sensíveis à presença de CC, ou seja, a adição de elementos que não levaria à existência de cardiopatia congênita na população em geral; o faz na população com síndrome de Down devido a maior sensibilidade nesses pacientes sindrômicos.

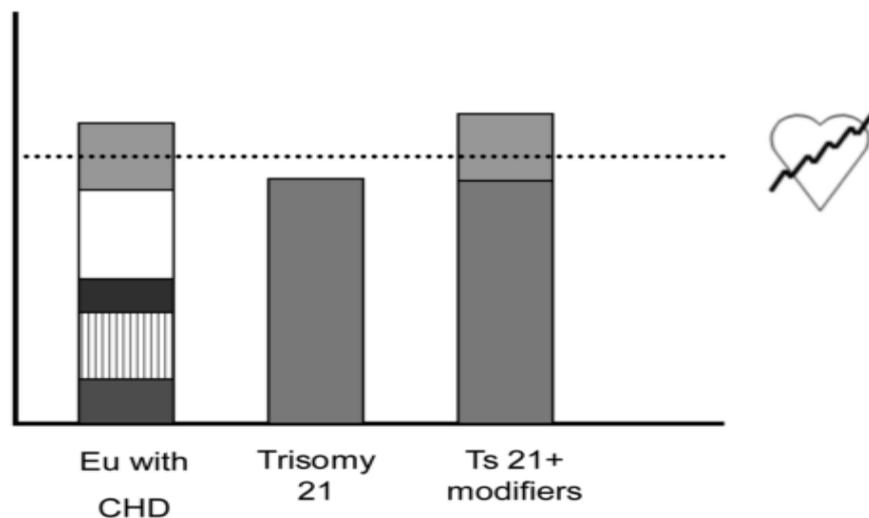
Li *et al.* (2012) realizaram um estudo com camundongos para tentar esclarecer porque cerca de metade desses pacientes sindrômicos tem CC e a outra metade tem o coração normal, sugerindo que modificadores genéticos interagem com o gene sensível à dosagem em Hsa21 para resultar em CC. Eles levantaram a hipótese de que existe um limite em ambos os SD e populações euplóides para o número de perturbações genéticas que podem ser toleradas antes de desenvolverem CC.

Os autores estudaram um grupo de indivíduos com SD e defeito do septo atrioventricular total e sequenciaram 2 genes candidatos para CC: CRELD1, que está associado ao defeito do septo atrioventricular em pessoas com ou sem SD, e HEY2, cujo ortólogo de rato (ou seja, dois genes homólogos derivados de um ancestral comum). São designados ortólogos quando estes foram separados por um evento de especiação, onde cada cópia do gene divergiu para duas espécies distintas. Sendo assim, genes ortólogos partilham um ancestral comum e têm funções iguais (Hey2), produzindo defeitos septais quando mutados.

Diversas variantes deletérias foram identificadas, mas a frequência desses modificadores potenciais foi baixa. Cruzaram ratos com formas mutantes desses potenciais modificadores para o modelo de rato Ts65Dn de SD. Cruzando

alelos de perda de função de um ou outro *Creld1* ou *Hey2*, causou-se um aumento significativo na frequência de CC, demonstrando uma interação entre os modificadores e genes. Os autores também demonstraram que, embora cada um destes modificadores de mutantes seja benigno, quando herdados em conjunto, estes interagem para afetar o desenvolvimento do coração. Os estudiosos levantaram a hipótese de que existe um limiar para efeitos aditivos de modificadores genéticos em pacientes sensíveis (LI *et al.*, 2012).

Fig 8 - A threshold model for CHD



Fonte: LI, C. *et al.* nov. 2012, p 302. A threshold model for CHD.

Estudos com camundongos desenvolvidos por Robinson *et al.* (2003) e Maslen *et al.* (2006) demonstraram que alterações no gene *CRELD1* estavam relacionados com a presença de DSAV em portadores de SD. Em 2003, Robinson *et al.* identificaram e caracterizaram o gene *CRELD1* como o primeiro gene humano a ser implicado na patogênese de DSAV isolado, e também no DSAV quando encontrado com heterotaxia.

Assim como a duplicação do gene 16 nos camundongos, foi relatado como estar relacionado a alterações gastrointestinais e cardiovasculares semelhantes aos que ocorrem no cromossomo 21 em portadores de SD (LI *et al.*, 2007).

Recentemente, Lana-Elola *et al.* (2016), em seu grupo de pesquisa da França, usaram um modelo em ratos pra tentar identificar a associação entre CC e

SD. Com o objetivo de identificar genes sensíveis que causam alterações fenotípicas entre as quais CC, os autores usaram engenharia cromossômica para gerar um painel de mapeamento de sete linhagens de ratos com trissomia parcial de regiões do cromossomo 16 ortólogo ao cromossomo 21 do homem.

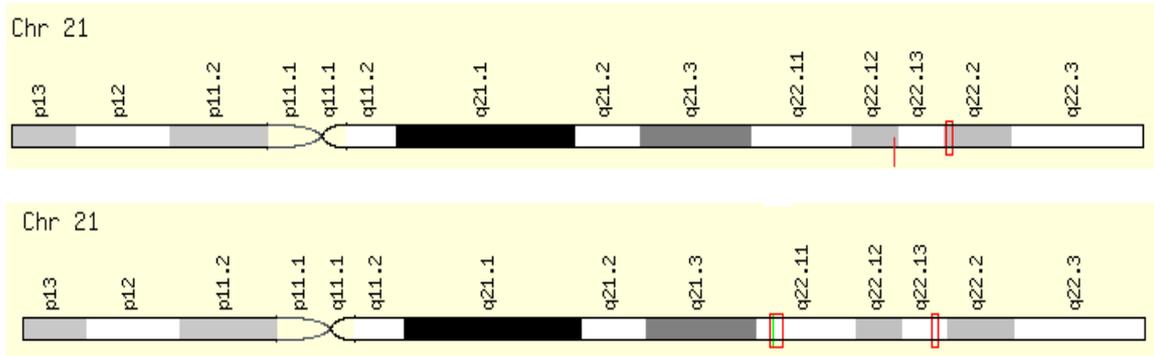
Uma análise sistemática dessas sete linhagens identificou uma região crítica suficiente para causar CC quando presente em três cópias e mostraram que eles continham pelo menos dois loci de dosagem sensível. Além disso, duas destas novas cepas têm um subtipo específico de defeito septo atrioventricular, com *shunt* exclusivo a nível ventricular, e demonstraram que, contrariamente à hipótese atual, essa cardiopatia (DSAV) não é definida como uma falha na formação da protrusão mesenquimal dorsal (LANA–ELOLA *et al.*, 2016).

Os fatores epigenéticos podem estar relacionados ao surgimento de CC na SD, mais especificamente ao padrão de metilação. Alguns trabalhos já demonstraram, por exemplo, diferença demetilação entre pacientes com Síndrome de Down e doença de Alzheimer e pacientes com Síndrome de Down isoladamente. Talvez o mesmo ocorra em relação às cardiopatias congênitas nesse grupo de pacientes (JONES *et al.*, 2013).

Também já foi descrito por Sailani (2013) a relação entre polimorfismo de nucleotídeo único (SNPS) e variação do número de cópias (CNV) com a presença de cardiopatias em pacientes portadores de SD. Ademais, teve por objetivo identificar a contribuição de grande número de cópias variantes (CNV) para Síndromes de Down associadas à DSAV, cujo risco na população trissômica é de 2000 vezes maior em relação à população dissômica geral. A arquitetura genética de DSAV é complexa e multifatorial na sua natureza.

Como já foi descrito, para ocorrer a SD é necessária a presença de uma região do cromossomo 21 que seja triplicada, denominada região crítica. Para ocorrer a cardiopatia congênita é necessário que outra região do cromossomo 21 também esteja triplicada. Fazendo uma intersecção entre essas duas regiões, encontramos esses genes relacionados a CC e SD, quais sejam: DSCR3, DSCR6, DSCR9, DYRK1A, HLCS, PIGP, RCAN1, RUNX1, SIM2 e TTC3.

Figure 9 - Genomic dissection of DS-associated heart defects in mice



Fonte: LIU, C. et al. , nov. 2011.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a expressão gênica de genes compreendidos entre *Tiam1* e *Kcnj6* em pacientes com Down e correlacioná-los com presença de cardiopatia congênita. Verificar se gênero é um fator de risco para cardiopatia congênita na Síndrome de Down.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Verificar alterações na área crítica do cromossomo 21 para Síndrome de Down entre pacientes com tal síndrome com e sem cardiopatia congênita;
- b) Verificar alterações compreendidas entre os genes *Tiam-Kcnj6* entre pacientes com e sem cardiopatia congênita e com Síndrome de Down;
- c) Verificar alterações no PIGP e sua relação com a presença de cardiopatia congênita em portadores de Síndrome de Down.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A síndrome de Down é a cromossopatia mais comum, ocorrendo em cerca de 1:700 nascidos vivos. Dentre as malformações associadas à essa síndrome a cardiopatia congênita tem uma incidência que varia de 40 a 60 % nos portadores dessa síndrome.

Vários estudos na literatura já foram feitos sobre isso. Porque alguns portadores dessa síndrome apresentam cardiopatia e outros não?

