



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ABORDAGEM MOLECULAR DA LEUCEMIA
TRANSITÓRIA E DA LEUCEMIA MIELOIDE, ASSOCIADAS
À SÍNDROME DE DOWN**

Lílian Barros Queiroz

Brasília

2012



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ABORDAGEM MOLECULAR DA LEUCEMIA
TRANSITÓRIA E DA LEUCEMIA MIELOIDE, ASSOCIADAS
À SÍNDROME DE DOWN**

Lílian Barros Queiroz

Orientadora: Prof.^a Dra. Íris Ferrari

Coorientador: Prof. Dr. Cezar Martins de Sá (*in memorian*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas.

Brasília

2012

“Os ideais que iluminaram
meu caminho e sempre me deram
coragem para enfrentar a vida foram:
a verdade, a bondade e a beleza.”

Albert Einstein

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

À minha pequena **Natália**, que me acompanhou no laboratório durante nove meses de gestação e hoje é a maior alegria e realização da minha vida.

À minha **mãe** querida, amiga confidente que me fortalece, compreende e ilumina o meu caminho; pelo amor incondicional e por sempre acreditar nos meus sonhos.

Ao meu esposo **Giácomo**, companheiro e cúmplice, por estar sempre ao meu lado com amor, compreensão e carinho.

AGRADECIMENTOS

À querida professora e orientadora **Dra Íris Ferrari** por me ter ensinado a perseverar e enfrentar desafios e limitações com apoio incondicional; pela inestimável colaboração na efetivação deste trabalho; pela análise citogenética dos pacientes e preciosas correções; pelos conselhos e encorajamento em todos os momentos, em especial, pelo caminho que me fez trilhar desde o meu primeiro estágio em seu laboratório de genética. É com enorme gratidão, carinho e orgulho que externo meus agradecimentos pelo meu crescimento profissional e pessoal. Tê-la como Mestre renomada, fascinada pela ciência, lutando e dividindo seus conhecimentos, vencendo obstáculos, recai sobre mim maior responsabilidade em honrar tudo aquilo que, generosamente, me foi passado durante o mestrado e doutorado.

Ao admirável professor e coorientador **Dr. Cezar Martins de Sá** (*in memoriam*), por ter me recebido em seu laboratório com apoio incondicional. Pela enorme colaboração na efetivação deste trabalho; pelo rico aprendizado e estímulo contínuo às atividades de pesquisa, ao desprendimento e encorajamento. Você deixou saudades e exemplo que nunca me esquecerei de simplicidade, perseverança e brilhantismo.

À Professora **Dra. Beatriz Dolabela de Lima**, pela dedicação e competência na padronização das técnicas moleculares; pelos sábios ensinamentos; pela grandiosa colaboração na efetivação deste trabalho; pela disponibilidade em me ajudar sempre; pelo suporte em todos os experimentos, correções e figuras. E por ter se tornado uma grande referência e amizade na minha vida. Sem o seu apoio seria muito difícil chegar até aqui.

À Professora **Dra. Juliana Mazzeu**, pela incansável luta em prol da pesquisa; pelas valiosas discussões, contribuições, correções; pela enorme paciência em me ter ensinado a analisar os eletroferogramas e, pela grande amizade que esse convívio me proporcionou. A minha sincera gratidão.

À **Dra. Ísis Magalhães**, por ter possibilitado o campo de pesquisa desta tese; pela contribuição, incessante dedicação e empenho na continuidade do projeto do *GATAI*, que visa a oportunidade de um diagnóstico mais preciso aos pacientes pediátricos com síndrome de Down e leucemia.

À **Dra. Mara Santos** e ao **Dr. José Carlos Córdoba** pelo testemunho profissional; pela contribuição na minha formação profissional. Em especial a você Dra. Mara pela importante colaboração na análise citogenética.

À **Dra. Terezinha Cardoso** por me permitir a realização deste trabalho em seus pacientes do Hospital de Apoio de Brasília, foi de fundamental relevância.

Ao **Dr. Carlos Alberto**, por ter me aconselhado a procurar um estágio na área de genética, no laboratório da Dra Íris, sua dica e seu nome foram primordiais para que eu chegasse até aqui.

Ao voltar os olhos para os quatro anos de estudos que se passaram, sinto-me imensamente grata pela vida e pelas pessoas iluminadas, que me proporcionaram tantas experiências e tantos aprendizados. Manifesto aqui meus agradecimentos a essas pessoas e a todos que contribuíram e me nortearam na busca e no alcance deste meu objetivo.

A **Deus**, por tudo, por ser a luz do meu caminho, e pela minha família, razão de ser da minha vida.

Aos meus queridos pais, **José Maria e Lucinha**, por mostrar a importância do estudo para a vida, por todo apoio, carinho e amor. A eles minha eterna gratidão.

A minha querida filha, **Natália**, minha pequena-grande companheira, por transformar a minha vida, por todas as alegrias que me proporciona e pelo amor com que me nutre.

Ao meu esposo, **Giácomo**, pelo apoio durante todos esses anos; pela ajuda imprescindível em fazer a Natália dormir todas as noites para que eu pudesse terminar esse trabalho.

Aos meus irmãos, **Renard e Luciano**, meus grandes amigos, que mesmo de tão longe sempre me apoiaram e se orgulharam das minhas conquistas; pelo carinho e esforço de tornar real um sonho buscado.

À toda minha amada **família, tios, primos e sogros**, que contribuíram com pensamentos e atitudes positivas que me encorajaram no desenvolvimento deste trabalho. Em especial à querida **tia Lourdinha**, pela dedicação incondicional e imenso amor, presença constante e marcante em todos os momentos da minha vida.

Às minhas queridas e saudosas **Vó e tia Aninha**, pelo imenso amor dedicado e exemplos de vida deixados.

Às minhas queridas afilhadas **Carol e Beatriz**, pela imensa amizade, pelos momentos divertidos e únicos.

À todos os amigos do Laboratório de Biologia do Gene: **Ricardo Camargo, Renata Ferreira, Fabiana Brandão, Stênia Magalhães e Samuel Mandacaru** pelo tempo em que estivemos juntos compartilhando de um mesmo ideal. Meu carinho e saudade. Em especial, ao **Ricardo Camargo** pela grande ajuda experimental. À **Lilium Maçaneiro** pela amizade,

longas conversas e pelo carinho nesses anos. À **Marinez**, pela preparação dos materiais, organização do laboratório e amizade.

À **Débora Rabelo**, grande amiga, pela admiração, incentivo e exemplo de garra e coragem.

Ao **Rodrigo Coutinho**, pelo exemplo de determinação e coragem, pela amizade verdadeira e pelo enorme carinho desde a época do mestrado.

À **Patrícia Fritsch** que me concedeu este projeto magnífico, o qual me encorajou a ingressar nesse doutorado e, pela amizade iniciada.

Aos amigos **Ana Beatriz, Alessandra Baptista, Thenille do Carmo, Rita de Cássia, Olívia Laquis, Larissa, Flávia, Pollyana e Marcos** pelo carinho e amizade nesses anos.

À toda equipe do Laboratório de Genética da UnB e do Hospital de Apoio de Brasília pelo exemplo de competência profissional e, por me ajudar a requisitar os pacientes com síndrome de Down. À Dra. **Raquel Toscano**, pela valiosa ajuda na colheita de sangue dos bebês com suspeita de síndrome de Down e pela análise do esfregaço de sangue que contribuíram para o diagnóstico dos pacientes. À **Nilza de Jesus**, grande amiga e sempre disposta a servir, pela colaboração e arte em bandamento GTG das amostras dos pacientes. Ao **Raony**, pela presteza constante, me auxiliando nas fichas de atendimento.

Aos **Pacientes** e seus **Familiares**, por terem permitido a utilização de suas amostras, o que foi essencial para a execução deste estudo. Além disso, nos mostrou a necessidade de implantação de uma unidade de diagnóstico molecular para que todos os recém-nascidos com síndrome de Down possam ter acesso ao melhor diagnóstico, proporcionando assim um melhor prognóstico da doença.

À **Pós-Graduação em Ciências Médicas** e à **CAPES** pelo apoio e oportunidade em realizar esse doutorado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE GRÁFICOS.....	iv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO.....	1
1. Hematopoiese normal e leucêmica	1
2. Leucemogênese na síndrome de Down	3
3. Gene <i>GATA1</i>	4
3.1. Família GATA	5
3.2. Mutações no <i>GATA1</i> da LT e LM-SD	6
4. Mutações no gene <i>GATA1</i> em pacientes com anemia diseritropoiética	11
4.1. Estudos experimentais de <i>gata1</i> em camundongos	13
4.2. Interação proteína-proteína	15
5. Outras mutações associadas à LT e LM-SD	16
6. Trissomia do cromossomo 21 e suas implicações	18
6.1. Efeitos da trissomia do cromossomo 21 na hematopoiese fetal	19
6.2. Expressão gênica da trissomia do cromossomo 21	20
6.3. Oncogenes candidatos leucêmicos do cromossomo 21	20
6.4. miRNAs codificados pelo cromossomo 21	22
7. Doença residual mínima (DRM)	24
8. Métodos de diagnóstico para LT e LM-SD	25
OBJETIVOS	28
CASUÍSTICA E MÉTODOS	29
1. Pacientes	29
1.1. Pacientes com suspeita clínica de anemia diseritropoiética sem SD	30
2. Análise citogenética.....	30
2.1. Obtenção de metáfases a partir do cultivo de leucócitos de sangue periférico (SP) e de células de medula óssea (MO)	30
3. Análise Molecular.....	32
3.1. Extração de DNA a partir de linfócitos	33

3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	33
3.3. PCR das amostras dos pacientes com suspeita clínica de anemia diseritropoiética	33
3.4. Eletroforese de DNA	34
3.5. Sequenciamento direto.....	34
3.5.1. Sequenciamento direto das amostras dos pacientes com suspeita clínica de anemia diseritropoiética	34
4. Clonagem dos fragmentos de PCR.....	35
4.1. Preparo de células competentes de <i>Escherichia coli</i>	35
4.2. Ligação e transformação de <i>E.coli</i>	36
4.3. Extração de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	36
4.4. Análise de perfil de restrição	37
5. Doença residual mínima (DRM)	37
6. Imunofenotipagem	38
RESULTADOS	40
1. Análise citogenética.....	41
2. Análise molecular por PCR	42
3. Sequenciamento direto.....	43
4. Análise da clonagem dos fragmentos de PCR.....	46
5. Doença residual mínima (DRM)	47
6. Análise dos pacientes com suspeita de anemia diseritropoiética.....	51
7. Análise imunofenotípica (IF).....	52
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
APÊNDICES	70
APÊNDICE I - Artigo publicado.....	70
APÊNDICE II - Capítulo publicado	79
APÊNDICE III - Material e Métodos	93
APÊNDICE IV- Registro dos pacientes com diagnóstico de síndrome de Down.....	97
APÊNDICE V - Registro dos pacientes com suspeita de anemia diseritropoiética	101
APÊNDICE VI - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa UnB / HUB	102
APÊNDICE VII - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FEPECS.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Modelos para expressão das isoformas de GATA1.....	6
Figura 2- Diagrama esquemático de <i>GATA1</i> mostrando as posições e tipos de mutações encontradas em amostras de LT e LM-SD.	7
Figura 3- Modelo <i>multi-step</i> da leucemogênese na SD.....	9
Figura 4 - Esquema do vetor pGEM-T utilizado para clonagem.	35
Figura 5 - Cariótipo com trissomia constitucional do cromossomo 21 numa metáfase obtida de cultura de linfócitos.	41
Figura 6 - Análise citogenética de aspirado de medula óssea do paciente 2..	42
Figura 7 - Análise da PCR de 14 pacientes com SD em gel de agarose a 1,5%..	42
Figura 8 - Mutação detectada no paciente 2 com LM-SD.....	43
Figura 9 - Análise do eletroferograma do paciente 1 ao diagnóstico de LT..	44
Figura 10 - Análise do eletroferograma do paciente 2 ao diagnóstico de LM-SD.....	45
Figura 11 - Mutação detectada no paciente 3 interrompeu a leitura de <i>GATA1</i> e resultou na introdução de um códon de parada prematura depois do códon Thr53.....	45
Figura 12- Mutação detectada no paciente 4 interrompeu a leitura de <i>GATA1</i> e resultou na introdução de um códon de parada prematura depois do códon Asp20.	46
Figura 13 - Análises de restrição dos pacientes 1 e 2 visualizadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.....	47
Figura 14 - Monitoramento da remissão espontânea do paciente 1 com LT.....	48
Figura 15 - Monitoramento da resposta terapêutica do paciente 2 com LM-SD.	49
Figura 16 - <i>Nested</i> PCR da eluição da terceira banda do paciente 2.....	50
Figura 17- Análise de PCR do exon 4 de pacientes com suspeita de anemia diseritropoiética em gel de agarose a 1,5%.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Alterações genéticas identificadas em leucemias associadas à SD.....	17
Tabela 2 - Frequências absoluta e relativa dos pacientes com SD menores que 4 meses de vida segundo o sexo.	40
Tabela 3 - Mutações no exon 2 do <i>GATA1</i> em pacientes com SD e LT ou LM-SD.....	44
Tabela 4 - Resultados da caracterização imunofenotípica.....	53
Tabela 5 - Tabela dos primers utilizados nas reações de PCR.	95

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição da frequência absoluta de pacientes com SD, segundo sua faixa etária.	40
Gráfico 2 - Estimativa da massa molecular das três bandas reveladas pela PCR em gel de agarose no paciente 2 pela migração da corrida.	49
Gráfico 3 - Estimativa da massa molecular das duas bandas reveladas pelo <i>nested</i> PCR em gel de agarose no paciente 2 pela migração da corrida.	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AD	Domínio de ativação N-terminal
CF	Domínio dedo de zinco na região C-terminal
CBS	Cistationina beta-sintetase
DHPLC	Cromatografia líquida desnaturante de altaperformance
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Mistura de desoxinucleotídeos 5'-trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DRM	Doença residual mínima
DSCR	Região Crítica da síndrome de Down
FAB	Franco-Americano-Britânico
FOG	Amigo de <i>GATA1</i>
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
HAB	Hospital de Apoio de Brasília
HRM	<i>High resolution melting</i>
Hsa21	Cromossomo 21
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IF	Imunofenotipagem
LLA	Leucemia linfoide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMA-M7	Leucemia megacarioblástica aguda
LM-SD	Leucemia Mieloide da síndrome de Down
LT	Leucemia transitória
MO	Medula óssea
mRNA	RNA mensageiro
NF	Domínio dedo de zinco na região N-terminal
NOHP	Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica da Secretaria de Saúde do DF
NUGEN	Núcleo de Genética do Hospital de Apoio de Brasília
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real
RN	Recém-nascido
SD	Síndrome de Down
SP	Sangue periférico

RESUMO

A condição do paciente com síndrome de Down (SD) desperta um interesse especial nos estudos sobre leucemogênese, não só pela leucemia transitória (LT) que acomete cerca de 4% dos recém-nascidos (RNs) com SD, mas também pela alta incidência de leucemia mieloide da SD (LM-SD), normalmente rara na população pediátrica geral. A relação patogênica dessas condições foi determinada pela presença de mutações somáticas no gene *GATA1* que impede a síntese da proteína GATA1, mas não a síntese da proteína truncada, GATA1s. Os objetivos desse trabalho foram: (a) identificar a presença de mutações somáticas no exon 2 do gene *GATA1* em uma coorte de RNs e crianças com SD nos dois tipos de proliferação clonal, LT e LM-SD, visando a consolidá-lo como marcador molecular no monitoramento da doença residual mínima (DRM); (b) padronizar o protocolo de técnicas moleculares para o diagnóstico precoce da LT e LM-SD; (c) determinar a incidência de LT nesse grupo amostral do Distrito Federal; e (d) detectar a presença de mutações nos exons 2 e 4 do gene *GATA1* em um paciente com suspeita clínica de anemia diseritropoiética, sem SD e em sua família. Deste modo, a triagem para a detecção de mutações no exon 2 do *GATA1* foi realizada em 198 amostras de 169 pacientes com SD, sendo que as 29 amostras restantes corresponderam a seguimento em diferentes datas de coleta. A frequência de mutações detectada foi de 2,36%, quatro de 169 pacientes (dois com LT e os outros dois com LM-SD). Todas essas mutações encontradas foram inéditas: p.Tyr63fs66p; p.Ala62fs13; Thr53fs82; p.Asp20fs117. A citogenética identificou alteração clonal (47,XY,del(5)(p13~14),del(6)(q?),+21c[12]/47,XY,+21c[46]) em um paciente com LM-SD. Para dois pacientes, um com LT e outro com LM-DS, demonstramos que suas mutações podem ser utilizadas como marcadores estáveis no monitoramento da DRM. A análise da amostra do paciente com suspeita clínica de anemia diseritropoiética sem SD e de sua família, não revelou mutação nos exons 2 e 4 do *GATA1*. Podemos destacar a padronização efetiva das técnicas moleculares para mutações no *GATA1* em pacientes com SD. Isso possibilita uma implantação de unidade de diagnóstico molecular para que todos os RNs com SD sejam rastreados em avaliações clínicas para a detecção precoce de mutações no *GATA1*, complementando assim a rotina hematológica e citogenética. Além disso, haverá a determinação da frequência real de LT, além de monitorar a DRM na remissão espontânea da LT e na resposta terapêutica em caso de progressão para LM-SD.

ABSTRACT

The condition of patients with Down syndrome (DS) awakens a particular interest in studies on leukemogenesis, not only by transient leukemia (TL) that affects about 4% of newborns (NBs) with DS, but also by the high incidence of myeloid leukemia of DS (ML-DS), rare in the general pediatric population. The pathogenetic relationship of these conditions was determined by the presence of somatic mutations in *GATA1* gene that prevents GATA1 protein synthesis, but not the expression of the truncated protein, GATA1s. The aims of this study were: (a) to identify the presence of somatic mutations in exon 2 of *GATA1* gene in a cohort of NBs and children with DS in two types of clonal proliferation, TL and ML-DS, in order to consolidate it as a molecular marker for monitoring the minimal residual disease (MRD), (b) to standardize the protocol of molecular techniques for early diagnosis of TL and ML-SD; (c) to determine the incidence of TL in this group of the Federal District, (d) to detect the presence of mutations in exons 2 and 4 of the *GATA1* gene in one patient with clinical suspicion of dyserythropoietic anemia, without DS and his family. Therefore, screening for *GATA1* mutations in exon 2 was performed on 198 samples from 169 patients with DS, and the 29 remaining samples corresponded to follow up on different sampling dates. The frequency detected was 2.36%, four of 169 patients (two with TL and the others two with ML-DS). All these mutations were novel: p.Tyr63fs66p; p.Ala62fs13; Thr53fs82; p.Asp20fs117. Cytogenetic analysis disclosed a clonal rearrangement (47,XY,del(5)(p13~14),del(6)(q?),+21C[12]/47,XY,+21c[46]) in a patient with ML-DS. In two patients with TL and ML-DS we demonstrated that their mutations can be used as a stable marker for monitoring MRD. No mutations in *GATA1* were identified in the patient with dyserythropoietic anemia and his family. We highlight the effective standardization of molecular techniques for *GATA1* mutation screening in DS patients. This allows deployment of a molecular diagnostic unit for all newborns with DS to be screened for early detection of *GATA1* mutations, thus complementing the hematological and cytogenetic routine. Hence, the real frequency of TL could be determined as well as monitoring of MRD in spontaneous remission of TL and therapeutic response in case of progression to ML-DS.

INTRODUÇÃO

Síndrome de Down (SD) ou trissomia constitucional do cromossomo 21 (Hsa21) é a aneuploidia humana mais comum causada pela presença total ou parcial do Hsa21, com incidência de 1 em 700 nascimentos (ZIPURSKY et al., 1997). Crianças com SD frequentemente apresentam alterações no sistema hematopoiético, como macrocitose, anormalidades na contagem de plaquetas e aumento da ocorrência de leucemia (LANGE, 2000; MALINGE et al., 2009).

1. Hematopoiese normal e leucêmica

A hematopoiese se inicia durante a vida intrauterina, cronologicamente, no mesoderma extraembrionário do saco vitelínico, fígado e medula óssea (MO). Caracteriza-se por ser um processo complexo regulado pela expressão coordenada de vários fatores de transcrição, que são ativados ou inibidos no decorrer da hematopoiese, garantindo a maturação da população celular de forma apropriada e em níveis constantes. A expressão desregulada desses fatores e o consequente desequilíbrio de suas funções parecem preceder a transformação maligna (SHIMIZU et al., 2008; TENEN, 2003).

Genes envolvidos na proliferação e diferenciação de células normais podem atuar na indução ou progressão de um tumor maligno quando sua estrutura ou expressão é alterada. Deste modo, a ativação de proto-oncogenes e mutações em genes supressores tumorais que regulam o ciclo celular parecem estar envolvidas na patogênese das leucemias (OLIVEIRA; NETO, 2004).

As leucemias são neoplasias hematológicas originadas a partir de uma única célula da linhagem hematopoiética que sofreu alterações genéticas em determinada fase ao longo de sua via de diferenciação. Elas são resultantes de um processo anormal, não controlado, da diferenciação e proliferação clonal derivadas de uma linhagem celular pluripotente, que substituem progressivamente as células hematopoiéticas normais por células do clone leucêmico (GOLONI et al., 2001; OLIVEIRA; NETO, 2004). Habitualmente a MO está infiltrada por células leucêmicas no momento do diagnóstico, assim como também podem ser detectadas hepato e esplenomegalia (HENRY, 1999).

Um acúmulo de células indiferenciadas e imaturas denominadas blastos encontra-se no sangue periférico (SP) e na MO. Isto ocorre porque a célula que origina o clone

neoplásico é um precursor cuja mutação causa perda da capacidade maturativa. Esses blastos podem ser de origem linfóide ou mieloide. Essas duas categorias citológicas são posteriormente divididas dependendo do nível de diferenciação do tipo celular predominante (GOLONI et al., 2001). Considera-se que esse processo, de proliferação clonal, tenha se originado pela mutação somática de uma única célula dentro de uma população menor de células progenitoras (HAFERLACH et al., 2005).

As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular e o grau de maturação das células. As leucemias agudas (LA), que compreendem a leucemia mieloide aguda (LMA) e a leucemia linfoblástica aguda (LLA), são doenças progressivas e agressivas caracterizadas por rápida proliferação clonal acompanhada de bloqueio maturativo (anaplasia) variável, o que possibilita a existência de diferentes subtipos de leucemias. Já nas leucemias crônicas (LC) a proliferação clonal não está associada inicialmente a um bloqueio maturativo. Assim, a população celular diferencia-se e amadurece, embora haja graus variáveis de displasia, o que compromete funcionalmente a população celular afetada. Sua progressão é lenta, porém seguida de transformação tardiamente em leucemia aguda (OLIVEIRA; NETO, 2004).

A heterogeneidade entre as LAs e as diferenças de comportamento biológico entre pacientes motivaram o estabelecimento de uma classificação. Em 1976, o grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs a classificação para esse grupo de doenças com base em aspectos morfológicos, grau de maturação e presença de componentes específicos. Assim, identificaram seis diferentes subtipos de LMA (M1 a M6), possibilitando dessa forma a comparação de programas terapêuticos a serem utilizados para o tratamento de tais doenças. Mais tarde, houve revisão da classificação, tendo sido acrescentados dois novos subtipos (M0 e M7) (BENNETT et al., 1976; 1985; 1991).

Na maioria das leucemias, uma alteração cromossômica, gênica ou epigenética é responsável e/ou necessária para o desenvolvimento de transformação maligna. Entretanto, essa alteração pode ser seguida por mudanças cromossômicas secundárias, que têm importante papel no comportamento subsequente da doença. As anormalidades cromossômicas secundárias podem ativar oncogenes ou eliminar genes supressores de tumor não envolvidos no primeiro evento cromossômico e resultar em uma cascata de ativações oncogênicas transitórias ou permanentes, portanto sendo responsáveis pela progressão da neoplasia. Outras alterações randômicas são também encontradas na

constituição cromossômica devido à instabilidade das células neoplásicas. Assim, o acúmulo de várias anormalidades genéticas ou *hits* caracterizam a evolução da célula cancerígena (IZRAELI et al., 2007).

2. Leucemogênese na síndrome de Down

Crianças com SD têm maior probabilidade de desenvolverem LA, o que sugere que a trissomia do cromossomo 21 contribui diretamente e funcionalmente para a transformação maligna de células hematopoiéticas. Entretanto, a SD não é uma síndrome de instabilidade genômica clássica, pois apresenta menor predisposição ao desenvolvimento de cânceres, em particular tumores sólidos, incluindo o neuroblastoma e o tumor de Wilms (HASLE, 2001; MALINGE et al., 2009). Possivelmente, isso se deve à cooperação de um subconjunto de genes trissômicos: *Erg*, *Ets2*, *Adamts1* e *Dscr1* (MALINGE et al., 2012).

Recém-nascidos (RNs) com SD possuem risco de 10 a 20 vezes maior de desenvolverem LA quando comparados com as taxas de incidências de leucemias na população infantil (HITZLER et al., 2003). A história natural da LA em crianças com SD apresenta uma intrigante relação entre a idade de aparecimento da doença e o subtipo celular da leucemia. Crianças com SD com idade superior a quatro anos apresentam predominantemente LLA, cuja incidência é aproximadamente 20 vezes maior que na população em geral, enquanto portadores da SD com idade inferior a três anos têm maior probabilidade de desenvolverem leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M7), cuja incidência é 500 vezes maior que em crianças sem SD (HITZLER et al., 2003; LANGE, 2000). A LMA-M7 da SD é reconhecida hoje como uma entidade biológica distinta com características próprias, associação com mielodisplasia e megacariopoiese anormal, sendo portanto classificada como leucemia mieloide da SD (LM-SD) (HASLE et al., 2003).

A condição do paciente com SD desperta interesse especial nos estudos sobre leucemogênese, não só pela alta prevalência de LM-SD, normalmente rara na população pediátrica em geral, mas também por outra forma curiosa de proliferação clonal denominada doença mieloproliferativa transitória (DMT) ou leucemia transitória (LT) que acomete cerca de 4% dos RNs com SD. A LT é uma doença clonal caracterizada pelo acúmulo de megacarioblastos imaturos no fígado fetal e no sangue periférico que podem progredir para LM-SD, indistinguível de um quadro de leucemia aguda (GAMIS;

HILDEN, 2002; HITZLER et al., 2003; PINE et al., 2007; RAINIS et al., 2003; ZIPURSKY, 2003), o que contribui para a hipótese de que a LM-SD é derivada da LT (LANGE, 2000).

Em contraste com a LM-SD, a LT geralmente evolui com remissão espontânea nos primeiros três meses de vida e por isso é considerada uma síndrome pré-leucêmica. Essa remissão espontânea ocorre em torno de 60% dos casos de LT (KANEZAKI et al., 2010; MASSEY et al., 2006). No entanto, aproximadamente 20% das crianças diagnosticadas com LT desenvolverão LM-SD em até dois ou três anos da remissão espontânea da LT, a qual não regride sem quimioterapia (CABELOF et al, 2009; MUNDSCHAU et al, 2003).

O mecanismo biológico da remissão espontânea na LT ainda não está claro (IZRAELI et al., 2007; RAINIS et al., 2003). Holt et al. (2002) demonstraram que a atividade da telomerase encontrava-se diminuída no começo da LT e sugeriu que esta deficiência poderia explicar sua regressão espontânea. Contudo, os fatores subjacentes da transformação "benigna" em LT para "maligna" em LM-SD permanecem desconhecidos apesar de inúmeros trabalhos já terem documentado superexpressão de alguns genes envolvidos (*BACH1*, *SON*, *C21orf66*, *GABPA*, *CXADR*, *SYNJ1*, *STCH*, *RUNX1*, *ETS2* e *TRIB1*), mas nada ainda comprovado fidedignamente (ARCECI, 2002; BOURQUIN et al., 2006; GAMIS; HILDEN, 2002; GE et al., 2006; IZRAELI et al., 2007; MALINGE et al., 2012; MALKIN et al., 2000; RAINIS et al., 2003; YOKOYAMA et al., 2012).

Em casos raros, a criança com LT pode apresentar morte precoce durante os primeiros seis meses de vida. Em 15 a perto de 25% desses, a morte precoce ocorre devido a fatores de mau prognóstico como hidropsia fetal, insuficiência hepática severa manifestada por icterícia, diátese hemorrágica, insuficiência cardiopulmonar e falha da remissão espontânea nos primeiros três meses de vida (AHMED et al., 2004; KANEZAKI et al., 2010; KLUSMANN et al., 2008; MASSEY et al., 2006; MURAMATSU et al., 2008; PINE et al., 2007; SHIMIZU et al., 2008).

3. Gene *GATA1*

O gene *GATA1* (*globin transcription factor 1*), localizado na região Xp11.23 do cromossomo X, codifica a proteína *GATA binding protein 1* (GATA1) pertencente à família de fatores transcricionais, com motivo estrutural para ligação ao DNA do tipo dedo

de zinco (*zinc finger*) com diferentes padrões de expressão e genes alvos distintos. GATA1 é essencial para a sobrevivência de células progenitoras eritrocíticas e para a maturação adequada de megacariócitos. Exerce, portanto, papel imprescindível na diferenciação eritrocítica e megacariocítica em cooperação com seu cofator denominado *friend of GATA1 (FOG1)*. Assim, o silenciamento dos genes *GATA1* ou *FOG1* resulta em letalidade embrionária devido à anemia severa associada à megacariopoiese anormal ou ausente (MAGALHÃES et al., 2005; WESCHLER et al., 2002; YU et al., 2002). Tem sido demonstrado que o fator hematopoiético GATA1 interage com múltiplos fatores de transcrição, coativadores e corepressores, que regulam a expressão de genes, como o gene *Myc*, de linhagens específicas (SHIMIZU et al., 2008; RYLSKI et al., 2003).

O gene *GATA1* consiste de 6 exons que se estendem em 6.857 kb e codifica uma fase de leitura de 1.239 nucleotídeos, iniciando-se no exon 2 (primeiro exon codificante). A proteína GATA1 constituída por 413 aminoácidos e 42,75 kDa possui um domínio N-terminal de transativação (AD) e dois domínios com motivos estruturais do tipo dedo de zinco. Esses dois dedos de zinco são funcionalmente distintos e cooperam para obter especificidade e estabilidade para ligação ao DNA. O domínio dedo de zinco da região N-terminal (NF) contribui para a ligação de cofatores, enquanto que o da região C-terminal (CF) é responsável pela ligação de alta afinidade ao DNA (FIGURA 1) (MARTIN; ORKIN, 1990; SHIMIZU et al., 2008).

3.1. Família GATA

Nos mamíferos, a família GATA é composta por seis membros divididos em duas subfamílias com base no perfil de expressão e estrutura gênica. *GATA1*, *GATA2* e *GATA3* são expressos principalmente na linhagem hematopoiética (SHIMIZU et al., 2008). *GATA1* é importante para o desenvolvimento de células eritrocíticas e megacariocíticas, enquanto *GATA2* é crucial para a proliferação e manutenção de células pluripotentes e de progenitores multipotentes, sendo que *GATA3* contribui para o desenvolvimento de células T (SHIMIZU et al., 2008). Embora os fatores de GATA 4, 5 e 6 estejam associados mais frequentemente com linhagens endodérmicas, não existe uma associação bem estabelecida com a camada germinativa (SHIMIZU et al., 2008).

De fato, ambas *GATA1* e *GATA2* possuem papéis fundamentais no controle da proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas, onde defeitos decorrentes de

mutações nesses genes têm sido investigados como possíveis desencadeadores para LM-SD (SHIMIZU et al., 2008).

3.2. Mutações no *GATA1* da LT e LM-SD

As mutações no exon 2 do *GATA1* impedem a síntese da cadeia pesada de GATA1 (traduzida a partir do primeiro códon ATG do exon 2), mas não a síntese da proteína truncada, denominada GATA1s com 330 aminoácidos e 34,23 kDa. GATA1s caracteriza-se pela ausência do exon 2 e do domínio de ativação N-terminal (AD), mas retém ambos os dedos de zinco, conforme ilustrado na Figura 1. GATA1s é expresso a partir do códon para Met84 do exon 3 em consequência da tradução alternativa ou do *splicing* alternativo, que elimina o exon 2 (CALLIGARIS et al., 1995; RAINIS et al., 2003; WESCHLER et al., 2002).

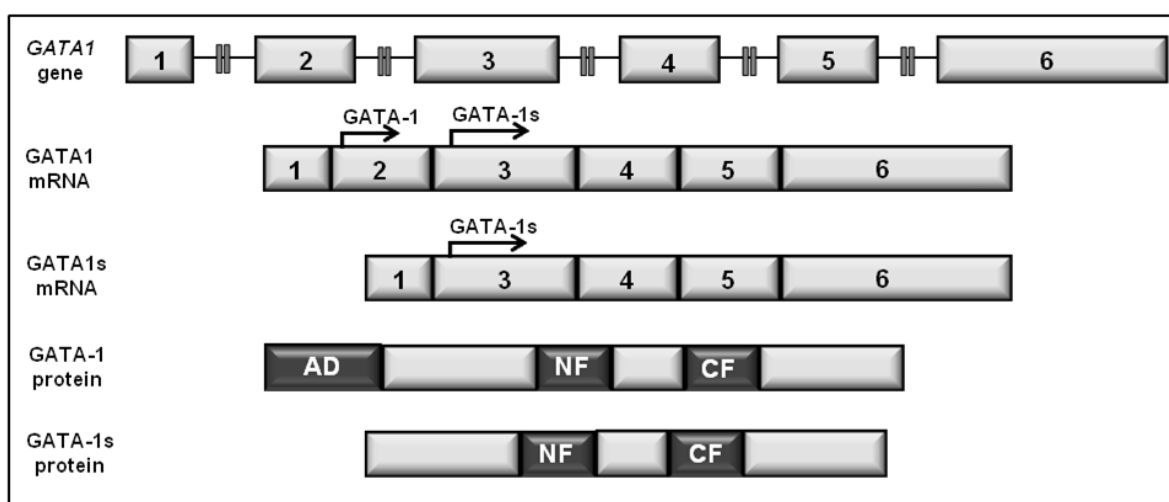


Figura 1- Modelos para expressão das isoformas de GATA1. A proteína GATA1 é traduzida a partir do mRNA do gene *GATA1*, enquanto a produção de GATA1s pode ocorrer tanto pela tradução alternativa a partir do exon 3 do *GATA1* como pelo *splicing* alternativo, com ausência do exon 2. Domínio de ativação N-terminal (AD) e os dois domínios dedo de zinco na região N-terminal (NF) e C-terminal (CF) da proteína GATA1

Indivíduos saudáveis codificam ambas as formas da proteína, 42,75 kDa e 34,23 kDa, enquanto o alelo mutado só codifica GATA1s (34,23 kDa) (MUNDSCHAU; CRISPINO, 2006; WESCHER et al., 2002). Mesmo sendo detectada ambas as formas de GATA1 em tecido embrionário de camundongo, suas proporções relativas variam durante o desenvolvimento, sugerindo que a atividade transcricional de GATA1 possa ser

modulada pela razão relativa dessas duas isoformas (CALLIGARIS et al., 1995). Logo, os níveis de expressão dessas duas isoformas são cruciais para o desenvolvimento adequado das células eritrocíticas e megacariocíticas (IZRAELI et al., 2007).

A análise de megacariócitos específicos em camundongos sem a expressão de *Gata1* revelou que a baixa expressão (ou ausência completa) de *Gata1* causa bloqueio da diferenciação celular, proliferação excessiva de megacariócitos e redução de plaquetas circulantes (WESCHER et al., 2002). Dessa forma, a expressão reduzida de GATA1 é decisiva para gênese da LT e LM-SD, pois passa a funcionar diretamente como um oncogene na presença da trissomia do cromossomo 21 (RAINIS et al., 2003; SHIMIZU et al., 2008).

Mutações como inserções, deleções, duplicações e mutações pontuais tanto favorecem a introdução de um códon de parada prematura *frameshift* com tradução alternativa a partir do exon 3, como também pode ocasionar a perda do exon 2 por *splicing* alternativo. De acordo com Cabelof et al. (2009), as mutações mais frequentes na LT e LM-SD se referem a inserções, deleções e duplicações no exon 2 do *GATA1* correspondendo a 74%, seguido por substituição de base com 26%. Alford et al (2011) relataram que mais de 95% das mutações descritas em pacientes com LT e LM-SD ocorrem no exon 2 (Figura 2). No entanto, há também registros raros de mutações detectadas no intron 1, intron 2 e exon 3 do *GATA1* (ALFORD et al., 2011; AMORIM et al., 2009; GROET et al., 2003; PINE et al., 2007; RAINIS et al., 2003).

