



Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pesquisa
Divisão de Medicina Experimental

Alexandre Bezerra Conde Figueiredo

**RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE
GATA1 EM CRIANÇAS COM SÍNDROME DE
DOWN**

Rio de Janeiro

2008

Alexandre Bezerra Conde Figueiredo

**RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE
GATA1 EM CRIANÇAS COM SÍNDROME DE
DOWN**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Câncer, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Oncologia.

Orientadora: Dr^a Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Rio de Janeiro

2008

Figueiredo, Alexandre Bezerra Conde

Rastreamento de mutações no gene *GATA1* em crianças com síndrome de Down. / Alexandre Bezerra Conde Figueiredo
Paginas 1-135. Rio de Janeiro, 2008.

Orientadora: Dr^a Maria do Socorro Pombo de Oliveira

Dissertação de mestrado – Instituto Nacional de Câncer, Pós-Graduação em Oncologia, 2008.

Referências Bibliográficas: 83-93

1- Síndrome de Down. 2- *GATA1*. 3- LMA-M7. 4- LT

ALEXANDRE BEZERRA CONDE FIGUEIREDO**RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NO GENE *GATA1* EM CRIANÇAS COM
SÍNDROME DE DOWN****ORIENTADORA: DR^a. MARIA DO SOCORRO POMBO DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto Nacional de Câncer, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em 30 de Maio de 2008.

BANCA EXAMINADORA

DR^a CINTHYA STERNBERG
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

DR^a MARA PIANOVSKI
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MÁRCIA PIMENTEL
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

SUPLENTES

MARTIN BONAMINO
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

DR FERNANDO REGLA VARGAS
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Rio de Janeiro
2008

INDICE

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE FIGURAS	16
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Síndrome de Down	18
1.2 Hematopoese.....	20
1.2.1 Megacariopoese.....	22
1.3 O gene <i>GATA1</i>	23
1.3.1 <i>GATA1</i> e suas interações.....	25
1.4 Síndromes Mieloproliferativas.....	27
1.5 Síndromes Mielodisplásicas.....	30
1.6 Epidemiologia das leucemias na síndrome de Down.....	32
1.7 <i>GATA1</i> e a leucemogênese no Down.....	34
2 JUSTIFICATIVA.....	39
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Principal	41
3.2 Objetivos Secundários.....	41
4 METODOLOGIA.....	42
4.1 Sujeitos.....	42
4.2 Amostras.....	42
4.3 Métodos.....	46

4.3.1 Extração de DNA de amostras congeladas e esfregaços de SP/MO.....	47
4.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	48
4.3.3 Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance (dHPLC).....	49
4.3.4 Seqüenciamento dos produtos da PCR.....	51
4.4 Análises Estatísticas.....	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Alterações encontradas no <i>GATA1</i>	55
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÕES.....	82
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
9 ANEXOS.....	94

RESUMO

Crianças com síndrome de Down (SD) apresentam um risco 10 a 20 vezes maior de desenvolver leucemia do que crianças normais, particularmente a leucemia megacarioblástica aguda (LMA-M7) e uma forma reversível denominada doença mieloproliferativa transitória também conhecida como leucemia transitória (LT), devido ao fato de que geralmente há uma remissão espontânea dentro de 3 meses. A LT pode ser considerada uma pré-condição leucêmica, já que cerca de 20% dos pacientes podem desenvolver a LMA-M7 no prazo de 4 anos.

Recentemente, foi relatado que mutações somáticas no *GATA1*, localizado no cromossomo X, estão presentes tanto em blastos de LT quanto em LMA-M7 de crianças com SD. O *GATA1* é um fator de transcrição e está presente na diferenciação normal das linhagens eritróides e megacariocíticas. O modo pelo qual as alterações no *GATA1* contribuem para a leucemia ainda é desconhecido.

A partir disso, estabelecemos um programa nacional, a fim de determinar a incidência de mutações no *GATA1* (éxons 2 e 3) em uma coorte de recém-nascidos com SD.

Para isso, utilizamos a técnica de cromatografia líquida desnaturante de alta performance (dHPLC) e seqüenciamento automático. Esta técnica de dHPLC se baseia nas variações de heteroduplex e homoduplex dos fragmentos de DNA e apesar de o seqüenciamento automático ser o padrão ouro para a identificação de mutações, este método pode ser lento quanto à análise da mutação, ao passo que o dHPLC tem se mostrado eficaz e rápido para a análise das variações genéticas de diversos genes de interesse médico.

Para este estudo utilizamos medula óssea e/ou sangue periférico de 111 crianças com SD (recém-nascidos e crianças sendo a grande maioria com menos de 4 anos de idade) obtidos entre janeiro de 2000 e dezembro de 2007, sem tratamento prévio. Um total de 127 amostras de crianças com SD foram analisadas, sendo 66 crianças com SD e doenças hematológicas identificadas clinicamente e 61 recém-nascidos com SD e sem evidência clínica de doenças hematológicas.

A análise através do dHPLC e seqüenciamento automático identificou dezenove mutações no éxon 2 exclusivamente em crianças com LT e LMA-M7 com SD e em uma criança com LT e SD foi detectada alteração no éxon 3.