Tentando estudar se existiria genes específicos no cromossomo 21 que estivessem correlacionados à síndrome de Down e cardiopatia congênita, tivemos por objetivo fazer um estudo da expressão genica de determinados genes presentes no cromossomo 21 em pacientes cardiopatas e não cardiopatas.

Nesse estudo foram avaliados 32 pacientes (21 cardiopatas e 11 não cardiopatas). Nesse grupo foram estudados sete genes (DYRK1A, DSCR3, HLCS, PIGP, RCAN1, RUNX1 e TTC3), por parecerem serem mais prováveis de estarem correlacionados à cardiopatia congênita em portadores de SD. Apenas o gene DYRK1A mostrou uma diferença significativa entre os grupos, assim como o gene PIGP mostrou diferença estatisticamente significativa entre a presença ou não de Defeito do Septo Atrioventricular, apesar do número pequeno de pacientes.

Em outro estudo em que foi feito uma meta análise pra ver a diferença de generos entre os pacientes com síndrome de Down e com cardiopatia congênita. Foram revisados 578 artigos, tendo sido incluídos doze artigos na meta análise. Em conclusão observou-se um predomínio de cardiopatia congênita em especial o Defeito do Septo Atrioventricular no genero feminino em portadores da síndrome de Down.

REFERÊNCIAS

- ALABDULGADER, A. A. Congenital Heart Disease in 740 Subjects: epidemiological aspects. **Annals of Tropical Paediatrics**, [S.l.]. v. 21, n. 2, p. 111-118, jun. 2001.
- AL-BARADIE, R. et al. Duane Radial Ray Syndrome (Okihiro Syndrome) Maps to 20q13 and Results from Mutations in SALL4, a New Member of the SAL Family. **American Journal of Human Genetics**, [S.l.].v.71, n.5, p.1195-1199, 2002.
- AL-JARALLAH, A. S. Down's syndrome and the pattern of congenital heart disease in a community with high parental consanguinity. **Medical Science Monitor**, [S.l.]. v. 15, n. 8, p. 409-412, ago. 2009.
- ALMEIDA, P. **Movimento Down**. 2012. Disponível em: <<https://www.movimento.down.org.br>>. 2012. Acesso em: 21 nov. 2016.
- AMBROS, V. The functionsof animal microRNAs. **Nature**, [S.l.]. v.431,p.350-355, 2004.
- AVRAMOPOULOS, D. et al. Apolipoprotein E allele distribution in parents of Down's syndrome children. **Lancet**, [S.l.]. v. 347, p.862-865, mar. 1996.
- BARKAI, G. et al. Frequency of Down's syndrome and neural-tube defects in the same family. **Lancet**,[S.l.]. v. 361, n. 9366, p.1331-1335, abr. 2003.
- BASSON, C.T. et al. Mutations in human TBX5 cause limb and cardiac malformation in Holt–Oram syndrome. **Nature Genetics**, [S.l.]. v.15, n.1, p.30-35, jan.1997.
- BENSON, D. W. et al. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. **Journal of Clinical Investigation**, [S.l.]. v. 104, n.11, p.1567-1573, 1999.
- BERTELLI, E. C. P et al. Recentes avanços moleculares e aspectos genético-clínicos em síndrome de Down. **Revista Brasileira de Medicina**, [S.l.]. v. 62, n. 9, p. 401-408, set. 2005.
- BUCKINGHAM, M.; MEILHAC, S.; ZAFFRAN, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. **Nature ReviewsGenetics**, [S.l.]. v. 6, p. 826–835, 2005.
- BARLOW, G. M., et al. Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. **Genetics in Medicine**, [S.l.]. v. 3, n. 2, p. 91-101, mar./abr. 2001.
- BAŞPINAR, O. et al. Prevalence and distribution of children with congenital heart diseases in the central Anatolian region, Turkey. **Turkish Journal of Pediatrics**, [S.l.]. v. 48, n. 3, p. 237-243, jul./set. 2006.
- BERGSTRÖM, S. et al. Trends in Congenital Heart Defects in Infants With Down Syndrome. **Pediatrics**, [S.l.]. v. 138, n. 1, p. 1-9, jun. 2016.

BERMUDEZ, B. E. et al. Down syndrome: Prevalence and distribution of congenital heart disease in Brazil. **São Paulo Medical Journal**,[S.I.]. v. 133, n. 6, p. 521-524, nov./dez. 2015.

BIBEN, C. et al. Cardiac septal and valvular dysmorphogenesis in mice heterozygous for mutations in the homeobox gene Nkx2-5. **Circulation Research**, [S.I.]. v. 87, n. 10, p. 888-895, nov. 2000.

BISELLI, J. M. et al. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and elevated plasma concentrations of homocysteine: maternal risk factors for Down syndrome in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, [S.I.]. v. 7, n. 1, p. 33-42, 2008.

BRUNEAU, B. G. et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. **Cell**,[S.I.]. v. 106, n. 6, p. 709-21, set. 2001.

BRUNEAU, B.G. The developmental genetics of congenital heart disease. **Nature**, [S.I.]. v. 451, n. 21, p. 943-948, fev. 2008.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other tube defect. **Morbidity and Mortality Weekly Report**,[S.I.]. v. 41, n. RR-14, p. 1-7, set. 1992.

CHADEFAUX-VEKEMANS, B. et al. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism in etiology of Down syndrome. **International Pediatric Research Foundation**, [S.I.]. v. 51, n. 6, p. 766-7, jun. 2002.

CHAMPAGNE, C. R. et al. Should we mend their broken hearts?The history of cardiac repairs in children with Down syndrome. **Pediatrics**, [S.I.]. v. 134, n. 3, p. 1048-1050, dez. 2014

CHRISTIAN, J. K. et al. Reversibility of changes in nucleic acid methylation and gene expression induced in rat liver by severe dietary methyl deficiency. **Carcinogenesis**, [S.I.]. v. 14, n. 4, p. 551-557, abr. 1993.

COPPEDÈ, F. et al. Polymorphisms in folate-metabolizing genes, chromosome damage, and risk of Down syndrome in Italian women: identifications of key factors using artificial neural networks. **BMC Medical Genomics**, [S.I.]. v. 3, n. 42, p. 1-10, set. 2010.

COOPER, W. O. et al. Major congenital malformations after first-trimester exposure to ACE inhibitors. **The New England Journal of Medicine**. [S.I.]. v. 354, n. 23, p. 2443–2451, jun. 2006.

CAPONE, G. T. Down syndrome: advances in molecular biology and the neurosciences. **Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics**, [S.I.]. v. 22, n. 1, p. 40-59, fev. 2001.

DEVLIN, L.; MORRISON, P. J. Accuracy of the clinical diagnosis of Down Syndrome. **The Ulster Medical Journal**, [S.l.]. v. 73, n. 1, p. 4-12, mai. 2004.

DE RUBENS FIGUEROA, J. et al. Heart malformations in children with Down syndrome. **Revista Española de Cardiología**, [S.l.]. v. 56, n. 9, p. 894-9, set. 2003.

DIGILIO, M. C. et al. Atrioventricular canal defect without Down syndrome: a heterogeneous malformation. **American Journal of Medical Genetics**, [S.l.]. v. 85, n. 2, p. 140-6, jul. 1999.

ELMAGRPY, Z. et al. Down syndrome and congenital heart disease: why the regional difference as observed in the Libyan experience? **Cardiovascular Journal of Africa**, [S.l.]. v. 22, n. 6, p. 306-9, nov./dez. 2011.

ESPINOLA-ZAVALA, N. et al. Prevalence of Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension in Down's Syndrome: An Echocardiographic Study. **Journal of Cardiovascular Ultrasound**, [S.l.]. v. 23, n. 2, p. 72-7, jun. 2015.

FARIA, P. F. et al. Associação entre cardiopatias congênitas e infecções graves em crianças com Síndrome de Down. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, [S.l.]. v. 33, n. 1, p. 15-18, 2014.

FENECH, M. Recommended dietary allowances (RDAs) for genomic stability. **Mutation Research**, [S.l.]. v. 480-481, p. 51-54, set. 2001.

FERENCZ, C. et al. Congenital cardiovascular malformations associated with chromosome abnormalities: an epidemiologic study. **Journal of Pediatrics**, [S.l.]. v. 114, n. 1, p. 79-86, jan. 1989.

FERNANDO-MIGUEL, R.; CHEON, M. S.; LUBEC, G. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain (Part V): Overexpression of phosphatidyl-inositol-glycan class P (DSCR5). **Amino Acids**, [S.l.]. v. 26, n. 3, p. 255-261, jun. 2004.

FREEMAN, S. B. et al. Population-based study of congenital heart defects in Down syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, [S.l.]. v. 80, n. 3, p. 213-217, nov. 1998.

GARDINER, K. Gene- dosage effects in Down syndrome and trissomic mouse models. **Genome Biology**, [S.l.]. v. 5, n. 10, p. 244, 2004.

GARG, V. et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. **Nature**, [S.l.]. v. 424, n. 6947, p. 443-447, jul. 2003.

GAULDEN, M. E. Maternal age effect: the enigma of Down syndrome and other trisomic conditions. **Mutation Research**, [S.l.]. v. 296, n. 1-2, p. 69-88, Dec 1992.