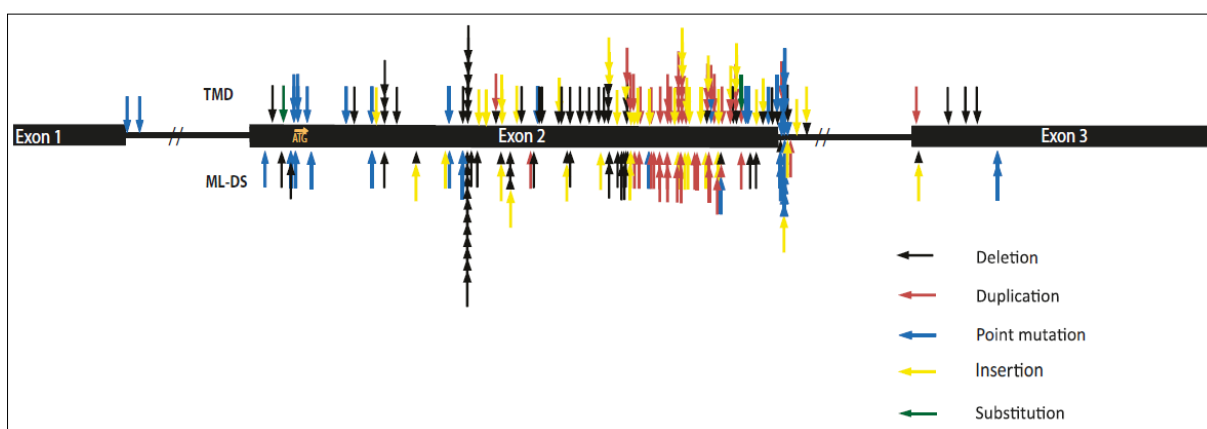


Figura 2- Diagrama esquemático de *GATA1* mostrando as posições e tipos de mutações encontradas em amostras de LT e LM-SD. Cada seta representa um paciente diferente (ALFORD et al., 2011).

Mutações em *GATA1* são frequentemente associadas à LT e ocorrem intraútero com 21 a 23 semanas de gestação (TAUB et al., 2004). A verdadeira frequência da LT é desconhecida e provavelmente uma proporção significativa de afetados não é rotineiramente diagnosticada (AHMED et al., 2004; MALINGE et al., 2009; RAINIS et al., 2003). Klusmann et al. (2008) sugeriram que o prognóstico de LM-SD precedido pela LT seja melhor que LM-SD *de novo*.

Estudos em andamento na Europa e América do Norte estão correlacionando mutações do *GATA1* com amostras de esfregaço sanguíneo de RNs para representar um valor mais preciso da incidência da LT (MALINGE et al., 2009). Pine et al. (2007) analisaram o DNA dos cartões do teste do pezinho de 585 crianças com SD e detectaram mutações no *GATA1* em 3,8% (22/585) deles. No entanto, mutações em *GATA1* podem não ter sido detectadas em pacientes com poucos clones pré-leucêmicos, mutações subclonais, baixo número de células nos cartões do teste, ou LT extra medular, sem blastos circulantes. Assim, é provável que a frequência de LT não seja maior que 5% dos RNs com SD (MALINGE et al., 2009). Além disso, os RNs do sexo masculino apresentaram um aumento, não significativo de mutações no *GATA1*, em relação ao sexo feminino (PINE et al., 2007).

Estudos revelaram que mutações do *GATA1* na LT ativam a proliferação de progenitores celulares que são requeridos para promover a LM-SD, caracterizando assim uma progressão *multi-step*, ilustrada na Figura 3. Esse processo deve envolver a participação de genes/proteínas que ainda não foram identificados. Esses progenitores megacariocíticos rapidamente desaparecem após o nascimento. A base molecular e celular dessa remissão natural é até hoje desconhecida, mas pode estar relacionada a mudanças epigenéticas do microambiente hematopoiético que ocorrem durante o crescimento e desenvolvimento neonatal. Megacarioblastos afetados com *hits* genéticos adicionais são, provavelmente, submetidos à evolução clonal, tornando-os susceptíveis à transformação maligna em células leucêmicas e ao desenvolvimento da LM-SD (AHMED et al., 2004; SHIMIZU et al., 2008).

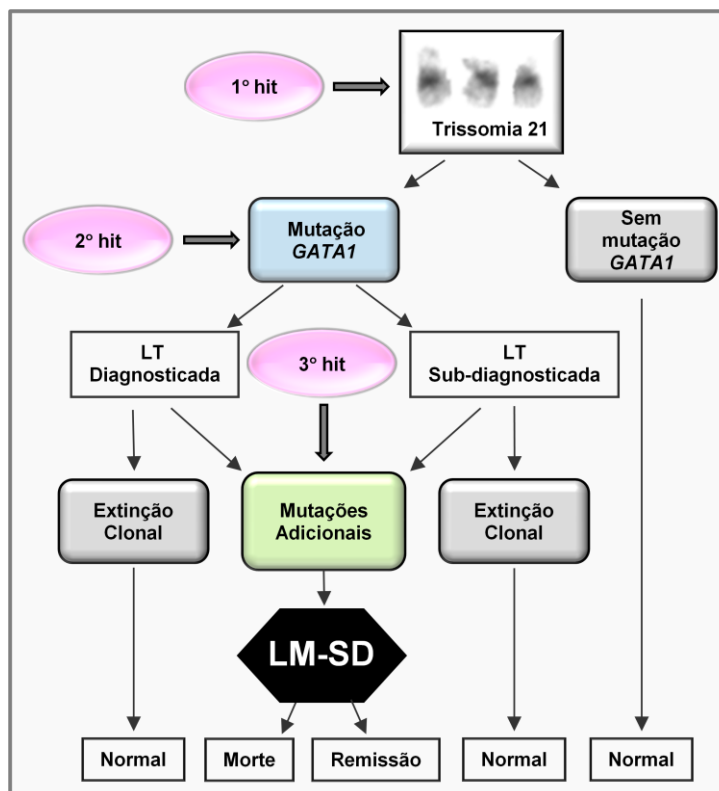


Figura 3- Modelo *multi-step* da leucemogênese na SD. O acúmulo de *hits* (múltiplas anormalidades genéticas) caracteriza a evolução da LT para LM-SD.

Mutações no *GATA1* não têm sido identificadas em crianças normais sem SD, em crianças com SD e outros tipos de LA, ou em outros tipos de FAB da LMA ou síndromes mielodisplásicas de crianças sem SD e sem mosaicismo, enfatizando a cooperação específica dessas mutações com a trissomia do cromossomo 21 na LM-SD. As mutações em *GATA1* são somáticas, restritas a clones leucêmicos e não são, portanto, detectadas em amostras em remissão. Essas mutações foram adquiridas e selecionadas, porque provavelmente concederam uma vantagem clonal. Em contraste, as leucemias mieloides em crianças maiores ou iguais a quatro anos com SD são geralmente negativas para mutações no *GATA1* e seu prognóstico não difere de LMA em pacientes não-Down (CABELOF et al., 2009; LANGE, 2000; MUNDSCHAU et al., 2003; PINE et al., 2007; WECHSLER et al., 2002).

Rainis et al. (2003) registraram pacientes com mutações idênticas do *GATA1* na LT e posteriormente na LM-SD, provando que a LM-SD foi originada do clone da LT, o que foi confirmado por outros autores (AHMED et al., 2004; HITZLER; ZIPURSKY, 2005; KANEZAKI et al., 2010; MUNDSCHAU et al., 2003). Além disso, Rainis et al. (2003)

registraram gêmeos monozigóticos, com trissomia adquirida do cromossomo 21 em células blásticas, que apresentaram a mesma mutação do *GATA1* na LT e na LM-SD. Devido à idêntica mutação adquirida nas células leucêmicas dos gemelares, é provável que a mutação tenha ocorrido intraútero em um dos gêmeos e que suas células pré-leucêmicas tenham migrado para o outro irmão por meio de anastomoses sanguíneas placentárias. Mutações em *GATA1* possuem um papel oncogênico ativo devido às mesmas mutações encontradas nos blastos da LT e posteriormente da LM-SD, o que mostra sua relação clonal (HITZLER; ZIPURSKY, 2005; MUNDSCHAU et al., 2003). A complexidade da LT e LM-SD foi também documentada em gêmeos idênticos com SD, onde o gêmeo A apresentou características clínicas de LT com remissão espontânea nos primeiros três meses e sem progressão para LM-SD, enquanto o gêmeo B não apresentou alterações hematológicas como seu irmão, mas desenvolveu LM-SD aos dois anos de idade (HOMANS et al., 1993).

Kanezaki et al. (2010) documentaram que diferentes classes de mutações no *GATA1* resultam em uma eficiência variável de tradução de GATA1s e, além disso, que o nível de expressão da proteína GATA1s está correlacionada com o risco de progressão para LM-SD. Entretanto, um estudo subsequente de Alford et al. (2011) mostrou que o tipo de mutação no *GATA1* não é prognóstico de quais pacientes com LT irão progredir para LM-SD, já que nenhuma diferença foi observada nos tipos de mutação entre os pacientes com LT e com LM-SD. Devido ao fato de não existir nenhuma maneira de prever quais pacientes com LT irão desenvolver LM-SD ou quais pacientes com LM-SD irão recair após quimioterapia, mutações somáticas de cada paciente podem ser utilizadas como marcadores moleculares estáveis para o monitoramento da doença residual mínima (DRM), na evolução da LT e na resposta terapêutica dos pacientes com LM-SD (ALFORD et al., 2011; HITZLER; ZIPURSKY, 2005; PINE et al., 2005).

Weschler et al. (2002) analisaram a inativação do cromossomo X em lisado de células do aspirado de MO de portadoras da LM-SD. Como as células leucêmicas nas mulheres mostram inativação do mesmo cromossomo X devido à monoclonalidade, os autores previram que o alelo tipo selvagem estaria no cromossomo X inativo e, portanto, a proteína selvagem não seria traduzida. Como esperado, não se detectou GATA1 e somente a proteína truncada GATA1s. Rainis et al. (2003) propuseram que se não houvesse o processo de inativação do cromossomo X, o *GATA1* mutado estaria envolvido em uma frequência maior de pacientes do sexo feminino com SD e LT.

A LT e a LM-SD ocorrem exclusivamente em pacientes com SD e são acompanhadas por mutações somáticas no *GATA1*. No entanto, vários autores têm descrito que a LT e subsequentemente LM-SD podem ocorrer raramente em indivíduos com fenótipo e/ou citogenética normais, sem trissomia constitucional do cromossomo 21. Esses casos mostram a trissomia do cromossomo 21 no cariótipo ao diagnóstico, mas após a remissão espontânea da LT apresentam apenas a linhagem diploide normal. Magalhães et al. (2005) documentaram que a maioria desses pacientes com LT, após a remissão espontânea completa, não apresenta nenhuma evidência de recorrência ou progressão para LM-SD. No entanto, Yanase et al. (2010) relataram que a trissomia do 21 surge novamente nos casos que progridem para LM-SD. Contudo, a trissomia do cromossomo 21 nesses casos é restrita aos blastos, indicando sua natureza somática, não sendo detectada durante a remissão da doença e ressaltando sua importância na alteração citogenética. Há casos raros na literatura desse status genético sem características fenotípicas de SD, mas com mosaïcismo da trissomia constitucional do cromossomo 21 (CARPENTER et al., 2005; CUSHING et al., 2006; MAGALHÃES et al., 2005; RAINIS et al., 2003; SANDOVAL et al., 2005; YANASE et al., 2010).

4. Mutações no gene *GATA1* em pacientes com anemia diseritropoiética

Mutações no *GATA1* podem ocorrer também constitucionalmente em famílias com anemia diseritropoiética congênita e trombocitopenia (NICHOLS et al., 2000). Mutações *missense* herdadas no exon 4 do *GATA1* alteram a configuração espacial do domínio dedo de zinco N-terminal (codificado pelo exon 4) impedindo que esse se ligue ao seu principal cofator FOG-1, o que resulta em anemia diseritropoiética congênita e trombocitopenia, sendo que essa característica não é observada em indivíduos com SD (IZRAELI et al., 2007; MUNDSCHAU et al., 2003; MUNDSCHAU; CRISPINO, 2006). Além disso, esses indivíduos, apesar de possuírem mutações similares àquelas vistas no exon 2 da LT e LM-SD, não chegam a desenvolver leucemia, comprovando que mutações no *GATA1* são insuficientes para dar início à leucemogênese clonal na ausência da trissomia do cromossomo 21 (MUNDSCHAU; CRISPINO, 2006).

A primeira descrição dessa mutação foi encontrada em uma mulher com trombocitopenia moderada que teve dois filhos que apresentaram desde o nascimento macrotrombocitopenia severa e anemia diseritropoiética. A troca pontual G→A na posição

613 foi identificada nos indivíduos hemizigotos e na mãe heterozigota. Essa mutação converte um resíduo de valina em um resíduo de metionina na posição 205 (Val205Met) da proteína GATA1 (NICHOLS et al., 2000). Os megacariócitos de famílias portadoras de anemia diseritropoiética congênita apresentaram alterações semelhantes aos megacariócitos de camundongos deficientes em expressão de *Gata1* sugerindo que a interação GATA1/FOG1 seja também crucial em estágios tardios da megacariopoiese (NICHOLS et al., 2000). Hasegawa et al. (2012) documentaram em estudo com camundongos transgênicos que a expressão de *Gata1* mutante V205G parece ser insuficiente para suprir a deficiência de *Gata1*, o que leva a morte prematura devido à anemia hemolítica. No entanto, essa morte prematura pode ser evitada quando existe uma superexpressão de *Gata1s*, contudo isso ainda é insuficiente para manter a homeostase eritrocítica.

Outra mutação nesse mesmo domínio foi descrita por Freson et al. (2002) em quatro gerações de uma família avaliada, onde os pacientes apresentaram apenas macrotrombocitopenia. Uma alteração de aspartato para glicina na posição 218 (Asp218Gly) foi encontrada tanto nas mulheres heterozigotas quanto nos homens hemizigotos. Apenas os homens hemizigóticos apresentaram trombocitopenia acentuada e as mulheres não apresentaram alterações clínicas.

Mehaffey et al. (2001) descreveram uma família com alteração de dois nucleotídeos (GG→TC) na posição 622 e 623 resultando na alteração Gln208Ser em porção altamente conservada do domínio dedo de zinco da terminação amino (NF) de *GATA1*. Nos homens hemizigóticos foi encontrada uma diminuição do número de plaquetas, enquanto que nas mulheres heterozigotas não foram encontradas alterações clínicas. Posteriormente, Duhrsen et al. (2011) também relataram uma família com mutação G208R no *GATA1* relacionada à citopenia. Os homens apresentaram uma baixa taxa de descendentes enquanto que as mulheres heterozigotas apresentaram abortos frequentes, o que sugeriu aumento de morte fetal em homens hemizigotos.

Yu et al. (2002) registraram uma família portadora da síndrome de trombocitopenia ligada ao X com talassemia causada por uma mutação *missense* (Arg216Gln) no domínio dedo de zinco da terminação amino (NF) de *GATA1*. Essa mutação produziu macrotrombocitopenia e β -talassemia nos indivíduos hemizigóticos e anemia discreta nas mulheres heterozigotas.

Freson et al. (2002) descreveram outra família com macrotrombocitopenia severa, anemia e mortalidade precoce devido a mutação Asp218Tyr em *GATA1*. Esse mesmo resíduo 218 já havia sido implicado na mutação Asp218Gly com macrotrombocitopenia e moderada diseritropoiese sem anemia. Estudos na interação dedo de zinco revelaram uma perda de afinidade mais intensa de GATA1-Asp218Tyr do que GATA1-Asp218Gly a FOG. Comparando as características fenotípicas dos pacientes das duas famílias, observou-se que a morfologia plaquetária e eritrocitária assim como os níveis de expressão dos produtos dos genes alvo de GATA1 estavam muito mais comprometidos no hemizigótico da primeira mutação (Asp218Tyr). O alelo Asp218Tyr (ao contrário do alelo Asp218Gly) não era expresso nas plaquetas de portadores femininos enquanto que seus leucócitos mostravam desvio de inativação do cromossomo X. Os autores concluíram que a natureza da substituição do aminoácido na posição 218 do NF de GATA1 é de crucial importância na determinação da severidade do fenótipo nos pacientes com macrotrombocitopenia familiar ligado ao X e que possivelmente também induza um desvio de inativação do X (FRESON et al., 2002).

Portanto, as mutações no exon 4 do gene *GATA1* parecem levar a diferentes graus de plaquetopenia com ou sem anormalidades na linhagem eritroide. Todas as anormalidades encontradas nessas mutações foram atribuídas a interrupções na ligação do domínio dedo de zinco da GATA1 com o seu principal cofator FOG1 ou à ligação desse domínio com uma região consensual no DNA (FRESON et al., 2002; MEHAFFEY et al., 2001; NICHOLS et al., 2000; YU et al., 2002).

Além das mutações encontradas no exon 4, Hollanda et al. (2006) relataram uma família com mutação congênita (332G-C) no exon 2 do *GATA1*. Os homens afetados sintetizaram apenas a isoforma GATA1s e exibiram um quadro clínico de anemia e displasia, mas não chegaram a desenvolver leucemia, porém essa produção normal ou baixa de GATA1s também não era suficiente para conduzir à eritropoiese normal. Essa observação estabelece que a ausência de GATA1 e o sinergismo entre GATA1s e a trissomia do 21 são pré-requisitos para o desencadeamento da LT ou LM-SD.

4.1. Estudos experimentais de *gata1* em camundongos

Shimizu et al. (2008) documentaram que camundongos totalmente sem expressão de *Gata1* (*Gata1* – *null*) morrem na embriogênese devido à deficiência da eritropoiese

primitiva e definitiva, enquanto que camundongos que expressam níveis reduzidos de Gata1 (Gata1.05 - camundongos que expressam 5% dos níveis de mRNA de gata1 do tipo selvagem) apresentam graus variáveis de anemia e trombocitopenia.

Os dados apresentados até agora argumentam fortemente que a ausência de GATA1 em humanos é considerada um dos principais alvos da leucemogênese. A análise genética *in vivo* de camundongos com mutação no *Gata1* e os resultados de exames clínicos da LT e LM-SD em humanos revelaram que as leucemias são desencadeadas por dois tipos de disfunções em Gata1: o primeiro é um déficit quantitativo de Gata1 em camundongos, observado em Gata1.05; e o outro é um defeito qualitativo de Gata1, observado em pacientes com LT e LM-SD e em camundongos transgênicos. No processo leucemogênico, uma simples mutação de *Gata1* ou *GATA1* poderia predispor as células progenitoras à transformação leucêmica, mesmo que apenas uma mutação primária seja insuficiente para a transformação completa. Tanto a disfunção quantitativa quanto a qualitativa do Gata1 podem levar ao acúmulo de células progenitoras de linhagem comprometida em camundongos afetados, mas nem todos desenvolvem leucemia. Isso sugere que alterações genéticas adicionais devem ser necessárias para a transformação de progenitores mutantes de GATA1 em leucemia.

Como nenhum caso de leucemia foi observado em camundongos transgênicos, foi sugerido que progenitores megacariocíticos anormais sejam eliminados antes de acumularem *hits* genéticos adicionais. Porém, não se deve descartar a possibilidade de que diferenças genéticas da hematopoiese de camundongos e de seres humanos possam explicar a falha de camundongos transgênicos em desenvolverem LM-SD. Além disso, diferenças na gestação entre camundongos e seres humanos poderiam explicar que os camundongos *knockout* simplesmente não têm tempo de adquirir um segundo *hit* para o desencadeamento da LM-SD (SHIMIZU et al., 2008).

Devido a inativação randômica do cromossomo X nas mulheres, dois tipos de células somáticas podem resultar em Gata1.05: uma população celular que tem o alelo Gata1 de tipo selvagem no cromossomo X ativo e o alelo Gata1.05 no inativo e a outra população celular que possui o alelo do tipo selvagem Gata1 no cromossomo X inativo e o alelo Gata1.05 no ativo. No segundo caso, a diferenciação eritrocítica está bloqueada devido à insuficiência de expressão de Gata1, enquanto que as células eritrocíticas que possuem o alelo Gata1 do tipo selvagem no cromossomo X ativo se diferenciam normalmente em eritrócitos maduros (SHIMIZU et al., 2008).

4.2. Interação proteína-proteína

Além de se ligarem ao DNA, fatores transcricionais frequentemente participam de interações proteína-proteína críticas na modulação de suas atividades. Estudos têm mostrado uma nova visão na regulação do desenvolvimento hematopoiético, contrastando com o modelo no qual fatores transcricionais linhagem específicos exerceriam papel exclusivamente de ativador positivo de programas genéticos de linhagem específica. As observações atuais sugerem que eles simultaneamente exerçam efeitos inibitórios em programas gênicos de outras linhagens. Este paradigma traz novos esclarecimentos sobre os mecanismos de parada de maturação vistos nas leucemias agudas. Uma expressão anômala de um fator transcricional linhagem específico (por meio de translocações, mutações, inserções virais e mecanismos epigenéticos) pode bloquear a maturação celular por antagonismo direto da atividade de um fator transcricional normal em um estágio específico e aumentar a sobrevivência de um só tipo celular (CANTOR; ORKIN, 2001).

A proteína GATA1 pode interagir com outras proteínas formando complexos proteicos que estimulam ou inibem determinadas regiões gênicas. Dentre as proteínas que GATA1 interage destacam-se: c-Myb, EKLF, Fli-1, FOG1, HDAC5, LMO2, PU.1, RUNX1, CREB-1, Ski-1, SP1 (LOWRY; MACKAY, 2006). Entre essas interações proteicas, a mais estudada é a ligação com FOG1 que está relacionada com a diferenciação das células de linhagem eritroide e megacarioblástica (CANTOR et al., 2002; MUNTEAN; CRISPINO, 2005). O complexo GATA1/FOG1 é responsável por inibir uma variedade de genes, entre eles o GATA2 e ativar outros como EKLF e β -glonina. Enquanto a proteína GATA1s caracteriza-se por não ser capaz de inibir alguns genes de fatores transcricionais, incluindo: *GATA2*, *PU.1*, *Ikaros*, *Myb* e *Myc*, que têm efeito bastante proliferativo sobre o crescimento de células hematopoiéticas (MUNTEAN; CRISPINO, 2005; LI et al., 2005).

GATA1s não difere de sua forma selvagem na capacidade de se ligar ao DNA e interagir com seu cofator FOG1, no entanto apresenta uma redução na sua capacidade de ativação transcricional, uma vez que está truncado o seu domínio de ativação N-terminal (RAINIS et al., 2003; WECHSLER et al., 2002). FOG1 liga-se especificamente ao motivo estrutural dedo de zinco da terminação amino (NF) de GATA1, é expresso abundantemente em células eritrocíticas e megacariocítica e atua em associação com GATA1 durante o desenvolvimento hematopoiético (CRISPINO et al., 1999). Trata-se de uma proteína de 998 aminoácidos codificada pelo gene *ZFPM1* e que contém nove

motivos dedo de zinco, sendo que quatro deles (ZFS 1,5,6 e 9) mediam a interação com GATA1 (FOX et al., 1999; SPLENDORE et al., 2005; WECHSLER et al., 2002).

5. Outras mutações associadas à LT e LM-SD

A cooperação entre mutações que promovam proliferação e sobrevivência e mutações que bloqueiam a diferenciação normal é necessária para o desenvolvimento da leucemia. Por exemplo, mutações que atuam na tirosina quinase FLT3 na LMA são frequentemente associadas com translocações cromossômicas recorrentes específicas ou com mutações dominantes negativas no fator de diferenciação granulocítica. Assim, a colaboração entre um ou mais genes do cromossomo 21 e mutações no gene *GATA1* da LT apresenta uma função clonal inicialmente comum e geralmente reversível (RAINIS et al., 2003). Desta forma, a presença de mutações no exon 2 no *GATA1* da LT sugere que exista uma cooperação entre o aumento da dosagem de gene ou genes do cromossomo 21 com a iniciação pré-natal de proliferação clonal de precursores megacariocíticos (MALINGE et al., 2009).

A observação de mutação idêntica no *GATA1* em pacientes com LT e LM-SD sugere que a leucemia tenha surgido de um clone originado da LT. Baseado nos inúmeros trabalhos com mutações no *GATA1* por diversos grupos de pesquisa, Malinge et al. (2009) em um estudo de revisão documentaram que a LT e LM-SD exigem tanto a presença da trissomia do cromossomo 21 como a mutação no *GATA1*. No entanto, ainda não está claro se essas duas alterações são suficientes para promover a LT. Além disso, mutações secundárias específicas que promovam a evolução da LT para LM-SD ainda são pouco conhecidas, apesar de terem sido identificados alguns candidatos com mutações cooperativas. Estes incluem mutações no *JAK3*, *TP53*, *FLT3* e *JAK2* cujas localizações e frequências foram registradas na Tabela 1 (MALINGE et al., 2009; 2012).

Tabela 1- Alterações genéticas identificadas em leucemias associadas à SD (MALINGE et al., 2009; 2012).

Tipos de leucemia	Genes mutados	Localizações	Frequências registradas
LT	<i>GATA1</i>	Xp11.23	97,3%
	<i>JAK3</i>	19p13.1	12,5%
	<i>TP53</i>	17p13.1	7,7%
LM-SD	<i>GATA1</i>	Xp11.23	89,2%
	<i>TP53</i>	17p13.1	21,4%
	<i>JAK3</i>	19p13.1	13,2%
	<i>JAK2</i>	9p24.1	6,2%
	<i>FLT3</i>	13q12.2	5,7%

A identificação de mutações que ativam genes da tirosina quinase nas amostras de LT e LM-SD tem proporcionado novas ideias sobre sua transformação para LM-SD. Primeiramente, foram detectadas mutações em *JAK3* em uma fração pequena, porém significativa, de amostras de leucemias associadas à SD. Entre as mutações encontradas, a maioria foi considerada como ganho de função, levando a um crescimento independente de citocinas em células Ba/F3 *in vitro* (MALINGE et al., 2009). *Jak3* foi também encontrado na linhagem celular CMK (células que não expressam *GATA1* do tipo selvagem e são extraídas de pacientes com LM-SD) induzindo anormalidade hematopoiética bifenotípica letal em camundongos com características de LMA-M7 (WALTERS et al., 2006). Outras mutações em *JAK3* também foram propostas como perda de função (DE VITA et al., 2007). Riera *et al.* (2011) demonstraram recentemente que mutações no *JAK3* estão presentes em amostras de indivíduos normais, com frequência semelhante à observada em pacientes com LMA, sugerindo um polimorfismo. Norton et al. (2007) também não detectaram nenhuma mutação nos 23 exons de *JAK3* em 17 amostras de LT e LM-SD, mas identificaram dois casos de polimorfismo. Assim, estudos adicionais são necessários para determinar se essas diferenças nas variações do *JAK3* afetam o desenvolvimento megacariocítico e se realmente mutações no *JAK3* atuam na leucemogênese da LM-SD. Além de mutações no *JAK3*, mutações também no gene *JAK2* e *FLT3* haviam sido identificadas em amostras de LT e LM-SD (HUSSEIN et al., 2009; MALINGE et al.,

2008;). No entanto, foram comprovados em modelos de cooperação oncogênica que a expressão genética alterada desses genes desregulam a proliferação e diferenciação de megacariócitos, porém não são capazes de desenvolver o fenótipo típico da LM-SD *in vivo* (MALINGE et al., 2012). Norton et al. (2007) não detectaram mutação no *JAK2* em 19 amostras de LT e LM-SD.

Devido à ativação constitucional do fator de crescimento 2 ligado à insulina e observada nos blastos da LT e LM-SD, Klusmann et al. (2010) mostraram que *GATA1s* realmente apresenta dificuldade para restringir essa ativação, resultando em um aumento proliferativo e sobrevida de progenitores hepáticos fetais.

Mais de 20 genes envolvidos no metabolismo oxidativo estão localizados no Hsa21, incluindo superóxido dismutase (*SOD*) e Cistationina Beta Sintase (*CBS*). A trissomia do Hsa21 resulta em estresse oxidativo e alteração do metabolismo de folato, predispondo fortemente à aquisição de mutações no *GATA1* e conseqüentemente ao desenvolvimento da LT (CABELOF et al., 2009). Além disso, Cabelof et al. (2009) demonstraram que a capacidade de reparo de DNA em amostras de pacientes com SD apresentava-se comprometida, sugerindo, portanto, um papel crítico na susceptibilidade de crianças com SD em desenvolver LT e LM-SD. Foi observado ainda que blastos da LM-SD, ao contrário da LT, apresentam atividade de telomerase, comprometendo assim seu caráter maligno de proliferação leucêmica (HOLT et al., 2002).

6. Trissomia do cromossomo 21 e suas implicações

Várias observações sustentam a participação funcional da trissomia do cromossomo 21 em neoplasias hematológicas. Essas incluem a alta incidência de leucemia em pacientes com SD, onde blastos de pacientes com LT e LM-SD sempre possuem trissomia do 21 constitucional, podendo também ter cópias extras do 21 (tetrassomia). No entanto, crianças não-Down com trissomia ou tetrassomia do cromossomo 21 adquiridas somaticamente em blastos são observadas frequentemente em diferentes tipos de leucemia, incluindo LLA com hiperdiploidia e LMA *de novo* (MALINGE et al., 2009; VYAS; CRISPINO, 2007).

Presume-se que a trissomia completa ou parcial do cromossomo 21, de aproximadamente 33,7 Mb, promova uma superexpressão de um ou mais dos 551 genes, 31 transcritos *antisense* e 19 miRNAs diferentes (<http://www.mirbase.org>, acessado em 12/09/2012) que podem cooperar, com a ausência de *GATA1*, na patogênese da LM-SD.

Mutações em vários genes no cromossomo 21 já foram identificadas em leucemias e muitos desses genes são reconhecidos como codificadores de fatores transcricionais atuantes em várias etapas da hematopoiese. Deste modo, deve haver uma contribuição de genes presentes no cromossomo 21 que cooperem com mutações no *GATA1* para causarem a leucemogênese (LOOK, 2002; MALINGE et al., 2009).

As correlações genótipo-fenótipo da trissomia parcial em crianças com suspeita de SD levou à identificação da *Down Syndrome Critical Region* (DSCR), localizada na região 21q22. Sua caracterização tem limitado potencialmente a lista de genes implicados no fenótipo clínico. No entanto, a correlação funcional entre os genes dentro dessa região específica e a maioria dos fenótipos clínicos ainda é controversa. Embora nenhum gene específico dentro da região tenha sido inequivocamente ligado ao aumento da incidência de leucemia em SD, alguns genes são candidatos fortes, incluindo *ERG*, *ETS2* e *RUNX1* (LYLE et al., 2008; MALINGE et al., 2009).

6.1. Efeitos da trissomia do cromossomo 21 na hematopoiese fetal

Dado que a LT tem suas origens em uma célula progenitora de fígado fetal e é restrita a crianças com SD (ou casos raros de trissomia 21 adquirida), é provável que a trissomia do 21 afete diretamente o desenvolvimento das células hematopoiéticas durante a gestação. Estudos anteriores demonstraram que mutações no *GATA1* podem se desenvolver bem cedo nos embriões com 21 a 23 semanas de gestação (TAUB et al., 2004). Para definir o contexto celular em que mutações no *GATA1* ocorrem, dois grupos estudaram recentemente a associação entre a trissomia do 21 e a hematopoiese no fígado fetal humano (Ff). Eles registraram que, embora a trissomia do 21 não altere a proporção de CD34⁺ e CD38⁻ nas células, ela desencadeia um aumento significativo ao longo do tempo (de 2 a 3 vezes) de progenitores eritrocíticos megacariocíticos (MEPs) no Ff (35% em 16 semanas para 65% em 18 semanas) (CHOU et al., 2008; MALINGE et al., 2009).

As perturbações funcionais induzidas pela trissomia do 21 podem vir a criar um contexto celular que é altamente susceptível a eventos adicionais, tais como a mutagênese de *GATA1* na LT. O ensaio baseado em células de Ff fornece uma ferramenta poderosa para identificar genes específicos do Hsa21 que participam da LT. Estudos preliminares que utilizam transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR) têm demonstrado que não existem diferenças significativas na expressão do

ERG, *ETS2*, *RUNX1* e *SON*, candidatos classificados como oncogenes leucêmicos potenciais, em trissomia versus Ff euplóide (CHOU et al., 2008; TUNSTALL-PEDOE et al., 2008). No entanto, são necessários estudos funcionais desses genes candidatos a progenitores para se determinarem os requisitos de desenvolvimento para leucemia (MALINGE et al., 2012).

6.2. Expressão gênica da trissomia do cromossomo 21

Estudos realizados por meio de microarranjos têm evidenciado um aumento global da expressão gênica do cromossomo 21 na LM-SD em relação à LMA-M7 não-Down. Ge et al. (2006) e Bourquin et al. (2006) documentaram uma discrepância na expressão de 76 genes entre LM-SD versus LMA-M7 não-Down. Entre esses genes, os que codificam marcadores eritrocíticos, tais como glicoproteína A e CD36, parecem estar significativamente superexpressos na LM-SD, como confirmado pela presença de blastos na imunofenotipagem (IF) (LANGEBRAKE et al., 2005). Além disso, a análise de 47 genes do cromossomo 21, incluindo *BACH1*, *SON*, *C21orf66* e *GABPA* revelou uma expressão aumentada, mas sem diferenças significativas entre LM-SD e LMA-M7 não-Down (BOURQUIN et al., 2006). Da mesma forma, Ge et al. (2006) identificaram 7 genes dos 551 genes do Hsa21, com expressão diferencial entre a LT e LM-SD, incluindo: *BACH1*, *CXADR*, *SYNJ1* e *STCH*. De fato, *BACH1* e *CXADR* foram os dois únicos genes frequentemente superexpressos na LM-SD comparados com LMA-M7 não-Down. A diferença apresentada entre os dois estudos se deve aos diferentes parâmetros utilizados para a determinação da alteração da expressão gênica ou à pureza das amostras (MALINGE et al., 2009).

6.3. Oncogenes candidatos leucêmicos do cromossomo 21

Vários genes do cromossomo 21 são candidatos convincentes ao posto de oncogenes leucêmicos como o gene *RUNX1* (também conhecido como *AML1*) que codifica o parceiro heterodimérico do complexo de fatores transcricionais, denominados *core-binding factor* β (CBF β), e que coopera com *GATA1* durante a diferenciação megacariocítica; e os três fatores transcricionais de *ETS* (*ERG*, *ETS2* e *GABPA*), os quais são expressos e implicados funcionalmente na diferenciação megacariocítica (GE et al.,

2008; MALINGE et al., 2009). Fortes evidências sugerem que *RUNXI* esteja envolvido na LM-SD, devido à identificação de mutações em seu domínio de ligação ao DNA registrado em 5% de leucemias esporádicas e em leucemias mieloides com trissomia do 21 adquirida (PREUDHOMME et al., 2000). Entretanto, apesar de mutações com perda de função do *RUNXI* estarem associadas à leucemia, não está claro como três cópias do cromossomo 21 promovem a tumorigênese na SD (IZRAELI, 2004). Portanto, é possível que células com trissomia do 21 expressem diferentes isoformas de *RUNXI* que, por sua vez, podem afetar o desenvolvimento do tumor (LEVANON; GRONER, 2004). Além disso, diferentes expressões de isoformas *RUNXI* foram observadas em amostras humanas de LMA-M7, embora o nível de expressão total de *RUNXI* tenha sido menor em LM-SD comparado com LMA-M7 não-Down (BOURQUIN et al., 2006). Em contraste, foi visto que a trissomia para *Runx1* não é requerida para o desenvolvimento de anomalias mieloproliferativas em camundongos Ts65Dn (modelo utilizado com trissomia parcial do Hsa21, 71 genes em comum) (KIRSAMMER et al., 2008).

Foi observada ainda a desregulação do proto-oncogene *ERG* em muitos tipos de cânceres. Entre as neoplasias hematológicas, encontra-se a superexpressão de *ERG* em amostras de LMA com cariótipo normal ou complexo envolvendo a trissomia do 21 adquirida (BALDUS et al., 2004). Esta superexpressão de *ERG* foi também encontrada em células K562 (células humanas que expressam ambas as formas de GATA1), alterando a diferenciação da linhagem megacariocítica e aumentando a expressão de seus marcadores, incluindo CD41 e CD61 (RAINIS et al., 2005). Para confirmar o papel de *ERG* em estágios finais da megacariopoiese, Loughran et al. (2008) estudaram camundongos mutantes homozigotos e heterozigotos para *Erg* e observaram que o primeiro morreu ainda no útero em consequência de um defeito na hematopoiese definitiva e o segundo mostrou trombocitopenia sem alterações no número de megacariócitos na MO.

Malinge et al. (2012) relataram que, embora vários grupos tenham relacionado a trissomia do gene *Erg* com o fenótipo mieloproliferativo em camundongos (Ts65Dn), sua associação com LM-SD comparada com não-Down permanece incerta, pois o gene *ERG* parece ser superexpresso em amostras de LMA-M7 não-Down, possivelmente devido a outras anormalidades genéticas. No entanto, sua expressão baixa em LM-SD pode ser suficiente para cooperar com outros genes trissômicos, como *DYRK1A*, *CHAF1B* e/ou *HLCS*. Estudos anteriores também mostraram que *ERG* não é superexpresso em fígados fetais trissômicos comparados com os euploides (CHOU et al., 2008). Esta mesma

observação foi também relatada para outro oncogene do cromossomo 21, *RUNX1*, que inicialmente havia sido sugestivo de estar associado com LM-SD, mas que agora parece não estar relacionado com LM-SD (MALINGE et al., 2012). Deste modo, são necessários experimentos adicionais para assegurar se a trissomia do *ERG* está realmente relacionada à LM-SD (MALINGE et al., 2012).