GRANZOTTI, J. A. et al. Incidência de cardiopatias congênitas na Síndrome de Down. **Jornal de Pediatria**, [S.l.]. v. 71, n. 1, p. 28-30, 1991.

GRECH, V.; GATT, M. Syndromes and malformations associated with congenital heart disease in a population-based study. **International Journal of Cardiology**, [S.I.]. v. 68, n. 2, p. 151-156, fev. 1999.

GRILLO, L. B. N. et al. Mutations in the methylene-tetrahydrofolate reductase gene and Down syndrome. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.I.]. v. 18, n. 6, p. 1795-1797, nov./dez. 2002.

GURIS, D. L. et al. Dose-dependent interaction of Tbx1 and Crkl and locally aberrant RA signaling in a model of del22q11 syndrome. **Developmental Cell**, [S.I.]. v. 10, n. 1, p. 81-92, jan. 2006.

GUITTI, J. C. S. Aspectos epidemiológicos das Cardiopatias Congênitas em Londrina, Paraná. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.I.]. v. 74, n. 5, p. 395-399, 2000.

HATTORI, M. et al. The DNA sequence of human chromosome 21. **Nature**, v. 405, n. 6784, p. 311-319, mai. 2000.

HARTMAN, R. J. et al. The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: a population-based study. **Pediatric Cardiology**, v. 32, n. 8, p. 1147-57, dez. 2011.

HASSAN, I. et al. Profile and risk factors for Congenital Heart Disease. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 47, n. 3, p. 78-81, mar. 1997.

HASSOLD, T.; CHIU, D. Maternal age-specific rates of numerical chromosome abnormalities with special reference to trisomy. **Human Genetics**, v. 70, n. 1, p. 11-17, 1985.

HASSOLD, T.; SHERMAN, S. Down syndrome: Genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. **Clinical Genetics**, v. 57, n. 2, p. 95-100, fev. 2000.

HOBBS, C. A. et al. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 3, p. 623-630, set. 2000.

HOFFMAN, J. I. E.; KAPLAN, S. The Incidence of Congenital Heart Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 39, n. 12, p. 1890-900, jun. 2002.

HULTÉN, M. A. et al. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. **Molecular Cytogenetics**, v. 1, p. 21, set. 2008.

HU, T. et al. TBX1 regulates fibroblast growth factors in the anterior heart field through a reinforcing autoregulatory loop involving forkhead transcription factors. **Development**, v. 131, n. 21, p. 5491-5502, nov. 2004.

IRVINE, B.; LUO, W.; LEÓN, J. A. Congenital anomalies in Canada 2013: a perinatal health surveillance report by the Public Health Agency of Canada's Canadian

Perinatal Surveillance System. **Health Promotion and Chronic Disease Prevention in Canada**, v. 35, n. 1, p. 21-22, mar. 2015.

JAMES, S. J. et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factor for Down syndrome. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 4, p. 495-501, out. 1999.

JENKINS, K. J. et al. Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young endorsed by the American Academy of Pediatrics. **Circulation**, v. 115, n. 23, p. 2995-3014, jun. 2007.

JONES, M. J. et al. Distinct DNA methylation patterns of cognitive impairment and trisomy 21 in Down syndrome. **BMC Medical Genomics**, v. 6, p. 58, dez. 2013.

KAMP, A. et al. Genome-wide identification of mouse congenital heart disease loci. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 16, p. 3105-3113, ago. 2010.

KOSHIBA-TAEUCHI, K. et al. Cooperative and antagonistic interactions between SALL4 e TBX5 pattern the mouse limb and heart. **Nature Genetics**, v. 38, n. 2, p. 175-183, fev. 2006.

KIM, M. A. et al. Prevalence of congenital heart defects associated with Down syndrome in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 29, n. 11, p. 1544-1549, nov. 2014.

KIRK, E. P. et al. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 2, p. 280-291, ago. 2007.

KOLA, I.; HERTZOG, P. J. Animal models in the study of the biological function of genes on human chromosome 21 and their role in the pathophysiology of Down syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 6, n. 10, p. 1713-1727, 1997.

KORBEL, J. O. et al. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 29, p. 12031-12306, jul. 2009.

KORENBERG, J. R. et al. Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. **American Journal of Human Genetics**, v. 47, n. 2, p. 236-246, ago. 1990.

LANA-ELOLA, E. et al. Genetic dissection of Down syndrome-associated congenital heart defects using a new mouse mapping panel. **eLife**, v. 5, s./p., jan. 2016.

- LEJEUNE, L.; GAUTIER, M.; TURPIN, R. Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 248, p. 1771-1722,
- LI, Q.Y. et al. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury(T) gene family. **Nature Genetics**, v. 15, n. 1, p. 21-29, jan. 1997.
- LI, Z. et al. Duplication of the entire 22.9Mb human chromosome 21 syntenic region on mouse chromosome 16 causes cardiovascular and gastrointestinal abnormalities. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 11, p. 1359-1366, jun. 2007.
- LI, H. et al. Genetic modifiers predisposing to congenital heart disease in the sensitized Down syndrome population. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 5, n. 3, p. 301-308, jun. 2012.
- LINDSAY, E. A. et al. TBX1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. **Nature**, v. 410, p. 97-101, mar. 2001.
- LIU, C. et al. Genetic analysis of Down syndrome-associated heart defects in mice. **Human Genetics**, v. 130, n. 5, p. 623-32, nov. 2011.
- LIU, S. et al. Environmental risk factors for congenital heart disease in the Shandong Peninsula, China: a hospital-based case-control study. **Journal of Epidemiology**, v. 19, n. 3, p. 122-130, 2009.
- LIU, C. S.; CHIANG, H. C.; CHEN H. W. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism determines the plasma homocysteine-lowering effect of large-dose folic acid supplementation in patients with cardiovascular disease. **Nutrition**, v. 20, n. 11-12, p. 974-978, nov./dez. 2004.
- MASLEN, C. L. et al. CRELD1 Mutations contribute to the occurrence of cardiac atrioventricular septal defects in Down Syndrome. **American Journal of Medical Genetics**, v. 140, n. 22, p. 2501-2505, nov. 2006.
- MERSCHER, S. et al. TBX1 is responsible for cardiovascular defects in velo-cardio-facial/DiGeorge syndrome. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 619-629, fev. 2001.
- MILLER, S. P. et al. Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 1928-1938, 2007.
- MOKHTAR, M. M. et al. Cytogenetic profile of Down syndrome in Alexandria, Egypt. **East Mediterrean Health Journal**, v. 9, n. 1-2, p. 37-44, jan./mar. 2003.
- MONTGOMERY, R. L. et al. Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. **Genes & Development**, v. 21, n. 14, p. 1790-1802, jul. 2007.
- MOON, A. M. et al. Crkl deficiency disrupts Fgf8 signaling in a mouse model of 22q11 deletion syndromes. **Developmental Cell**, v. 10, n. 1, p. 71-80, jan. 2006.

- MORSY, M. M. et al. The spectrum of congenital heart diseases in down syndrome. A retrospective study from Northwest Saudi Arabia. **Saudi Medical Journal**, v. 37, n. 7, p. 767-772, jul. 2016.
- MOURATO, F. A.; VILLACHAN, L. R.; MATTOS, S. S. Prevalence and profile of congenital heart disease and pulmonary hypertension in Down syndrome in a pediatric cardiology service. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 32, n. 2, p. 159-63, jun. 2014.
- MUNCKLE, N. et al. Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240 like gene in patients with congenital heart defects (transposition of the great arteries). **Circulation**, v. 108, n. 23, p. 2843-2850, dez. 2003.
- NARAYANAN, D. L. et al. Cardiac spectrum, cytogenetic analysis and thyroid profile of 418 children with Down syndrome from South India: a cross-sectional study. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 81, n. 6, p. 547-551, jun. 2014.
- NAZARI, P. et al. Prevalence of Congenital Heart Disease: A Single Center Experience in Southwestern of Iran. **Global Journal of Health Science**, v. 8, n. 10, p. 56421, mar. 2016.
- NISLI, K. et al. Congenital heart disease in children with Down's syndrome: Turkish experience of 13 years. **Acta Cardiologica**, v. 63, n. 5, p. 585-589, out. 2008.
- O'LEARY, V. B. et al. MTRR and MTHFR polymorphism: link to Down syndrome? **American Journal of Medical Genetics**, v. 107, n. 2, p. 151-5, jan. 2002.
- OLIVEIRA, G. S.; GOMES, M. História da Síndrome de Down. **Projeto Gama Down**. Disponível em: <<https://espacodown.wordpress.com/historia-da-sindrome-de-down/>>. Acesso em: 21 jun. 2017.
- OLSON, E. N. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. **Science**, v. 313, p. 1922-1927, 2006.
- PIERPONT, M. E. et al. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge : a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee , Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. **Circulation**, v. 115, p. 3015-3038, 2007.
- PINTO, F. F. et al. Down's syndrome: different distribution of congenital heart diseases between the sexes. **International Journal of Cardiology**, v. 27, n. 2, p. 175-8, mai. 1990.
- POGRIBNA, M. et al. Homocysteine metabolism in children with Down syndrome: in vitro modulation. **American Journal of Human Genetics**, v. 69, n. 1, p. 88-95, jul. 2001.
- PRALL, O. J. W. et al. An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls second heart field progenitor specification and proliferation. **Cell**, v. 128, n. 5, p. 947-959, mar. 2007.