A superexpressão de *ETS2* também tem sido observada em diversos tipos de cânceres, incluindo a LMA. Além disso, transcritos de *ETS2* apresentam níveis elevados tanto em LM-SD como em LMA-M7 não-Down. Esses fatos juntamente com o envolvimento do *ETS2* na regulação dos genes megacariocíticos sugerem que *ETS2* tenha papel importante na LT e/ou LM-SD. Camundongos deficientes de *Ets2* morrem antes da hematopoiese embrionária e camundongos transgênicos *Ets2* desenvolvem anormalidades de comportamento linfóide semelhante ao observado em pessoas com SD. Assim como *ERG*, a superexpressão de *ETS2* também foi responsável por promover uma mudança na diferenciação de células eritrocíticas K562 para megacariocíticas (GE et al., 2008; MALIANGE et al., 2009).

Embora o membro *GABP α* da família *ETS* não tenha sido classificado como um oncogene, ele é expresso na linhagem megacariocítica e atua em estágios precoces de maturação da megacariopoese (PANG et al., 2006). Estudos têm mostrado que *GABP α* parece afetar diretamente o ciclo celular pela regulação da expressão de genes requeridos para síntese de DNA e degradação de inibidores do ciclo celular (YANG et al., 2007). Dos genes do Hsa21, *GABPA* foi um dos poucos cuja expressão estava elevada em LM-SD em relação à LMA-M7 não-Down (BOURQIN et al., 2006).

6.4. miRNAs codificados pelo cromossomo 21

O Hsa21 é conhecido por codificar 19 miRNAs (<http://www.mirbase.org>, acessado em 12/09/2012). Desses, o *miR-125b-2* se apresenta com expressão elevada em blastos de LT e LM-SD comparados com os megacariócitos normais (KLUSMANN et al., 2007). Klusmann et al. (2010) mostraram que *miR-125b-2* tem papel essencial na regulação da megacariopoese e na patogênese da LT e LM-SD, em cooperação com GATA1s. Os autores demonstraram, em células de camundongos e de humanos, que esta superexpressão de *miR-125b-2* desencadeia aumento proliferativo e auto-renovação de células progenitoras megacariocíticas (PMs) e progenitores eritrocíticos/megacariocíticos (PEM), sem afetar

sua diferenciação normal. Em contraste com *ERG* e *ETS2* o *miR-125b-2* caracteriza-se por ser altamente expresso em blastos de LT e LM-SD e esta superexpressão de *miR-125b-2* é fundamental no controle da proliferação de progenitores eritrocíticos/megacariocíticos.

Klusmann et al. (2010) documentaram que os *miR-125b* são altamente expressos em blastos da LT e LM-SD, uma vez que os genes alvo identificados de *miR-125b* foram pouco regulados. Assim, os *miR-125b* exercem potencial oncogênico por bloqueio da regulação gênica mediada por miRNA. Desta maneira, dependendo do contexto celular, o *miR-125b* pode agir como um oncogene ou como um supressor tumoral. No entanto, não se sabe exatamente o papel do *miR-125b-2* na leucemogênese.

Dados experimentais suportam a hipótese de que o aumento da dosagem de genes do Hsa21 e dos fatores de transcrição *ETS* facilitam o desenvolvimento da megacariopoiese anormal. Acredita-se que outros genes do Hsa21 (incluindo genes codificadores de miRNA) também sejam necessários para conduzir todo o espectro de doenças hematológicas em crianças com SD (MALINGE et al., 2009). Atualmente, fatores que levam à superexpressão de *miR-125b-2*, particularmente em blastos de LT e LM-SD permanecem a ser definidos.

Como discutido por diversos autores, a trissomia do cromossomo 21 e mutações no *GATA1* são importantes para LT, porém não são suficientes para o desenvolvimento da LM-SD, sugerindo que mutações genéticas adicionais são necessárias para seu desenvolvimento (SHIMIZU et al., 2008). Comprovando esse fato, nenhum modelo de camundongo trissômico desenvolve o fenótipo da LT ou LM-SD, mesmo quando acasalados com camundongos portadores de mutações no *Gata1* (MALINGE et al., 2012). Pesquisas extensivas têm sido focalizadas na identificação de alterações epigenéticas subsequentes à LT, que podem estar relacionadas à LM-SD, no intuito de prever a progressão maligna e o seu prognóstico nos pacientes (YOKOYAMA et al., 2012). Yokoyama et al. (2012) identificaram uma mutação somática no gene *TRIB1*, localizado no cromossomo 8, na região 8q24.13, que deve cooperar com mutação no *GATA1* na LM-SD. Vale ressaltar que essa mutação foi também detectada durante a remissão da LT, enquanto a mutação no *GATA1* havia desaparecido. Isso sugere que a mutação no *TRIB1* é um evento genético precoce na leucemogênese que contribui para o processo *multistep* dessa leucemia. Os autores demonstraram que *TRIB1* pode ser considerado um importante oncogene para LM-SD, devido ao aumento observado da fosforilação de ERK e da

degradação de C/EBP α , por meio da expressão aumentada de Trib1 em relação ao tipo selvagem.

Malinge et al. (2012) mostraram em um modelo de camundongo que a cooperação entre os três eventos oncogênicos: trissomia do cromossomo 21, mutação no *GATA1* e terceiro evento mutacional são suficientes para induzir a LM-SD *in vivo*. Além disso, identificaram *DYRK1A* como um gene da região DSCR potente na indução de leucemia megacarioblástica. Sua proteína DYRK1A tem papel fundamental na regulação de células tronco embrionárias na SD (CANZONETTA et al., 2008). Embora o gene *DSCR1* não esteja superexpresso na LM-SD, sua expressão reduzida também não revelou variação significativa. Além disso, demonstraram que a dosagem não balanceada do gene *DYRK1A* tem relação com a inibição de tumores sólidos e com a predisposição à leucemia em indivíduos com SD. Dessa maneira, este mesmo gene pode se apresentar tanto como supressor tumoral como proto-oncogene.

7. Doença residual mínima (DRM)

As mutações no *GATA1* da LT e LM-SD são clonais e, geralmente, a mesma mutação encontrada na LT é posteriormente encontrada na LM-SD. A DRM se caracteriza pela persistência de um pequeno número de células blásticas resistentes que não desaparecem durante a remissão espontânea da LT e durante o tratamento da LM-SD. Essas células escapam à ação das drogas por não estarem em fase proliferativa do ciclo celular (G0) (HITZLER; ZIPURSKY, 2005). Pine et al. (2005) demonstraram, pela primeira vez, a possibilidade de se utilizarem as mutações detectadas no *GATA1* ao diagnóstico de LT ou LM-SD como marcadores clonais estáveis para o monitoramento da DRM nesses pacientes.

Essa abordagem serve como uma ferramenta valiosa no acompanhamento da remissão espontânea da LT e na avaliação da resposta ao tratamento da LM-SD em nível subcitológico. A DRM pode ser dividida em dois subgrupos: um no qual o tamanho do clone de blastos após a remissão morfológica do tratamento continua a diminuir até se tornar indetectável versus um segundo grupo, em que um clone de blastos permanece detectável em nível submicroscópico. É interessante correlacionar esses padrões cinéticos da DRM com a probabilidade dela progredir mais tarde para LM-SD ou apresentar falha na resposta ao tratamento (HITZLER; ZIPURSKY, 2005).

8. Métodos de diagnóstico para LT e LM-SD

O diagnóstico da LT ocasionalmente ocorre durante as primeiras semanas de vida como hidropsia fetal. O RN pode ser assintomático, a não ser pela contagem sanguínea elevada associada com hepatoesplenomegalia. No fígado, há infiltração megacariocítica e fibrose hepática, provavelmente causada pelo excesso de citocinas secretadas dos megacarioblastos. A síndrome clínica completa pode ser desenvolvida apenas na segunda ou terceira semana de vida. O esfregaço sanguíneo mostra células vermelhas nucleadas, plaquetas gigantes e fragmentos megacariócitos, típicos blastos basofílicos com projeções características de blastos megacariocíticos (MALINGE et al., 2009). LM-SD é precedida em 20-60% dos casos por uma fase mielodisplásica caracterizada por trombocitopenia e alterações displásicas. O aspirado de MO é geralmente escasso, com detecção de fibrose na biópsia de MO (CREUTZIG et al., 1996; LANGE et al., 1998). Ao contrário da LT, não existe nenhum envolvimento clínico do fígado.

A realização de hemograma com contagem diferencial e análise morfológica sugere o diagnóstico de LA quando detectada a presença de células blásticas e outras alterações hematológicas, sendo esta suspeita confirmada com análise citomorfológica do mielograma, ao se evidenciar achado de 25% ou mais de blastos (VARDIMAN et al., 2002; HASLE et al., 2003).

A imunofenotipagem caracteriza a linhagem hematopoiética envolvida e seu grau de maturação por meio de anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos. Essa revela que blastos são positivos para CD33, CD34, CD41, CD61, glicoforina A e muitas vezes CD7 e CD36 (LANGERBRAKE et al., 2005; MASSEY et al., 2006). Savasan e Ravindranath (2003) observaram que blastos de crianças com LM-SD expressam CD36, em contraste com a baixa ou não expressão de CD36 nas LM sem SD. Os marcadores megacariocíticos CD41, CD42a e CD61 também contribuem para o diagnóstico de LM-SD. Além do diagnóstico da leucemia, a imunofenotipagem contribui para o monitoramento da DRM (PELLOSO et al., 2003). A imunofenotipagem dos blastos na LM-SD é geralmente similar à LT, exceto pela percentagem de CD34+ nas células ser menor na LM-SD (LANGEBRAKE, 2005).

A análise cromossômica do clone leucêmico tem identificado um grande número de alterações recorrentes, numéricas e/ou estruturais, adicionais e complexas, associadas aos aspectos morfológicos e imunofenotípicos específicos de cada leucemia (REGO, 2002). As

alterações cariotípicas que estão confinadas aos clones malignos desaparecem durante a remissão hematológica e reaparecem com a recidiva, algumas vezes demonstrando evidências de novas alterações adicionais ao clone anormal original (HITZLER; ZIPURSKY, 2005; IZRAELI et al., 2007). Além da trissomia constitucional do cromossomo 21, cópias adicionais do cromossomo 8 e 21 são as alterações numéricas mais frequentes na LM-SD, encontradas em aproximadamente 10 e 15%, respectivamente. Outros achados citogenéticos associados com alta taxa de recaída em LMA não-Down, tais como monossomia do 7 e deleção do 5/5q- também ocorrem em pacientes com LM-SD, mas parece não ter um impacto negativo no prognóstico nesses casos raros (GAMIS et al., 2003; 2005; RAINIS et al., 2003).

Abordagem de técnicas moleculares permite maior sensibilidade e especificidade para detecção de mutações no *GATA1* e tornam-se essenciais para a identificação de alterações genéticas presentes nas leucemias. Além disso, as técnicas moleculares têm sido fundamentais na decisão clínica sobre o melhor esquema terapêutico a ser aplicado que proporciona melhor qualidade de vida aos pacientes (OLIVEIRA et al., 2004).

No entanto, a capacidade de detecção de mutações depende da proporção de células mutantes na amostra. O rastreamento para detecção de mutações no *GATA1* em casos com baixa proporção de células blásticas era realizado anteriormente por meio de gel de poliacrilamida (PAGE) (AHMED et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2006). Posteriormente, veio a técnica de cromatografia líquida desnaturante de alta performance (dHPLC), que se baseia nas variações de heteroduplex e homoduplex dos fragmentos de DNA, técnica considerada até então eficaz para o rastreamento de alterações nos exons 2 e 3 do gene *GATA1*, com 100% de concordância com o sequenciamento automático (AMORIM et al., 2009). A sensibilidade da técnica é de cerca de 2 a 5%. Atualmente, uma técnica que tem se mostrado bastante promissora no rastreamento populacional para mutações no *GATA1* é a de *High resolution melting* (HRM), baseada na alteração da curva de temperatura de fusão e que apresenta alta sensibilidade de detecção (ALFORD et al., 2011).

Contudo, a identificação das mutações no *GATA1* só pode ser feita pelo sequenciamento direto, realizado tanto pelo DNA genômico como pelo cDNA. No entanto, quando a proporção de células blásticas na amostra é baixa, ambos os meios de detecção podem falhar na identificação das mutações. O sequenciamento por meio do DNA genômico é o mais utilizado devido ao seu êxito em relação a amostras escassas e a

materiais arquivados. A amplificação com primers intrônicos apresenta baixa sensibilidade na detecção de deleções que compreendem o exon 2 inteiro, sendo aconselhável, nesses casos, o uso de cDNA. Por outro lado, o sequenciamento por meio do cDNA também apresenta desvantagem, que é a identificação de apenas um produto de *splicing* alternativo do exon 2 (junção entre os exons 1 e 3). Dessa forma, não é possível determinar se a mutação subjacente é uma deleção grande ou uma única mudança de base no local do *splicing* intrônico (XU et al., 2003). Em geral, para a detecção por sequenciamento direto, a proporção de clones mutantes na amostra deve ser de no mínimo 20%.

Uma vez que a mutação é identificada, pode-se monitorar a DRM por meio de primers específicos para determinada mutação, permitindo maior sensibilidade (10^{-4} a 10^{-5}) de detecção de células mutantes por meio de qRT-PCR, muito além da detecção microscópica (PINE et al., 2005).

Atualmente, o diagnóstico da LT e LM-SD no Distrito Federal se firma em exames tradicionais de hemograma e mielograma, o que pode contribuir para seu subdiagnóstico. Há necessidade de implantação de uma unidade de diagnóstico molecular para a detecção precoce de mutações no gene *GATA1* em pacientes com SD.

O presente estudo serve de padronização para sua possível implantação, que beneficiará toda população do DF com informações peculiares a cada paciente: acompanhamento da evolução da doença; abordagem terapêutica diferenciada e adequada a cada um, com respectivos prognósticos; identificação da frequência de ocorrência da LT e LM-SD; e uniformização nos critérios de diagnóstico para um tratamento adequado e melhoria da qualidade de vida dessas crianças. Esta ação futuramente poderá servir de referência para todo o Brasil, uma vez que não há, neste momento, nenhum centro de pesquisa nem laboratório privado que realize o diagnóstico molecular precoce de mutação do gene *GATA1*.

OBJETIVOS

Esse estudo tem como objetivo geral identificar a presença de mutações somáticas no exon 2 do gene *GATA1* em uma coorte de recém-nascidos e crianças com SD para o diagnóstico de LT e LM-SD.

Objetivos específicos:

1. Padronizar o diagnóstico molecular para detecção precoce de mutações no exon 2 do gene *GATA1* em pacientes com síndrome de Down, possibilitando a incorporação de um protocolo de diagnóstico molecular de LT e LM-SD, no Distrito Federal.
2. Validar as mutações detectadas no *GATA1* como marcadores moleculares estáveis no monitoramento da doença residual mínima;
3. Determinar a frequência da LT em uma coorte de recém-nascidos com síndrome de Down no Distrito Federal, no período entre fevereiro de 2008 a junho de 2011;
4. Detectar a presença de mutações nos exons 2 e 4 do gene *GATA1* em um paciente com suspeita clínica de anemia diseritropoiética, sem síndrome de Down e sua família.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

1. Pacientes

O estudo foi realizado em 169 pacientes diagnosticados com SD, sem características clínicas de LT e LM-SD, que foram atendidos no Ambulatório de Genética Clínica, do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e no Núcleo de Genética (NUGEN), do Hospital de Apoio de Brasília (HAB), no período compreendido entre fevereiro de 2008 a junho de 2011. As crianças que vieram a apresentar um quadro de leucemia foram acompanhadas pela equipe do Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica da Secretaria de Estado e Saúde do Distrito Federal (NOHP-SESDF), sediada no HAB.

Tratando-se de centro regional de referência em Saúde Pública para diagnóstico das alterações genéticas e para diagnóstico e tratamento das leucemias infantis, o HUB e o HAB reúnem a integralidade dos casos de SD e leucemias infantis atendidas na rede pública do Distrito Federal, que correspondem aos pacientes pediátricos procedentes do DF e entorno.

A colheita de sangue foi realizada no Ambulatório de Genética Clínica do HUB e no NUGEN do HAB para a realização de exames citogenéticos, hematológicos e imunofenotípicos que correspondem à rotina diagnóstica assistencial. Parte dessas amostras foram utilizadas para a pesquisa molecular de mutações no exon 2 do *GATA1*.

Foram obtidas 183 amostras de sangue periférico e 15 de medula óssea de um total de 168 pacientes de ambos os sexos com SD, confirmada ao cariótipo, menores de quatro meses de vida. Essa idade de corte foi estabelecida considerando-se a idade em que a maioria dos pacientes com SD recebe o primeiro atendimento nos serviços de genética e com base no pico de LT que ocorre entre duas e três semanas de vida e que frequentemente desaparece dentro de três meses de vida (LANGE, 2000; MALINGE et al., 2009). Foi incluído um paciente que apresentou sinais clínicos de LM-SD com idade de um ano e seis meses. Esse paciente chegou ao ambulatório de Genética Clínica com um ano e um mês de vida para confirmação do diagnóstico de SD que havia sido realizado na Bahia (BA). Quatorze amostras de SP e 15 de MO do presente estudo corresponderam a repetições de colheita de material de seis pacientes nos quais houve suspeita clínica de LT para LM-SD.

O presente trabalho foi aprovado tanto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - Hospital Universitário

de Brasília (CEP-FM 034/2008) como também pelo comitê de ética e pesquisa da FEPECS SES-DF (Parecer nº034/2009).

1.1. Pacientes com suspeita clínica de anemia diseritropoiética sem SD

Foi analisado um paciente sem SD com quadro clínico de anemia diseritropoiética e trombocitopenia, com hemácias características de β -talassemia, o que sugeriria a necessidade de exame molecular para pesquisa de mutações nos exons 2 e 4 do gene *GATA1*. Como a suspeita era de mutação constitucional no *GATA1*, sua família foi também analisada.

Foram obtidas sete amostras de SP correspondendo a seis membros de uma família sem SD, a amostra restante correspondeu a seguimento do paciente suspeito, após um ano. Esses pacientes foram atendidos no HAB pela equipe do NOHP-SESDF, no período compreendido entre fevereiro de 2008 a junho de 2011.

2. Análise citogenética

A análise citogenética, que consiste em detectar trissomia constitucional do cromossomo 21 e possíveis alterações clonais, foi realizada no Laboratório de Genética Clínica da UnB e no NUGEN, quando se tratando de pacientes atendidos no Ambulatório de Genética Clínica do HUB e no HAB, respectivamente.

2.1. Obtenção de metáfases a partir do cultivo de leucócitos de sangue periférico (SP) e de células de medula óssea (MO)

Técnica de citogenética realizada de acordo com Moorehead et al. (1960); Bottura e Ferrari (1960), com modificações. As análises cromossômicas de cultura de linfócitos foram realizadas a partir de metáfases obtidas de cultura temporária *in vitro* de linfócitos de sangue periférico e/ou medula óssea, utilizando-se bloqueio da mitose em metáfase com colchicina. De cada paciente foram obtidos aproximadamente 2mL de sangue periférico ou aspirado de medula óssea, heparinizado.

No caso da amostra de SP, essa foi mantida em uma garrafa de cultivo estéril, onde era semeado 1 mL de sangue para cada garrafa com 9 mL de meio RPMI, previamente

filtrado, acrescidos de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL), 2 mL de soro fetal bovino e 400 µL de fito-hemaglutinina, em estufa a 37°C. As amostras foram cultivadas por 72 horas em estufa a 37°C. Para a realização dos procedimentos, acrescentaram-se 280 µL de colchicina (0,16 µg/mL) em cada garrafa de cultura, substância que despolimeriza a tubulina do fuso mitótico com bloqueio das mitoses em metáfase.

Em relação ao aspirado de MO, cada amostra foi mantida em duas garrafas de cultivo com 13 mL de meio de cultura RPMI, acrescidos de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 U/mL), com 2 mL de soro fetal bovino. Após homogeneizar o material, o mesmo era dividido em dois frascos estéreis, que foram identificados como cultura direta (MOD) e cultura de 24 horas (MO24), em estufa a 37°C. Para a realização da MOD, 280 µL de colchicina (0,16 µg/mL) foram acrescentados imediatamente após o procedimento e para a cultura de 24 horas, esta era acrescentada somente no dia seguinte.

Após o período de ação da colchicina, 20 min, o material era transferido para dois tubos de fundo cônico (falcon), com capacidade para 15 mL, e centrifugado por 5 min a 1000 rpm. O sobrenadante foi então desprezado e adicionaram-se ao sedimento 14 mL de solução hipotônica KCl 0,075 M previamente aquecida a 37°C, a qual provoca intumescência da célula e espalhamento dos cromossomos, seguida por homogeneização com auxílio de pipeta Pasteur. Em seguida, os tubos foram colocados em estufa a 37°C, por 20 min e submetidos à nova centrifugação a 1000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi desprezado e com a utilização do vórtex foram acrescidos 7 mL de fixador, constituído de uma solução de metanol e ácido acético glacial na proporção de 3 para 1, o qual fixa as metáfases e lava os restos celulares. Os tubos foram novamente centrifugados por 5 min, o sobrenadante desprezado e 7 mL de fixador acrescidos. A fixação foi repetida por mais três vezes e, ao término, cerca de 2 mL de fixador foram utilizados a fim de suspender as células do sedimento para o preparo das lâminas, variando o volume de acordo com o tamanho do sedimento.

As lâminas utilizadas foram limpas com solução saturada de KOH (40 g eram diluídos em 1 L de álcool comercial) onde permaneciam por 24 horas antes de serem lavadas em água corrente e depois armazenadas a 4°C em água destilada. No momento do uso, as lâminas foram posicionadas ligeiramente inclinadas e uma gota da suspensão de células era então colocada sobre a lâmina com ajuda de pipeta Pasteur. O excesso de água foi retirado com papel absorvente e a primeira lâmina foi flambada com auxílio de uma

lamparina de álcool a fim de se observar a concentração do material e a qualidade das metáfases, e mais seis lâminas foram preparadas e guardadas. Essas lâminas que não foram flambadas foram submetidas ao processo de “envelhecimento” (desidratação), colocadas em estufa seca, a 50°C durante 24 horas. Todas as lâminas foram identificadas para posterior análise.

A coloração foi feita com a utilização da solução de Giemsa, corante químico que se liga ao DNA, diluído em tampão fosfato 0,06 M e pH 6,8 (Na_2HPO_4 e KH_2PO_4) na proporção de 1 para 30, durante 5 min.

As lâminas desidratadas passaram por um processo de bandamento GTG, técnica de coloração dos cromossomos para produzir padrões específicos de bandas heterocromáticas escuras (bandas G) e eucromáticas claras alternadas (G - negativas). Cada lâmina foi inicialmente colocada em uma cubeta de plástico, contendo 50 mL de tampão “*Hanks Balance Salt Solution*” (HBSS) e 100 μL de tripsina, 2,5% a 37°C, solução que submete os cromossomos a uma digestão controlada, durante um tempo variável de 10 a 15 s. Após serem retiradas do frasco com tripsina, as lâminas foram mergulhadas em frasco contendo apenas HBSS (50 mL), retiradas, e em seguida mergulhadas em um terceiro frasco contendo 50 mL de HBSS e 1 mL de soro fetal bovino, e finalmente, mergulhadas em um quarto frasco contendo apenas HBSS, retiradas e submetidas à coloração com Giemsa nas mesmas proporções já descritas (SEABRIGHT, 1971).

Para análise utilizou-se microscópio óptico, com objetiva de imersão com aumento de 100x e ocular de 10x, totalizando um aumento de 1000x. Após análise, os cariótipos foram descritos de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN, 2009) (SHAFFER et al., 2009).

3. Análise Molecular

Para a análise molecular, cuja finalidade foi detectar mutações no exon 2 do gene *GATA1* e identificar a frequência de ocorrência dessas mutações em crianças com SD, amostras de SP e MO foram transportadas, em temperatura ambiente, do HAB ou do Laboratório de Genética Clínica (UnB) até o Laboratório de Biologia do Gene do Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, onde foram executados os exames moleculares.

3.1. Extração de DNA a partir de linfócitos

Foram coletados aproximadamente 1 mL de SP/MO em EDTA/heparina. O DNA genômico foi extraído por meio dos kits: *Genomic Blood DNA Purification kit (Amersham Biosciences)* ou *PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen)*, seguindo o protocolo específico. Quantificou-se a amostra de DNA em espectrofotômetro (*Pharmacia Biotech–Gene Quant*), o que permitiu o preparo da amostra em concentração ideal para análise.

3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR do exon 2 do gene *GATA1* foi realizada utilizando 50 ng de DNA genômico adicionados a uma mistura (volume final 50 µL) contendo: 4 mM Tris HCl (pH:8,4), 10 mM de KCl; 1 mM de MgCl₂; 10% de DMSO; 2 mM de dNTPs; 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen); 10 pmoles de cada primer: PR307 (5' TGAGGTGATGGAGTGGGAGGAGG 3') e PR310 (5' GGTCGGCACATCCATTTGAGAAGC 3') correspondendo à amplificação de um fragmento de 479 pb. A reação foi submetida a 35 ciclos no termociclador iCyclerTM (*Bio-Rad*). Desnaturação inicial ocorreu por 5 min. O tempo de ciclo e as temperaturas para desnaturação, anelamento e extensão foram respectivamente: 94 C por 30 s, 64 C por 30 s e 72 C por 1 min, e extensão final de 72 C por 7 min. Controles negativos foram incluídos em todos os experimentos.

3.3. PCR das amostras dos pacientes com suspeita clínica de anemia diseritropoiética

A reação de PCR dos exons 2 e 4 do gene *GATA1*, da família testada para anemia diseritropoiética, sem SD, foi realizada sob as mesmas condições descritas acima, com exceção dos primers do exon 4 que foram: PR378 (5' AAAAAGGACAGGGAAGTTGAGGTG 3') e PR379 (5' TGTGTAGGATGAAGGCAAGGGTTT 3') correspondendo à amplificação de um fragmento de 418 pb.

3.4. Eletroforese de DNA

Para análise do produto de PCR, em gel de agarose 1,5%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio foram aplicados 5 µL do produto de PCR adicionados de 1 µL de tampão de amostra 10X (TBE 10X; Glicerol 50%; Azul de Bromofenol 0,01%; Xileno Cianol 0,01%). O marcador de massa molecular utilizado foi de 100 pb (Invitrogen).

O tampão de corrida utilizado foi o TEB 0,5X (Tris Base 0,89 M; Ácido Bórico 0,89 M; EDTA 0,02 M). A eletroforese foi realizada em um tempo variável de três horas e com voltagem igual a 100 V. Após a corrida, o gel foi visualizado em transluminador e o resultado documentado digitalmente com auxílio do *software Quantity one* da *Bio-Rad*.

3.5. Sequenciamento direto

Após análise em gel de agarose os produtos de PCR foram encaminhados para purificação e sequenciamento direto na empresa Coreana *Macrogen* (<http://www.macrogen.com/eng/sequencing/automatic.jsp>), no sequenciador ABI 3730XL (*Applied Biosystems*). Foram empregados cerca de 100 ng de produto de PCR purificado, 10 pmoles de cada primer interno: PR351 (5' GAAGGATTTCTGTGTCTGAGG 3') e PR366 (5' CAATGCCAAGACAGCCACTC 3').

As sequências obtidas foram analisadas utilizando o software *sequence 4.9 demo* (www.genecodes.com) e comparadas com a sequência de referência do *GATA1* (GenBankNT-079573). As variações encontradas foram descritas de acordo com a Nomenclatura Internacional de mutações (DEN DUNNEN; ANTONARAKIS, 2000; DEN DUNNEN; PAALMAN 2003).

3.5.1. Sequenciamento direto das amostras dos pacientes com suspeita clínica de anemia diseritropoiética

As amostras da família com suspeita clínica de anemia diseritropoiética sem SD foram submetidas à reação de sequenciamento dos exons 2 e 4 do gene *GATA1* e suas análises foram realizadas sob as mesmas condições descritas anteriormente, com exceção dos primers utilizados no exon 4 que foram os mesmos da sua reação de PCR (PR378 e PR379).

4. Clonagem dos fragmentos de PCR

Para confirmar e determinar com precisão o tamanho e a localização das mutações encontradas no exon 2 do *GATA1* nos pacientes 1 e 2, produtos de PCR purificados foram clonados em um sistema de vetor pGEM-T (Promega) conforme ilustrado na Figura 4. Quinze clones recombinantes do paciente 1 e trinta e um clones do paciente 2 foram selecionados por digestão com as enzimas de restrição *SacII* e *NdeI* e em seguida submetidos ao sequenciamento.

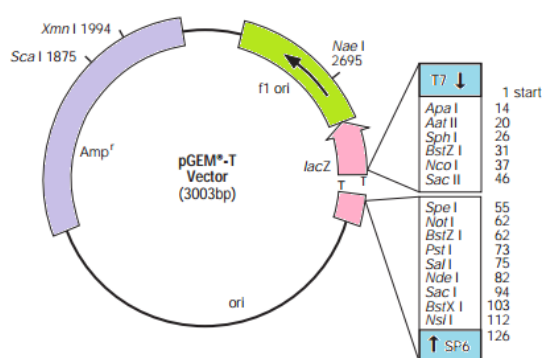


Figura 4 - Esquema do vetor pGEM-T utilizado para clonagem. Em destaque, estão as localizações dos sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *SacII* e *NdeI* empregadas na digestão dos plasmídeos.

4.1. Preparo de células competentes de *Escherichia coli*

As células de *E. coli* da linhagem DH5 α estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas, estriadas em placa de LB ágar e em seguida incubadas a 37°C por 18 horas. A partir desta placa, obteve-se de 4 a 6 colônias de 2-3 mm de diâmetro, inoculou-se em 100 mL de meio SOB, cultivou-se sob agitação (220 rpm) a 30°C até se atingir uma OD₆₀₀/mL de 0,6. Em seguida, a cultura foi resfriada em banho de gelo por 10 min e centrifugada a 2500 g, por 10 min, a 4°C. O sedimento de células foi gentilmente ressuspenso em 32 mL de tampão TB gelado, incubado em banho de gelo por 10 min e novamente centrifugado a 2500 g, por 10 min, a 4°C. O sedimento obtido foi gentilmente ressuspenso em 8 mL de tampão TB. Em seguida, adicionou-se lentamente DMSO homogeneizando-o para uma concentração final de 7%, incubou-se no gelo por 10 min, distribuiu-se 200 μ L da suspensão de células em tubos de 1,5 mL, esses foram armazenados imediatamente em nitrogênio líquido (INOUE et al., 1990).

4.2. Ligação e transformação de *E.coli*.

Todas as ligações foram feitas em um volume final de 10 µL contendo: 10 ng de produto de PCR purificado; 50 ng do vetor pGEM-T (pGEM-T *Vector System* - Promega); 1x de tampão ligase “*Rapid Ligation Buffer*”; 3,0 U de T4 DNA Ligase (Promega) incubados por 1 hora à temperatura ambiente e, em seguida, a 4°C durante a noite. A proporção 1 de vetor para 2 de inserto foi calculada de acordo com a fórmula descrita em Promega *Protocols & Applications Guide* (1991) (www.promega.com/biomath).

As células competentes aliquotadas foram descongeladas em banho de gelo. Foram utilizados 5 µL do sistema de ligação para transformar células da linhagem DH5α. As células foram incubadas em gelo por uma hora, em seguida, submetidas ao choque térmico por 1 min a 42°C e rapidamente transferidas para o banho de gelo por 2 min. Posteriormente, acrescentou-se 800 µL do meio SOC e incubou-se a 37°C por 1 hora.

Foram semeados 100 µL das células preparadas em placas de LB ágar (volume final de aproximadamente 20 mL) contendo: ampicilia (100 µg/mL); X-Gal 0,004 % (solução estoque em N,N'-Dimetilformamida); IPTG 50 µM e cultivadas a 37°C por cerca de 18 horas.

4.3. Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

Para extração de DNA plasmidial foi utilizado o método de lise alcalina segundo Birnboim e Doly (1979). Cada colônia branca foi retirada com auxílio de palitos de madeira estéreis e incubada em 3 mL de meio 2YT com 3 µL AMP, sob agitação (220 rpm) a 37°C por aproximadamente 20 horas. Foram retiradas aproximadamente 10 colônias brancas de cada amostra e apenas uma colônia azul de todo experimento para servir de controle negativo das análises.

Foi retirada uma alíquota de 1,5 mL de uma cultura de *E. coli* em fase estacionária de crescimento, transferida para um tubo *Eppendorf* e centrifugada a 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi totalmente descartado e o sedimento de células ressuspensionado em 100 µL de solução I (Tris HCl 25 mM; pH 8,0; EDTA 10 mM; pH 8,0) com auxílio do vórtex. Adicionou-se 200 µL de solução II (NaOH 0,2 M e SDS 1%) que solubiliza os lipídeos da membrana e permite a completa lise celular. O conteúdo do tubo foi misturado

por inversão e incubado por 5 min à temperatura ambiente. Logo após, adicionou-se 150 μL de solução III gelada (Acetato de potássio 3 M; Ácido acético 2 M; pH 5,6), por inversão do tubo, misturou-se a solução até o aparecimento do precipitado de DNA cromossomal. Incubou-se no gelo por 5 min e centrifugou-se a 12.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi retirado e transferido para um tubo novo onde foram adicionados 400 μL de isopropanol. Incubou-se por 2 min à temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi totalmente retirado e o sedimento de DNA plasmidial obtido foi lavado com 1 mL de etanol 70% gelado, sem ressuspensão, e centrifugado a 12.000 rpm por 8 min. O sedimento foi seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 50 μL de água milli Q e armazenado a -20°C . Após a obtenção de clones recombinantes, os plasmídeos preparados (minipreparação) foram submetidos à análise em gel de agarose a 1% para verificar se os plasmídeos eram recombinantes.

4.4. Análise de perfil de restrição

Inicialmente, a digestão dos plasmídeos foi realizada de forma linear apenas com a enzima *HindIII* (20 U/ μL) e analisada em gel de agarose a 1%, para seleção das amostras lineares que, posteriormente, foram digeridas com as enzimas *SacII* (20 U/ μL) e *NdeI* (20 U/ μL) para a liberação do fragmento de PCR clonado. As digestões foram preparadas com 15 μL de volume final, contendo: 1 μL e 2 μL de DNA, respectivamente, incubadas em banho-maria a 37°C por 2 horas. As enzimas foram utilizadas com seus respectivos tampões de reação, de acordo com as recomendações do fabricante.

5. Doença residual mínima (DRM)

Com a identificação precisa das mutações após clonagem e sequenciamento direto foi realizado o monitoramento da DRM em dois pacientes, utilizando primers específicos para cada mutação no exon 2 do *GATA1*: a) Amostras do paciente 1 com LT foram submetidas ao *multiplex* PCR com os primers: PR349 (5' CACTGGCCTACACTCCCCAGGTA 3') e PR310 correspondendo à amplificação de um fragmento de 156 pb. Como controle da reação foi utilizado o gene do gliceraldeído-3-fostato desidrogenase (*GAPDH*) com primers: PR194 (5' CCCATCACCATCTTCCAGG 3') e PR195 (5' AGTGAGCTTCCCGTTCAGC 3') correspondendo à amplificação de um

fragmento de 472 pb; b) Amostras do paciente 2 com LM-SD foram submetidas ao *nested* PCR com primers: PR307 e PR382 (5' GCAGCTGCAGCAGGCCAGTGC 3') correspondendo à amplificação de um fragmento de 318 bp.

A PCR foi realizada seguindo as mesmas condições descritas anteriormente, sendo, neste momento, procurada a mesma mutação identificada na primeira amostra de cada paciente ao diagnóstico. A amplificação da banda foi sinal de mau prognóstico para os pacientes caracterizando a DRM. No paciente 1 com LT, foi calculada a densidade relativa da intensidade de pixels na escala de cinza na razão *GATAI* (156 pb)/*GAPDH* por meio do software ImageJ para confirmar a diminuição da população mutada.

6. Imunofenotipagem

Foram realizadas análises multiparamétricas por meio da técnica de citometria de fluxo para determinação das linhagens celulares, de acordo com os seus estágios de maturação normal na medula óssea. O painel de anticorpos monoclonais (AcMo) incluiu: Anticorpos monoclonais intracitoplasmáticos (cCD3, cCD20, cTdT, cMPO) e de superfície (sHLA-DR, sCD2, sCD3, sCD7, sCD8, sCD11b, sCD13, sCD14, sCD19, sCD33, sCD34, sCD41, sCD42a, sCD45, sCD56, sCD61). Inicialmente, a amostra de medula óssea foi distribuída em diferentes tubos contendo 50 µL em cada um, separando-os em dois grupos, para marcação com painel intracitoplasmático e de superfície.

Para a marcação intracitoplasmática, foi adicionado, em cada tubo, 1 mL de solução de lise comercial (BD FACS™ Lysing Solution) e incubados à temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, foram adicionados 400 µL de solução de saponina a 5% (saponina + PBS) durante 10 min, para perfuração da membrana citoplasmática das células mononucleares. Posteriormente, as células foram lavadas com solução salina balanceada (PBS), centrifugadas por 5 min a 3500 rpm e, em seguida, foram adicionados 4 µL de cada AcMo do painel citoplasmático, conjugados a fluorocromos diferentes, incubando-se os tubos por 15 min, no escuro e em temperatura ambiente.