RAMACHANDRAN D. et al. Contribution of copy variation to Down Syndrome associated atrioventricular septal defects. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 7, p. 554-560, jul. 2015.

_____. Genome-Wide Association Study of Down Syndrome-Associated Atrioventricular Septal Defects. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 5, n. 10, p. 1961-71, jul. 2015.

RAY, J. G. et al. Prevalence of trisomy 21 following folic acid food fortification. **American Journal of Medical Genetics**, v. 120, p. 309-313, 2003.

ROIZEN, N. J.; PATTERSON, D. Down's syndrome. **Lancet**, v. 361, p. 1281-89, 2003.

ROBINSON, S. W. et al. Missense in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 1047-1052, 2003.

SAILANI, M. R. et al. The complex SNP and CNV genetic architecture of the increased risk of congenital heart defects in Down syndrome. **Genome Research**, v. 23, n. 9, p. 1410-1421, set. 2013.

SAITO, Y. et al. The developmental and aging changes of Down's syndrome cell adhesion molecule expression in normal Down's syndrome brains. **Acta Neuropathologica**, v.100, p. 654-664, 2000.

SANDRI, C. et al. Heart morphogenesis is not affected by overexpression of the Sh3bgr gene mapping to the Down syndrome heart critical region. **Human Genetics**, v. 114, n. 5, p. 517-519, abr. 2004.

SATODA, M. et al. Mutations in TFAP2B cause Char syndrome ,a familial form of patent ductus arteriosus. **Nature Genetics**, v. 25, p. 42-46, 2000.

SCOTT, C.; THAME, M. The Incidence of Cardiac Lesions among Children with Down's Syndrome in Jamaica - A Prospective Study. **West Indian Medical Journal**, v. 63, n. 7, p. 693-697, dez. 2014.

SCHOTT, J. J. et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. **Science**, v. 281, p. 108-111, 1998.

SCHOENEBECK, J. J.; KEEGAN, B. R.; YELLOW, D. Vessel and blood specification override cardiac potential in anterior mesoderm. **Developmental Cell**, v. 13, p. 254-267, 2007.

SHAFFER, L. G. et al. A molecular genetic approach to the identification of isochromosomes of chromosome 21. **Human Genetics**, v. 86, n. 4, p. 375-382, fev. 1991.

SHAFFER L.G. et al. ; Pattern origin determination in thirty de novo Robertsonian translocations. **American Journal of Medical Genetics** 1992;43:957-963

SHERMAN, S. L. et al. Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. **Human Molecular Genetics**, v. 3, n. 9, p. 1529-1535, set. 1994.

_____. Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, n. 3, p. 608-620, set. 1991.

SHETH, J. J.; SHETH, F. J. Gene polymorphism and folate metabolism: a maternal risk for Down syndrome. **Indian Pediatrics**, v. 40, p. 115-123, 2003.

SHIBUYA, K. et al. Isolation of two novel genes, DSCR5 and DSCR6, from Down syndrome critical region on human chromosome 21q22.2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, n. 3, p. 693-698, mai. 2000.

SRIVASTAVA, D. Making or breaking the heart:from lineage determination to morphogenesis of myocardial cells. **Cell**, v. 126, p. 1037-1048, 2006.

STEIN, Z.; STEIN, W.; SUSSER, M. Attrition of trisomies as a maternal screening device. An explanation of the association of trisomy 21 with maternal age. **Lancet**,v. 1, n. 8487, p. 944-947, abr. 1986.

STOLL, C. et al. Associated congenital anomalies among cases with Down syndrome. **European Journal of Medical Genetics**,v. 58, n. 12, p. 674-80, Dec 2015. ISSN 1878-0849.

STUPPIA, L. et al. C677T mutation in the 5,10- MTHFR gene and risk of Down syndrome in Italy. **European Journal of Human Genetics**, v. 10, p. 388-390, 2002.

SUNDER-PIASMANN, G.; FLOTH, A.; FODINGER, M. Hyperhomocysteinemia in organ transplantation. **Current Opinion in Urology**, v. 10, n. 2, p. 87-94, mar. 2000.

VAN ROOIJ, E.; OLSON, E. N. Micro RNAs: powerfull new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets.**The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 2369-2376, 2007.

VARELA D. **Síndrome de Down**. 2016. Disponível em:
<<https://www.drauziovarella.com.br/crianca-2/sindrome-de-down>, acesso em 01/10/2016. Acesso em: 21 nov. 2016

VIGO, C. A. G. **Estudo citogenético-clínico da trissomia parcial do cromossomo 21**. 1997. 189 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1997.

WALD, N. J. et al. Quantifying the effect of folic acid. **Lancet**,v. 358, n. 9298, p. 2069-73, dez. 2001.

WARREN, A. C. et al. Evidence for reduced recombination on the non-disjoined chromosome 21 in Down syndrome. **Science**, v. 237, p. 652-654, 1987.

WEIJERMAN, M. E. et al. Prevalence of congenital heart defects and persistent pulmonary hypertension of the neonate with Down syndrome. **European Journal of Pediatrics**, v. 169, n. 10, p. 1195-9, out. 2010.

WEISMANN, C. G.; GELB, B. D. The genetics of congenital heart disease : a review of recent developments . **Current Opinion in Cardiology**, v. 22, n. 3, p. 200-206, mai. 2007.

WELLS, G. L. et al. Congenital heart disease in infants with Down's syndrome. **The Southern Medical Journal**, v. 87, n. 7, p. 724-727, jul. 1994.

WU, S.M. et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. **Cell**, v. 127, p. 1137-1150, 2006.

XU, H. et al. TBX1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. **Development**, v. 131, p. 3217-3227, 2004.

YAGI, H. et al. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. **Lancet**, v.362, p. 1366-1373, 2003.

ZHAO, Y.; SAMAL, E.; SRIVASTAVA, D. Serum response factor regulates a muscle-specific micro-RNA that targets Hands2 during cardiogenesis. **Nature**, v. 436, p. 214-220, 2005.

ZHAO, Y. et al. Dysregulation of cardiogenesis ,cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. **Cell**, v.129, p. 303-317, 2007.

ZHENG, C. J.; BYERS, B. Oocyte selection: a new model for the maternal-age dependence of Down syndrome. **Human Genetics**, v. 90, n. 1-2, p. 1-6, set./out. 1992.

APÊNDICE - Publicações

PUBLICAÇÃO I – *GENDER DIFFERENCES IN THE PREVALENCE OF CONGENITAL HEART DISEASE IN DOWN'S SYNDROME: A BRIEF META-ANALYSIS.*

Em processo de revisão na “BMC Medical Genetics”

Fator de impacto: 3.219

MGTC-D-17-00148

Gender differences in the prevalence of congenital heart disease in Down's syndrome: a brief meta-analysis.

Tereza Diogenes; Felipe Mourato, M.D.; José Lima Filho; Sandra Mattos
BMC Medical Genetics

Dear DrMourato,

Thank you for submitting your manuscript 'Gender differences in the prevalence of congenital heart disease in Down's syndrome: a brief meta-analysis.' to BMC Medical Genetics.

The submission id is: MGTC-D-17-00148

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following website:

<http://mgtc.edmgr.com/>

If you have forgotten your username or password please use the "Send Login Details" link to get your login information. For security reasons, your password will be reset.

Best wishes,

Editorial Office

BMC Medical Genetics

<https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/>

Title page:

Title: Gender differences in the prevalence of congenital heart disease in Down's syndrome: a brief meta-analysis.

Authors:

1. Tereza Cristina Pinheiro Diogenes (MD)^{1,2}: tereza.diogenes@hotmail.com;
2. Felipe Alves Mourato (MD)^{1,2}: felipe.a.mourato@gmail.com;
3. José Luiz de Lima Filho (MD)²: joseluiz60@mac.com;
4. Sandra da Silva Mattos (MD)^{1,2}: ssmattos@gmail.com;

Institution:

1. Círculo do Coração de Pernambuco, Recife-Pernambuco-Brazil.
2. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife-Pernambuco-Brazil.

Corresponding author: Felipe Alves Mourato, UCMF, Av. Governador Agamenon Magalhães, 4760, Paissandu, UCMF, CEP 52010-902, PE, Brasil. Telephone: +55 81 81314848. E-Mail: felipe.a.mourato@gmail.com

Conflict of interest: None.

Abstract:

Background: Down's syndrome (DS) affects one per 700 live births and congenital heart disease (CHD) occurs in 40-60% of these patients. Contributing factors to the association between DS and CHD are being unraveled. Gender could be one of them. Methods: We performed a meta-analysis of CHD prevalence in DS, separated by gender. Three search engines were used and 578 articles were reviewed. Twelve articles were included. Results: Quantitative analysis showed a higher prevalence of CHD, particularly atrioventricular septal defects (AVSD), in female patients. No differences were found in others forms of CHD. Conclusion: CHD, particularly AVSD, are more common in the female gender of Down's syndrome patients.

Keywords: Down, gender, meta-analysis, systematic review, congenital heart disease.

Background

Down's Syndrome (DS) affects one in each 700 live births^[1,2]. Its incidence is directly related to maternal age and has been increasing throughout the world^[3]. CHD occurs in 40-60% of DS cases^[4] and constitutes an important prognostic factor in these patients. Numerous factors may contribute to the development of different cardiac malformations in DS. Some are being unraveled recently in animal models^[5]. However, until now, there has been few reports looking into gender as a potential factor associated to the genesis of CHD in DS.

It is well known that DS is a risk factor for CHD. In these patients, the most frequent forms of CHD are atrioventricular septal defects (AVSD), ventricular septal defects (VSD) and atrial septal defects (ASD)^[6,7]. The reported prevalence of these defects varies among studies^[8-14]. This could reflect inherent characteristics of the studied populations, such a higher frequency of genetic variances that predispose to the presence of AVSD^[15].

In this context, gender could influence the presence and type of CHD. Some studies point out a higher predominance of male gender in patients with DS^[16,17], but studies carried out in pediatric cardiology centers point to a large number of female patients with DS and CHD^[16,18]. This paradox could be explained by a higher incidence of CHD in female patients with DS, leading to higher mortality rates earlier in life, although many other unknown factors could be at play to influence these findings.

The purpose of this study was to compare the prevalence of CHD and DS between genders through a meta-analysis and systematic review.

Methods

Eligibility criteria

Studies that described the prevalence of CHD in DS by gender were included. Studies where this information was not available were excluded.

Information sources

The search for articles was performed using the following data engines: Medline (accessed via Pubmed), Scopus and Scielo. Terms included were those used by Mesh for Medline and Scopus, and the descriptors of Health Sciences (Decs) for Scielo. Terms included: "prevalence", "Down syndrome" and "congenital heart disease". Supplemental file 1 contains the full search strategy. Articles, published until August 30th, 2016, were included. Additional search was performed in the

bibliographic references of the researched articles. Authors from selected papers with incomplete data were contacted by e-mail. Complete articles were obtained and analyzed by authors.

Selection of studies and data extraction

Two authors (Mattos and Mourato) evaluated the title and abstracts of the identified articles. The complete texts of the selected abstracts were obtained and posteriorly analyzed by the same authors. After this initial analysis, each selected article's information were added to a database. The authors agreed that discordances about the inclusion of an article should be sorted by consensus. However, there were no disagreements. Duplicated studies were excluded.

Data analysis

Gender prevalence was calculated by dividing the total number of DS patients with CHD by the total number of DS for each gender. The prevalence of AVSD, ASD, VSD, PDA (patent ductus arteriosus) and TOF (tetralogy of Fallot) were calculated dividing the number of DS with each cardiac defect by the total number of patients with DS in the study. A combined data analysis was performed to identify the Odds Ratio between genders, being the female gender considered a risk factor. The confidence intervals and the size of the pondered effect were calculated and the meta-analysis graphs built using the MedCalc v 16.8 software.

Heterogeneity between studies was calculated using the I^2 , which describes the variability, not related to sample errors, in the studied population. An I^2 beyond 75% is consistent with high heterogeneity. As such, the meta-analysis should be carried out using the fixed model if the heterogeneity analysis resulted in number constantly inferior to 75% and using a random effects model if it resulted in a number equal or superior to 75% (i.e. considering the I^2 confidence interval). The Mantel-Haenszel method was used for calculating the weighted summary Odds ratio under the fixed effects model. Subsequently, heterogeneity statistics were incorporated to calculate the summary Odds ratio under the random effects model (in accordance to I^2 statistics).

Results

From the engine database sources, 595 abstracts were selected. Initial review identified 35 for full text analysis. From this latter group, only four fulfilled the eligibility criteria and were included in the meta-analysis^[18-21]. Direct contact with the authors

of the remaining 31 articles made it possible to include another eight studies [12,13,16,22–26], totalizing 12 articles for analysis. In total, 20,465 patients with DS (11,165 male and 9,300 female) were included in the meta-analysis. Figure 1 demonstrates articles selection's process and progress, according to the PRISMA method. Raw data were included in the supplementary file 2.

After the meta-analysis, it was observed that female gender is a risk factor for the presence of CHD in DS (Figure 2). The same occurs if we consider AVSD alone (Figure 2). However, when VSD, ASD, PDA and TOF (figures 3 and 4) are considered separately, there is no difference among genders. All analyses utilized the random effects' model.

Discussion

The frequency of CHD in this systematic analysis is in accordance with other studies involving DS [8,10–12,14,16,20,24,27–31]. Few studies fulfilled the inclusion criteria for this meta-analysis. The main problem was the lack of information about the prevalence of CHD in DS, according to gender. Some studies mentioned an association between the female gender and a higher prevalence of CHD [16,18]. However, these findings were not highlighted subsequently.

Various theories exist to explain the origins of CHD in DS. Some authors suggest that the presence of certain variants in specific genes could be the underlying cause for CHD in this population [5,15]. Others suggest a correlation with the presence of single nucleotides polymorphism (SNPs) and Copy Number Variations (CNVs) [32]. And there are also ethnical genetic differences, which could play a role in the difference incidence of CHD among these patients [16,20]. In this context, differences between gender, with their specific genetic charges, could also exert an influence over the determining factors for CHD in this population.

In this meta-analysis, we observed a higher frequency of CHD in the female gender (OR: 1.514, IC: 1.207 to 1.899). This finding suggests that this gender is more susceptible to CHD in DS. Another finding that supports this conclusion is that AVSD, alone, also showed a higher frequency in female gender (OR: 1.376, IC: 1.206 to 1.570); and this form of CHD is more prevalent in DS than the general population [33]. TOF, on the other hand, was more frequent in males, but without statistical significance (OR: 0.782, IC: 0.597 to 1.023). These differences might be explained by a potential different susceptibility of gender to different CHD pathogenic

pathways (for example, DSAV is correlated with extracellular matrix anomalies and TOF with ectomesenchymal tissue migration anomalies^[34]). Other possible explanation would be that males with DS die before birth or before the timing of these studies (with similar a incidence early in life, but a lower prevalence later). Unfortunately, these hypotheses cannot be evaluated in this meta-analysis.

This meta-analysis had some limitations. First, it included only articles from three databases (Scielo, Pubmed and Scopus). This can lead to no identification of minor or locally published studies, whose inclusion could alter some of the findings presented herein (such as TOF being equally prevalent among genders in DS). Second, the populations included in this revision are rather different among themselves. For example, Morris et al. included data from 20 European Countries, and of both live births and abortions after the 20th week^[21]. It is known that the prevalence of CHD, particularly complex malformations, is higher in abortions^[35]. Conversely, Pinto et al. and Jaiyesimi et al. included children followed in health centers, which can overestimate the prevalence of CHD^[18,20]. Vis et al included only adults with DS, which can reduce the prevalence of complex heart diseases (due to higher mortality)^[19]. Third, it was not possible perform an analysis of ethnicity separated by gender, which could provide more insights on the origin of CHD in DS. Despite such limitations, however, it was possible to show a clear trend of a higher prevalence of CHD (more specifically of AVSD) in the female population with DS.

Conclusion

This brief meta-analysis demonstrated higher prevalence of congenital heart disease, particularly AVSD, on female patients with Down syndrome.

Acknowledgement

None.

Availability of Data and Materials

The articles included in this meta-analysis can be found in the respective journals. More information at the bibliography section. The raw data is included in the supplementary file 2.

Competing Interest

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' Contribution

FM carried out the statistical analysis and part of the articles selection. SM carried out part of the articles selection and revised the manuscript critically for important intellectual content. TD participated in the design of the study and drafted the manuscript. JF revised the manuscript critically for important intellectual content and participated in its design and coordination.

Bibliography

1. Nadal M, Moreno S, Pritchard M, Preciado MA, Estivill X, Ramos-Arroyo MA. Down syndrome: characterisation of a case with partial trisomy of chromosome 21 owing to a paternal balanced translocation (15;21) (q26;q22.1) by FISH. *J. Med. Genet.* 1997;34:50–4.
2. Cuckle HS. Primary prevention of Down's syndrome. *Int. J. Med. Sci.* 2005;93.
3. Vilas Boas LT, Albernaz EP, Costa RG. Prevalence of congenital heart defects in patients with Down syndrome in the municipality of Pelotas, Brazil. *J. Pediatr. (Rio. J).* 2009;85:403–7.
4. Laursen HB. Congenital heart disease in Down's syndrome. *Br. Heart J.* 1976;38:32–8.
5. Li H, Cherry S, Klinedinst D, DeLeon V, Redig J, Reshey B, et al. Genetic modifiers predisposing to congenital heart disease in the sensitized Down syndrome population. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2012;5:301–8.
6. Mikkelsen M, Poulsen H, Nielsen KG. Incidence, survival, and mortality in Down syndrome in Denmark. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 1990;7:75–8.
7. Tubman TR, Shields MD, Craig BG, Mulholland HC, Nevin NC. Congenital heart disease in Down's syndrome: two year prospective early screening study. *BMJ Br. Med. J.* 1991;302:1425–7.
8. Alabdulgader AAA. Congenital heart disease in 740 subjects: epidemiological aspects. *Ann. Trop. Paediatr.* 2001;21:111–8.
9. Nisli K, Oner N, Candan S, Kayserili H, Tansel T, Tireli E, et al. Congenital heart disease in children with Down's syndrome: Turkish experience of 13 years. *ActaCardiol.* 2008;63:585–9.