Para a marcação de superfície foram utilizados 4 µL de cada AcMo do painel pré estabelecido, com posterior incubação por 15 min, no escuro e em temperatura ambiente, e suspensão em solução de lise comercial (BD FACS™ Lysing Solution) por 10 min. Em seguida, o material foi centrifugado por 5 min a 3500 rpm e lavado por três vezes com solução salina balanceada (PBS) e novamente centrifugado por 5 min a 3500 rpm.

Os dados foram coletados ajustando-se o limiar de dispersão frontal (FSC) em células viáveis para excluir plaquetas e debris (células mortas), com análise de pelo menos 10.000 eventos de cada tubo, usando-se o programa CellQuest (BD, San Jose, CA) do citômetro de fluxo FACS Calibur (BD, San Jose, CA). Os resultados foram reportados como porcentagem de células positivas e intensidade média de fluorescência (IMF) das células positivas.

RESULTADOS

O número amostral correspondeu ao número de conveniência representado por todos os pacientes encaminhados aos ambulatórios de genética clínica do HUB e HAB com suspeita de SD, mas sem características clínicas de LT e LM-SD. Foi possível alcançar um número amostral de 168 pacientes com SD menores que quatro meses de idade, sendo 92 (54,8%) do sexo masculino e 76 (45,2%) do sexo feminino (Tabela 2). A menor idade observada entre esses pacientes foi de 1 dia e a maior foi de 3 meses e 26 dias, média de 26,5 dias, mediana de 14 dias (Gráfico 1). Destes 168 pacientes com SD, um subgrupo correspondendo apenas aos recém-nascidos (RNs), menores ou iguais a 30 dias de vida, foi representado por 125 (74,4%) pacientes, média de 12,7 dias e mediana de 10 dias.

Tabela 2 - Frequências absoluta e relativa dos pacientes com SD menores que 4 meses de vida segundo o sexo.

Sexo	Frequências	
	Absoluta	Relativa (%)
Masculino	92	54,8
Feminino	76	45,2
TOTAL	168	100

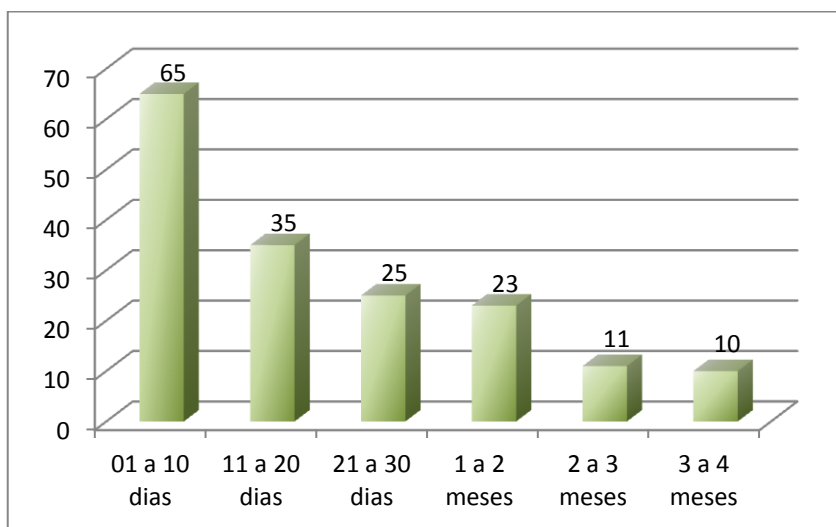


Gráfico 1 - Distribuição da frequência absoluta de pacientes com SD, segundo sua faixa etária.

Foi incluído nesse estudo um paciente com SD do sexo masculino (Paciente 4) com suspeita clínica de LM-DS na idade de um ano e seis meses para confirmação molecular do diagnóstico de LM-DS. Analisamos retrospectivamente sua primeira amostra, com um ano e um mês de vida, que havia sido colhida apenas para citogenética, pois já havia passado da faixa etária de corte para análise molecular.

É interessante destacar que não houve perda do material disponível para análise molecular, fato que ilustra a crescente incorporação da pesquisa molecular para mutações no *GATA1* em RNs com SD, possibilitando uma gradativa implantação do exame molecular nesses centros de diagnóstico.

1. Análise citogenética

Dos 168 pacientes com SD, menores que 4 meses de vida, diagnosticados pelo exame citogenético, 159 (94,6%), apresentaram a trissomia livre do cromossomo 21, cujo cariótipo foi 47,XY,+21 ou 47,XX,+21 (Figura 5), e nos nove casos restantes (5,4%), foram identificadas translocações Robertsonianas, com cariótipo 46,XY,+21,rob(21;21)(q10;q10) ou 46,XX,+21,rob(21;21)(q10;q10). Não foi encontrado nenhum caso de mosaïcismo. Além disso, o paciente 2 com trissomia constitucional do 21 apresentou alteração clonal 47,XY,del(5)(p13~14),del(6)(q?),+21c[12]/47,XY,+21c[46] no aspirado de medula óssea (Figura 6).

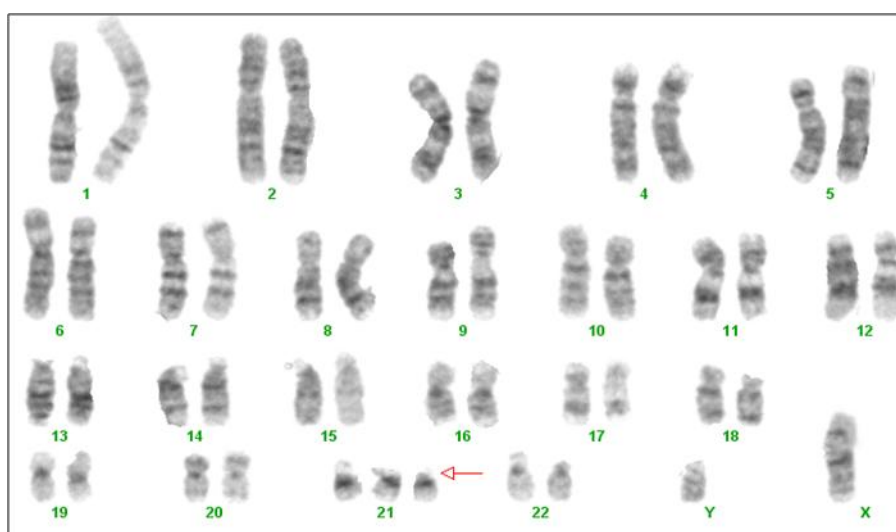


Figura 5 - Cariótipo com trissomia constitucional do cromossomo 21 numa metáfase obtida de cultura de linfócitos.



Figura 6 - Análise citogenética de aspirado de medula óssea do paciente 2. Cariótipo: 47,XY,del(5)(p13~14),del(6)(q?),+21c.

2. Análise molecular por PCR

A partir da análise de PCR foi possível selecionar as amostras que passariam para próxima etapa, que seria o sequenciamento direto. Dentre as 198 amostras analisadas pela PCR (Figura 7), praticamente todas foram submetidas ao sequenciamento, com exceção de algumas amostras do paciente 2 que apresentaram múltiplas bandas em gel de agarose (Figura 8), o que impediria uma qualidade satisfatória para análise das seqüências.

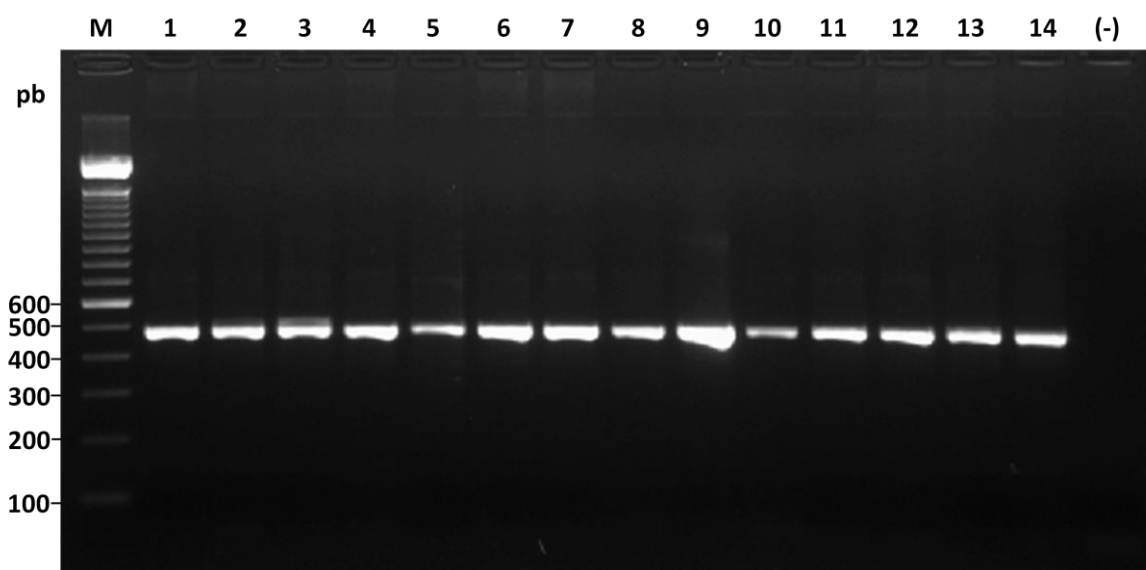


Figura 7 - Análise da PCR de 14 pacientes com SD em gel de agarose a 1,5%. Marcador de massa molecular (100 pb); quatorze amostras de produtos de PCR (fragmento de 479 pb); controle negativo.

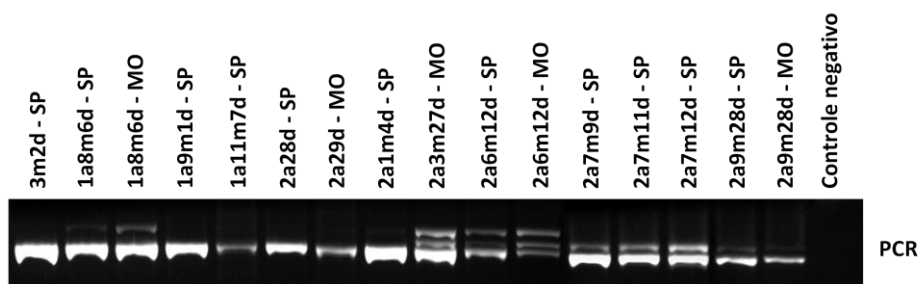


Figura 8 - Mutação detectada no paciente 2 com LM-SD. Dezesesseis amostras (SP e MO) em ordem cronológica desde 3 meses e 2 dias até 2 anos 9 meses e 28 dias. Análise de produtos de PCR do exon 2 do *GATA1* (fragmento de 479 pb) mostrou múltiplos clones, apresentando até três bandas.

3. Sequenciamento direto

Para detecção de mutações no exon 2 do *GATA1* onde mais de 95% das mutações ocorrem, amostras de todos os pacientes, com exceção de algumas amostras do paciente 2 citado acima, foram analisadas por meio do sequenciamento direto a partir de produtos de PCR purificados. A frequência de mutações no exon 2 do *GATA1* foi de 2,36%, correspondendo a quatro de 169 pacientes com SD como mostrado na Tabela 3. Todas estas quatro mutações detectadas: p.Tyr63fs66 (Figura 9); p.Ala62fs13 (Figura 10); p.Thr53fs82 (Figura 11); p.Asp20fs117 (Figura 12); foram inéditas e inseriram um *frameshift* com códon de parada prematura, resultando possivelmente na expressão de *GATA1*s como consequência da tradução alternativa.

Considerando apenas os RNs com SD menores ou iguais a 30 dias de vida, a frequência de mutações no *GATA1* foi de 1,6% (2 de 125). Estes dois pacientes (pacientes 1 e 3) foram diagnosticados com LT durante as primeiras semanas de vida, com 18 e 7 dias de vida, respectivamente. No entanto outros dois pacientes, ambos com quatro dias de vida, apresentaram alterações hematológicas de LT, porém nós não conseguimos detectar nenhuma mutação no exon 2 do *GATA1* pelo sequenciamento. Considerando esses dois RNs com LT e aqueles dois com LT e mutações no *GATA1* (Pacientes 1 e 3) a frequência de LT seria de 3,2% (4 de 125).

O paciente 4 foi encaminhado com um ano um mês e seis dias de idade, para confirmação do diagnóstico de SD. Cinco meses depois, ele apresentou anormalidades hematológicas o que levou a suspeitar de LM-SD. A identificação da mutação c.58delG corroborou o diagnóstico de LM-SD.

Tabela 3 - Mutações no exon 2 do *GATA1* em pacientes com SD e LT ou LM-SD.

Pacientes	Sexo	Idade	Diag	Ptns alt	Mutações
Paciente 1	M	18d	LT	p.Tyr63fs66	c.187_211delTACAGGGACGCTGAGGCCTACAGAC
Paciente 2	M	2a7m	LM-SD	p.Ala62fs13	c.185_206dupGCTGCAGCTGCGGCACTGGCCT
Paciente 3	F	7d	LT	p.Thr53fs82	c.160_166delACCGCTGinsGTA
Paciente 4	M	1a1m7d	LM-SD	p.Asp20fs117	c.58delG

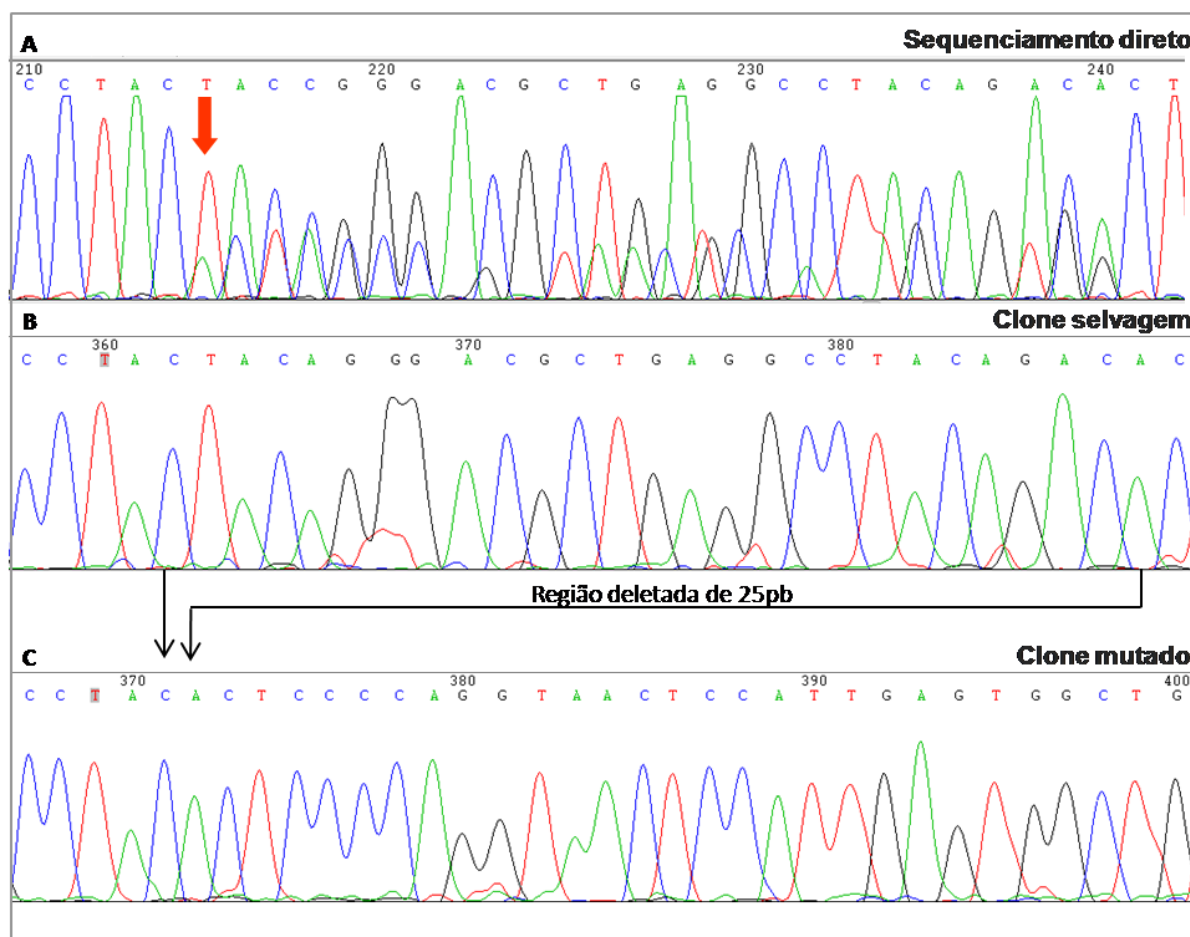


Figura 9 - Análise do eletroferograma do paciente 1 ao diagnóstico de LT. (A) sequenciamento direto dos produtos de PCR mostrou uma mudança de fase de leitura (seta vermelha), indicando a mutação (c.187_211delTACAGGGACGCTGAGGCCTACAGAC). Após a detecção da mutação, produtos de PCR foram clonados e os clones sequenciados individualmente; (B) clone selvagem mostrou a porção de 25 pb que foi deletada neste paciente; (C) clone mutado confirmou a deleção de 25 pb que alterou a leitura do *GATA1* e resultou na introdução de um códon de parada prematura depois do Tyr63.

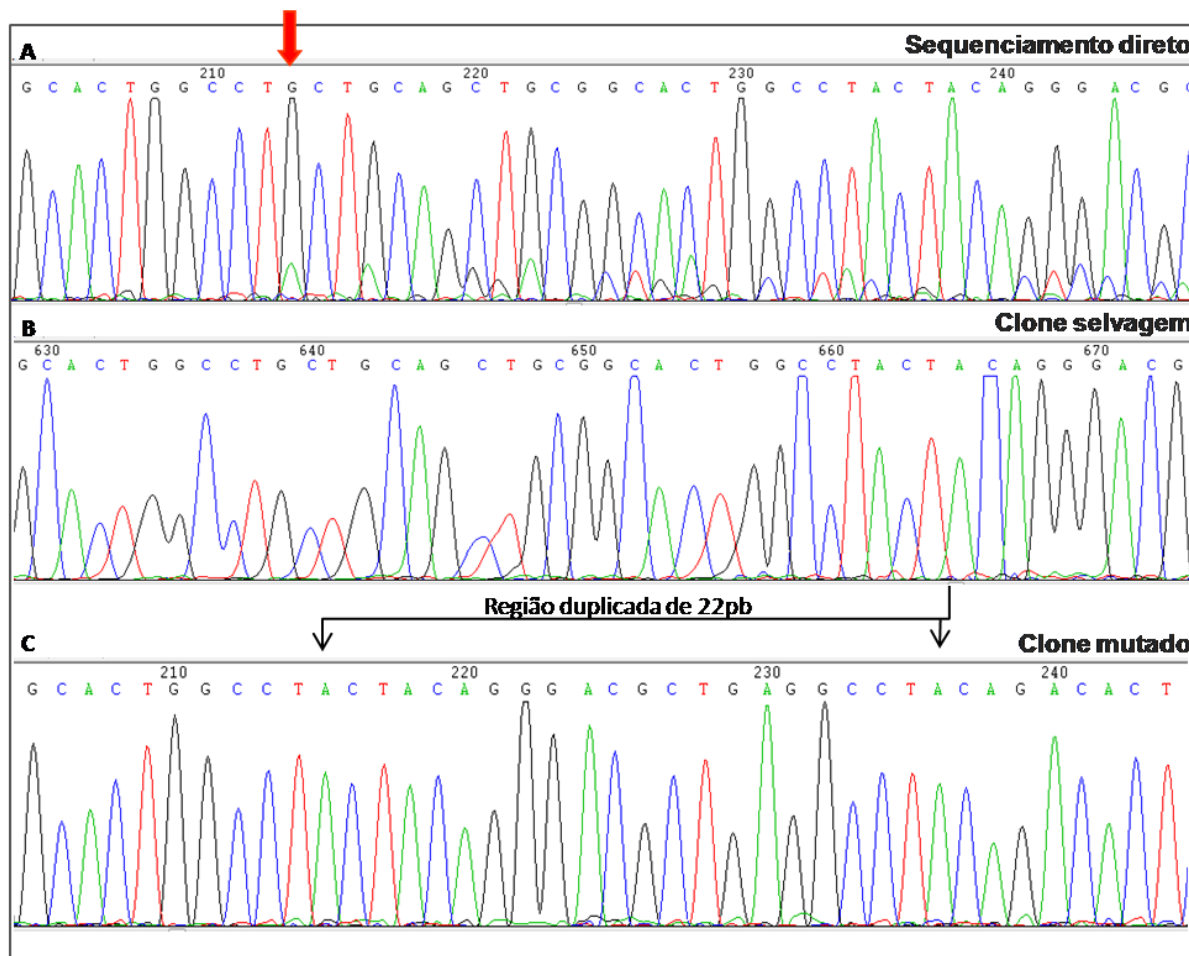


Figura 10 - Análise do eletroferograma do paciente 2 ao diagnóstico de LM-SD (4^o amostra de MO). (A) sequenciamento direto dos produtos de PCR mostrou uma mudança de fase de leitura, indicando a mutação (c.185_206dupGCTGCAGCTGCGGGCACTGGCCT). Após a detecção da mutação, produtos de PCR foram clonados e os clones sequenciados individualmente; (B) clone selvagem mostrou a porção mutada neste paciente; (C) clone mutado confirmou a duplicação de 22 pb que alterou a leitura do *GATA1* e resultou na introdução de um códon de parada prematura depois do Ala62.

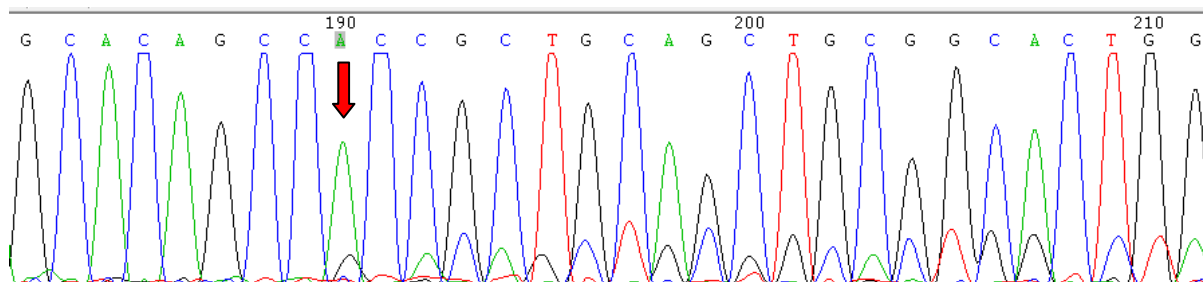


Figura 11 - Mutação (c.160_166delACCGCTGinsGTA) detectada no paciente 3 interrompeu a leitura de *GATA1* e resultou na introdução de um códon de parada prematura depois do códon Thr53.

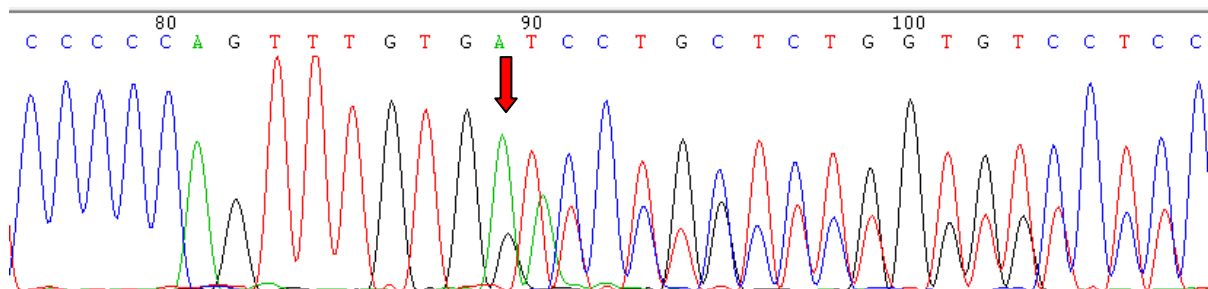


Figura 12- Mutação (c.58delG) detectada no paciente 4 interrompeu a leitura de *GATA1* e resultou na introdução de um códon de parada prematura depois do códon Asp20.

4. Análise da clonagem dos fragmentos de PCR

Todos os fragmentos liberados pelas enzimas de restrição *SacII* e *NdeI* para confirmação das clonagens construídas nos pacientes 1 e 2, corresponderam aos tamanhos esperados de aproximadamente 500 pb, conforme visto nos géis de agarose a 1,5% da Figura 13. Foi possível observar uma diferença significativa entre suas bandas, permitindo assim a seleção dos possíveis clones mutados, para que posteriormente fossem confirmados pelo sequenciamento.

Após o sequenciamento de 15 e 31 clones selecionados dos pacientes 1 e 2, respectivamente, por digestão com as enzimas *SacII* e *NdeI* foi possível confirmar a deleção de 25 pb no paciente 1; e no paciente 2 foi confirmada a duplicação de 22 pb, no entanto era esperado a detecção de uma segunda mutação neste paciente, já que sua PCR havia apresentado um padrão de até três bandas.

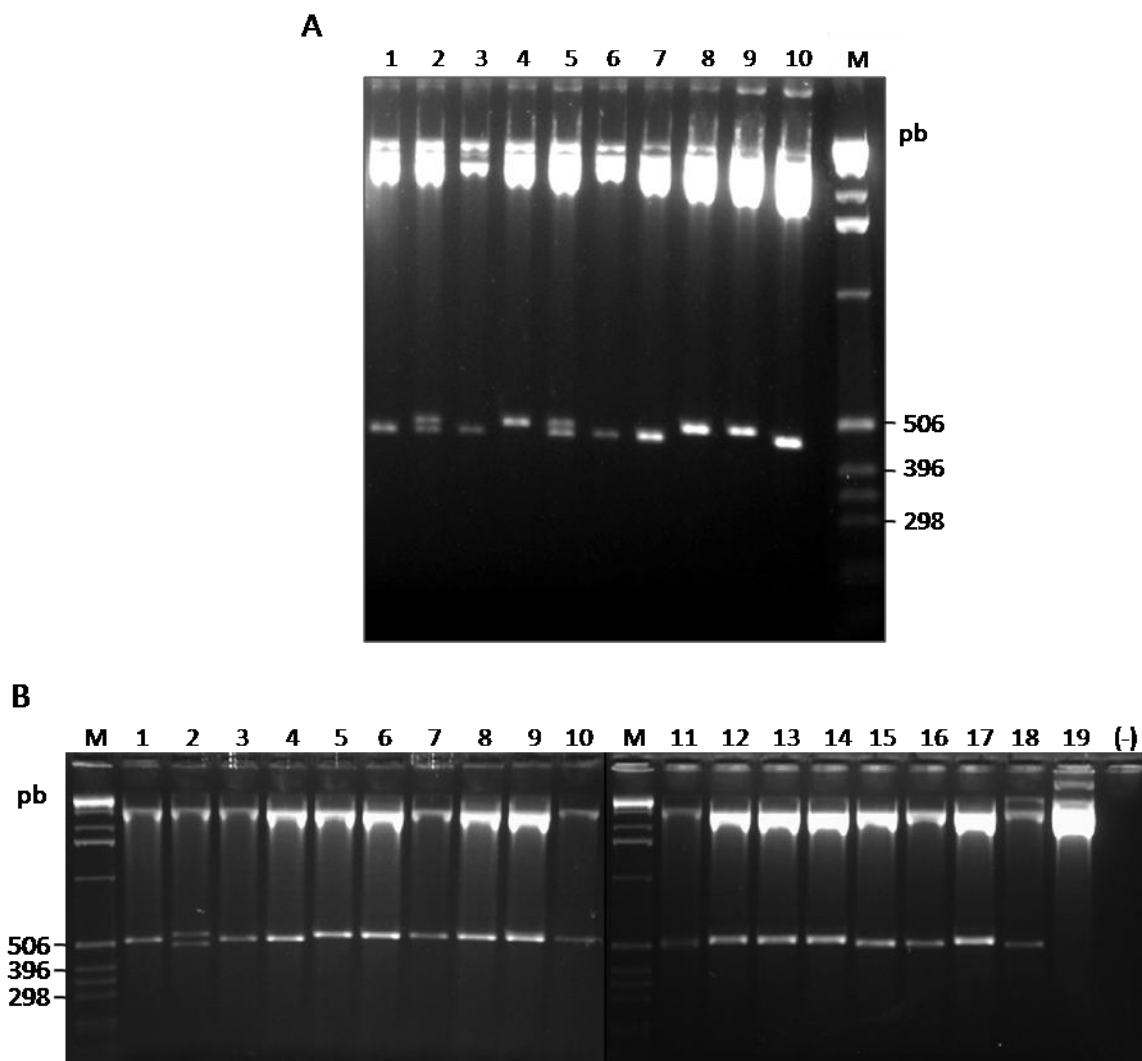


Figura 13 - Análises de restrição dos pacientes 1 e 2 visualizadas por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Marcador de massa molecular (1 kb); Todos os fragmentos liberados corresponderam a aproximadamente 500 pb; (A) dez clones obtidos do paciente 1, observa-se uma diferença significativa entre suas bandas; (B) poços de 1-18 representam 18 clones obtidos da 4^o amostra de MO (2a6m12d) do paciente 2, sendo possível identificar uma pequena diferença entre seus clones; poço 19 representa o controle negativo (clone azul).

5. Doença residual mínima (DRM)

Foi realizado o monitoramento da DRM do paciente 1 com LT, por meio de *multiplex* PCR, em quatro amostras (SP e MO) cronológicas: 18d, 26d, 1m3d e 1m17d. Foi observado um decréscimo da população de clones mutantes de *GATA1* nas últimas amostras, o que poderia caracterizar o progresso para remissão espontânea (Figura 14A). Tal progresso para remissão espontânea da LT foi comprovado pela quantificação relativa da intensidade de pixels em tons de cinza proveniente das bandas do gel de agarose,

mostrando um decréscimo de 61% das mutações em *GATA1* em relação ao controle *GAPDH* como mostrado na Figura 14B. A remissão completa não foi alcançada uma vez que o paciente foi a óbito em consequência de uma doença cardíaca congênita aos três meses de vida.

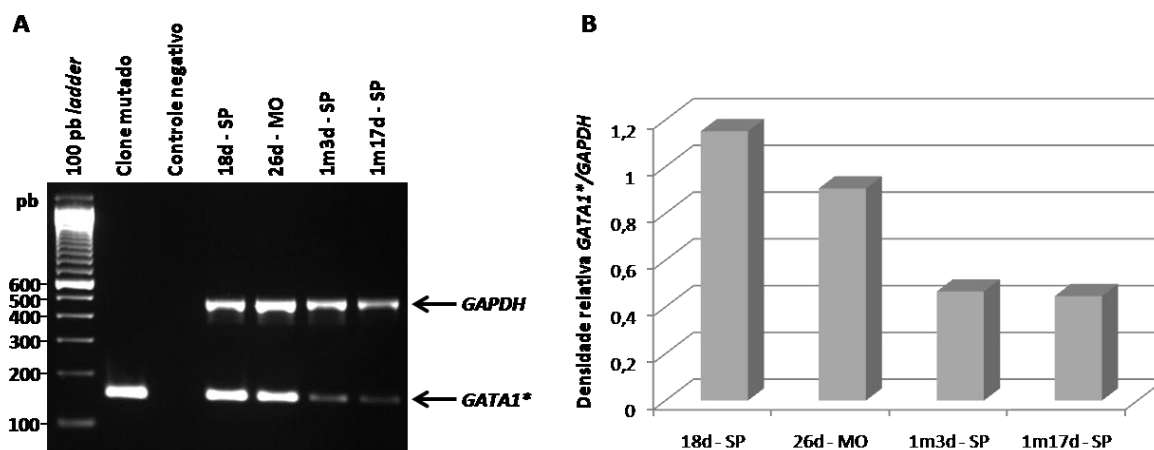


Figura 14 - Monitoramento da remissão espontânea do paciente 1 com LT. (A) análise da DRM por *Multiplex* PCR. Marcador de massa molecular (100 pb); pGEM-T (controle positivo); controle negativo; quatro amostras (SP e MO) do pacientes 1 em idades diferentes. A amplificação do fragmento menor (156 pb) correspondeu à mutação do *GATA1* e a amplificação do fragmento maior (472 pb) correspondeu ao controle da reação *GAPDH*; (B) quantificação relativa da mutação no *GATA1* em relação ao *GAPDH*, mostrando a evolução para remissão espontânea.

O paciente 2 chegou ao ambulatório de genética clínica aos três meses de vida e foi subdiagnosticado para LT. Entretanto, com um ano e oito meses de idade, ele retornou com suspeita clínica de leucemia. Aproximadamente cinco meses depois, a análise citogenética mostrou alteração clonal (47,XY,del(5)(p13~14),del(6)(q?),+21c) no aspirado de MO, o que confirmou o diagnóstico de LM-SD (Figura 6). O mesmo foi confirmado pela imunofenotipagem após um mês do diagnóstico citogenético. Algumas de suas dezesseis amostras (SP e MO) obtidas em diferentes datas de coleta revelaram múltiplas bandas no gel de agarose por análise da PCR (Figura 8). O sequenciamento direto não detectou nenhuma mutação nas primeiras oito amostras deste paciente, desde 3m2d até 2a1m4d. A amostra da PCR de dois anos e seis meses de idade foi então clonada, por apresentar um padrão mais recente de três bandas, e após o sequenciamento direto, uma duplicação de 22 pb foi detectada nos clones recombinantes. Usando um primer específico para essa duplicação, foram monitoradas todas as 16 amostras desse paciente para DRM, por *nested* PCR, e foi possível detectar a persistência da mutação no exon 2 do *GATA1* em todas as

amostras deste paciente, incluindo as primeira amostras coletadas anteriormente à manifestação da LM-SD (Figura 15).

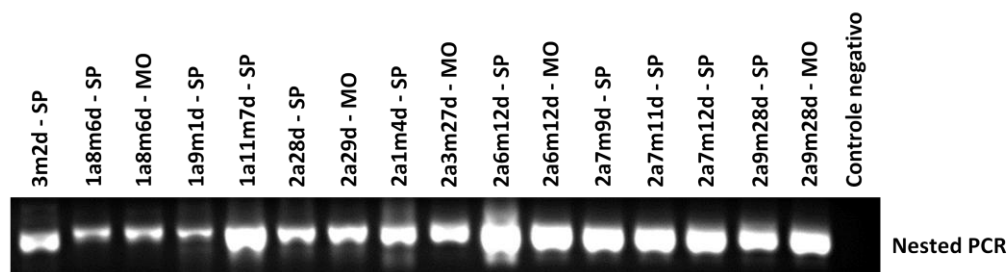


Figura 15 - Monitoramento da resposta terapêutica do paciente 2 com LM-SD. Após identificação da duplicação de 22 pb no exon 2 do *GATA1*, a resposta terapêutica foi monitorada por *nested* PCR, mostrando a amplificação do fragmento de 318 pb em todas as dezesseis amostras (SP e MO).

Para desvendar o caso atípico do paciente 2 que apresentou três bandas pela PCR em gel de agarose (Figura 8) e apenas uma mutação detectada pelo sequenciamento direto de 31 clones previamente selecionados por enzimas de restrição, era preciso descobrir qual das três bandas corresponderia ao fragmento mutado. Como a mutação era uma duplicação de 22 pb, a primeira banda, de menor massa, possivelmente corresponderia à população de células normais. Para isso, realizou-se uma estimativa de massa molecular das três bandas e calculou-se pela migração da corrida. Com base nestes dados estimados, pode-se constatar que a duplicação de 22 pb correspondia à segunda banda de maior massa molecular (próxima à selvagem), conforme ilustrado no gráfico 2 abaixo.

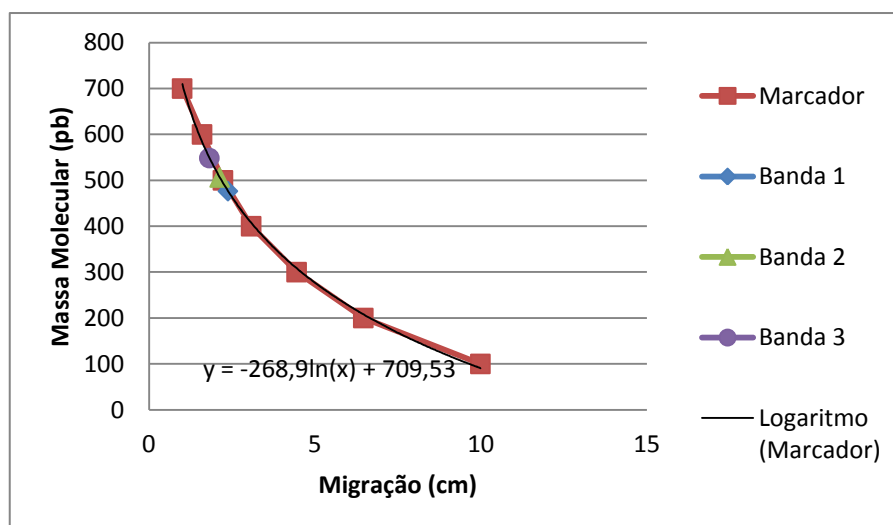


Gráfico 2 - Estimativa da massa molecular das três bandas reveladas pela PCR em gel de agarose no paciente 2 pela migração da corrida.

Para a análise da banda de maior massa molecular, esta foi eluída e reamplificada com os primers originais e com os do *nested* PCR (Figura 16). As três bandas foram reamplificadas com os primers originais e duas bandas foram reveladas pelo *nested* PCR, ao invés de ter sido amplificada apenas uma banda referente à mutação. O próximo desafio foi então identificar se a duplicação de 22 pb corresponderia agora à primeira ou segunda banda do *nested* PCR realizado a partir do eluído. Para isso, realizamos novamente uma estimativa de massa molecular das duas bandas reveladas pelo *nested* PCR e calculamos pela migração da corrida. Com base nesses dados estimados, pudemos constatar que a duplicação de 22 pb correspondeu à segunda banda com maior massa molecular, e que a primeira banda correspondeu ao alelo selvagem, conforme ilustrado no gráfico 3 abaixo. Logo, a última banda visualizada pela PCR em gel de agarose é resultante de um híbrido formado entre a banda selvagem e a mutada com 22 pb.

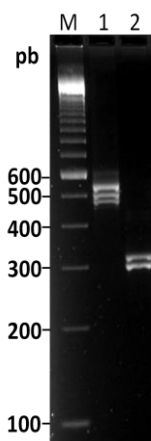


Figura 16 - *Nested* PCR da eluição da terceira banda do paciente 2 (3º amostra de MO - 2a3m27d). Marcador de massa molecular (100 pb); amostra 1 - fragmento amplificado com os primers PR307-310 (479 pb); amostra 2 - fragmento amplificado com os primers PR307-382 (318 pb).

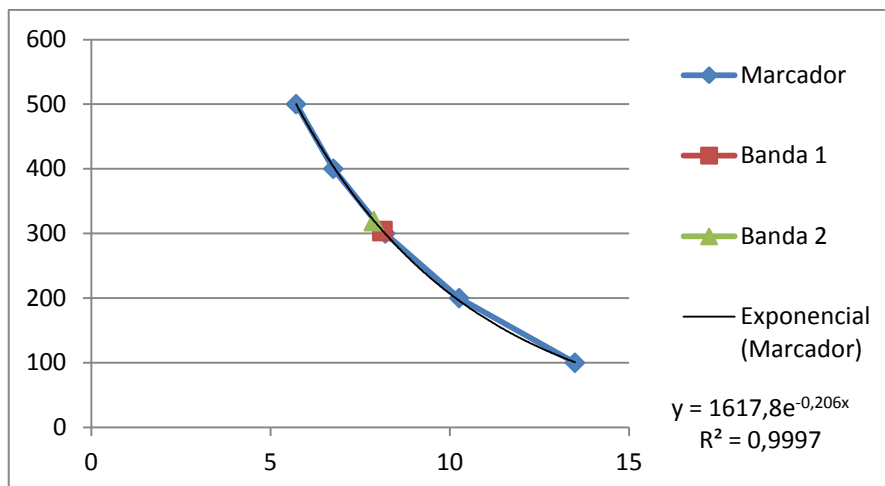


Gráfico 3 - Estimativa da massa molecular das duas bandas reveladas pelo *nested* PCR em gel de agarose no paciente 2 pela migração da corrida.

Em relação ao paciente 4 com LT que apresentou deleção de uma base (c.58delG), o mesmo sucesso não foi alcançado ao analisar a DRM nesse paciente. Foi realizado inicialmente uma digestão com a enzima *Bam*HI, pois a sequência mutada criava um sítio de restrição para a enzima. No entanto, essa técnica não se mostrou eficaz, pois tanto as amostras desse paciente como de indivíduos controles foram digeridas. Deste modo, a fim de aumentar a especificidade da reação, foi desenhado um primer específico para esta mutação e analisado por meio da PCR, porém novamente os controles foram amplificados. Como se trata de mutação de uma única base é possível que o primer não esteja sendo tão específico quanto o esperado e, portanto, o alelo normal continua sendo amplificado.

6. Análise dos pacientes com suspeita de anemia diseritropoiética

Dos seis pacientes selecionados para mutações constitutivas no *GATA1*, 4 (66,7%) eram do sexo masculino e 2 (33,3%) do sexo feminino e as idades variaram entre 3 a 30 anos, com média de 15 anos e mediana de 11,5 anos.

Todas as amostras desses pacientes foram submetidas à PCR com os exons 2 e 4 do *GATA1*, regiões documentadas como propensas a mutações nesse perfil de pacientes, para em seguida serem analisadas pelo sequenciamento direto (Figura 17).

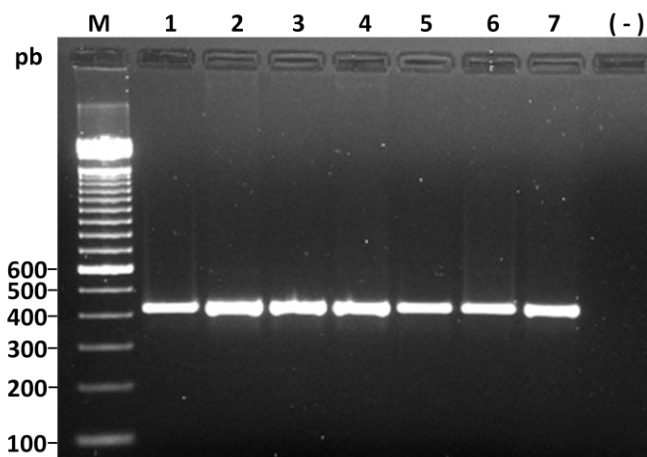


Figura 17- Análise de PCR do exon 4 de pacientes com suspeita de anemia diseritropoiética em gel de agarose a 1,5%. Marcador de massa molecular (100 pb); sete amostras de produtos de PCR provenientes de seis pacientes (fragmento amplificado de 418 pb); controle negativo.

O sequenciamento direto proveniente das amostras do paciente suspeito de anemia diseritropoiética e de sua família não mostrou nenhuma mutação nos exons 2 e 4 do *GATA1*.

7. Análise imunofenotípica (IF)

A análise imunofenotípica, por citometria de fluxo, permitiu a caracterização da LM-SD nos pacientes 2 e 4 e em dois pacientes (LT-I e LT-II) diagnosticados morfologicamente como LT, porém sem detecção de mutação no exon 2 do *GATA1*. Os outros pacientes que apresentaram mutação no exon 2 do *GATA1* provavelmente não tinham blastos suficientes para realização da IF e comprovação da linhagem. Como a medula óssea na maioria das crianças com LT e LM-SD é fibrótica, a avaliação da contagem de blastos se torna bastante dificultada. O critério clássico de diferenciação está representado na Tabela 4, cujos marcadores relacionados à LT e LM-SD caracterizam-se por ser o CD41, CD42 ou CD 61 (LANGE, 2000).

Tabela 4 - Resultados da caracterização imunofenotípica.

Pacientes	Citoplasmático %				Superfície %															
	MPO	CD 3	TdT	CD 20	CD 13	CD 19	CD 7	CD 8	CD 34	CD 56	CD 41	CD 2	HLA DR	CD 45	CD 11b	CD 14	CD 3	CD 33	CD 61	CD 42a
Pac 2 SP (21/10/09)	0	4	-	-	1	-	44	11	17	1	31	-	19	98	15	-	14	62	21	60
Pac 4 SP (28/09/10)	4	1	-	6	60	5	13	9	34	0	49	10	67	87	67	0	10	-	37	26
Pac LT-I SP (23/02/11)	6	13	-	-	80	7	-	-	49	-	47	13	27	93	-	15	4	82	59	43
Pac LT-II MO (11/05/09)	0	36	0	4	-	7	52	9	69	40	59	-	26	97	-	-	17	4	25	-

DISCUSSÃO

Sendo a SD a aneuploidia humana mais comum com alta prevalência de LT e LM-SD há necessidade de implantação de uma unidade de diagnóstico molecular para identificação precoce de mutações no *GATA1* em pacientes com SD no período neonatal. Apesar dos avanços obtidos na área da biologia molecular durante as últimas décadas que permitem um diagnóstico sensível e específico, acredita-se que a LT ainda seja subdiagnosticada, até mesmo em países em que o serviço de genética molecular é amplamente difundido. Atualmente, o diagnóstico da LT no Distrito Federal perpetua-se em exames tradicionais de hemograma e mielograma, o que pode, dessa forma, contribuir para seu subdiagnóstico, já que o exame molecular ainda não é realizado rotineiramente.

O rastreamento de mutações no *GATA1* em RNs com SD sem achados clínicos de LT, alvo do presente trabalho, foi relatado por Ahmed et al. (2004) e Pine et al. (2007) usando sequenciamento direto de produtos de PCR. Nesse trabalho foram analisados 168 pacientes com SD sem manifestações clínicas de LT e um paciente com suspeita de LM-SD para mutações no exon 2 do *GATA1*. Quatro novas mutações no *GATA1* indicativas de LT e LM-SD foram detectadas correspondendo a uma frequência de 2,36% (quatro de 169), conforme mostrado na Tabela 3. Considerando apenas os RNs com menos de 30 dias de vida a frequência de mutações foi de 1,6% (dois de 125). Os estudos anteriores de Zipursky et al. (1997), Ahmed et al. (2004) e Pine et al. (2007) apresentaram frequências maiores de LT com 10,4% (oito de 77), 9,5% (dois de 21) e 3,8% (22 de 585), respectivamente. No entanto, se incluíssemos na frequência aqueles dois pacientes com alterações hematológicas de LT, nos quais não conseguimos identificar mutações no *GATA1*, a frequência seria de 3,2% (quatro de 125 RNs com SD), próxima à frequência publicada por Pine et al. (2007).

Em dois pacientes com SD (pacientes 1 e 3) as mutações no *GATA1* foram detectadas em amostras coletadas nas primeiras semanas de vida, antes de qualquer evidência hematológica de LT. Esses achados confirmam os dados da literatura, onde o pico de LT ocorre na segunda e terceira semanas de vida (LANGE, 2000; MALINGE et al, 2009). O paciente 1 apresentou sinais clínicos de leucemia aos 26 dias de vida, oito dias após sua primeira visita ao ambulatório de genética para diagnóstico da SD. A paciente 3 não retornou ao ambulatório de genética clínica para acompanhamento.

Houve dois trabalhos brasileiros que também rastrearam mutações no exon 2 do *GATA1* em crianças com SD sem manifestações clínicas de doenças hematológicas. Magalhães (2005) e Amorim et al. (2009) avaliaram respectivamente 22 e 59 crianças com SD e ambos não identificaram nenhuma mutação no exon 2 do *GATA1* por sequenciamento direto, sendo o resultado da Amorim também confirmado por dHPLC.

A maioria das crianças com SD é encaminhada para avaliação citogenética logo após o nascimento. Em 125 pacientes de um total de 169 tinham idade entre zero e 30 dias, considerada ideal para rastreamento da LT, o que corresponde à 74% dos pacientes encaminhados aos ambulatórios de Genética Clínica do HUB e HAB com suspeita clínica de SD. A média de idade que esses pacientes chegam aos ambulatórios é de seis meses, dado observado entre fevereiro de 2008 a junho de 2011. Em nosso estudo incluímos 44 pacientes que chegaram aos ambulatórios de Genética Clínica com idades entre 31 dias e 3 meses e 26 dias e não identificamos nenhuma mutação entre eles, possivelmente por serem normais para mutações no *GATA1*, ou então por corroborar a hipótese de que o pico para detecção de LT ocorre na segunda e terceira semanas de vida, frequentemente desaparecendo dentro de três meses de vida (LANGE, 2000; MALINGE et al., 2009).

No entanto, a ampliação dessa idade de corte foi importante para o diagnóstico da LM-SD no paciente 2. Nele, apesar de termos identificado a mutação no exon 2 do *GATA1* apenas aos 2 anos e 29 dias de vida, ao analisarmos amostras retrospectivamente com métodos específicos para detecção dessa mutação, identificamos sua presença desde a primeira amostra, obtida aos 3 meses de vida. Logo, se não tivéssemos aumentado a idade de corte dos pacientes com SD, teríamos perdido essa amostra primordial.

A seleção de casos com SD em idades abaixo de 4 meses, no presente estudo, de fato pode ter impedido o diagnóstico de mutações no *GATA1* em pacientes com LM-SD com até 3 anos de idade. A presença de um caso, paciente 4, com um ano e um mês de vida chama a atenção porque é importante a identificação precoce de mutações no gene *GATA1* em pacientes com LM-SD que propiciaria o melhor protocolo de tratamento para eventuais pacientes. No período de estudo, cerca de 109 pacientes com SD foram excluídos do grupo amostral para rastreamento do *GATA1* por estarem acima da idade preconizada para a seleção. Embora não se tenha notícia de que qualquer desses pacientes tenha apresentado quadro de LM-SD, não está excluída a possibilidade de algum deles ter tido a doença. Nem todos os pacientes são acompanhados nos serviços de atendimento para SD e é possível

que aqueles que apresentem a mutação no *GATA1* tenham precocemente falecido de LM-SD não diagnosticada.

A ausência de detecção de mutações no exon 2 do *GATA1* em dois RNs com SD, que posteriormente foram diagnosticados por sinais clínicos de alterações hematológicas, como LT; e nas oito amostras iniciais do paciente 2, possivelmente seja reflexo da raridade de clones mutantes presentes nas amostras desses pacientes que foram subdiagnosticados para LT. Essa baixa contagem de blastos resulta em uma baixa sensibilidade de detecção por meio do sequenciamento direto (AHMED et al., 2004). Magalhães et al. (2006) relataram um caso de alta leucometria ao diagnóstico sem nenhuma mutação detectada no *GATA1*. Posteriormente, foi observado que o paciente encontrava-se no 21º dia de vida e a contagem de blastos na amostra era menor que 10%. Portanto, o clone mutante poderia estar presente, mas devido sua raridade em relação aos alelos normais não foi possível sua detecção por meio do sequenciamento direto. Alford et al. (2011) também relataram falha na detecção de mutações no *GATA1* em 16 pacientes com LT (12%) devido à baixa contagem de blastos. Os autores documentaram 0,5% como limite inferior de blastos para detecção de mutações bem sucedidas. No entanto, eles mesmos apresentaram um paciente, cuja contagem de blastos foi de 42%, que falhou na detecção de mutação, sugerindo assim uma mutação incomum envolvendo uma sequência fora da área genômica ou uma grande deleção dentro desta área afetando o sítio de anelamento do primer.

De acordo com Alford et al. (2011) a identificação de mutações por meio do sequenciamento direto de DNA a partir de blastos submetidos a citometria de fluxo (FACS) foi bem sucedida, no entanto, a partir de amostras não fracionadas já houve falha na detecção. Em alguns casos, foi necessário subclonar produtos de PCR do gene *GATA1* para identificar a mutação. Nesses casos onde não se detecta mutação no *GATA1*, Alford et al. (2011) sugeriram a realização da técnica de HRM (*High Resolution Melting*), devido ao seu maior poder de sensibilidade, sendo, portanto bastante promissora no rastreamento populacional de RNs com SD para mutações no *GATA1*.

Contudo, apesar do surgimento das técnicas moleculares de diagnóstico que revolucionaram a ciência com seu maior poder de sensibilidade e especificidade, a citogenética nunca perdeu seu lugar, pelo contrário, aliou-se à biologia molecular e ganhou novo poder de resolução, abrindo a era da citogenética molecular (MINGRONI-NETTO, 1995).

A grande relevância da citogenética pôde ser constatada ao diagnóstico do paciente 2, no qual o exame citogenético (Figura 6) foi o primeiro a identificar o clone leucêmico, confirmando a suspeita clínica de LM-SD e permitindo o início imediato do tratamento quimioterápico nesse paciente. Já pela imunofenotipagem, o mesmo só foi confirmado um mês após o diagnóstico citogenético. No entanto, era de se esperar que o sequenciamento direto fosse a primeira técnica capaz de detectar a LM-SD, sendo que o mesmo não ocorreu, passando a ser a última técnica a comprovar esse diagnóstico, possivelmente devido à baixa frequência de clones leucêmicos. Desta forma, isto permite reconhecer o imenso valor da citogenética, que até hoje, depois de tantos anos e de tantos avanços moleculares ainda se perpetua, sendo neste caso considerada a técnica mais sensível de detecção para o diagnóstico de LM-SD.

Nesse mesmo caso do paciente 2, a análise da PCR de algumas amostras revelou múltiplas bandas, sendo detectadas até três bandas em gel de agarose, conforme mostrado na Figura 8. Este padrão de múltiplas bandas já foi descrito por alguns autores, como Ahmed et al. (2004); Groet et al. (2005); Cabelof et al. (2009), que identificaram múltiplas mutações independentes no *GATA1*. No caso desse trabalho, no entanto, após a clonagem e o sequenciamento detectamos apenas duas populações clonais, uma normal e a outra com a duplicação de 22 pb, de um total de 31 clones previamente selecionados por digestão (Figura 13B). De acordo com os cálculos de estimativa de massa molecular das bandas pela migração da corrida, essas duas populações clonais corresponderam a primeira e segunda banda do gel de PCR, de menores massas moleculares, respectivamente (Gráfico 2). Constatamos também que a última banda da PCR, de maior massa molecular, seja, provavelmente, resultante de um híbrido formado entre a primeira banda que é a selvagem e a segunda que corresponde à mutada com 22 pb (Gráfico 3). Logo, esse único caso de múltiplas bandas não foi similar aos achados de Ahmed *et al.* (2004), que verificaram pela primeira vez as múltiplas mutações independentes no *GATA1*, em quatro de 12 pacientes que desenvolveram LM-SD. Nesses pacientes, a análise dos clones mutantes por sequenciamento direto permitiu a confirmação de que cada banda continha uma mutação diferente de *GATA1*. Curiosamente, ao diagnóstico da LM-SD apenas uma das três mutações estava presente. Assim, a presença dessas múltiplas mutações no *GATA1* sugere que as mutações são eventos frequentes em células hematopoiéticas de crianças com SD.

Apesar da baixa frequência de mutações detectadas no exon 2 do *GATA1*, todas as mutações identificadas aqui foram: inserção, deleção e duplicação, que resultaram em um

códon de parada prematura. Esses dados são consistentes com as frequências de 78% por Alford et al. (2011), 74% por Cabelof et al. (2009), 83% por Hitzler et al. (2003) e 100% por Wechsler et al. (2002).

A maioria das mutações descritas foram detectadas no exon 2 do *GATA1*, no entanto há também registros raros de mutações no intron 1 (PINE et al., 2007), intron 2 (RAINIS et al., 2003) e no exon 3 do *GATA1* (AMORIM et al., 2009; GROET et al., 2003). Como o exon 3 é iniciado a partir do códon Met84 e contém apenas 29 nucleotídeos, a probabilidade de uma mutação ocorrer nesse exon é pequena. No entanto, sugere-se que o exon 3 seja também incluído nos protocolos de triagem, especialmente quando o rastreamento para o exon 2 falhar na detecção de mutações (SPLENDORE et al., 2005). Magalhães et al. (2006) chegaram a estender sua triagem para mutações no exon 3, em quatro pacientes (2 com LM-SD e 2 com LT), onde não haviam obtido êxito na detecção de mutações no exon 2. Mas, mesmo assim, não encontraram nenhuma mutação no exon 3 do *GATA1* quando analisados por sequenciamento direto.

A análise da DRM dos pacientes 1 e 2 realizada por meio de PCR revelou a amplificação da região mutada em diferentes datas de coleta, caracterizando assim um mau prognóstico. No entanto, pode-se inferir que a população de clones leucêmicos do paciente 1 apresentou diminuição gradativa em relação às suas primeiras amostras. Conforme visto na Figura 14, esse paciente estava evoluindo para remissão espontânea, como era de se esperar pelo curso natural da LT que costuma ocorrer dentro de três meses de vida (LANGE, 2000; MALINGE et al., 2009). Já o paciente 2 foi considerado um caso particularmente interessante, porque nunca respondeu ao tratamento para LM-SD e conseqüentemente nunca entrou em remissão completa. Mesmo sendo reinduzido ao tratamento, ele continuou apresentando blastos que contribuiram para uma evolução atípica da doença. A detecção de clones mutantes aos três meses de vida indica também que ele provavelmente não chegou a atingir remissão espontânea da LT, conforme mostrado na Figura 15.

Foi avaliada nesse trabalho uma ferramenta de monitoramento da DRM nos pacientes 1 e 2 com LT e LM-SD, respectivamente (Figuras 14 e 15) e comprovamos que os blastos são marcadores clonais estáveis adequados para avaliar a DRM. Vários autores sugerem o uso de qRT-PCR para monitorar a DRM (HITZLER E ZIPURSKY, 2005; PINE et al., 2005), no entanto, demonstramos aqui que mesmo uma PCR semi-quantitativa pode ser utilizada quando existir alta frequência de clones mutantes. No entanto, o mesmo

sucesso não foi alcançado ao analisarmos a DRM do paciente 4, com deleção de apenas uma base, que possivelmente ocorreu devido à sequência nucleotídica da região afetada, o que garantiu baixa especificidade de detecção nesse caso (dado não mostrado). Desta maneira, nem utilizando a técnica qRT-PCR resolveria a questão, pois se trata de um problema estrutural da sequência mutada.

Os pacientes com SD do sexo masculino representaram 55% da amostra (93 de 169), demonstrando concordância com a literatura, onde há uma discreta predominância do sexo masculino (MANDAVA et al., 2010). Indivíduos do sexo masculino também apresentaram um risco elevado (75%) de mutações no *GATA1* quando comparados com os do sexo feminino (25%). Porém esses dados não foram significativos devido ao número pequeno de pacientes identificados com mutações no *GATA1*. Contudo, esses valores foram concordantes com os apresentados por Pine et al. (2007) que foram de 68,18% e 31,82%, e por Ahmed et al. (2004) e Cabelof et al. (2009) de 66,7% e 33,3%, respectivamente.

A análise citogenética revelou que a trissomia livre do cromossomo 21, resultado da não disjunção meiótica, foi identificada em 94,6%, dado semelhante aos achados publicados de 95% e 89,05% por Freeman et al. (2007) e Mandava et al. (2010), respectivamente. Em relação à translocação robertsoniana, entre o cromossomo 21q e o braço longo de um dos cromossomos acrocêntricos, Berend et al. (2003) relataram em 5%, Freeman et al. (2007) registraram em 4% e Mandava et al. (2010) documentaram em 7,06%. Em nosso estudo a frequência foi de 5,4%, concordante com os relatos supracitados. Além disso, todas as mutações robertsonianas encontradas foram rob(21;21), considerada a mais rara entre elas, uma vez que as mais comuns são entre o cromossomo 21q e os cromossomos 14q ou 22q (CYRUS et al., 2007, BEREND et al., 2003).

Apenas um caso de alteração clonal foi identificado por análise citogenética, o do paciente 2 com LM-SD. De acordo com dados citogenéticos de LT apresentados por Alford et al. (2011), nenhuma correlação significativa foi observada entre a não progressão para LM-SD e a presença da trissomia do cromossomo 21, como a única alteração citogenética. Portanto o cariótipo não prediz quais pacientes irão progredir para LM-SD.

De acordo com Langebrake (2005) e Malinge et al. (2009) a imunofenotipagem dos blastos da LM-SD é geralmente similar à LT, exceto pela menor percentagem de CD34+ nas células de LM-SD. Nossos resultados foram concordantes com os supracitados; todas as amostras sequenciais do paciente 2 apresentaram frequência baixa de CD34+ em relação

aos possíveis casos de LT (LT-I e II), os quais foram diagnosticados apenas morfológicamente (Tabela 4).

Esperávamos encontrar no paciente com suspeita de anemia diseritropoiética e em sua família mutações constitucionais nos exon 2 ou 4 do *GATA1* com produção somente da isoforma GATA1s, porém sem predisposição à leucemia. No entanto, a hipótese clínica não se confirmou por meio do sequenciamento direto, havendo, portanto, necessidade de rastreamento total de todos os exons do *GATA1* para melhor esclarecimento. Esse paciente apresentou características clínicas que pareciam semelhantes ao caso descrito por Yu et al. (2002) com anemia e trombocitopenia, cujas hemácias apresentavam características morfológicas de β -talassemia.

No presente estudo, técnicas moleculares simples foram ideais para detecção de mutação no *GATA1* e para monitoramento da DRM, enquanto que o estudo citogenético contribuiu na identificação de alterações numéricas e estruturais. Com base em nossas observações, recomendamos que todos os RNs com SD sejam rastreados rotineiramente em avaliações clínicas para a detecção precoce de mutações no *GATA1*, determinando assim a frequência real da LT e permitindo o acompanhamento da evolução da LT e LM-SD. Ressaltamos que os pacientes com LT mesmo com curso clínico benigno e remissão espontânea, apresentam risco aumentado de desenvolverem LM-SD e necessitam de seguimento clínico mais estreito (ZIPURSKY et al., 1992).

A frequência de mutações no *GATA1* em RNs nesse estudo e em estudos anteriores está provavelmente subestimada, devido à incapacidade ainda dos métodos existentes de detectarem quando a frequência de clones é baixa. Novos métodos, tais como sequenciamento de próxima geração com alta cobertura, poderão vir a lançar luz quanto à verdadeira frequência de mutações no *GATA1* e adicionar novos conhecimentos sobre a leucemogênese na SD.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No estudo sobre a triagem de mutações no exon 2 do gene *GATA1* em uma coorte de RNs e crianças com SD, esse trabalho propõe que a detecção precoce dessas mutações é de extrema importância para o diagnóstico e o acompanhamento da evolução clínica da LT e LM-SD. Propõe, também, que as mutações específicas de cada paciente servem de marcadores moleculares estáveis no monitoramento da DRM de forma bastante eficaz por meio da técnica de PCR.

O conjunto de resultados obtidos evidencia a padronização efetiva das técnicas moleculares para o diagnóstico da LT e LM-SD, que proporcionou a identificação de mutações inéditas no exon 2 do *GATA1* em quatro pacientes. Além disso, proporcionou a oportunidade de monitorar a DRM em dois pacientes com alta frequência de clones mutantes. No entanto, esse mesmo sucesso não foi alcançado em um paciente com mutação pontual, o que possivelmente ocorreu devido à baixa especificidade de detecção no caso. Em relação ao paciente com suspeita clínica de anemia constitucional e sua família, a ausência de detecção de mutações no exon 2 e 4 do *GATA1*, merece ser melhor investigada em todos os exons do *GATA1* para confirmação do diagnóstico clínico inicial.

Como perspectiva desse estudo, podemos citar a possibilidade de incorporação de um protocolo de diagnóstico molecular para a complementação dos exames já realizados, uma vez que não há, no momento, nenhum centro de pesquisa nem laboratório privado que realize este diagnóstico molecular no Brasil, visando a criação de um centro de referência para todo o país. Contudo, será preciso aprimorar a técnica de rastreamento utilizada com a análise de HRM que tem se mostrado bastante promissora para este fim. Além disso, deve-se expandir a investigação para os introns 1 e 2 e exon 3 do *GATA1*, uma vez que as alterações podem ocorrer ao longo de toda região codificadora.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M.; STERNBERG, A.; HALL, G.; THOMAS, A., et al. Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. **Blood**, 103(7): 2480-2489, 2004.
- ALFORD, K.A.; REINHARDT, K.; GARNETT, C.; NORTON, A., et al. Analysis of GATA1 mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia. **Blood**, 118: 2222-2238, 2011.
- AMORIM, M.R.; FIGUEIREDO, A.B.; SPLENDORE, A.; MAGALHÃES, I.Q., et al. Detection of mutations in GATA1 gene using automated denaturing high-performance liquid chromatography and direct sequencing in children with Down syndrome. **Leuk Lymphoma**, 50: 834-840, 2009.
- ARCECI, R.J. Down syndrome, transient myeloproliferative syndrome, and leukemia: bridging development and neoplasia. **J Pediatr Hematol Oncol**, 24(1): 1, 2002.
- BALDUS, C.D.; LIYANARACHCHI, S.; MRÓZEK, K.; AUER, H., et al. Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 101: 3915-3920, 2004.
- BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G., et al. Proposal for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) cooperative group. **British Journal of Haematology**, 33(4): 451-458, 1976.
- BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. **Ann Intern Med**, 103(4): 620-625, 1985.
- BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). **British Journal of Haematology**, 78(3): 325-329, 1991.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, 7(6): 1513-23, 1979.
- BOTTURA, C.; FERRARI, I. A simplified method for the study of chromosomes in man. **Nature**, 186: 904-905, 1960.
- BOURQUIN, J.P.; SUBRAMANIAN, A.; LANGEBRAKE, C., et al. Identification of distinct molecular phenotypes in acute megakaryoblastic leukemia by gene expression profiling. **Proc Natl Acad Sci**, 103: 3339-3344, 2006.
- BEREND, S. A.; PAGE, S.L.; ATKINSON, W.; MCCASKILL, C., et al. Obligate Short-Arm Exchange in De Novo Robertsonian Translocation Formation Influences Placement of Crossovers in Chromosome 21 Nondisjunction. **Am J Hum Genet**, 72: 488-495, 2003.
- CABELOF, D.C.; PATEL, H.V.; CHEN, Q.; VAN REMMEN, H., et al. Mutational spectrum at GATA1 provides insights into mutagenesis and leukemogenesis in Down syndrome. **Blood**, 114: 2753-2763, 2009.
- CALLIGARIS, R.; BOTTARDI, S.; COGOI, S.; APEZTEGUIA, I. SANTORO, C. Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA1 transcription factor. **Proc Natl Acad Sci**, 92(25): 11598-11602, 1995.

- CANTOR, A.B.; ORKIN, S.H. Hematopoietic development: a balancing act. **Curr Opin Genet Dev**, 11(5): 513-9, 2001.
- CANTOR, A.B.; KATZ, S.G.; ORKIN, S.H. Distinct domains of the GATA-1 cofactor FOG-1 differentially influence erythroid versus megakaryocytic maturation. **Mol Cell Biol**, 22: 4268-4279, 2002.
- CANZONETTA, C.; MULLIGAN, C.; DEUTSCH, S.; RUF, S., et al. DYRK1A-dosage imbalance perturbs NRSF/REST levels, deregulating pluripotency and embryonic stem cell fate in Down syndrome. **Am J Hum Genet**, 83: 388-400, 2008.
- CARPENTER, E.; VALVERDE-GARDUNO, V.; STERNBERG, A.; MITCHELL, C., et al. GATA1 mutation and trisomy 21 are required only in haematopoietic cells for development of transient myeloproliferative disorder. **Br J Haematol**, 128: 548-551, 2005.
- CHOU, S.T.; OPALINSKA, J.B.; YAO, Y., et al. Trisomy 21 enhances human fetal erythro-megakaryocytic development. **Blood**, 112: 4503-4506, 2008.
- CREUTZIG, U.; RITTER, J.; VORMOOR, J.; LUDWIG, W.D., et al. Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia in Down's syndrome. A report of 40 children of the AML-BFM Study Group. **Leukemia**, 10: 1677-1686, 1996.
- CRISPINO, J.D.; LODISH, M.B.; MACKAY, J.P.; ORKIN, S.H. Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1: FOG complex. **Mol Cell**, 3(2): 219-28, 1999.
- CUSHING, T.; CLERICUZIO, C.L.; WILSON, C.S.; TAUB, J.W., et al. Risk for leukemia in infants without Down syndrome who have transient myeloproliferative disorder. **J Pediatr**, 148: 687-689, 2006.
- CYRUS, C.; CYRIL, E.; CHERIAN, K.M.; KULKARNI, S.; NALLATHAMBI, C. Down syndrome with tandem 21;21 rearrangement and Ebstein's anomaly: a case report. **Int J Cardiol**, 115: 58-60, 2007.
- DE VITA, S.; MULLIGAN, C.; MCELWAINE, S.; DAGNA-BRICARELLI, F., et al. Loss-of-function JAK3 mutations in TMD and AMKL of Down syndrome. **Br J Haematol**, 137: 337-341, 2007.
- DEN DUNNEN, J.T.; ANTONARAKIS, S.E. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Human Mutation**, 15(1): 7-12, 2000.
- DEN DUNNEN, J.T.; PAALMAN, M.H. Standardizing Mutation Nomenclature: Why Bother? **Human mutation**, 22: 181-182, 2003.
- DÜHRSEN, U.; KRATZ, C.P.; FLOTHO, C.; LAUENSTEIN, T., et al. Long-term outcome of hemizygous and heterozygous carriers of a germline GATA1 (G208R) mutation. **Ann Hematol**, 90: 301-306, 2011.
- FOX, A.H.; LIEW, C.; HOLMES, M.; KOWALSKI, K., et al. Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. **EMBO J**, 18(10): 2812-22, 1999.
- FREEMAN, S.B.; ALLEN, E.G.; OXFORD-WRIGHT, C.L.; TINKER, S.W. The National Down Syndrome Project: Design and Implementation. **Public Health Rep**, 122(1): 62-72, 2007.

FRESON, K.; MATTHIJS, G.; THYS, C.; MARIËN, P., et al. Different substitutions at residue D218 of the X-linked transcription factor GATA1 lead to altered clinical severity of macrothrombocytopenia and anemia and are associated with variable skewed X inactivation. **Hum Mol Genet**, 11(2): 147-52, 2002.

GAMIS, A.S.; HILDEN, J.M. Transient myeloproliferative disorder, a disorder with too few data and many unanswered questions: does it contain an important piece of the puzzle to understanding hematopoiesis and acute myelogenous leukemia? **J Pediatr Hematol Oncol**, 24(1): 2-5, 2002.

GAMIS, A.S.; WOODS, W.G.; ALONZO, T.A.; BUXTON, A., et al. Increased age at diagnosis has a significantly negative effect on outcome in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group Study 2891. **J Clin Oncol**, 21: 3415-3422, 2003.

GAMIS, A.S. Acute myeloid leukemia and Down syndrome evolution of modern therapy-state of the art review. **Pediatr Blood Cancer**, 44: 13-20, 2005.

GE, Y.; DOMBKOWSKI, A.A.; LAFIURA, K.M., et al. Differential gene expression, GATA1 target genes, and the chemotherapy sensitivity of Down syndrome megakaryocytic leukemia. **Blood**, 107: 1570-1581, 2006.

GE, Y.; LAFIURA, K.M.; DOMBKOWSKI, A.A.; CHEN, Q., et al. The role of the proto-oncogene ETS2 in acute megakaryocytic leukemia biology and therapy. **Leukemia**, 22: 521-529, 2008.

GOLONI, C.B.V. Estudo das alterações cariotípicas, do rearranjo gênico BCR/ABL e do cromossomo 20 em leucemias. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, 23(1): 1516-8484, 2001.

GROET, J.; MCELWAINE, S.; SPINELLI, M.; RINALDI, A., et al. Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. **Lancet**, 361: 1617-1620, 2003.

GROET, J.; MULLIGAN, C.; SPINELLI, M.; SERRA, A.; et al. Independent clones at separable stages of differentiation, bearing different GATA1 mutations, in the same TMD patient with Down syndrome. **Blood**, 106(5): 1887-1888, 2005.

HAFERLACH, T.; WOLFGANG, K.; SCHNITTGER, S.; SCHOCH, C. Modern diagnosis in acute leukemias. **Oncology Hematology**, 56(2): 223-234, 2005.

HASEGAWA, A.; SHIMIZU, R.; MOHANDAS, N.; YAMAMOTO, M. Mature erythrocyte membrane homeostasis is compromised by loss of the GATA1-FOG1 interaction. **Blood**, 119: 2615-2623, 2012.

HASLE, H.; NIEMEYER, C.M.; CHESSELLS, J.M.; BAUMANN, I., et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. **Leukemia**, 17: 277-282, 2003.

HASLE, H. Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. **Lancet Oncol**, 2(7): 429-436, 2001.

HENRY, J.B. **Diagnóstico clínico e tratamento por métodos laboratoriais**. São Paulo: Manole, 1999. 19ª ed.

HITZLER, J.K.; CHEUNG, J.; LI, Y.; SCHERER, S.W.; ZIPURSKY, A. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. **Blood**, 101: 4301-4304, 2003.