10. Hartman RJ, Rasmussen SA, Botto LD, Riehle-Colarusso T, Martin CL, Cragan JD, et al. The contribution of chromosomal abnormalities to congenital heart defects: A population-based study. *Pediatr. Cardiol.* 2011;32:1147–57.
11. Al-Jarallah AS. Down's syndrome and the pattern of congenital heart disease in a community with high parental consanguinity. *Med. Sci. Monit.* 2009;15:CR409-12.
12. Bermudez BEBV, Medeiros SL, Bermudez MB, Novadzki IM, Magdalena NIR. Down syndrome: Prevalence and distribution of congenital heart disease in Brazil. *São Paulo Med. J. Rev. Paul. Med.* 2015;133:521–4.
13. Scott C, Thame M. The Incidence of Cardiac Lesion among Children with Down's Syndrome in Jamaica - a Prospective Study. *West Indian Med. J.* 2014;63.
14. Başpınar O, Karaaslan S, Oran B, Baysal T, Elmaci AM, Yorulmaz A. Prevalence and distribution of children with congenital heart diseases in the central Anatolian region, Turkey. *Turk. J. Pediatr.* 2006;48:237–43.
15. Robinson SW, Morris CD, Goldmuntz E, Reller MD, Jones M a, Steiner RD, et al. Missense mutations in CRELD1 are associated with cardiac atrioventricular septal defects. *Am. J. Hum. Genet.* 2003;72:1047–52.
16. Freeman SB, Bean LH, Allen EG, Tinker SW, Locke AE, Druschel C, et al. Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. *Genet. Med.* 2008;10:173–80.
17. Mourato FA, Villachan LRR, Mattos S da S. Prevalence and profile of congenital heart disease and pulmonary hypertension in Down syndrome in a pediatric cardiology service. *Rev. Paul. Pediatr.* 2014;32:159–63.
18. Pinto FF, Nunes L, Ferraz F, Sampayo F. Down's syndrome: different distribution of congenital heart diseases between the sexes. *Int. J. Cardiol.* 1990;27:175–8.
19. Vis JC, de Bruin-Bon RH, Bouma BJ, Huisman S a, Imschoot L, van den Brink K, et al. Congenital heart defects are under-recognised in adult patients with Down's syndrome. *Heart.* 2010;96:1480–4.
20. Jaiyesimi O, Baichoo V. Cardiovascular malformations in Omani Arab children with Down's syndrome. *Cardiol. Young.* 2007;17:166–71.
21. Morris JK, Garne E, Wellesley D, Addor MC, Arriola L, Barisic I, et al. Major congenital anomalies in babies born with Down syndrome: A EUROCAT population-based registry study. *Am. J. Med. Genet. Part A.* 2014;164:2979–86.

22. Kim MA, Lee YS un, Yee NH ee, Choi JS oo, Choi JY un, Seo K. Prevalence of congenital heart defects associated with Down syndrome in Korea. *J. Korean Med. Sci.* 2014;29:1544–9.
23. Vida VL, Barnoya J, Larrazabal LA, Gaitan G, de Marian Garcia F, Castaneda AR. Congenital cardiac disease in children with Down's syndrome in Guatemala. *Cardiol. Young.* 2005;15:286–90.
24. Bergstro m S, Carr H, Petersson G, Stephansson O, Bonamy A-KE, Dahlstro m A, et al. Trends in Congenital Heart Defects in Infants With Down Syndrome. *Pediatrics.* 2016;138.
25. Narayanan DL, Yesodharan D, Kappanayil M, Kuthirolly S, Thampi M V., Hamza Z, et al. Cardiac spectrum, cytogenetic analysis and thyroid profile of 418 children with Down syndrome from South India: A cross-sectional study. *Indian J. Pediatr.* 2014;81:547–51.
26. Källén B, Mastroiacovo P, Robert E. Major congenital malformations in Down syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1996;65:160–6.
27. De Rubens Figueroa, J. , Mangana, B. P., Hach, J. L. P., Jiménez, C. C., Urbina RC. Hearth malformations in children with Down syndrome. *Rev EspCardiol.* 2003;56:894–9.
28. Elmagrpy Z, Rayania., Shah a., Habas E, Aburawi EH. Down syndrome and congenital heart disease : why the regional difference as observed in the Libyan experience? *Cardiovasc. J. Afr.* 2011;22:306–9.
29. Espinola-Zavaleta N, Soto ME, Romero-Gonzalez A, Gomez-Puente LDC, Munoz-Castellanos L, Gopal AS, et al. Prevalence of congenital heart disease and pulmonary hypertension in down´s syndrome: An echocardiographic study. *J. Cardiovasc. Ultrasound.* 2015;23:72–7.
30. Grech V, Gatt M. Syndromes and malformations associated with congenital heart disease in a population-based study. *Int. J. Cardiol.* 1999;68:151–6.
31. Irvine B, Luo W, Leo JA. Congenital Anomalies in Canada 2013: A Perinatal Health Surveillance Report by the Public Health Agency of Canada's Canadian Perinatal Surveillance System. *Heal. Promot. Chronic Dis. Prev. Canada.* 2015;35:2013–4.

32. Sailani MR, Makrythanasis P, Valsesia A, Santoni FA, Deutsch S, Popadin K, et al. The complex SNP and CNV genetic architecture of the increased risk of congenital heart defects in Down syndrome. *Genome Res.* 2013;23:1410–21.
33. Pierpont ME, Basson CT, Benson DW, Gelb BD, Giglia TM, Goldmuntz E, et al. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation.* 2007;115:3015–38.
34. Croti U, Mattos S, Pinto Jr V, Aiello V, Moreira V. *Genética das Cardiopatias Congênitas. Cardiologia e Cirurgia cardiovascular pediátrica.* 20. São Paulo: Roca; 2012. p. 47–56.
35. Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth MP. Study of Down syndrome in 238,942 consecutive births. *Ann. génétique.* 1998;41:44–51.

List of Abbreviations

ASD - atrial septal defects
 AVSD - atrioventricular septal defects
 CNV – Copy Number Variations
 CHD – Congenital Heart Disease
 Decs - descriptors of Health Sciences
 DS – Down's syndrome
 OR – Odds Ratio
 PDA – Patent Ductus Arteriosus
 SNPs – Single-Nucleotide Polymorphism
 TOF – Tetralogy of Fallot
 VSD - ventricular septal defects

Figure 1: Flow chart of eligible studies for meta-analysis.

Figure 2: Meta-analysis of all CHD and DSAV by gender in Down syndrome

- Legend: IC-Interval of confidence. OR-Odds Ratio. A – OR meta-analysis of all CHD in Down syndrome by gender. B – OR meta-analysis of AVSD in Down syndrome by gender.

Figure 3: Meta-analysis of ASD and VSD by gender in Down syndrome

- Legend: IC-Interval of confidence. OR-Odds Ratio. A – OR meta-analysis of ASD in Down syndrome by gender. B – OR meta-analysis of VSD in Down syndrome by gender.

Figure 4: Meta-analysis of PDA and TOF by gender in Down syndrome

- Legend: IC-Interval of confidence. OR-Odds Ratio. A – OR meta-analysis of PDA in Down syndrome by gender. B – OR meta-analysis of TOF in Down syndrome by gender.

Declarations:

1. Ethics approval and consent to participate:
 - a. Not applicable
2. Consent for publication:
 - a. Not applicable
3. Availability of data and material:
 - a. The articles included in this meta-analysis can be found in the respective journals. More information at the bibliography section.
4. Competing interests:
 - a. The authors declares that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.
5. Funding:
 - a. None
6. Authors' contributions:
 - a. FM carried out the statistical analysis and part of the articles selection. SM carried out part of the articles selection and revised the manuscript critically for important intellectual content. TD participated in the design of the study and drafted the manuscript. JF revised the manuscript critically for important intellectual content and participated in its design and coordination.
7. Acknowledgements:
 - a. None