- HITZLER, J.; ZIPURSKY, A. GATA 1 mutations as clonal markers of minimal residual disease in acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome--a new tool with significant potential applications. **Leuk Res**, 29: 1239-40, 2005.
- HOLLANDA, L.M.; LIMA, C.S.; CUNHA, A.F.; ALBUQUERQUE, D.M., et al. An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. **Nat Genet**, 38, 807-812, 2006.
- HOLT, S.E.; BROWN, E.J.; ZIPURSKY, A. Telomerase and the benign and malignant megakaryoblastic leukemias of Down syndrome. **J Pediatr Hematol Oncol**, 24(1): 14-17, 2002.
- HOMANS, A.C.; VERISSIMO, A.M.; VLACHA, V. Transient abnormal myelopoiesis of infancy associated with trisomy 21. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, 15: 392-399, 1993.
- HUSSEIN, K.; BOCK, O.; THEOPHILE, K.; SCHULZ-BISCHOF, K., et al. MPLW515L mutation in acute megakaryoblastic leukaemia. **Leukemia**, 23: 852-855, 2009.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. **Gene**, 96(1): 23-28, 1990.
- IZRAELI, S. Leukaemia: a developmental perspective. **Br J Haematol**, 126: 3-10, 2004.
- IZRAELI, S.; RAINIS, L.; HERTZBERG, L.; SMOOHA, G.; BIRGER, Y. Trisomy of chromosome 21 in leukemogenesis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, 39: 156-159, 2007.
- KANEZAKI, R.; TOKI, T.; TERUI, K.; XU, G.; WANG, R.; SHIMADA, A., et al. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. **Blood**, 116: 4631-4638, 2010.
- KIRSAMMER, G.; JILANI, S.; LIU, H.; DAVIS, E., et al. Highly penetrant myeloproliferative disease in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. **Blood**, 111: 767-775, 2008.
- KLUSMANN, J.H.; CREUTZIG, U.; ZIMMERMANN, M.; DWORZAK, M., et al. Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. **Blood**, 111: 2991 - 2998, 2008.
- KLUSMANN, J.H.; LI, Z.; BÖHMER, K.; MAROZ, A., et al. miR-125b-2 is a potential oncomiR on human chromosome 21 in megakaryoblastic leukemia. **Genes Dev**, 24: 478-490, 2010.
- KLUSMANN, J.H.; REINHARDT, D.; HASLE, H.; KASPERS, G.J., et al. Janus kinase mutations in the development of acute megakaryoblastic leukemia in children with and without Down's syndrome. **Leukemia**, 21: 1584-1587, 2007.
- LANGE, B. The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. **Br J Haematol**, 110(3): 512-24, 2000.
- LANGE, B.J.; KOBRINSKY, N.; BARNARD, D.R.; ARTHUR, D.C., et al. Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891. **Blood**, 91, 608-615, 1998.
- LANGEBRAKE, C.; CREUTZIG, U.; REINHARDT, D. Immunophenotype of Down syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differs

significantly from other diseases with morphologically identical or similar blasts. **Klin Padiatr**, 217:126-134, 2005.

LEVANON, D.; GRONER, Y. Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. **Oncogene**, 23: 4211-4219, 2004.

LI, Z.; GODINHO, F.J.; KLUSMANN, J.H.; GARRIGA-CANUT, M., et al. Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. **Nat Genet**, 37: 613-619, 2005.

LOOK, A.T. A leukemogenic twist for GATA1. **Nat Genet**, 32(1): 83-84, 2002.

LOUGHRAN, S.J.; KRUSE, E.A.; HACKING, D.F.; DE GRAAF, C.A., et al. The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. **Nat Immunol**, 9: 810-819, 2008.

LOWRY, J.A.; MACKAY, J.P. GATA-1: one protein, many partners. **Int J Biochem Cell Biol**, 38: 6-11, 2006.

LYLE, R.; BENA, F.; GAGOS, S., et al. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. **Eur J Hum Genet**, 17(4): 454-466, 2009

MAGALHÃES, I.Q.; SPLENDORE, A.; EMERENCIANO, M.; CÓRDOBA, M. S., et al. Transient neonatal myeloproliferative disorder without Down syndrome and detection of GATA1 mutation. **J Pediatr Hematol Oncol**, 27: 50-52, 2005.

MAGALHÃES, I.Q.; SPLENDORE, A.; EMERENCIANO, M.; FIGUEIREDO, A., et al. GATA1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrome. **Cancer Genet Cytogenet**, 166: 112-116, 2006.

MALINGE, S.; BLISS-MOREAU, M.; KIRSAMMER, G.; DIEBOLD, L., et al. Increased dosage of the chromosome 21 ortholog Dyrk1a promotes megakaryoblastic leukemia in a murine model of Down syndrome. **J Clin Invest**, 122: 948-962, 2012.

MALINGE, S.; IZRAELI, S.; CRISPINO, J.D. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. **Blood**, 113: 2619-2628, 2009.

MALINGE, S.; RAGU, C.; DELLA-VALLE, V.; PISANI, D., et al. Activating mutations in human acute megakaryoblastic leukemia. **Blood**, 112: 4220-4226, 2008.

MALKIN, D.; BROWN, E.J.; ZIPURSKY, A. The role of p53 in megakaryocyte differentiation and the megakaryocytic leukemias of Down syndrome. **Cancer Genet Cytogenet**, 116(1): 1-5, 2000.

MANDAVA, S.; KOPPAKA, N.; BHATIA, V.; DAS, B.R. Cytogenetic analysis of 1572 cases of Down syndrome: a report of double aneuploidy and novel findings 47,XY,t(14;21)(q13;q22.3)mat,+21 and 45,XX,t(14;21) in an Indian population. **Genet Test Mol Biomarkers**, 14: 499-504, 2010.

MARTIN, D.I.; ORKIN, S.H. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. **Genes Dev**, 4(11): 1886-1898, 1990.

MASSEY, G.V.; ZIPURSKY, A.; CHANG, M.N.; DOYLE, J.J.; et al. A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. **Blood**, 107: 4606-4613, 2006.

MEHAFFEY, M.G.; NEWTON, A.L.; GANDHI, M.J.; CROSSLEY, M.; DRACHMAN, J.G. X-linked thrombocytopenia caused by a novel mutation of GATA-1. **Blood**, 98(9): 2681-8, 2001.

MINGRONI-NETTO, R.C. **Série monografias n° 02**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995.

MOOREHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp. Cell Res**, 20: 613-616, 1960.

MUNDSCHAU, G.; GURBUXANI, S.; GAMIS, A.S.; GREENE, M.E., et al. Mutagenesis of GATA1 is an initiating event in Down syndrome leukemogenesis. **Blood**, 101: 4298-4300, 2003.

MUNDSCHAU, G.; CRISPINO, J. GATA1s goes germline. **Nat Genet**, 38(7): 741-742, 2006.

MUNTEAN, A.G.; CRISPINO, J.D. Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. **Blood**, 106(4): 1223-31, 2005.

MURAMATSU, H.; KATO, K.; WATANABE, N.; MATSUMOTO, K., et al. Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukaemia. **Br J Haematol**, 142: 610-615, 2008.

NICHOLS, K.E.; CRISPINO, J.D.; PONCZ, M.; WHITE, J.G., et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. **Nat Genet**, 24(3): 266-70, 2000.

NORTON, A.; FISHER, C.; LIU, H.; WEN, Q., et al. Analysis of JAK3, JAK2, and C-MPL mutations in transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia of Down syndrome blasts in children with Down syndrome. **Blood**, 110: 1077-1079, 2007.

OLIVEIRA, R.A.G.; NETO, A.P. **Anemias e Leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais**. São Paulo: Roca, 2004.

PANG, L.; XUE, H.H.; SZALAI, G., et al. Maturation stage-specific regulation of megakaryopoiesis by pointed-domain Ets proteins. **Blood**, 108: 2198-2206, 2006.

PELLOSO, L.A.F.; CHAUFFAILLE, M.L.L.F.; GHANAME, F.S.; YAMAMOTO, M., et al. Cariótipo em leucemia mieloide aguda: importância e tipo de alteração em 30 pacientes ao diagnóstico. **Rev. Assoc. Med. Bras**, 49(2): 150-155, 2003.

PINE, S.R.; GUO, Q.; YIN, C.; JAYABOSE, S., et al. Incidence and clinical implications of GATA1 mutations in newborns with Down syndrome. **Blood**, 110: 2128-2131, 2007.

PINE, S.R.; GUO, Q.; YIN, C.; JAYABOSE, S., et al. GATA1 as a new target to detect minimal residual disease in both transient leukemia and megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. **Leuk Res**, 29(11): 1353-1356, 2005.

PREUDHOMME, C.; WAROT-LOZE, D.; ROUMIER, C.; GRARDEL-DUFLOS, N., et al. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. **Blood**, 96: 2862-2869, 2000.

- RAINIS, L.; BERCOVICH, D.; STREHL, S.; TEIGLER-SCHLEGEL, A., et al. Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. **Blood**, 102: 981-986, 2003.
- RAINIS, L.; TOKI, T.; PIMANDA, J.E.; ROSENTHAL, E., et al. The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. **Cancer Res**, 65: 7596-7602, 2005.
- REGO, E.M. Molecular basis of acute myelogenous leukemia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, 24(3): 160-165, 2002.
- RIERA, L.; LASORSA, E.; BONELLO, L.; SISMONDI, F., et al. Description of a novel Janus kinase 3 P132A mutation in acute megakaryoblastic leukemia and demonstration of previously reported Janus kinase 3 mutations in normal subjects. **Leuk Lymphoma**, 52: 1742-1750, 2011.
- RYLSKI, M.; WELCH, J.J.; CHEN, Y.Y.; LETTING, D.L., et al. GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. **Mol Cell Biol**, 23: 5031-5042, 2003.
- SANDOVAL, C.; PINE, S.R.; GUO, Q.; SASTRY, S., et al. Tetrasomy 21 transient leukemia with a GATA1 mutation in a phenotypically normal trisomy 21 mosaic infant: case report and review of the literature. **Pediatr Blood Cancer**, 44: 85-91, 2005.
- SAVASAN, S.B.S.; RAVINDRANATH, Y. CD36 expression is associated with superior in vitro Ara-C sensitivity in acute megakaryocytic leukemia with and without down syndrome. **Med pediatr oncol**, 41: 274-275, 2003.
- SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, 2:971-972, 1971.
- SHAFFER, L.G.; SLOVAK, M.L.; CAMPBELL, L.J.; KANGER, S. **An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)**, 2009.
- SHIMIZU, R.; ENGEL, J.D.; YAMAMOTO, M. GATA1-related leukaemias. **Nat Rev Cancer**, 8(4): 279-287, 2008.
- SPLENDRE, A.; MAGALHÃES, I.Q.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. GATA1 mutations in myeloproliferative disorders: nomenclature standardization and review of the literature. **Hum Mutat**, 26: 390-392, 2005.
- TAUB, J.W.; MUNDSCHAU, G.; GE, Y., et al. Prenatal origin of GATA1 mutations may be an initiating step in the development of megakaryocytic leukemia in Down syndrome. **Blood**, 104: 1588-1589, 2004.
- TENEN, D.G. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. **Nature Reviews Cancer**, 3: 89-101, 2003.
- TUNSTALL-PEDOE, O.; ROY, A.; KARADIMITRIS, A.; DE LA FUENTE, J., et al. Abnormalities in the myeloid progenitor compartment in Down syndrome fetal liver precede acquisition of GATA1 mutations. **Blood**, 112: 4507-4511, 2008.
- VARDIMAN, J.W.; HARRIS, N.L.; BRUNNING, R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood**, 100(7): 2292-2302, 2002.
- VYAS, P.; CRISPINO, J.D. Molecular insights into Down syndrome-associated leukemia. **Curr Opin Pediatr**, 19: 9-14, 2007.
- WALTERS, D.K.; MERCHER, T.; GU, T.L.; O'HARE, T., et al. Activating alleles of JAK3 in acute megakaryoblastic leukemia. **Cancer Cell**, 10: 65-75, 2006.

- WECHSLER, J.; GREENE, M.; McDEVITT, M.A.; ANASTASI, J., et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. **Nat Genet**, 32: 148-152, 2002.
- XU, G.; NAGANO, M.; KANEZAKI, R.; TOKI, T., et al. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. **Blood**, 102: 2960-2968, 2003.
- YANASE, K.; KATO, K.; KATAYAMA, N.; MOURI, Y., et al. Transient abnormal myelopoiesis in a cytogenetically normal neonate. **Int J Hematol**, 92: 527-530, 2010.
- YANG, Z.F.; MOTT, S.; ROSMARIN, A.G. The Ets transcription factor GABP is required for cell-cycle progression. **Nat Cell Biol**, 9: 339-346, 2007.
- YOKOYAMA, T.; TOKI, T.; AOKI, Y.; KANEZAKI, R., et al. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. **Blood**, 119, 2608-2611, 2012.
- YU, C.; NIAKAN, K.K.; MATSUSHITA, M.; STAMATOYANNOPOULOS, G., et al. X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. **Blood**, 100: 2040-2045, 2002.
- ZIPURSKY, A.; BROWN, E.; CHRISTENSEN, H.; SUTHERLAND, R.; DOYLE, J. Leukemia and/or myeloproliferative syndrome in neonates with Down syndrome. **Semin Perinatol**, 21: 97-101, 1997.
- ZIPURSKY, A., POON, A.; DOYLE, J. Leukemia in Down syndrome: a review. **Pediatr Hematol Oncol**, 9: 139-149, 1992.
- ZIPURSKY A. Transient leukaemia-a benign form of leukaemia in newborn infants with trisomy 21. **Br J Haematol**, 120(6): 930-938, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE I - Artigo publicado na revista Genetics and Molecular Research

Title: **Analysis of *GATA1* mutations and leukemogenesis in newborns with Down syndrome**

Running title: **Screening for *GATA1* mutations in newborns with Down syndrome**

L.B. Queiroz¹, B.D. Lima¹, J.F. Mazzeu^{2,3}, R. Camargo¹, M.S. Córdoba⁴, I.Q. Magalhães⁵,
C. Martins-de-Sá^{1†} and Í. Ferrari²

¹Departamento de Biologia Celular, ²Departamento de Genética e Morfologia, ⁴Hospital
Universitário, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil; ³Programa em Ciências
Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil;
⁵Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica, Secretaria de Saúde do DF, Brasília, DF,
Brazil

Correspondence: Prof. Dr. Beatriz D. Lima, Departamento de Biologia Celular, Instituto de
Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, CEP 70910-90, Brasília, DF, Brazil. E-mail:
bdlima@unb.br; beatrizdolabela@gmail.com

ABSTRACT. It has been reported that patients with Down syndrome (DS) frequently develop transient myeloproliferative disorder (TMD) and less commonly myeloid leukemia of DS (ML-DS). The pathogenetic relationship of these conditions was determined by the presence of somatic mutations of *GATA1* gene in children with both TMD and ML-DS. To determine the incidence of *GATA1* mutations in a cohort of DS patients and the applicability of these mutations as a clonal marker to detect minimal residual disease (MRD), we screened 198 samples of 169 patients with DS for mutations in *GATA1* exon 2 by direct sequencing. Novel mutations were detected in four (2.36%) DS patients (2 with TMD and 2 with ML-DS). We showed by PCR techniques that TMD and ML-DS patients' specific mutation can be used as stable marker to monitor the spontaneous remission and therapy response, respectively.

Key words: Down syndrome; *GATA1* mutation; transient myeloproliferative disorder; myeloid leukemia of DS; minimal residual disease

INTRODUCTION

Individuals with Down syndrome (DS) have higher probability of developing childhood acute leukemia. The condition of patients with DS awakens, therefore, a special interest in studies on leukemogenesis not only by the unusual high prevalence of myeloid leukemia of DS (ML-DS) in children with DS (Lange, 2000; Zipursky, 2003), but also by another clonal proliferation called transient myeloproliferative disorder (TMD), which affects between 4 to 10% of newborns with DS (Zipursky et al., 1997; Pine et al., 2007). In about 60% of the cases, TMD resolves spontaneously within the first 3 months of life (Massey et al., 2006; Kanezaki et al., 2010). However, approximately 20% of children diagnosed with TMD will develop ML-DS, after 2 to 3 years of TMD spontaneous remission, which does not regress without chemotherapy (Mundschau et al., 2003; Cabelof et al., 2009).

Acquired mutations in exon 2 of the hematopoietic transcription factor *GATA1* mapped at Xp11.23 are consistently present in the affected cells of children with TMD and ML-DS, leading to expression of N-terminally truncated *GATA1*s protein (Wechsler et al., 2002; Cabelof et al., 2009). These *GATA1* alterations are somatic and are therefore no longer detectable in remission samples (Ahmed et al., 2004). When TMD progresses to ML-DS, the same *GATA1* mutation is usually present in blasts of both, showing their clonal relationship (Hitzler and Zipursky, 2005). Alford et al. (2011) reported that the type of *GATA1* mutation is not prognostic for which patients with TMD will progress to ML-DS, since no difference was seen in types of mutation between patients with TMD and with ML-DS. Due to the fact that there is no way to predict which patient with TMD will develop ML-DS or which patient with ML-DS will relapse after chemotherapy, somatic mutation of each patient may be used as a stable molecular target for minimal residual disease (MRD) monitoring the resolution of TMD and the therapy response in ML-DS patients (Hitzler and Zipursky, 2005; Pine et al., 2005; Alford et al., 2011).

The aims of the present study were to identify the presence of somatic mutations in exon 2 of the hematopoietic transcription factor *GATA1* gene in children with DS in two types of clonal proliferation, TMD and ML-DS, in order to consolidate it as a MRD molecular marker, and to determine the frequency of TMD in a cohort of DS children.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The reference population in this study was made up of all DS newborns and children of both sexes under four months old, with no clinical findings of TMD and ML-DS, consecutively admitted in Outpatient of Clinical Genetics, Hospital Universitário de Brasília (HUB) and in Center for Genetics (NuGEN), Hospital de Apoio de Brasília (HAB), from February 2008 to June 2011. These two public centers gather the entirety of the patients diagnosed with DS, coming from the Brazilian's Federal District and surrounding areas. DS children who came to present a picture of leukemia were accompanied by staff of the Center for Pediatric Oncology and Hematology of the Department of State and Federal District Health (NOHP-SESDF), based in HAB, which is the regional benchmark in public health treatment of childhood leukemias.

One hundred and eighty three peripheral blood samples (PB) corresponding to a total of 168 patients under four months old were analyzed. We included in this study a patient who presented clinical signs of ML-DS at age one year and six months. A previous

sample collected at age one year and one month for cytogenetic analysis was also tested. The other 29 samples corresponded to a follow-up of the patients with clinical suspicion of leukemia at different collection dates. Bone marrow (BM) samples were obtained for follow-up of six patients with clinical characterization of leukemia at different collection dates to a total of 15 samples. The age at diagnosis less than four months was decided arbitrarily in order to not miss any possible TMD patient.

This study was approved by Brasilia University Faculty of Medicine (UnB-FM 034/2008) and Secretary State for Health (FEPECS 034/2009) ethics committees. In all cases informed consent was obtained from the parents in concordance with the Declaration of Helsinki.

Cytogenetic analysis was performed for every case by GTG banding according to standard procedures.

Analysis of *GATA1* mutations

Genomic DNA was extracted from PB and BM using Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences) or PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen).

Polymerase chain reaction (PCR) of the *GATA1* exon 2 was carried out using primers PR307 (5' TGAGGTGATGGAGTGGGAGGAGG 3') and PR310 (5' GGTCGGCACATCCATTTGAGAAGC 3') (479-bp amplicon). The PCR was performed on iCycler™ thermocycler (Bio-Rad) containing 50 ng of chromosomal DNA and 10 pmoles of each primer. The PCR conditions were: 35 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 64°C, 60 s at 72°C, initiated by 5 min of denaturation at 95°C, and completed by 7 min of final extension at 72°C. Negative controls were included in all experiments. After agarose gel electrophoresis analysis, PCR products were purified and sequenced.

Sequencing was performed directly on purified PCR products using internal primers: PR351 (5' GAAGGATTTCTGTGTCTGAGG 3') and PR366 (5' CAATGCCAAGACAGCCACTC 3') on ABI 3730XL automatic DNA sequencer (*Applied Biosystems*). The sequencer 4.9 software was used for the sequence analysis, and the electropherograms obtained were compared with the reference sequence for *GATA1* (GenBank NM_002049).

To accurately determine the size and location of the mutations from patients 1 and 2, purified PCR products were cloned into a pGEM-T vector system (Promega). Fifteen and thirty one recombinant clones from patient 1 and 2, respectively, were selected by digestion with *SacII* and *NdeI* restriction enzymes and submitted to sequencing.

Detection of minimal residual disease (MRD)

Two patients with *GATA1* mutations were monitored for MRD by PCR using mutation-specific oligonucleotides for each *GATA1* mutations: a) Samples from patient 1 with TMD were submitted to multiplex PCR with primers PR349 (5' CACTGGCCTACTACTCCCCAGGTA 3') and PR310 (156-bp amplicon) and control *GAPDH* gene with primers PR194 (5' CCCATCACCATCTTCCAGG 3') and PR195 (5' AGTGAGCTTCCCGTTCAGC 3') (472-pb amplicon); b) Samples from patient 2 with ML-DS were submitted to nested PCR with primers PR307 and PR382 (5' GCAGCTGCAGCAGGCCAGTGC 3') (318-bp amplicon). The PCR analysis was performed as described above. In the TMD patient, the relative density of intensity of pixels in the grayscale at 156-bp PCR/*GAPDH* ratio was measured by ImageJ software to confirm the decrease of the mutated population.

RESULTS

Among the 168 DS patients under four months old evaluated, with no clinical findings of TMD and ML-DS, 92 (54.8%) were male and 76 (45.2%) were female, whose ages at the time of diagnosis ranged between 1 day to 3 months and 26 days, with a mean age of 26.5 days and median of 14 days. A subset of only neonates was represented by 125 (74%) patients, with a mean age of 12.7 days and median of 10 days. The cytogenetic analysis showed that 159 (94.6%) had simple trisomy 21 (47,XY,+21 or 47,XX,+21) and nine (5.4%) were identified with Robertsonian translocations (46,XY,+21,rob(21:21)(q10;q10) or 46,XY,+21,rob(21:21)(q10;q10)). No case of mosaicism was identified.

To detect *GATA1* mutations in exon 2 where more than 95% of all mutations occur, samples from all DS patients were analyzed by direct sequencing of the purified PCR products. Detection rate of *GATA1* mutations in exon 2 was 2.36%, corresponding to four out of 169 DS patients as shown in Table 1. All mutations identified were novel and inserted a frameshift with premature translation termination, possibly resulting in the expression of GATA1s in consequence of an alternative translation initiation site.

Considering only DS newborns with 30 days of life or less, the frequency of *GATA1* mutations was 1.6%, two out of 125 DS newborns. In two patients, both four days old, who presented hematological abnormalities of TMD, we did not identify any *GATA1* mutations. Considering these two TMD patients and those two with TMD and *GATA1* mutations (Patients 1 and 3) the frequency of TMD would be 3.2% (four out of 125 DS newborns).

Patients 1 and 3 (Table 1) were characterized as TMD, and Patient 1 was further monitored for MRD by multiplex PCR in four sequential samples (PB and BM): 18d, 26d, 1m3d and 1m17d (Figure 1A). The quantification of relative intensity of pixels of the bands from agarose gel showed a decrease in *GATA1* mutation in relation to the GAPDH control as shown in Figure 1B. Probably this corresponds to a decrease in *GATA1* mutated population, and progression to spontaneous remission. The complete remission could not be documented as the patient died in consequence of congenital heart disease at the age of three months.

Patient 2 arrived at genetics clinic at the age of three months and was underdiagnosed for TMD. However at the age of one year and eight months, he returned with suspicion of leukemia. Approximately five months later, cytogenetic analysis showed clonal alteration at BM aspirate that confirmed the diagnosis of ML-DS (Figure 2). By PCR analysis of 16 samples (PB and BM) obtained at different collection dates, multiple bands were revealed on the agarose gel (Figure 3). After direct PCR sequencing of the eight initial samples, from 3m2d until 2y1m4d, no mutation was detected. The PCR from the sample of two years and six months was cloned and after sequencing a 22-bp duplication was detected in the recombinant clones. Using a specific primer for this duplication in a nested PCR, we monitored all 16 samples for MRD and observed the persistence of the *GATA1* mutation in all samples, including the first ones collected prior to ML-DS manifestation (Figure 3).

Patient 4 was referred to us at age of one year one month and six days, to confirm the DS diagnosis. Five months later he presented hematological abnormalities and ML-DS was suspected. The identification of the mutation corroborated the diagnosis.

DISCUSSION

Screening for *GATA1* mutations in DS newborns without clinical findings of TMD have been reported by Ahmed et al. (2004) and Pine et al. (2007) using PCR direct sequencing. Here we screened 168 DS patients without clinical manifestations of TMD and one DS patient with suspicion of ML-DS for mutations in exon 2 of *GATA1*. We detected four novel mutations indicative of TMD and ML-DS corresponding to a frequency of 2.36% (four out of 169). Considering only the newborns, under 30 days of life, the frequency of mutations was 1.6% (two out of 125). Previous studies by Zipursky et al. (1997), Ahmed et al. (2004) and Pine et al. (2007) had higher TMD frequencies of 10.4% (eight out of 77), 9.5% (two out of 21) and 3.8% (22 out of 585), respectively. However, if we include in the frequency the two TMD patients in whom we failed to identify a *GATA1* mutation, the frequency would be 3.2% (four out of 125 DS newborns), close to the frequency published by Pine et al. (2007).

In two DS patients (Patients 1 and 3) *GATA1* mutations were detected on samples collected on the first weeks of life (Table 1) before any hematological evidence of TMD. This finding supports the literature data that the peak of TMD occurs at the second and third weeks of life (Lange, 2000; Malinge et al., 2009). Patient 1 presented clinical signs of leukemia at 26 days of life, eight days after the first visit at genetic center for DS diagnose. Patient 3 did not return to the genetics clinic for follow-up.

Most children with DS are referred for cytogenetic studies soon after birth and screening for *GATA1* mutations should be done at that time. In our study we included 44 patients with ages between 31 days and 3 months and 26 days and did not identify mutations in any of them. However, patient 2 presented with ML-DS at age 2 years and 29 days but we could detect the mutation using specific primers in a sample collected at 3 months. This case is particularly interesting because he never entered complete remission after treatment for ML-DS and the detection of mutated clones at age three months indicates that he did not achieved spontaneous remission of TMD either, as shown in Figure 3.

Our failure to detect a *GATA1* mutation in the two DS newborns that were later TMD diagnosed by clinical signs of hematologic abnormalities and in the eight initial samples of Patient 2 may reflect the rarity of the mutant clone which results in the little sensitivity to detect low blast count by direct sequencing. Alford et al. (2011) also reported failure to detect *GATA1* mutations in 16 patients with TMD (12%) due to low blast count. They documented 0.5% as the lower limit of blasts for successful mutation detection. However, they recorded one patient (blast count 42%) that failed to detect mutation suggesting an uncommon mutation involving sequence outside the genomic area, spanning the PCR, or a deletion inside this area, affecting the primer annealing site.

According to Alford et al. (2011) direct sequencing of DNA from blasts that underwent FACS was successful in identifying sequence mutation in patients, whereas direct sequencing of DNA from unfractionated samples failed. In some cases it was necessary to subclone the *GATA1* PCR product to pinpoint mutation sequence. They suggested that high-resolution melt analysis would be more sensitive in cases that failed to detect mutation.

Despite the low frequency of *GATA1* mutations detected, all of the mutations identified here were insertion/deletion/duplications, all resulting in a premature stop codon. This data is consistent with the frequencies of 78% by Alford et al. (2011), 74% by Cabelof et al. (2009), 83% by Hitzler et al. (2003) and 100% by Wechsler et al. (2002).

We had the opportunity to valuable a simple tool in monitoring the development of DRM in TMD and ML-DS patients (Figures 1 and 3) and to confirm that blasts are stable clonal markers suitable for the measurement of MRD. Several authors suggested the use of quantitative PCR for monitoring MRD, but here we demonstrate that even a semi-quantitative PCR can be used due to the high frequency of mutant clones.

Only one case of clonal alteration in ML-DS patient 2 was identified by cytogenetic analysis. According to cytogenetic data in neonates with TMD showed by Alford et al. (2011), no significant correlation was observed between not progressing to ML-DS and presenting with trisomy 21 as the only cytogenetic abnormality. Therefore, karyotype does not predict patients who will progress to ML-DS. In the present analysis, simple molecular techniques showed to be an ideal tool for detecting and monitoring *GATA1* mutation, while cytogenetic studies contributed to identifying numerical and structural abnormalities.

The frequency of *GATA1* mutations in newborns in this and previous studies is probably highly underestimated due to inability of the methods to detect low frequent clones. New methods such as next generation sequencing with high coverage may shed light in the true frequency of *GATA1* mutations and add new insights about DS leukemogenesis.

Based on our observations, we recommend that all DS newborns should be screened routinely in clinical evaluations to early detect *GATA1* mutations, thereby determining the real frequency of TMD and allowing follow-up of these patients for possible progression to ML-DS by MRD monitoring in TMD and subsequently in therapy response of ML-DS patients.

ACKNOWLEDGMENT

LB Queiroz received a PhD fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES/Brazil).

REFERENCES

- Ahmed M, Sternberg A, Hall G, Thomas A, et al. (2004). Natural history of *GATA1* mutations in Down syndrome. *Blood* 103:2480-2489.
- Alford KA, Reinhardt K, Garnett C, Norton A, et al. (2011). Analysis of *GATA1* mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia. *Blood* 118:2222-2238.
- Cabelof DC, Patel HV, Chen Q, van Remmen H, et al. (2009). Mutational spectrum at *GATA1* provides insights into mutagenesis and leukemogenesis in Down syndrome. *Blood* 114:2753-2763.
- Hitzler J and Zipursky A (2005). *GATA 1* mutations as clonal markers of minimal residual disease in acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome-a new tool with significant potential applications. *Leuk Res* 29:1239-1240.
- Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW and Zipursky A (2003). *GATA1* mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood* 101:4301-4304.

- Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, et al. (2010). Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood* 116:4631-4638.
- Lange B (2000). The management of neoplastic disorders of haematopoiesis in children with Down's syndrome. *Br J Haematol* 110:512-524.
- Malinge S, Izraeli S, Crispino JD (2009). Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood* 113:2619-2628.
- Massey GV, Zipursky A, Chang MN, Doyle JJ, et al. (2006). A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. *Blood* 107:4606-4613.
- Mundschau G, Gurbuxani S, Gamis AS, Greene ME, et al. (2003). Mutagenesis of GATA1 is an initiating event in Down syndrome leukemogenesis. *Blood* 101:4298-4300.
- Pine SR, Guo Q, Yin C, Jayabose S, et al. (2007). Incidence and clinical implications of GATA1 mutations in newborns with Down syndrome. *Blood* 110:2128-2131.
- Pine SR, Guo Q, Yin C, Jayabose S, et al. (2005). GATA1 as a new target to detect minimal residual disease in both transient leukemia and megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Leuk Res* 29:1353-1356.
- Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, et al. (2002). Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 32:148-152.
- Zipursky A (2003). Transient leukaemia-a benign form of leukaemia in newborn infants with trisomy 21. *Br J Haematol* 120:930-938.
- Zipursky A, Brown E, Christensen H, Sutherland R and Doyle J (1997). Leukemia and/or myeloproliferative syndrome in neonates with Down syndrome. *Semin Perinatol* 21:97-101.

Table 1. *GATA1* mutations in DS patients with TMD and ML-DS.

Patient	Sex	Age	Diagnose	P. Alteration	Mutation	Karyotype
Patient 1	M	18d	TMD	p.Tyr63fs66	c.187_211delTACAGGGACGCTGAGGCCTACAGAC	47,XY,+21
Patient 2	M	2y7m	ML-DS	p.Ala62fs13	c.185_206dupGCTGCAGCTGCGGCACTGGCCT	47,XY,del(5)(p13-14),del(6)(q?),+21c[12]/47,XY,+21c[46]
Patient 3	F	7d	TMD	p.Thr53fs82	c.160_166delACCGCTGinsGTA	47,XX,+21
Patient 4	M	1y1m7d	ML-DS	p.Asp20fs117	c.58delG	47,XY,+21

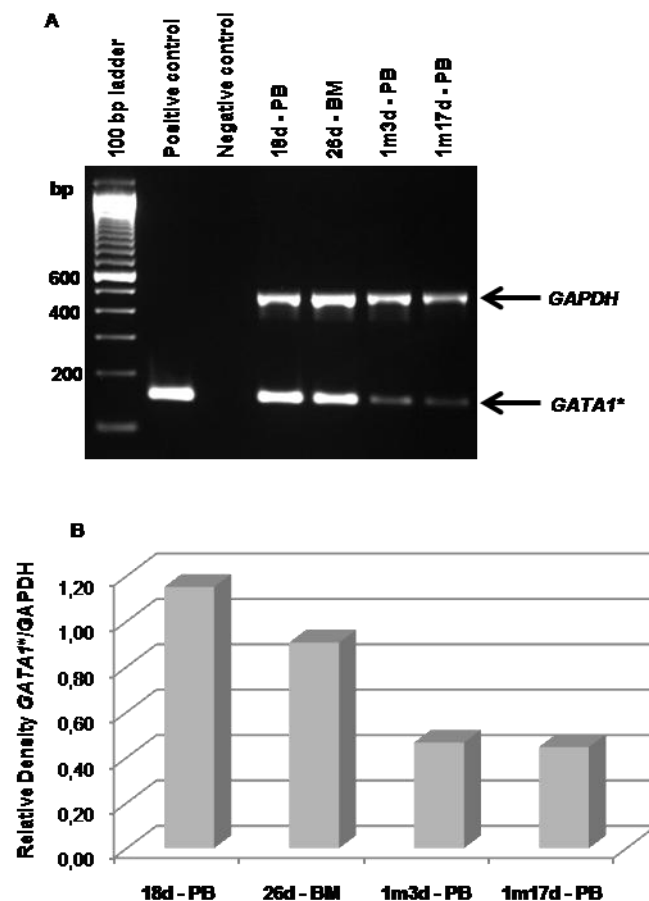
Figures:

Figure 1. Monitoring spontaneous remission of TMD in DS patient 1. (A) Multiplex PCR analysis of MRD from samples (PB and BM) at different ages. GATA1* - *GATA1* mutation specific amplicon (157 bp); GAPDH – internal control (472 bp). (B) Relative quantification of GATA1 mutation in relation to GAPDH, showing the progression to spontaneous remission.

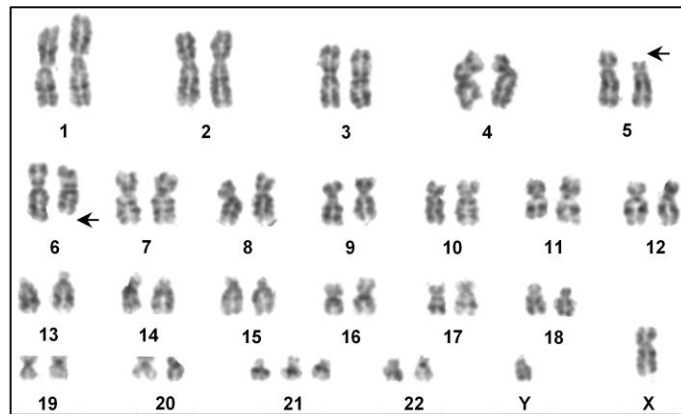


Figure 2. Cytogenetic analysis from DS patient 2 with clonal alteration at BM aspirate. Karyotype: 47,XY,del(5)(p13~14),del(6)(q?),+21c.

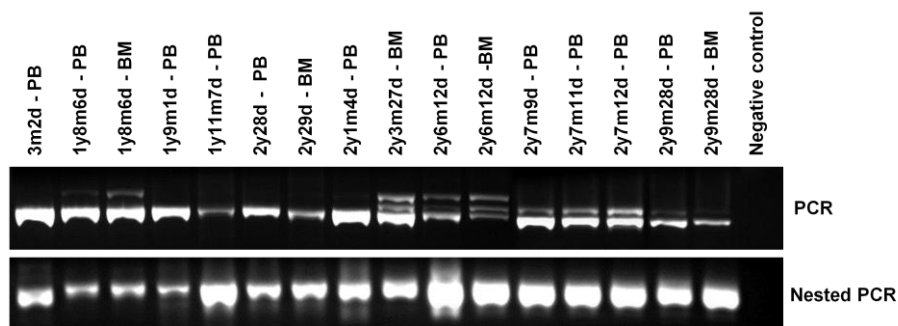


Figure 3. *GATA1* mutation detected in DS patient 2 with ML-DS. Sixteen samples (PB and BM) in chronological order since 3 months and 2 days until 2 years and 9 months and 28 days. PCR analysis of *GATA1* exon 2 (479-bp fragment) showed multiple clones with higher molecular weight. After identification of 22-bp duplication in *GATA1* exon 2, the therapy response was monitored by nested PCR, showing the 318-bp fragment in all samples, which represented poor prognostic of MRD.

Leukemogenesis in Down syndrome

Lílian Barros Queiroz¹; Cezar Martins de Sá¹; Juliana Forte Mazzeu²; Isis Quezado Magalhães³; Íris Ferrari²; Beatriz Dolabela de Lima¹.

¹*Departamento de Biologia Celular, ²Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas; Universidade de Brasília, Brasília, DF*

³*Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica, Secretaria de Saúde do DF, Brasília, DF Brazil*

1. Introduction

Constitutional trisomy 21 or Down syndrome (DS) is the most common human genetic aneuploidy caused by the presence of all or part of an extra 21st chromosome. The incidence of DS is estimated at 1 per 700 births (Malinge et al., 2009) and is the most common genetic factor predisposing to childhood leukemia. People with DS presents several clinical phenotypes, including cognitive impairment, craniofacial dysmorphism, gastrointestinal tract abnormalities, congenital heart defects, endocrine abnormalities, neuropathology leading to dementia and immunological defects. Concerning the hematopoietic system, children with DS frequently show abnormalities in platelet counts, macrocytosis and an increased prevalence of leukemia (Lange, 2000; Roizen & Amarose, 1993).

2. Manifestations of leukemia in Down Syndrome

The high frequency of leukemia in children with DS suggests that trisomy 21 is involved directly and functionally to the malignant transformation of hematopoietic cells. However, DS is not a classic genomic instability syndrome, since the overall risk of developing cancer, in particular solid tumors, including neuroblastoma and Wilms tumor, is lower in these people (Hasle, 2001; Malinge et al., 2009).

Newborns with DS have a risk 10 to 20 times higher of developing acute leukemia (AL) when compared with the incidence rates of leukemia in the general child population (Hitzler et al., 2003). The AL in children with DS presents an intriguing relationship between the age at onset of disease and the subtype of leukemia cell. DS children older than 4 years have predominantly acute lymphoblastic leukemia (ALL), whose incidence is approximately 20 times higher than in the general population. However the DS patients aged under 3 years are more likely to develop acute megakaryoblastic leukemia (AMKL), with an incidence 500 times higher than in children without DS (Hitzler et al., 2003; Issacs, 2003; Lange, 2000; Malinge et al., 2009).

The condition of patients with DS awakens, therefore, a special interest in studies on leukemogenesis not only by the high prevalence of AMKL, usually rare in the general pediatric population, but also by another form of clonal proliferation called transient myeloproliferative disorder (TMD) which affects between 5 and 10% of newborns with DS. The TMD is a clonal disease characterized by accumulation of immature megakaryoblasts in fetal liver and peripheral blood, a picture indistinguishable from AL (Hitzler et al., 2003; Malinge et al., 2009; Pine et al., 2007; Rainis et al., 2003; Zipursky, 2003). It is unclear whether all AMKLs are preceded by TMD, since several TMD cases are underdiagnosed. One study suggests that the prognosis for AMKLs preceded by TMD is better than de novo AMKL (Klusmann et al., 2008).

In contrast to AMKL, TMD usually evolves to spontaneous remission within the first three months of life and therefore is considered a pre-leukemic syndrome. This spontaneous remission can vary from 59 to 64% (Kanezaki et al., 2010; Massey et al., 2006). However, approximately 20% of children diagnosed with TMD will develop AMKL after 2 to 3 years of TMD spontaneous remission, which does not regress without chemotherapy (Malinge et al., 2009).

The biological mechanism of TMD spontaneous remission is not clear. Holt et al. (2002) showed that telomerase activity was decreased at the beginning of congenital leukemia and suggested that this deficiency

could explain the spontaneous regression. Furthermore, the factors underlying the transformation of the TMD "benign" status for "evil" in AMKL are unknown (Izraeli et al., 2007; Malkin et al., 2000; Rainis et al., 2003).

In rare cases, the TMD is fatal due to poor prognostic factors such as liver fibrosis or liver dysfunction, manifested by jaundice, bleeding diathesis, fetal hydrops, cardiopulmonary failure, high white blood cell (WBC) and failure of spontaneous remission within the first 3 months (Malinge et al., 2009; Massey et al., 2006; Pine et al., 2007; Shimizu et al., 2008). Most of these variants were found in all reports. However, the risk factors for the progression to AMKL remain unclear (Kanezaki et al., 2010). Three studies in the United States, Japan and Europe reported the natural course of TMD in 264 children with DS. These studies confirmed the transient course of this disease that usually resolved spontaneously within the first 3 months of life. However, these studies revealed that the disease is not benign, since early deaths have been reported in 15 to 20% of the cases (Klusmann et al., 2008; Massey et al., 2006; Muramatsu et al., 2008). Kanezaki et al. (2010) also reported early death in 24.2% of the DS patients with TMD.

3. Mutations in *GATA1* gene and leukemogenesis in Down Syndrome

The *GATA1* (globin transcription factor 1) gene located on the X chromosome in the region Xp11.23 encodes the GATA binding protein 1 (GATA-1) belonging to the family of transcription factors with zinc finger structural motifs for DNA binding. GATA-1 is essential for survival of erythroid progenitor cells and for proper maturation of megakaryocytes, so in this way this protein has an essential rule in the erythrocytic and megakaryocytic differentiation (Wechsler et al., 2002; Yu et al., 2002).

The *GATA1* gene is 6.857 kb long with 6 exons and an open reading frame of 1,239 nucleotides starting in exon 2. The protein GATA-1 consists of 413 amino acids and 42.75 kDa with an N-terminal transactivation domain and two zinc finger domains. These two fingers are functionally distinct and cooperate to achieve specific, stable DNA binding. The first finger (NF) is necessary only for full specificity and stability of binding, whereas the second one (CF) is required for DNA binding (Martin & Orkin, 1990, Shimizu et al., 2008).

GATA1 mutations prevent the synthesis of heavy chain of GATA-1 (translated from the first ATG codon of exon 2) but not the synthesis of truncated protein, with 330 amino acids and 34.23 kDa called GATA-1s. GATA-1s is also expressed starting at codon 84 in exon 3 in consequence of an alternative translation initiation site or alternative splicing that eliminates exon 2. This truncated protein lacks the transactivation domain, but retains both zinc fingers domains, as shown in figure 1. The function of GATA-1s is still quite unclear. Several experiments suggest that GATA-1s helps the megakaryocytic and erythrocyte differentiation (Weiss et al., 1997). However, studies of in vivo gene rescue suggest that only the endogenous GATA-1s expression would not be enough to restore definitive erythropoiesis unless this gene is hyper expressed (Shimizu et al., 2001). Even being detected both forms of GATA-1 in mouse embryonic tissue, their relative proportions vary during development, suggesting that the transcriptional activity of *GATA1* can be modulated by the relative rate of the two forms (Calligaris et al., 1995).

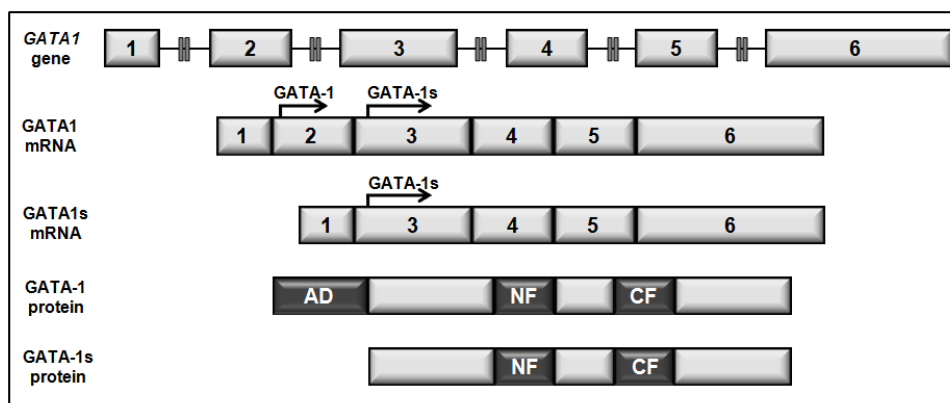


Figure 1 - Models for the expression of GATA-1 isoforms. The GATA-1 protein is translated from the GATA1 mRNA, whereas the GATA-1s protein can be translated either from the GATA-1 mRNA or from the alternative spliced GATA1s mRNA lacking exon 2.

The analysis of megakaryocyte-specific knockdown of *GATA1* in vivo has revealed a critical role for this factor in megakaryocytic development. Reduced expression (or complete absence) of GATA-1 in megakaryocytes leads to increased proliferation and deficient maturation as well as a reduced number of circulating platelets

(Vyas et al., 1999; Wechsler et al., 2002). Mice harboring a heterozygous *GATA1* knockdown allele frequently develop erythroblastic leukemia (Shimizu et al., 2004).

Mutations in *GATA1* gene are described in TMD as well as in AMKL, and occur mainly in the 5' end of the gene in exon 2, and less commonly in exon 3 (Xu et al., 2003). Mutations as insertions, duplications, deletions and point mutations, are responsible to abrogate splicing of exon 2 or to generate a stop codon prior to the alternative translational start codon at position 84. According to Rainis et al. (2003), the most frequent mutations in TMD and AMKL were deletions and insertions in exon 2 of *GATA1* corresponding to 65, 7% followed by 25.7% of point mutations and the remaining 8.6% is due to failure to identify the mutation.

Mutations in *GATA1* are frequently associated with TMD and occur in utero (Taub et al., 2004). The true frequency of TMD is unknown because it is likely that a significant proportion of these patients are not routinely diagnosed (Malinge et al., 2009; Rainis et al., 2003). Ongoing studies in Europe and North America combining screening for *GATA1* mutations and examination of neonatal blood smears will present a more precise picture of the true incidence of TMD (Malinge et al., 2009). Pine et al. (2007) examined DNA from Guthrie cards of 585 DS infants, and reported that *GATA1* mutations were detected in 3.8% of them. However, *GATA1* mutations may have been missed in patients with minor preleukemic clones, subclonal mutations, low numbers of cells on Guthrie cards, or extramedullary TMD without circulating blasts. In addition, a significant higher frequency of *GATA1* mutations in male newborns was observed. Malinge et al. (2009) presumed that it is likely that the frequency of TMD is not higher than 5% of DS newborns.

Studies have shown that *GATA1* mutations in TMD activate the proliferation of progenitor cells required to promote AMKL, featuring a multi-step disease. This process is likely to involve the participation of unidentified genes/proteins. These megakaryocytic progenitors quickly disappear after birth. Until now the molecular and cellular basis of this natural remission is unknown, but it may be related to changes in the hematopoietic microenvironment that occur during growth and neonatal development. Affected megakaryoblasts with additional genetic hits are probably subjected to clonal evolution, making them susceptible to malignant transformation to leukemic cells, leading to the development of AMKL (Shimizu et al., 2008) (figure 2).

Somatic mutations in the N-terminus activation domain of *GATA1* are found in most cases of TMD and AMKL, suggesting these mutations have a significant role in the process of leukemogenesis (Wechsler et al., 2002). *GATA1* mutations with trisomy 21 may be sufficient to promote the expansion of transient megakaryoblasts seen in TMD (Mundschau et al., 2003).

The expression levels of GATA-1 isoforms are crucial for the proper development of erythroid and megakaryocytic cells and compromised GATA-1 expression is a causal factor in leukemia (Shimizu et al., 2008). These findings strongly suggest that the qualitative deficit of GATA-1 contributes to the genesis of TMD and AMKL (Kanezaki et al., 2010). The selection of mutations that retain GATA-1s may result in disruption of normal balance between GATA-1 and GATA-1s, which probably would be involved in regulating normal development of megakaryocytes (Izraeli et al., 2007), but pass to act as an oncogene directly in the presence of trisomy 21. Alternatively, GATA-1s may be required for survival of leukemic blasts and the oncogenic effect may be purchased by the loss of the heavy chain of GATA-1. Another possibility is that this type of mutation may reflect specific mechanisms of selection or generation of this mutation in the presence of trisomy 21 (Rainis et al., 2003).

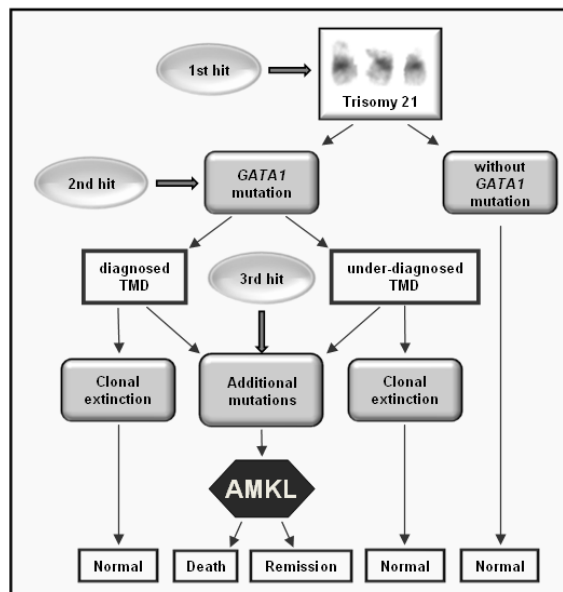


Figure 2 - A model for multi-step leukemogenesis in DS. The accumulation of hits (multiple genetic abnormalities) characterizes the evolution of TMD for AMKL.

According to some evidences the arising of AL is due to the cooperation between one class of mutations which interferes with differentiation (class II mutations) and another class which confers a proliferative advantage to cells (class I mutations) (Deguchi & Gilliland, 2002). It has been shown that high level expression of exogenous GATA-1 lacking the N-terminus induced differentiation rather than decreased the aberrant growth of GATA-1-null megakaryocytes (Kuhl et al., 2005; Muntean & Crispino, 2005). This observation suggested that abundant GATA-1s function like a class I mutation in TMD blasts. In contrast, reducing GATA-1 expression leads to differentiation arrest and aberrant growth of megakaryocytic cells (Vyas et al., 1999). The present data suggest that GATA-1s is expressed at very low levels in TMD blasts with GATA-1s low mutations. These levels may not be sufficient to provoke normal maturation. Together, these findings suggest that the low expression of GATA-1s might function like class II mutations in TMD blasts. Additional class I mutations or epigenetic alterations might be more effective in the development of leukemia in blast cells expressing GATA-1s at low levels (Kanezaki et al., 2010).

GATA1 mutations have not been identified in normal children, in children with DS and other types of leukemia, or in acute myeloid leukemias (AML) of children without DS. Mutations restricted to leukemic clones were not detectable in samples in remission. They were therefore selected and acquired, probably because they granted a clonal advantage (Pine et al., 2007; Wechsler et al., 2002).

Rainis et al. (2003) reported two patients with identical *GATA1* mutations in TL and subsequently in AMKL, showing that the AMKL was originated from the clone of TMD. Thus, *GATA1* is mutated in most patients with TMD, but that is not enough to generate leukemia after remission. Moreover, it has been reported that monozygotic twins that developed AMKL associated with acquired trisomy of chromosome 21 in blast cells have the same mutation that was not detected during remission. Because it was an identical mutation in the leukemic cells of twins, so it is likely that the mutation has occurred in one twin in utero and that his pre-leukemic cells have migrated to the other twin by blood embryological anastomoses.

Wechsler et al. (2002) analyzed the X chromosome inactivation in cell lysates from BM of women carrier from AMKL. Since the female leukemic cells showed the X chromosome inactivation due to monoclonality, and the mutant allele was detected only in leukemic cells, they predicted that the wild-type allele should be on the inactive X chromosome. As expected, only the truncated protein GATA-1s was observed. On the other hand Rainis et al. (2003) proposed that if there was no process of X chromosome inactivation, *GATA1* mutation would be involved in a higher frequency of patients with DS and TMD. Therefore, this inactivation of the *GATA1* mutation is considered a key event for non-occurrence of the TMD transformation to AMKL (Rainis et al., 2003).

Ahmed et al. (2004) described for the first time multiple independent *GATA1* mutations in four of 12 patients that developed AMKL, showing multiple *GATA1* mutant clones in the same individual. In these patients, analysis of mutant clones by automated sequencing allowed to confirm that each clone contained a different

mutation in *GATA1*. Interestingly, at the diagnosis of AMKL only one of the three mutations was present. The presence of these multiple *GATA1* mutations suggests that mutations are a frequent event in hematopoietic cells of DS children. Using cell surface markers, Groet et al. (2005) showed the presence of several independent clonal expansions in different stages of megakaryocytic differentiation in a single patient with TMD. Probably this was due to independent clones that acquired the respective mutations in different stages of differentiation.

GATA-1s is no different from wild type in their ability to bind to DNA and interact with its co-factor friend of GATA-1 (FOG-1), but shows a reduction in their ability to transcriptional activation since it was truncated to its activation domain N-terminal (Rainis et al., 2003; Wechsler et al., 2002).

FOG-1 binds specifically to the NF zinc finger motif of GATA-1, and is expressed abundantly in erythroid and megakaryocytic cells (Crispino et al., 1999). FOG-1 is encoded by the gene *ZPFM1* as a protein of 998 amino acids which contains nine zinc finger motifs, four of them (ZFS 1, 5, 6 and 9) mediate the interaction with GATA-1 (Fox et al., 1999; Muntean & Crispino, 2005). Studies using point mutations in *GATA1* lead to a protein with a remarkable reduction of the affinity to FOG-1, but with ability of DNA binding, demonstrating that direct interaction FOG-1 and GATA-1 is required for normal erythropoiesis in vitro (Crispino et al., 1999).

A missense mutation in the *GATA1* gene was described in members without DS of a family affected with congenital dyserythropoietic anemia and thrombocytopenia. The megakaryocytes of these patients had similar changes in the megakaryocytes of mice deficient in expression of *GATA-1* suggesting that the interaction GATA-1/FOG-1 is also crucial in late stages of megakaryopoiesis (Nichols et al., 2000).

4. Other mutations associated with DS leukemia

The occurrence of mutations in exon 2 of *GATA1* in TMD suggests that there is cooperation between increased dosage of the gene or genes on chromosome 21 with the initiation of prenatal clonal proliferation of megakaryocytic precursors (Malinge et al., 2009).

Based on numerous studies with mutations in *GATA1* by several research groups, Malinge et al. (2009) concluded that the TMD and AMKL require both trisomy 21 and *GATA1* mutation but is not clear if only these alterations are enough to promote the TMD. Furthermore, the specific secondary mutations that promote the evolution of TMD to AMKL are still unknown. It has been identified cooperating mutations including *JAK3*, *TP53*, *FLT3* and *JAK2* mutations whose frequencies are shown in table 1 (Malinge et al., 2009).

Types of leukemia	Mutated gene	Localization	Frequencies recorded
TMD	<i>GATA1</i>	Xp11.23	97,3%
	<i>JAK3</i>	19p13.1	12,5%
	<i>TP53</i>	17p13.1	7,7%
AMKL	<i>GATA1</i>	Xp11.23	89,2%
	<i>JAK3</i>	19p13.1	13,2%
	<i>FLT3</i>	13q12.2	5,7%
	<i>TP53</i>	17p13.1	21,4%
	<i>JAK2</i>	9p24.1	6,2%

Table 5- Genetic abnormalities identified in leukemia associated SD.

The identification of activating mutations in tyrosine kinase genes in TMD and AMKL specimens has provided new insights into the evolution of AMKL. *JAK3* mutations have been detected in a small but significant fraction of DS-leukemia samples. Among the mutations found, most were considered as gain of function. *JAK3* was also found in the CMK cell line (cells that do not express *GATA-1* wild type and are removed from patients with AMKL) inducing a lethal biphenotypic hematopoietic disorder in mice with features of AMKL (Walters et al., 2006). Other mutations in *JAK3* have been proposed to be loss of function (De Vita et al., 2007). Additional experiments are necessary to determine how these different *JAK3* variants affect hematopoiesis and megakaryocyte development (Malinge et al., 2009).

5. Trisomy 21 influence on hematopoiesis

The functional contribution of the trisomy 21 in hematologic malignancies is supported by several observations such as the high incidence of leukemia in DS patients, the fact that TMD and AMKL blasts present trisomy 21 (even in children without DS), and that acquired trisomy or tetrasomy of chromosome 21 is frequently observed in blasts of different types of leukemia, including hyperdiploid ALL and de novo AML (Vyas & Crispino, 2007).

It is assumed that the cells of DS complete or partial trisomy of Hsa21, approximately 33.7 Mb, promote an overexpression of at least one of the 364 known genes, 31 antisense transcripts, and five different miRNAs (miR-99a, let-7c, miR-155, miR-125b-2, and miR-802), which could cooperate with the loss of GATA-1 in the pathogenesis of AMKL. Mutations in several genes on chromosome 21 have been identified in leukemia, and many of them recognized as encoding transcription factors acting at various stages of hematopoiesis. There should be contribution of genes present on chromosome 21 that cooperate with mutations of the *GATA1* to cause leukemogenesis (Look, 2002; Malinge et al., 2009).

The identification of the Down Syndrome Critical Region (DSCR) on the 21q22 band based in the genotype-phenotype correlations of partial trisomy in children suspected of having DS disclosed a list of genes potentially implicated in the clinical phenotype. However no specific genes have been certainly linked to the increased incidence of leukemia in DS. Few strong candidates include *ERG*, *ETS2*, and *RUNX1* (Lyle et al., 2009; Malinge et al., 2009).

Since the TMD is originated in a fetal liver progenitor and is restricted to children with DS (or to rare cases of acquired trisomy 21), it is presumed that trisomy 21 directly affects the development of hematopoietic cells during gestation. It has been shown that *GATA1* mutations can appear in 21-week-old embryos (Taub et al., 2004). To define the cellular context in which *GATA1* mutations occur, two groups studied hematopoiesis in trisomy 21 human fetal livers (FLs) (Chou et al., 2008; Tunstall-Pedoe et al., 2008). They found that although trisomy 21 did not alter the proportion of CD34+ and CD38- cells, trisomy 21 FLs showed a 2 to 3 fold increase of megakaryocyte erythroid progenitors (MEPs), which appeared to increase over time (35% at 16 weeks to 65% at 18 weeks).

The functional perturbations induced by trisomy 21 probably induce a highly susceptible cellular environment to additional transformations such as *GATA1* mutagenesis in TMD. The FL cell-based assay is a powerful tool to determine the specific Hsa21 genes that participate in TMD. Preliminary qRT-PCR studies have shown that there are no significant differences in expression of *ERG*, *ETS2*, *RUNX1*, and *SON*, top-ranked candidate leukemia oncogenes, in trisomic versus euploid FLs (Chou et al., 2008; Tunstall-Pedoe et al., 2008). However, functional studies, such as knockdown of one or more of these candidates genes in FL progenitors followed by colony assays and transplantation experiments, are necessary to determine the requirements for these genes in leukemia (Malinge et al., 2009).

6. Specific chromosome 21 genes in DS-associated leukemia

Two microarray studies comparing AMKL versus non-DS AML have recently been reported (Bourquin et al., 2006; Ge et al., 2006) and 76 genes were described that discriminate between DS AMKL and non-DS. For example, genes encoding erythroid markers, glycophorin A and CD36, were found meaningfully overexpressed in AMKL, as confirmed by immunophenotypic analysis of blasts (Langebrake et al., 2005).

Analysis of the gene expression data also revealed that there is an overall increase in expression of chromosome 21 genes in AMKL, relative to non-DS AMKL. By gene set enrichment analysis, 47 Hsa21 genes, including *BACH1*, *SON*, *C21orf66*, and *GABPA*, contributed for this observed enrichment score, but the distinction between the 2 types of AMKL was not driven by differences in expression of chromosome 21 genes (Bourquin et al., 2006). By real time RT-PCR and microarray analyses, Ge et al. (2006) found that 7 of 551 genes were up or down-regulated in AMKL relative to non-DS AMKL and not encoded by chromosome 21, including *BST2*, *DUSP6*, *KRT18*, and *CD36*. Differences in these two data might be explained by differences in the samples or different protocols and methods used to analyse the expression of the genes.

6.1. Candidate leukemia oncogenes encoded by chromosome 21

Of the genes on chromosome 21, several are compelling candidate leukemia oncogenes. Of these, four such candidates are *RUNX1* (AML1), which encodes the heterodimeric partner of the complex of transcription factors denominated core-binding factor β (CBF β), cooperates with GATA-1 during megakaryocytic

differentiation, and the three ETS transcription factors, which are expressed and functionally involved in megakaryocytic differentiation and sensitivity to chemotherapy (*ERG*, *ETS2*, and *GABPA*) (Ge et al., 2008). It has been suggested that *RUNX1* is involved in the AMKL, since mutations in the DNA-binding domain of *RUNX1* was identified in 5% of sporadic leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21 (Osato et al., 1999; Preudhomme et al., 2000). However, despite of the loss-of-function mutations in *RUNX1* are associated with leukemia, it is not known how three copies of the chromosome 21 would promote tumorigenesis in DS (Izraeli, 2004). It is possible that cells with trisomy 21 express different levels of *RUNX1* isoforms, affecting tumor development (Levanon & Groner, 2004). Despite of the fact that the total level of *RUNX1* expression was lower in AMKL compared with non-DS AML, the differential expression of *RUNX1* isoforms was indeed observed in human AMKL samples (Bourquin et al., 2006). In contrast, trisomy for *Runx1* was found not to be required for the development of myeloproliferative disorder (MPD) in Ts65Dn mice (model used with partial trisomy 21) (Kirsammer et al., 2008). Furthermore, the Ts16 fetuses hematopoietic phenotype was not related with an increased ratio of *Runx1* or an altered expression of its isoforms (Gjertson et al., 1999).

Inherited hypomorphic mutations in *Runx1* cause low levels of expression in hematopoietic stem cells and result in the syndrome of thrombocytopenia with familial susceptibility to leukemia. Abnormalities in *Runx1* were not detected in AMKL (Rainis et al., 2003).

In different types of cancer, it has been shown that the *ERG* proto-oncogene is dysregulated, and its overexpression in AML samples with normal or complex karyotypes involving Hsa21 was observed (Baldus et al., 2004; Marcucci et al., 2005). An overexpression of *ERG* in human K562 cells that express both forms of GATA1 induced a switch in differentiation toward the megakaryocytic lineage and showed an increased expression of the early megakaryocytic markers, as CD41 and CD61 (Rainis et al., 2005). To confirm a role of *ERG* in late stages of megakaryopoiesis, Loughran et al. (2008), working with homozygous and heterozygous of mutant *Erg* mice, observed that the first one died in utero, in consequence of a defect in definitive hematopoiesis, and the second one showed thrombocytopenia with normal number of BM megakaryocytes.

Overexpression of *ETS2* has also been shown in several cancers, including AML (Baldus et al., 2004), and the amount of *ETS2* transcripts are increased in both AMKL (DS or non-DS) (Ge et al., 2008). These facts and its involvement in the regulation of megakaryocytic genes suggest that *ETS2* has an important role in TMD or AMKL. As same as for *ERG*, *ETS2* overexpression in K562 cells was found to promote a switch in differentiation from erythroid to megakaryocytic fate (Ge et al., 2008).

The ETS family member *GABPA* is not considered an oncogene and its expression in the megakaryocyte suggests that the *GABPA* protein has a role in early stages of megakaryocytic maturation (Pang et al., 2006). Recent studies have shown that *GABPA* directly affects the cell cycle by regulating the expression of genes required of DNA synthesis and degradation of cell-cycle inhibitors (Yang et al., 2007). Of Hsa21 genes, *GABPA* was one of the few whose expression is elevated in AMKL versus non-DS AML (Bourquin et al., 2006).

6.2. miRNAs encoded by chromosome 21

Hsa21 encode five miRNAs and overexpression of some of these has been observed in brain and heart tissues of people with DS and has been implicated in normal and pathologic hematopoiesis (Kuhn et al., 2008). For example, miR-99a is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34+ cells, whereas miR-155 and let-7c are down-regulated (Garzon et al., 2006). Notably, miR-155 has been linked to myeloproliferative and B-lymphoproliferative disorders (Garzon & Croce 2008; O'Connell et al., 2008). Studies have implicated miR-125b-2, which is overexpressed in TMD and AMKL samples compared with normal megakaryocytes, in the megakaryocytic leukemia of DS (Klusmann, 2007).

Klusmann et al. (2010) showed that miR-125b-2 is an oncogene potentially involved in the pathogenesis of trisomy 21-associated leukemia. They demonstrated in mice and human that overexpression of miR-125b-2 led to specific hyperproliferation and enhanced self-renewal capacity of megakaryocytic progenitor (MPs) and megakaryocytic/erythroid progenitors (MEPs), without affecting their normal differentiation. The miR-125b was highly expressed in AMKL blasts, whereas the identified target genes of miR-125b were down-regulated. Thus, miR-125b-2 has a role in regulating megakaryopoiesis and in the pathogenesis of trisomy 21-associated TMD and AMKL, in cooperation with GATA1s. The miR-125b-2 exerts its oncogenic potential by at least two different mechanisms: blocking post-transcriptional miRNA processing through repression of *DICER1* expression, and by inhibiting tumor suppressor genes, such as *ST18*.

7. Methods of leukemia diagnosis in DS

The diagnosis of TMD usually occurs during the first weeks after birth and is observed as hydrops fetalis. The elevated blood count associated with hepatomegaly is the common symptom in an asymptomatic neonate. Infants with TMD can also display occasionally jaundice and bleeding diatheses, respiratory distress coupled with ascites, pleural effusion, signs of heart failure, and skin infiltrates. There is megakaryocytic infiltration and liver fibrosis, likely caused by excess cytokines secreted from the megakaryoblasts. The full clinical TMD may develop only at the second or third week of life. Laboratory tests are significant for either thrombocytosis or thrombocytopenia accompanied by elevated leukocytes with excess of blasts. The blood smear may show nucleated red cells, giant platelets and megakaryocytic fragments, and, most significantly, typical deeply basophilic blasts with blebs characteristic to megakaryocytic blasts. The differential diagnosis includes leukoerythroblastic reaction associated with prematurity, sepsis, or asphyxia. However, the blasts of TMD usually persist for several weeks, and *GATA1* mutations are invariably found (Malinge et al., 2009).

AMKL is preceded in 20 to 60% of cases by an indolent prephase of myelodysplasia (MDS), characterized by thrombocytopenia and dysplastic changes, BM aspiration is often dry, and fibrosis is detected in BM biopsy (Creutzig et al., 1996; Lange et al., 1998). This MDS can last several months or years before progressing to leukemia. In contrast to MDS in non-DS children, which requires stem-cell transplantation for cure, MDS in children with DS present a highly favorable response to chemotherapy alone (Lange et al., 1998). Therefore, Hasle et al. (2003) suggested that all cases of MDS and overt myeloid leukemia in DS, children should be classified as one disease entity, and referred to as "acute myeloid leukemia of Down syndrome" or ML DS. As this is a unique disease, it should be classified separately from other cases of AML in the WHO-classification.

Immunophenotyping characterizes the hematopoietic lineage involved and their degree of maturation by monoclonal antibodies labeled with fluorochromes. Flow cytometry reveals that blasts are positive for CD34, CD33, CD41, CD61, glycoporphin A, and often CD7 and CD36 (Langebrake et al., 2005; Massey et al., 2006). Savasan & Ravindranath (2003) observed that blasts of DS children with AMKL express CD36, in contrast to the low or no expression of CD36 in AML without DS. If 25% of blast cells are not detected, the diagnosis of AMKL can be given by the megakaryocytic markers CD41, CD61 and CD42a. The immunophenotype of the blasts in AMKL is generally similar to TMD, except that the percentage of CD34 cells may be lower in AMKL (Langebrake, 2005; Malinge et al., 2009).

Pine et al. (2005) demonstrate the possibility of using specific *GATA1* mutations already identified in the diagnosis of TMD or AMKL to monitor the size of the clone of leukemic cells over time with a sensitivity level (10^{-4} to 10^{-5}) beyond the microscopic detection. The study confirmed that *GATA1* mutations in TMD and AMKL can be used as clonal markers were suitable for measurement of minimal residual disease (MRD).

This approach serves as a valuable tool in monitoring the spontaneous remission of TMD and in assessing response to treatment of AMKL subcytologic level. In addition, the MRD based *GATA1* mutations has been much in demand as a prognostic parameter for newborns with TMD. One may speculate, for example, that every group of newborns showing apparent remission of TMD can be divided into two subgroups: one in which the size of the clone of blasts in TMD after morphological remission continues to decline to become undetectable versus a second group, in which a clone of blasts in the TMD remains detectable submicroscopic level. It is interesting to correlate these patterns of MRD kinetics in TMD with the probability of developing AMKL later (Hitzler & Zipursky, 2005).

Additional copies of chromosome 8 and 21 in addition to the constitutional trisomy 21 are the most frequent in AMKL, and are found in approximately 10 to 15% for each chromosome. Cytogenetic findings associated with a high rate of relapse in non-DS AML, such as monosomy 7 and deletion 5/5q- also occur in DS patients but do not seem to have a negative impact on prognosis in the rare cases (Gamis et al., 2003, 2005; Rainis et al., 2003).

The approach of molecular techniques including: PCR amplification of *GATA1* exons 2 and 3, followed by direct sequencing or analysis by denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC), and cloning allow greater sensitivity and specificity of detection and have become essential for the identification of gene alterations in leukemias. The ability to detect mutations depends on the proportion of mutant cells in the sample. In general, for direct sequencing, approximately 20% of the sample has to have mutant cells. The sensitivity of DHPLC is higher at around 2 to 5%. Once a mutation has been identified, mutation-specific probes and primers for mutation detection by qRT-PCR can be designed that allow for more sensitive detection of mutant cells, which may be used for MRD detection (Pine et al., 2005).

Until recently, there were no reports on the expression levels of GATA-1s in TAM blasts, and the risk factors for the progression to AMKL. In 2010, Kanezaki et al. tested whether the spectrum of transcripts derived from the mutant *GATA1* genes affects the expression levels. They classified the mutations according to the types of transcripts, and investigated the modalities of expression by in vitro transfection experiments using GATA-1 expression constructs harboring mutations. They have shown that the mutations altered the amount of mutant protein. Based on the evaluation of GATA-1s expression, the mutations were classified into two groups: high and low GATA-1s expression. Phenotypic analyses of 66 TMD patients with *GATA1* mutations revealed that GATA-1s low expression mutations were significantly associated with a high risk of progression to AMKL and lower counts of both WBC and blast cells. These results suggest that quantitative differences in mutant protein levels have significant effects on the phenotype of TMD.

Nevertheless, neither mice nor humans with germline mutations expressing GATA-1s develop TMD or AMKL without trisomy 21 (Hollanda et al., 2006; Li et al., 2005). Therefore, the role of the trisomy 21 in the cellular transformation in AMKL seems to be fundamental (Klusmann et al., 2010). It remains unknown which factors on chromosome 21 cooperate with the oncogenic GATA-1s and which factors are involved in this transition from preleukemia to AMKL in only a part of these children (Kanezaki et al., 2010; Klusmann et al., 2007; Langebrake et al., 2006; Malinge et al., 2009).

8. Treatment Outcome

DS children with AMKL have an excellent prognostic, with an approximately 80% cure rate, in relation to children without DS who develop AML (Arico et al.; 2008; Creutzig et al., 2005; Gamis et al., 2003; Rao et al., 2006; Taub et al., 1996). This outcome is possible on contemporary AML protocols which based in reducing treatment intensity regimens has considerably reduced the mortality rates in children with DS (Creutzig et al., 2005; Gamis et al., 2003; Whitlock et al., 2005; Zeller et al., 2005).

AMKL blasts have shown hypersensitivity to varied chemotherapeutic drugs (Zwaan et al., 2002). Probably the hypersensitivity of the blasts to cytarabine (ARA-C) is due of the effect of *GATA1* mutations and Hsa21 on the levels of cytarabine-metabolizing enzymes (Ge et al., 2005). ARA-C sensitivity is restricted to the leukemic population and may be caused by increased expression levels of the cystathionine-beta-synthase gene, which is located on Hsa21 (Taub et al., 2000). Despite of many patients respond favorably to a simple regimen including low-dose of ARA-C, this is not currently the standard of care. Since many problems have been occurred in treating of AMKL like toxic deaths, infections, and cardiac toxicity, thereby new and less-intensive protocols have been initiated in the United States and Europe (Creutzig et al., 2005; International Cooperative Pediatric AML Study Group Myeloid Leukemia DS 2006 [European Clinical Trials Database (EUDRACT) no. 2007-006219-22]; Children's Oncology Group: The Treatment of Down Syndrome Children with AML and MDS under the age of 4 Years [COG-AAML0431]; low dose cytarabine in treating infants with DS and TMD [COG-AAML0532]).

Researchs in prospective clinical trials are trying to demonstrate whether treatment of TMD by low-dose cytarabine could prevent the arise of AMKL. Another related question to be clarified is whether treatment of clinically silent disease, identified by molecular detection of *GATA1* mutations in patients who recovered from TMD, can prevent the future development of AMKL (Malinge et al., 2009).

9. Conclusion

In conclusion, many questions remain unanswered concerning the factors that contribute to the progression of TMD and AMKL in DS-patients. Progress in research to unravel these questions will improve diagnosis and treatment. Furthermore, ensuring the diagnosis of *GATA1* mutations to the DS child to monitor the progression of the disease is essential to enable better clinical decision for the treatment regimen and, consequently, better quality of life to the patients.

10. Acknowledgments

Review supported by CAPES - Project CEP-FM 34/2008 and SES-DF 339/08.