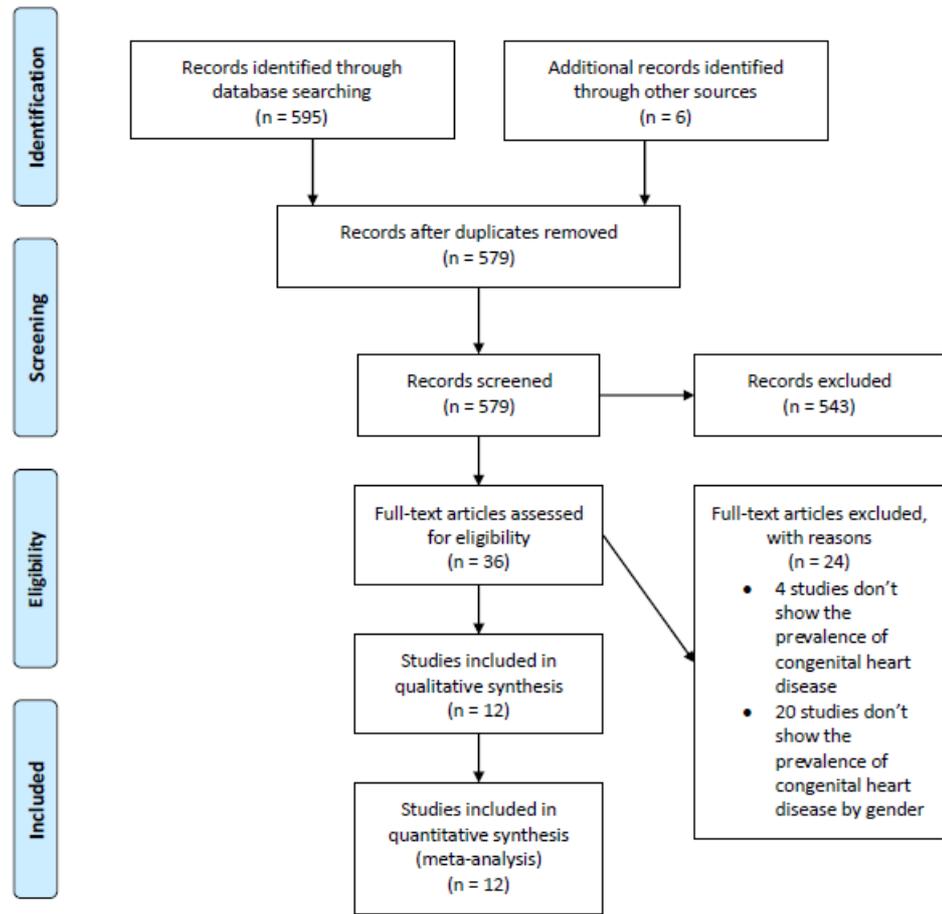


Figure 1 -

Figure 2 -

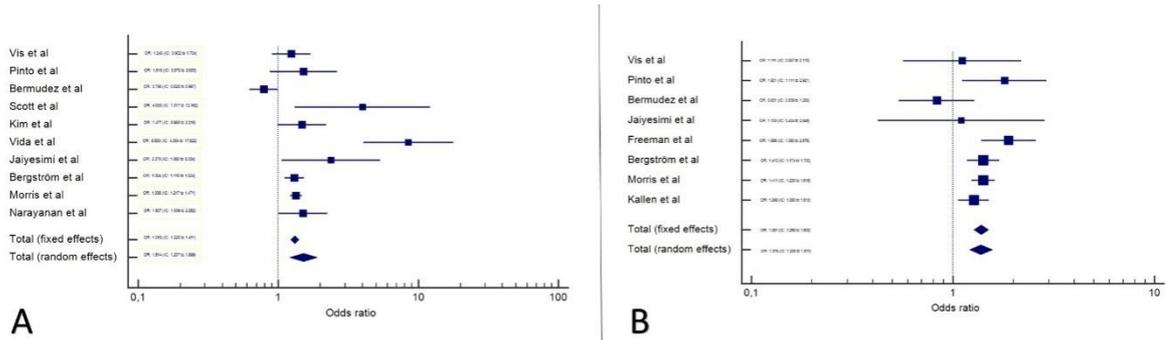


Figure 3 -

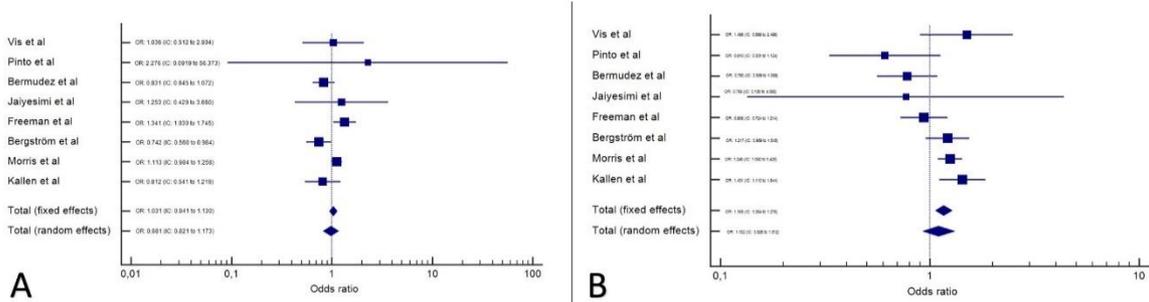
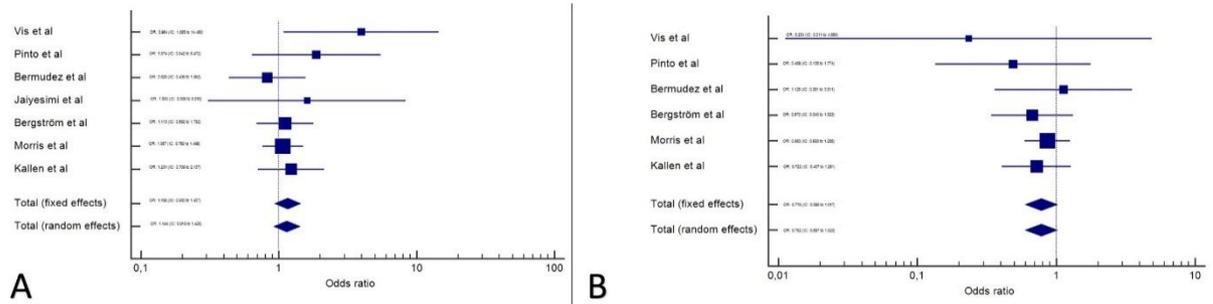


Figure 4:



Supplementary file 1: Search strategy (Pubmed)

((((((((((epidemiology[Title/Abstract] OR cohort study[Title/Abstract]) OR cohort analysis[Title/Abstract]) OR cross sectional study[Title/Abstract]) OR cross sectional analysis[Title/Abstract]) OR observational analysis[Title/Abstract]) OR prevalence[Title/Abstract]) OR frequency[Title/Abstract]))) AND (((down syndrome[Title/Abstract]) OR mongolism[Title/Abstract]) OR trisomy 21[Title/Abstract]) OR down's syndrome[Title/Abstract])) AND (((((congenital heart defects[Title/Abstract]) OR malformation of heart[Title/Abstract]) OR heart abnormalities[Title/Abstract]) OR congenital heart disease[Title/Abstract]) OR heart abnormality[Title/Abstract]) OR congenital heart defect[Title/Abstract])

Associated with Down Syndrome in Korea																
Congenital cardiac disease in children with Down's syndrome in Guatemala	Vida et al	2005	120	129	70	119	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Cardiovascular malformations in Omani Arab children with Down's syndrome	Jaiyesimiet al	2007	67	43	33	30	9	7	4	2	13	9	3	3	*	*
Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart	Freeman et al	2008	787	682	*	*	130	143	158	130	75	113	*	*	*	*
Trends in Congenital Heart Defects in Infants With Down Syndrome	Bergström et al	2016	1435	1153	727	660	139	85	157	150	284	298	37	33	24	13
Major Congenital Anomalies in Babies Born With Down Syndrome: A EUROCAT Population-Based Registry Study	Morris et al	2014	3905	3120	1579	1485	665	580	518	500	471	506	74	63	68	47

Cardiac Spectrum, Cytogenetic Analysis and Thyroid Profile of 418 Children with Down Syndrome from South India: A Cross-sectional Study	Narayanan et al	2013	235	183	134	122	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Major Congenital Malformations in Down Syndrome	Kallen et al	1996	3015	2552	*	*	58	40	115	137	268	281	25	26	31	19

Legend: *- Unavailable data. CHD- Congenital heart disease. ASD – atrial septal defect. VSD – Ventricular Septal Defect. AVSD – Atrioventricular septal defect. PDA- patent ductus arteriosus. TOF – Tetralogy of Fallot.

PUBLICAÇÃO 2 – *DYRK1A AND PIGP ARE MORE EXPRESSED IN DOWN SYNDROME WITH CHD AND AVSD*

Submetido ao “BMJ Medical Genetics”.

Fator de impacto: 5.65

16-Jun-2017

Dr. Mourato:

Your manuscript entitled "Down syndrome: *DYRK1A* can be overexpressed in congenital heart disease and *PIGP* in atrioventricular septal defect" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Medical Genetics.

Your manuscript ID is jmedgenet-2017-104871.

Please, note a number of institutions have taken out Open Access Memberships with the BMJ Journals, which either covers the cost of open access publishing for authors

at participating institutes, or allows authors to receive a discount on the open access fee.

Please, visit our open access page: <http://journals.bmj.com/site/authors/openaccess.xhtml> to see a full list of participating institutions, find out if you are eligible and how to obtain your discount code.

Please, check that all author names are correctly entered as this will be the name displayed in any PubMed search.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jmedgenet>.

We are constantly trying to find ways of improving the peer review system and continually monitor processes and methods by including article submissions and reviews in our research. If you do not wish your paper or review entered into our peer review research programme, please let us know by emailing jmg@bmjgroup.com as soon as possible.

Any individuals listed as co-authors on this manuscript are copied into this submission confirmation email. If you believe that you have received this email in error, please contact the Editorial Office.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Medical Genetics.

Respectfully,

Editor Journal of Medical Genetics

P.S.: What did you think of the article submission process?

At BMJ, we constantly strive to improve our services for authors and value your feedback. We'd really like to hear your opinions as part of our on-going efforts, and we'd be grateful if could take a few minutes to fill out our short survey. Your responses will, of course, remain confidential and you won't be identified in any results.

Please click on this link to access the survey: https://bmj.az1.qualtrics.com/SE/?SID=SV_6rNsVdbXkXH2WmV

We are constantly trying to find ways of improving our peer review system and continually monitor processes and methods by including article submissions and reviewers' reports in our research. If you do not wish your paper or review entered into a our peer review research programme, please let us know by emailing papersadmin@bmj.com as soon as possible.

Title page:

Title: Down syndrome: DYRK1A can be overexpressed in congenital heart disease and PIGP in atrioventricularseptal defect

Running title: DYRK1A, PIGP and Down Syndrome CHD

Authors:

1. Tereza Cristina Pinheiro Diogenes (MD)^{1,2}: tereza.diogenes@hotmail.com;
2. Felipe Alves Mourato (MD)^{1,2}: felipe.a.mourato@gmail.com;
3. Maria de Fátima Senra Cardoso (PhD)²: mcardoso@prospecmol.org
4. KatyanaKaline Silva Ferreira (MSc.)²: kferreira@prospecmol.org
5. Natália Didier Nunes Moser (MD)¹: natidnmoser@gmail.com;
6. DanyellyBruneskaGondim Martins (PhD)^{2,3}: bruneska@prospecmol.org;
7. Sandra da Silva Mattos (MD)^{1,2}: ssmattos@gmail.com;
8. José Luiz de Lima Filho (MD)^{2,3}: joseluiz60@me.com .

Institution:

1. Círculo do Coração de Pernambuco, Recife-Pernambuco-Brazil.
2. Laboratório de ImunopatologiaKeizoAsami - LIKA, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brazil.
3. Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Brazil.

Corresponding author: Felipe AlvesMourato, UCMF, Av. Governador Agamenon Magalhães, 4760, Paissandu, UCMF, CEP 52010-902, PE, Brasil. Telefone: +55 81 81314848. E-Mail: felipe.a.mourato@gmail.com

Conflict of interest: None.

Down's syndrome (DS) occurs in one per 700 livebirths. Congenital heart disease (CHD) occurs in 40-60% of patients with DS. Many studies point out that a region of chromosome 21 is responsible for the expression of DS phenotype (Down syndrome critical region – DSCR), including the presence of CHD. The present study compare

the expression of seven genes (DYRK1A, DSCR3, HLCS, PIGP, RCAN1, RUNX1 and TTC3, all of them present in DSCR) between DS patients with and without CHD. It was found that the gene DYRK1A can be overexpressed in patients with DS with all forms of CHD and PIGP can be overexpressed in DS with atrioventricularseptal defects.

Keywords: gene expression; Down syndrome; DYRK1A; congenital heart disease.

Communication

Down syndrome (DS) is the most common chromosomal abnormality, occurring in one per 700 livebirths[1]. Its phenotype includes various malformations, but the presence of congenital heart disease (CHD) is one of the most important prognostic factors in this syndrome[2]. CHD occurs in 40-60% of all DS cases, demonstrating an incomplete penetrance, with a high number of atrioventricularseptal defects (AVSD) among them[3].

The origin of DS phenotype (and consequently the origin of CHD in this syndrome) is not fully understood. Some authors pointed out that an additional region of chromosome 21 must be present in the genome to trigger the DS phenotype (the Down syndrome critical region – DSCR)[4]. Subsequently, other authors suggested that a minor region must be present to trigger CHD in DS (most specifically the region between Tiam1-Kcnj6)[5].

We performed a literature review of genes between Tiam1-Kcnj6 that are correlated with CHD and found 32 genes. We selected the seven who seemed the most likely candidates (DYRK1A, DSCR3, HLCS, PIGP, RCAN1, RUNX1 and TTC3) and analyzed their expression in patients with DS. We invited patients with DS from a pediatric cardiology Network to provide blood samples after their parents provided an informed consent. They were divided in two groups (with and without CHD) based on clinical and echocardiographic diagnoses. A second analysis was performed to identify patients with and without AVSD. The gene expression of these seven genes was obtained through real time PCR, using QuantiNova kits (Qiagen, USA) following manufacturer instruction. RPLP0 gene was used as reference and data evaluated according to described methodology[6]. The Mann-Whitney test was used to access differences between groups and $p < 0.05$ was considered significant.

A total of 32 patients participated of this study (21 with and 11 without CHD). The determination of relative expression used the non-CHD group as reference, showing

that AVSD group was up-regulated for RCAN1, DYRK1A, HLCS and PIGP genes. The DYRK1A gene was also found up-regulated in non-AVSD group, without significance (Figure 1C). Related to RUNX1, DSCR3 and TTC3 genes, it was not possible to determine a pattern of expression according to AVSD occurrence. The PIGP gene showed a different expression profile between both groups (Figure 1G), reaching a *p*-value of 0.07. The AVSD relative expression observed using non-AVSD as reference showed that only PIGP was up-regulated, while the other genes were found both up- and down-regulated among the patients.

The DYRK1A gene encodes a type of dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase and participates in various cellular processes. The overexpression of DYRK1A in Down syndrome was previously described, and also observed in this study. The majority of studies correlated it with mental impairment and an increased risk of Alzheimer's disease in those patients[7]. It is also described that both the underexpression and overexpression of this gene can lead to a NRSF(neuron-restrictive silencer factor)suppression[7]. In turn, NRSF regulates the expression of multiple fetal cardiac genes, and transgenic mice expressing a dominant-negative NRSF mutant exhibited cardiomyopathy[8]. It was not possible to determine the role of DYRK1A in AVSD development. Perhaps, the imbalance of DYRK1A expression can lead to CHD by dysregulating the fetal cardiac genetic program in a susceptible organism.

On the other hand, the PIGP expression showed a trend to be associated with ASVD (the most typical cardiac defect in DS). The PIGP is highly expressed in the heart and encodes an enzyme involved in the first step of glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis, which serves to anchor proteins to the cell surface[9]. Interestingly, the pathogenetics of AVSD involves anomalies in the extracellular matrix[10]. A possible explanation is that the overexpression of PIGP can produce an imbalance of anchor proteins in the heart cell surface, leading to anomalies in extracellular matrix and, consequently, to AVSD. However, specific studies need to be performed to confirm such hypothesis.

In conclusion, this communication shows that DYRK1A is more expressed in DS patients with CHD, but cannot be related to AVSD. Furthermore, PIGP is more expressed in DS with AVSD. Possible explanations to these findings are: 1- that DYRK1A overexpression can lead to a higher risk to all CHD by producing an

imbalance in the fetal heart genetic program and 2- that PIGP overexpression can lead to specific extracellular matrix anomalies that are present during the development of AVSD. However, further studies with increased number of patients are necessary to confirm such hypothesis.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to all members of the Pediatric Cardiology Network in Northeast Brazil, without whose efforts this work would not have been possible.

Bibliography

- 1 Pueschel SM. Clinical aspects of Down syndrome from infancy to adulthood. *Am J Med Genet Suppl* 1990;**7**:52–6.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2149974>
- 2 Stoll C, Alembik Y, Dott B, *et al.* Study of Down syndrome in 238,942 consecutive births. *Ann génétique* 1998;**41**:44–51.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9599651> (accessed 5 Nov 2013).
- 3 Stoll C, Dott B, Alembik Y, *et al.* Associated congenital anomalies among cases with Down syndrome. *Eur J Med Genet* 2015;**58**:674–80.
doi:10.1016/j.ejmg.2015.11.003
- 4 Shapiro BL. The Down syndrome critical region. *J Neural Transm Suppl* 1999;**57**:41–60.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10666667>
- 5 Liu C, Morishima M, Yu T, *et al.* Genetic analysis of Down syndrome-associated heart defects in mice. *Hum Genet* 2011;**130**:623–32.
doi:10.1007/s00439-011-0980-2
- 6 Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 2008;**3**:1101–8.
doi:10.1038/nprot.2008.73
- 7 Canzonetta C, Mulligan C, Deutsch S, *et al.* DYRK1A-Dosage Imbalance Perturbs NRSF/REST Levels, Deregulating Pluripotency and Embryonic Stem Cell Fate in Down Syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;**83**:388–400. doi:10.1016/j.ajhg.2008.08.012
- 8 Kuwahara K. NRSF regulates the fetal cardiac gene program and maintains normal cardiac structure and function. *EMBO J* 2003;**22**:6310–21.
doi:10.1093/emboj/cdg601

9 Choi D-K, Suzuki Y, Yoshimura S, *et al.* Molecular cloning and characterization of a gene expressed in mouse developing tongue, mDscr5 gene, a homolog of human DSCR5 (Down syndrome Critical Region gene 5). *Mamm Genome* 2001;**12**:347–51. doi:10.1007/s003350010283

10 Cernach M. Genética das Cardiopatias Congênitas. In: Croti UA, Mattos SS, Pinto Jr. VC, *et al.*, eds. *Cardiologia e cirurgia cardiovascular pediátrica*. São Paulo: : Roca 2012. 47–56.

Figure 1 - Gene expression in Down syndrome: A-G divided by the presence of CHD and H by the presence of AVSD