11. References

- Ahmed, M.; Sternberg, A.; Hall, G.; Thomas, A.; Smith, O.; O'marcaigh, A.; Wynn, R.; Stevens, R.; Addison, M.; King, D.; Stewart, B.; Gibson, B.; Roberts, I.; Vyas, P. (2004). Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. *Blood*, Vol.103, No.7, pp.2480-2489, ISSN 0006-4971
- Arico, M.; Ziino, O.; Valsecchi, M.G.; et al. (2008). Acute lymphoblastic leukemia and Down syndrome: presenting features and treatment outcome in the experience of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP). *Cancer*, Vol.113, No.3, pp.515-521, ISSN 0008-543X
- Baldus, C.D.; Liyanarachchi, S.; Mrozek, K.; et al. (2004). Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.101, No.11, pp.3915-3920, ISSN 0027-8424
- Bourquin, J.P.; Subramanian, A.; Langebrake, C.; et al. (2006). Identification of distinct molecular phenotypes in acute megakaryoblastic leukemia by gene expression profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.103, No.9, pp.3339-3344, ISSN 0027-8424
- Calligaris, R.; Bottardi, S.; Cogoi, S.; Apezteguia, I.; Santoro, C. (1995). Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.92, No.25, pp.11598-11602, ISSN 0027-8424
- Chou, S.T.; Opalinska, J.B.; Yao, Y. et al. (2008). Trisomy 21 enhances human fetal erythro-megakaryocytic development. *Blood*, Vol.112, No.12, pp.4503-4506, ISSN 0006-4971
- Creutzig, U.; Ritter, J.; Vormoor, J.; et al. (1996). Myelodysplasia and acute myelogenous leukemia in Down's syndrome. A report of 40 children of the AML-BFM Study Group. *Leukemia*, Vol.10, No.11, pp.1677-1686, ISSN 0887-6924
- Creutzig, U.; Reinhardt, D.; Diekamp, S.; Dworzak, M.; Sary, J.; Zimmermann, M. (2005). AML patients with Down syndrome have a high cure rate with AML-BFM therapy with reduced dose intensity. *Leukemia*, Vol.19, No.8, pp.1355-1360, ISSN 0887-6924
- Crispino, J.D.; Lodish, M.B.; Mackay, J.P.; Orkin, S.H. (1999). Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1: FOG complex. *Molecular Cell*, Vol.3, No.2, pp.219-228, ISSN 1097-2765
- De Vita, S.; Mulligan, C.; McElwaine, S.; et al. (2007). Loss-of-function JAK3 mutations in TMD and AMKL of Down syndrome. *British Journal of Haematology*, Vol.137, No.4, pp.337-341, ISSN 00071048
- Deguchi, K.; Gilliland, D.G. (2002). Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia*, Vol.16, No.4, pp.740-744, ISSN 0887-6924
- Fox, A.H.; Liew, C.; Holmes, M.; Kowalski, K.; Mackay, J.; Crossley, M. (1999). Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA proteins by means of multiple zinc fingers. *The EMBO Journal*, Vol.18, No.10, pp.2812-2822, ISSN 0261-4189
- Gamis, A.S.; Woods, W.G.; Alonzo, T.A.; et al. (2003). Increased age at diagnosis has a significantly negative effect on outcome in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: a report from the Children's Cancer Group Study 2891. *Journal of Clinical Oncology*, Vol.21, No.18, pp.3415-3422, ISSN 0732-183X
- Gamis, A.S. (2005). Acute myeloid leukemia and Down syndrome evolution of modern therapy – state of the art review. *Pediatric Blood & Cancer*, Vol.44, No.1, pp.13-20, ISSN 1545-5009
- Garzon, R.; Pichiorri, F.; Palumbo, T.; et al. (2006). MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.103, No.13, pp.5078-5083, ISSN 0027-8424
- Garzon, R.; Croce, C.M. (2008). MicroRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Current Opinion in Hematology*, Vol.15, No.4, pp.352-358, ISSN 1065-6251
- Ge, Y.; Stout, M.L.; Tatman, D.A.; et al. (2005). GATA1, cytidine deaminase, and the high cure rate of Down syndrome children with acute megakaryocytic leukemia. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol.97, No.3, pp.226-231, ISSN 0027-8874
- Ge, Y.; Dombkowski, A.A.; LaFiura, K.M.; et al. (2006). Differential gene expression, GATA1 target genes, and the chemotherapy sensitivity of Down syndrome megakaryocytic leukemia. *Blood*, Vol.107, pp.1570-1581, ISSN 0006-4971
- Ge, Y.; LaFiura, K.M.; Dombkowski, A.A.; et al. (2008). The role of the proto-oncogene ETS2 in acute megakaryocytic leukemia biology and therapy. *Leukemia*, Vol.22, No.3, pp.521-529, ISSN 0887-6924
- Gjertson, C.; Sturm, K.S.; Berger, C.N. (1999). Hematopoietic deficiencies and core binding factor expression in murine Ts16, an animal model for Down syndrome. *Clinical Immunology*, Vol.91, No.1, pp.50-60, ISSN 1744-666X
- Groet, J.; Mulligan, C.; Spinelli, M.; Serra, A.; McElwaine, S.; Cotter, F.E.; Dagna-Bricarelli, F.; Saglio, G.; Basso, G.; Nizetic, D. (2005). Independent clones at separable stages of differentiation, bearing different GATA1 mutations, in the same TMD patient with Down syndrome. *Blood*, Vol.106, No.5, pp.1887-1888, ISSN 0006-4971

- Hasle, H. (2001). Pattern of malignant disorders in individuals with Down's syndrome. *Lancet Oncology*, Vol.2, No.7, pp.429-436, ISSN 1470-2045
- Hasle, H.; Niemeyer, C.M.; Chessells, J.M.; et al. (2003). A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*, Vol.17, No.2, pp.277-282, ISSN 0887-6924
- Hitzler, J.K.; Cheung, J.; Li, Y.; Scherer, S.W.; Zipursky, A. (2003). GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*, Vol.101, No.11, pp.4301-4304, ISSN 0006-4971
- Hitzler, J. & Zipursky, A. (2005). GATA 1 mutations as clonal markers of minimal residual disease in acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome--a new tool with significant potential applications. *Leukemia Research*, Vol.29, No.11, pp.1353-1356, ISSN 0145-2126
- Hollanda, L.M.; Lima, C.S.; Cunha, A.F.; Albuquerque, D.M.; Vassallo, J.; Ozelo, M.C.; Joazeiro, P.P.; Saad, S.T.; Costa, F.F. (2006) An inherited mutation leading to production of only the short isoform of GATA-1 is associated with impaired erythropoiesis. *Nature Genetics*, Vol.38, No.7, pp.807-812, ISSN 1061-4036
- Holt, S.E.; Brown, E.J.; Zipursky, A. (2002). Telomerase and the benign and malignant megakaryoblastic leukemias of Down syndrome. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, Vol.24, No.1, pp.14-17, ISSN 0192-8562
- Issacs, H. (2003). Fetal and neonatal leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, Vol.25, No.5, pp.348-361, ISSN 0192-8562
- Izraeli, S. (2004). Leukemia: a developmental perspective. *British Journal of Haematology*, Vol.126, No.1, pp.3-10, ISSN 00071048
- Izraeli, S.; Rainis, L.; Hertzberg, L.; Smooha, G.; Birger, Y. (2007). Trisomy of chromosome 21 in leukemogenesis. *Blood Cells Molecules and Diseases*, Vol.39, No.2, pp.156-159, ISSN 1079- 9796
- Kanezaki, R.; Toki, T.; Terui, K.; Xu, G.; Wang, R.; Shimada, A.; Hama, A.; Kanegane, H.; Kawakami, K.; Endo, M.; Hasegawa, D.; Kogawa, K.; Adachi, S.; Ikeda, Y.; Iwamoto, S.; Taga, T.; Kosaka, Y.; Kojima, S.; Hayashi, Y.; Ito, E. (2010). Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*, Vol.116, No.22, pp.4631-4638, ISSN 0006-4971
- Kirsammer, G.; Jilani, S.; Liu, H.; et al. (2008). Highly penetrant myeloproliferative disease in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome. *Blood*, Vol.111, No.2, pp.767-775, ISSN 0006-4971
- Klusmann, J.H.; Reinhardt, D.; Hasle, H.; et al. (2007). Janus kinase mutations in the development of acute megakaryoblastic leukemia in children with and without Down's syndrome. *Leukemia*, Vol.21, No.7, pp.1584-1587, ISSN 0887-6924
- Klusmann, J.H.; Creutzig, U.; Zimmermann, M.; et al. (2008). Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. *Blood*, Vol.111, No.6, pp.2991-2998, ISSN 0006-4971
- Klusmann, J.H.; Li, Z.; Böhmer, K.; Maroz, A.; Koch, M.L.; Emmrich, S.; Godinho, F.J.; Orkin, S.H.; Reinhardt, D. (2010). miR-125b-2 is a potential oncomiR on human chromosome 21 in megakaryoblastic leukemia. *Genes & Development*, Vol.24, No.5, pp.478-490, ISSN 0890-9369
- Kuhl, C.; Atzberger, A.; Iborra, F.; Nieswandt, B.; Porcher, C.; Vyas, P. (2005). GATA1-mediated megakaryocyte differentiation and growth control can be uncoupled and mapped to different domains in GATA1. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.25, No.19, pp.8592-8606, ISSN 1098-5549
- Kuhn, D.E.; Nuovo, G.J.; Martin, M.M.; et al. (2008). Human chromosome 21-derived miRNAs are overexpressed in down syndrome brains and hearts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.370, No.3, pp.473-477, ISSN 0006-291X
- Lange, B.J.; Kobrinsky, N.; Barnard, D.R.; et al. (1998). Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891. *Blood*, Vol.91, No.2, pp.608-615, ISSN 0006-4971
- Lange, B.J. (2000). The management of neoplastic disorders of hematopoiesis in children with Down's syndrome. *British Journal of Haematology*, Vol.110, No.3, pp.512-524, ISSN 0007- 1048
- Langebrake, C.; Creutzig, U.; Reinhardt, D. (2005). Immunophenotype of Down syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differs significantly from other diseases with morphologically identical or similar blasts. *Klinische Pädiatrie*, Vol.217, No.3, pp.126-134, ISSN 0300-8630
- Langebrake, C.; Klusmann, J.H.; Wortmann, K.; Kolar, M.; Puhlmann, U.; Reinhardt, D. (2006). Concomitant aberrant overexpression of RUNX1 and NCAM in regenerating bone marrow of myeloid leukemia of Down's syndrome. *Haematologica*, Vol.91, No.11, pp.1473-1480, ISSN 0390-6078
- Levanon, D.; Groner, Y. (2004). Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene*, Vol.23, No.24, pp.4211-4219, ISSN 0950-9232
- Li, Z.; Godinho, F.J.; Klusmann, J.H.; Garriga-Canut, M.; Yu, C.; Orkin, S.H. (2005). Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nature Genetics*, Vol.37, No.6, pp.613-619, ISSN 1061-4036

- Look, A.T. (2002). A leukemogenic twist for GATA1. *Nature Genetics*, Vol.32, No.1, pp.83-84, ISSN 1061-4036
- Loughran, S.J.; Kruse, E.A.; Hacking, D.F.; et al. (2008). The transcription factor Erg is essential for definitive hematopoiesis and the function of adult hematopoietic stem cells. *Nature Immunology*, Vol.9, No.7, pp.810-819, ISSN : 1529-2908
- Lyle, R.; Bena, F.; Gagos, S.; et al. (2009). Genotype-phenotype correlations in Down syndrome identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *European Journal of Human Genetics*, Vol.17, No.4, pp. 454-466, ISSN 1018-4813
- Malinge, S.; Izraeli, S.; Crispino, J.D. (2009). Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*, Vol.113, No.12, pp.2619-2628, ISSN 0006-4971
- Malkin, D.; Brown, E.J.; Zipursky, A. (2000). The role of p53 in megakaryocytic differentiation and the megakaryocytic leukemias of Down syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, Vol.116, No.1, pp.1-5, ISSN 0165-4608
- Marcucci, G.; Baldus, C.D.; Ruppert, A.S.; et al. (2005). Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of Clinical Oncology*, Vol.23, pp.9234-9242, ISSN 0732-183X
- Martin, D.I.; Orkin, S.H. (1990). Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes & Development*, Vol.4, No.11, pp.1886-1898, ISSN 0890-9369
- Massey, G.V.; Zipursky, A.; Chang, M.N.; et al. (2006). A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. *Blood*, Vol.107, No.12, pp.4606-4613, ISSN 0006-4971
- Mundschau, G.; Gurbuxani, S.; Gamis, A.S.; Greene, M.E.; Arceci, R.J.; Crispino, J.D. (2003). Mutagenesis of GATA1 is an initiating event in Down syndrome leukemogenesis. *Blood*, Vol.101, No.11, pp.4298-4300, ISSN 0006-4971
- Muntean, A.G.; Crispino, J.D. (2005). Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. *Blood*, Vol.106, No.4, pp.1223-1231, ISSN 0006-4971
- Muramatsu, H.; Kato, K.; Watanabe, N.; et al. (2008). Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukemia. *British Journal of Haematology*, Vol.142, No.4, pp.610-615, ISSN 00071048
- Nichols, K.E.; Crispino, J.D.; Poncz, M.; White, J.G.; Orkin, S.H.; Maris, J.M.; Weiss, M.J. (2000). Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nature Genetics*, Vol.24, No.3, pp.266-270, ISSN 1061-4036
- O'Connell, R.M.; Rao, D.S.; Chaudhuri, A.A.; et al. (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *Journal of Experimental Medicine*, Vol.205, No.3, pp.585-594, ISSN 0022-1007
- Osato, M.; Asou, N.; Abdalla, E.; et al. (1999). Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1 gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood*, Vol.93, No.6, pp.1817-1824, ISSN 0006-4971
- Pang, L.; Xue, H.H.; Szalai, G.; et al. (2006). Maturation stage-specific regulation of megakaryopoiesis by pointed-domain Ets proteins. *Blood*, Vol.108, No.7, pp.2198-2206, ISSN 0006-4971
- Pine, S.R.; Guo, Q.; Yin, C.; et al. (2005). GATA1 as a new target to detect minimal residual disease in both transient leukemia and megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Leukemia Research*, Vol.29, No.11, pp.1353-1356, ISSN 0145-2126
- Pine, S.R.; Guo, Q.; Yin, C.; Jayabose, S.; Druschel, C.M.; Sandoval, C. (2007). Incidence and clinical implications of GATA1 mutations in newborns with Down syndrome. *Blood*, Vol.110, No.6, pp.2128-2131, ISSN 0006-4971
- Preudhomme, C.; Warot-Loze, D.; Roumier, C.; et al. (2000). High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood*, Vol.96, No.8, pp.2862-2869, ISSN 0006-4971
- Rainis, L.; Bercovich, D.; Strehl, S.; et al. (2003). Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood*, Vol.102, No.3, pp.981-986, ISSN 0006-4971
- Rainis, L.; Toki, T.; Pimanda, J.E.; et al. (2005). The protooncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. *Cancer Research*, Vol.65, No.17, pp.7596-7602, ISSN 0008-5472
- Rao, A.; Hills, R.K.; Stiller, C.; et al. (2006). Treatment for myeloid leukemia of Down syndrome: population based experience in the UK and results from the Medical Research Council AML 10 and AML 12 trials. *British Journal of Haematology*, Vol.132, No.5, pp.576-583, ISSN 00071048
- Roizen, N.J.; Amarose, A.P. (1993). Hematologic abnormalities in children with Down syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, Vol.46, No.5, pp.510-512, ISSN 1552-4868

- Savasan, S.B.S.; Ravindranath, Y. (2003). Cd36 Expression Is Associated With Superior In Vitro Ara-C Sensitivity In Acute Megakaryocytic Leukemia With And Without Down Syndrome. *Medical and Pediatric Oncology*, Vol.41, No.10, pp.274-275, ISSN 1096-911X
- Shimizu, R.; Takahashi, S.; Ohneda, K.; Engel, J. D.; Yamamoto, M. (2001). In vivo requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. *Embo Journal*, Vol.20, No.18, pp.5250-5260.
- Shimizu, R.; Kuroha, T.; Ohneda, O.; et al. (2004). Leukemogenesis caused by incapacitated GATA-1 function. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.24, No.24, pp.10814-10825, ISSN 1098-5549
- Shimizu, R.; Engel, JD, Yamamoto, M. (2008). GATA1-related leukaemias. *Nature Reviews Cancer*, Vol.8, No.4, pp.279-287, ISSN 1474-175X
- Taub, J.W.; Matherly, L.H.; Stout, M.L.; Buck, S.A.; Gurney, J.G.; Ravindranath, Y. (1996). Enhanced metabolism of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in Down syndrome cells: a contributing factor to the superior event free survival of Down syndrome children with acute myeloid leukemia. *Blood*, Vol.87, No.8, pp.3395-3403, ISSN 0006-4971
- Taub, J.W.; Huang, X.; Ge, Y.; et al. (2000). Cystathionine-beta-synthase cDNA transfection alters the sensitivity and metabolism of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in CCRF-CEM leukemia cells in vitro and in vivo: a model of leukemia in Down syndrome. *Cancer Research*, Vol.60, No.22, pp.6421-6426, ISSN 0008-5472
- Taub, J.W.; Mundschau, G.; Ge, Y.; et al. (2004). Prenatal origin of GATA1 mutations may be an initiating step in the development of megakaryocytic leukemia in Down syndrome. *Blood*, Vol.104, No.5, pp.1588-1589, ISSN 0006-4971
- Tunstall-Pedoe, O.; Roy, A.; Karadimitris, A.; et al. (2008). Abnormalities in the myeloid progenitor compartment in Down syndrome fetal liver precede acquisition of GATA1 mutations. *Blood*, Vol.112, No.12, pp.4507-4511, ISSN 0006-4971
- Vyas, P.; Ault, K.; Jackson, C.W.; Orkin, S.H.; Shivdasani, R.A. (1999). Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood*, Vol.93, No.9, pp.2867-2875, ISSN 0006-4971
- Vyas, P.; Crispino, J.D. (2007). Molecular insights into Down syndrome-associated leukemia. *Current Opinion in Pediatrics*, Vol.19, No.1, pp.9-14, ISSN 1040-8703
- Walters, D.K.; Mercher, T.; Gu, T.L.; et al. (2006). Activating alleles of JAK3 in acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell*, Vol.10, No.1, pp.65-75, ISSN 1535-6108
- Wang, Z.; Burge, C.B. (2008). Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, Vol.14, No.5, pp.802-813, ISSN 1355-8382
- Wechsler, J.; Greene, M.; McDevitt, M.A.; Anastasi, J.; Karp, J.E.; Le Beau, M.M.; Crispino, J.D. (2002). Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nature Genetics*, Vol.32, No.1, pp.148-152, ISSN 1061-4036
- Weiss, M. J.; Yu, C.; Orkin, S. H. (1997). Erythroid-cell-specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line. *Molecular and Cellular Biology*, Vol.17, No.3, pp.1642-1651, ISSN 1098-5549
- Whitlock, J.A.; Sather, H.N.; Gaynon, P.; et al. (2005). Clinical characteristics and outcome of children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood*, Vol.106, No.13, pp.4043-4049, ISSN 0006-4971
- Xu, G.; Nagano, M.; Kanezaki, R.; et al. (2003). Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood*, Vol.102, No.8, pp.2960-2968, ISSN 0006-4971
- Yang, Z.F.; Mott, S.; Rosmarin, A.G. (2007). The Ets transcription factor GABP is required for cell-cycle progression. *Nature Cell Biology*, Vol.9, No.3, pp.339-346, ISSN 1097 -6256
- Yu, C.; Niakan, K.K.; Matsushita, M.; Stamatoyannopoulos, G. Orkin, S.H.; Raskind, W.H. (2002). X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNAbinding rather than FOG-1 interaction. *Blood*, Vol.100, No.6, pp.2040-2045, ISSN 0006-4971
- Zeller, B.; Gustafsson, G.; Forestier, E.; et al. (2005). Acute leukaemia in children with Down syndrome: a population-based Nordic study. *British Journal of Haematology*, Vol.128, No.6, pp.797-804, ISSN 0007-1048
- Zipursky, A. (2003). Transient leukemia: a benign form of leukemia in newborn infants with trisomy 21. *British Journal of Haematology*, Vol.120, No.6, pp.930-938, ISSN 0007-1048
- Zwaan, C.M.; Kaspers, G.J.; Pieters, R.; et al. (2002). Different drug sensitivity profiles of acute myeloid and lymphoblastic leukemia and normal peripheral blood mononuclear cells in children with and without Down syndrome. *Blood*, Vol.99, No.1, pp.245-251, ISSN 0006-4971

APÊNDICE III - Material e Métodos

Meio de cultura RPMI 1640

Meio RPMI (1640)	80%;
Soro fetal bovino	15%;
Fitohemaglutinina	4%;
Penicilina	5g;
Estreptomicina	10g;

O meio era esterilizado por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm, aliquotado e armazenado a -20°C.

Giemsa

Giemsa (Merck)	1g;
Glicerina	54 mL;
Metanol	84 mL;

Hank's Balance Salt Solution (HBSS) – 10X

NaCl	80g;
KCl	4,0g;
Na ₂ HPO ₄	0,5g;
KH ₂ PO ₄	0,6g;
Glucose	10g;

O pH do tampão foi ajustado para 8,0 com Na₂HPO₄, aliquotado e armazenado a -20°C.

Meio LB (Luria-Bertani)

Peptona de caseína	1%;
Extrato de Levedura	0,5%;
NaCl	1%.

O pH do meio foi ajustado para 7,2 com NaOH, esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min e armazenado à temperatura ambiente.

Tampão TB para células competentes

Pipes 10 mM;

MnCl₂ 55 mM;

CaCl₂ 15 mM;

KCl 250 mM.

Dissolver todos os sais exceto o MnCl₂; ajustar o pH para 6,7 com KOH. Em seguida, adicionar o MnCl₂ e esterilizar por filtração através de filtro Millipore 0,22 µm; estocar a 4°C.

Ágar LB

Ao meio LB era adicionado ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,5% (p/v). Esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min e armazenado à temperatura ambiente.

Meio 2xYT

Peptona de caseína 1,6% (p/v);

Extrato de Levedura 1% (p/v);

NaCl 0,5% (p/v).

O pH do meio foi ajustado para 7,2 com NaOH, esterilizado em autoclave a 121°C por 20 min e armazenado à temperatura ambiente.

Meio SOB

Peptona de caseína 2% (p/v);

Extrato de Levedura 0,5% (p/v);

NaCl 0,05%;

KCl 2,5mM;

MgCl₂ 10mM.

O pH do meio foi ajustado para 7,2 com NaOH, esterilizado em autoclave a 120°C por 20 min. Resfriado, e em seguida adicionado ao meio o MgCl₂ (já em solução esterilizada por filtração).

Meio SOC

Foram adicionados 20mM de glicose previamente esterilizada por filtração ao meio SOB.

Linhagens bacterianas de *Escherichia coli*

DH5 α (Invitrogen): F⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ ⁻ thi-1 gyrA96 relA1.

Plasmídeo pGEM-T

O vetor pGEM-T (3,0 kb, Promega) contém: ori f1, amp^r, promotores T7 e SP6, gene *lacZ* e múltiplos sítios de clonagem. Esse vetor foi utilizado para a clonagem de produtos de PCR.

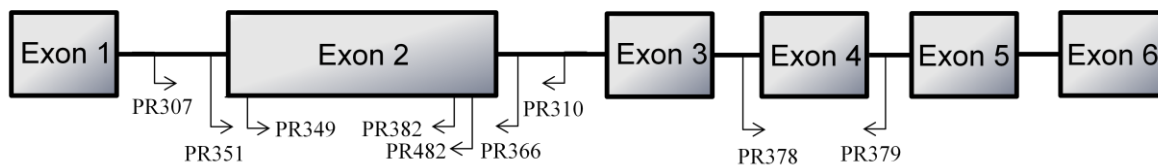
Tabela 5 - Tabela dos primers utilizados nas reações de PCR.

PRIMERS	EXONS	SEQUÊNCIAS	TM
PR307	<i>GATA1</i> -exon 2	5' TGAGGTGATGGAGTGGGAGGAGG 3'	62,1°C
PR310	<i>GATA1</i> -exon 2	5' GGTCGGCACATCCATTTGAGAAGC 3'	60,5°C
PR351	<i>GATA1</i> -exon 2	5' GAAGGATTTCTGTGTCTGAGG 3'	52,8°C
PR366	<i>GATA1</i> -exon 2	5' CAATGCCAAGACAGCCACTC 3'	56,6°C
PR349	<i>GATA1</i> -exon 2 - Pac 1	5' CACTGGCCTACACTCCCCAGGTA 3'	62,2°C
PR382	<i>GATA1</i> -exon 2 - Pac 2	5' GCAGCTGCAGCAGGCCAGTGC 3'	72°C
PR482	<i>GATA1</i> -exon 2 - Pac 4	5' GGACACCAGAGCAGGATCAC 3'	64,5°C
PR378	<i>GATA1</i> -exon 4	5' AAAAAGGACAGGGAAGTTGAGGTG 3'	57,4°C
PR379	<i>GATA1</i> -exon 4	5' TGTGTAGGATGAAGGCAAGGGTTT 3'	58,5°C
PR194	<i>GAPDH</i>	5' CCCATCACCATCTTCCAGG 3'	55,2°C
PR195	<i>GAPDH</i>	5' AGTGAGCTTCCCGTTCAGC 3'	57,6°C

Referência hGATA1 WT– Exon 2

TGAGGTGATGGAGTGGGAGGAGGGGGAAAGGAGGGGAAGAGGAGCAGGTGAAAGGAGGTGGGGGGGAAGGATTT
 CTGTGTCTGAGGACCCCTTCTGTCCCTCGCAGGTTAATCCCCAGAGGCTCCATGGAGTTCCCTGGCCTGGGGTC
 CCTGGGGACCTCAGAGCCCTCCCCAGTTTGTGGATCCTGCTCTGGTGTCTCCACACCAGAATCAGGGGTT
 TTCTTCCCCTCTGGCCTGAGGGCTTGGATGCAGCAGCTTCCTCCACTGCCCGAGCACAGCCACCGCTGCAG
 CTGCGGCACTGGCCTACTACAGGGACGCTGAGGCCTACAGACACTCCCCAGGTAACTCCATTGAGTGGCTGTC
 TTGGCATTGGCTGAGTGTCTGTTGGGGTTGCCATGGAGATCCTTGGCTAGGTTCAGAATACCACTGTGAGGATAT
 CTCAGAAATGGCTGGAAGCTTCTCAAATGGATGTGCCGACC

Localização no gene *GATA1* dos primers utilizados:



APÊNDICE IV- Registro dos pacientes com diagnóstico de síndrome de Down

Paciente	Sexo	Idade	Cariótipo
8081	M	2m	47,XY,+21
8089	F	4d	47,XX,+21
8096	F	6d	47,XX,+21
8101	M	15d	47,XY,+21
8213	M	4d	47,XY,+21
8254	F	25d	47,XX,+21
8255	M	7d	47,XY,+21
8302	M	3d	46,XY,+21,rob(21;21)(q10;q10)
8303	F	7d	47,XX,+21
8307	M	10d	47,XY,+21
8401	F	17d	47,XX,+21
8427	M	7d	47,XY,+21
8433	F	1m	47,XX,+21
8674	M	18d	47,XY,+21
8694	F	10d	47,XX,+21
8696	M	2m24d	47,XY,+21
8754	F	17d	46,XX,+21,rob(21;21)(q10;q10)
8756	M	5d	47,XY,+21
8757	F	8d	47,XX,+21
8762	M	1m	47,XY,+21
8786	F	11d	47,XX,+21
8791	F	10d	47,XX,+21
8797	M	10d	47,XY,+21
8803	F	1m5d	47,XX,+21
8806	M	2m9d	47,XY,+21
8814	M	5d	47,XY,+21
8834	M	11d	47,XY,+21
8838	M	5d	47,XY,+21
8840	M	1m10d	47,XY,+21
8845	M	1d	47,XY,+21
8851	M	3d	47,XY,+21
8852	M	7d	47,XY,+21
8880	M	3m25d	47,XY,+21
8881	M	13d	47,XY,+21
8940	F	2m18d	47,XX,+21
8957	M	8d	47,XY,+21
8969	F	7d	47,XX,+21
8983	F	24d	47,XX,+21
8984	M	1m6d	46,XY,+21,rob(21;21)(q10;q10)
9014	M	3m26d	47,XY,+21
9040	F	18d	47,XX,+21
9041	F	4d	47,XX,+21
9082	M	15d	47,XY,+21
9092	F	6d	47,XX,+21
9131	F	1m25d	47,XX,+21
9137	M	17d	47,XY,+21
9174	M	3d	47,XY,+21
9183	F	8d	47,XX,+21

9205	M	17d	47,XY,+21
9230	M	30d	47,XY,+21
9236	F	14d	47,XX,+21
9239	F	9d	47,XX,+21
9240	M	2m8d	47,XY,+21
9242	F	10d	47,XX,+21
9248	F	1m11d	47,XX,+21
9274	M	1a1m7d	47,XY,+21
9274II	M	1a5m28d	47,XY,+21
9274MO	M	1a5m29d	47,XY,+21
9274 MO	M	1a5m28d	já realizado
9274 MO V	M	1a11m14d	47,XY,+21
9274 MO II	M	1a6m10d	47,XY,+21
9274 MO III	M	1a6m21d	47,XY,+21
9274 MO IV	M	9m25d	47,XY,+21
9289	M	6d	47,XY,+21
9293	M	23d	47,XY,+21
9298	M	5d	47,XY,+21
9299	M	10d	47,XY,+21
9313	F	10d	47,XX,+21
9321	F	5d	47,XX,+21
9336	M	12d	47,XY,+21
9361	F	3m25d	47,XX,+21
9372	M	10d	46,XY,+21,rob(21;21)(q10;q10)
9378	F	7d	47,XX,+21
9379	M	1m10d	47,XY,+21
9413	M	38d	47,XY,+21
9417	M	15d	47,XY,+21
9418	M	6d	47,XY,+21
9434	F	11d	47,XX,+21
9451	F	9d	46,XX,+21,rob(21;21)(q10;q10)
9454	F	14d	47,XX,+21
9479	F	3m5d	47,XX,+21
9489	M	2m22d	47,XY,+21
9501	M	40d	47,XY,+21
9504	F	6d	47,XX,+21
9521	M	9d	47,XY,+21
9526	M	5d	46,XX,+21,rob(21;21)(q10;q10)
9564	M	2m	47,XY,+21
9570	M	4d	47,XY,+21
9574	M	3d	47,XY,+21
9576	M	12d	47,XY,+21
SD01/08	F	21d	47,XX,+21
SD02/08	M	19d	47,XY,+21
SD01/09	M	18d	47,XY,+21
SD01/09MO	M	26d	46,XY,+21
SD01/09II	M	1m2d	já realizado
SD01/09III	M	1m16d	já realizado
SD02/09	F	30d	47,XX,+21
SD05/09	F	30d	47,XX,+21
SD07/09	F	13d	47,XX,+21
SD12/09	F	4d	47,XX,+21
SD13/09	M	28d	47,XY,+21

SD15/09	F	13d	47,XX,+21
SD16/09	M	24d	47,XY,+21
SD17/09	M	9d	47,XY,+21
SD18/09	M	3m	47,XY,+21
SD18/09I	M	1a8m6d	já realizado
SD18/09MO	M	1a8m6d	Não cresceu
SD18/09II	M	1a9m1d	já realizado
SD18/09III	M	1a11m7d	já realizado
SD18/09IV	M	2a28d	já realizado
SD18/09MOII	M	2a29d	47,XY,del(5)(p13~14),del(6)(q?),+21c[12]/47,XY,+21c[46]
SD18/09V	M	2a1m4d	já realizado
SD18/09MOIII	M	2a3m27d	já realizado
SD18/09VI	M	2a6m12d	já realizado
SD18/09MOIV	M	2a6m12d	já realizado
SD18/09VII	M	2a7m9d	já realizado
SD18/09VIII	M	2a7m11d	já realizado
SD18/09IX	M	2a7m12d	já realizado
SD18/09X	M	2a9m28d	já realizado
SD18/09MOV	M	2a9m28d	já realizado
SD20/09	M	4d	47,XY,+21
SD20/09 MO	M	1a9m19d	já realizado
SD20/09 MOII	M	1a10m19d	já realizado
SD21/09	M	15d	47,XY,+21
SD22/09	F	2m4d	47,XX,+21
SD23/09	F	4d	47,XX,+21
SD23/09MO	F	9d	47,XX,+21
SD23/09III	F	16d	já realizado
SD24/09	F	11d	47,XX,+21
SD25/09	M	10d	47,XY,+21
SD30/09	M	28d	47,XY,+21
SD32/09	M	3m2d	47,XY,+21
SD33/09	F	8d	47,XX,+21
SD34/09	F	6d	47,XX,+21
SD35/09	M	6d	47,XY,+21
SD36/09	F	1m27d	47,XX,+21
SD38/09	F	10d	47,XX,+21
SD39/09	M	21d	47,XY,+21
SD40/09	F	14d	47,XX,+21
SD41/09	M	1m10d	47,XY,+21
SD42/09	M	26d	47,XY,+21
SD43/09	M	5d	47,XY,+21
SD44/09	M	8d	47,XY,+21
SD45/09	F	14d	46,XY,+21,rob(21;21)(q10;q10)
SD46/09	F	3m19d	47,XX,+21
SD48/09	F	28d	47,XX,+21
SD49/09	M	10d	47,XY,+21
SD50/09	M	5d	47,XY,+21
SD51/09	F	11d	47,XX,+21
SD52/09	F	11d	47,XX,+21
SD53/09	M	7d	47,XY,+21
SD54/09	F	20d	47,XX,+21
SD56/09	F	22d	47,XX,+21
SD01/10	M	27d	47,XY,+21

SD02/10	F	2m19d	47,XX,+21
SD03/10	M	1m18d	47,XY,+21
SD05/10	M	1m29d	47,XY,+21
SD07/10	M	7d	47,XY,+21
SD08/10	F	7d	47,XX,+21
SD09/10	M	3d	47,XY,+21
SD10/10	F	3d	47,XX,+21
SD13/10	M	6d	47,XY,+21
SD15/10	F	1m12d	47,XX,+21
SD16/10	F	2m15d	47,XX,+21
SD17/10	F	1m19d	47,XX,+21
SD20/10	F	1m12d	47,XX,+21
SD21/10	F	3m2d	47,XX,+21
SD22/10	M	25d	47,XY,+21
SD23/10	M	25d	47,XY,+21
SD24/10	F	1m	47,XX,+21
SD25/10	F	1m24d	47,XX,+21
SD26/10	F	10d	47,XX,inv(9)(p12q12),+21
SD27/10	M	1m26d	47,XY,+21
SD28/10	M	1m26d	47,XY,+21
SD29/10	F	28d	46,XX,+21,rob(21;21)(q10;q10)
SD31/10	M	6d	47,XY,+21
SD32/10	M	6d	47,XY,+21
SD33/10	M	2m 27d	47,XY,+21
SD34/10	M	3m10d	47,XY,+21
SD35/10	M	14d	47,XY,+21
SD36/10	F	11d	47,XX,+21
SD37/10	M	3m	47,XY,+21
SD38/10	F	1m23d	47,XX,+21
SD39/10	F	9d	47,XX,+21
SD40/10	M	28d	47,XY,+21
SD01/11	M	14d	47,XY,+21
SD06/11	F	1m4d	47,XX,+21
SD07/11	F	1m6d	47,XX,+21
SD08/11	F	20d	47,XX,+21
SD09/11	F	2d	47,XX,+21
SD10/11	M	11d	47,XY,+21
SD11/11	F	25d	47,XX,+21
SD12/11	F	7d	47,XX,+21
SD13/11	M	21d	47,XY,+21
SD14/11	M	29d	47,XY,+21
SD15/11	M	3m3d	47,XY,+21

**APÊNDICE V - Registro dos pacientes com suspeita clínica de anemia
diseritropoiética**

Paciente	Sexo	Idade	Cariótipo
SD03/09	M	15a22d	Não realizou
SD08/09	F	8a6d	Não realizou
SD09/09	F	30a	Não realizou
SD10/09	M	28a	Não realizou
SD11/09	M	3a	Não realizou
SD03/09II	M	16a	Não realizou
SD14/09	M	6a	Não realizou

APÊNDICE VI - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa UnB / HUB

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 034/2008

Título: “Abordagem molecular das Hemopatias da Síndrome de Down”.

Pesquisador responsável: Lilian Barros Queiroz

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es).

Data de entrada: 27/05/2008

Proposição do(a) relator(a)

() **Aprovação**

() **Não aprovação**

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 03/06/2008

Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 11/08/2008

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, a Coordenação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** *ad referendum*, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 12 de agosto de 2008.

Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UnB

APÊNDICE VII - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FEPECS



GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER Nº 034/2009

PROTOCOLO Nº DO PROJETO: 339/08 – Abordagem molecular das hemopátias clonais da Síndrome de Down.

Instituição Pesquisada: SES/DF

Area Temática Especial: Grupo III (não pertencente à área temática especial), Ciências da Saúde;

Validade do Parecer: 05/03/2011

Tendo como base a Resolução 196/96 CNS/MS, que dispõe sobre as diretrizes e normas regulamentadoras em pesquisa envolvendo seres humanos, assim como as suas resoluções complementares, o Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal, após apreciação ética, manifesta-se pela **APROVAÇÃO DO PROJETO**.

Esclarecemos que o pesquisador deverá observar as responsabilidades que lhe são atribuídas na Resolução 196/96 CNS/MS, inciso IX.1 e IX.2, em relação ao desenvolvimento do projeto. **Ressaltamos a necessidade de encaminhar o relatório parcial e final, além de notificações de eventos adversos quando pertinentes.**

Brasília, 05 de março de 2009.

Atenciosamente.

Maria Rita Carvalho Garbi Novaes
Comitê de Ética em Pesquisa/SES-DF
Coordenadora

Ângela Maria/CEP/SES-DF

Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde - SES
Comitê de Ética em Pesquisa
Fone: 325-4955 - Fone/Fax: 326-0119 - e-mail: cepesdf@saude.df.gov.br
SMHN - Q. 501 - Bloco "A" - Brasília - DF - CEP.: 70.710-904

BRASÍLIA - PATRIMONIO CULTURAL DA HUMANIDADE