A frequência de anomalias genéticas não foi estatisticamente significativa em relação ao sexo ou cor da pele e alterações no *GATA1* não foram detectadas em nossa coorte de recém-nascidos sem sinal de distúrbios hematológicos. A concordância da detecção através da técnica de dHPLC foi de 100% com o seqüenciamento automático.

Em conclusão, nossos resultados indicam que alterações no *GATA1* são específicas do subtipo LMA-M7 e LT da SD e que a técnica de dHPLC é eficaz e uma valiosa ferramenta para análise mutacional no *GATA1* e, além disso, podemos consolidar o *GATA1* como um marcador molecular com o intuito de uniformizar os critérios diagnósticos precoces da criança com SD melhorando assim sua taxa de sobrevida.

ABSTRACT

Children with Down syndrome (DS) have a 10 to 20-fold elevated risk of developing leukaemia, particularly acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) and a reversible form of myeloproliferative disorder, known as transient leukemia (TL), which usually spontaneously resolves within 3 months. TL can be considered a pre-leukemic condition, as approximately 20% of TL patients will develop AMKL within 4 years. Recently, it has been reported that somatic mutations in the X-linked *GATA1* gene are present in TL and AMKL blasts of DS infants. *GATA1* gene encodes a transcription factor that is critical for normal development of erythroid and megakaryocytic lineages. The precise pathway by which mutagenesis of *GATA1* contributes to leukemia is still unknown.

Then, we established a national program in order to determine the incidence of *GATA1* mutations in a cohort of DS newborns and children with DS presenting hematological disorders, furthermore we have evaluated the efficacy of denaturing high-performance liquid chromatography (dHPLC) screening method for detecting mutations in *GATA1* gene.

Bone marrow and/or peripheral blood from 111 DS children (newborns and children with the vast majority less than 4 years old) obtained between January 2000 and December 2007 without previous treatment. They were screened for *GATA1* mutations (exons 2 e 3) by the denaturing High-Performance Liquid Chromatographic (dHPLC) and direct sequencing in an automated sequencer. dHPLC has been developed to screen for DNA variations by separating heteroduplex and homoduplex DNA fragments by ion-pair reverse-phase liquid chromatography. Although the automatic sequencing is the gold standard technique for identifying mutations, this method can be time consuming for analysis, while the dHPLC was effective and fast for the analysis of genetic variations

A total of 127 samples from DS children were analyzed, with 66 DS children with hematological disorders identified clinically and 61 newborns without clinical evidence of hematological disorders by dHPLC and direct sequencing methods. Nineteen mutations were detected exclusively in exon 2 of DS children with AMKL and TL disorders and one was detected in exon 3 of DS child with TL. The frequency of genetic abnormalities was no statistically significant regarding to sex or ethnicity

and *GATA 1* mutation was not detected in our cohort of newborns without sign of hematological disorder. The overall detection rate of dHPLC screening was 100%. In conclusion, our results indicate that dHPLC is an efficient and valuable tool for *GATA1* mutational analysis

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	acetonitrila
AD	domínio de ativação N-terminal
AGM	aorta-gonada-mesonefron
ARA-C	Citarabina
ANAE	alfa naftil acetato esterase
CDA	citidina deaminase
CT	dedo de zinco C-terminal
CTH	célula-tronco hematopoética
CHP	célula hematopoética pluripotente
CNE	células nucleadas eritróides
dCTP	dinucleotídeo citosina trifosfato
dHPLC	<i>Denaturing High Liquid Chromatography</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
Fli1	<i>friend leukemia integration 1</i>
FOG1	<i>friend of GATA1</i>
FAB	Franco-Americano-Britânico
GATA	<i>GATA binding protein</i>
LA	leucemia linfóide
LLA	leucemia linfóide aguda
LMA	leucemia mielóide aguda
LMA-M7	leucemia megacarioblástica Aguda
LT	leucemia transitória
LT REM	leucemia transitória em remissão
MB	Megacarioblasto
MC	Megacariócito
MO	medula óssea
MPO	Mieloperoxidase
NF-E2	fator nuclear eritróide 2
NS	negro de Sudão
NT	dedo de zinco N-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde

PCR	reação em cadeia da polimerase
PL	progenitor linfóide
PL-B	progenitor linfóide B
PL-T	progenitor linfóide T
PM	progenitor mielóide
rpm	rotações por minuto
RUNX1	<i>AML1 - acute myeloid leukemia 1</i>
SD	síndrome de Down
SMT	síndrome mieloproliferativa transitória
SMD	síndrome mielodisplásica
SP	sangue periférico
TCN	total de células nucleadas
TCP	trombocitopenia

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição sumária dos principais genes envolvidos na patogênese da SD.....	19
Tabela 2. Resumo das características das LMAs de acordo com o FAB.....	28
Tabela 3. Mutações encontradas previamente no éxon 2 do <i>GATA1</i>	44
Tabela 4. Distribuição da coorte analisada.....	54
Tabela 5. Análise comparativa entre as técnicas para rastreamento do <i>GATA1</i>	58
Tabela 6. Caracterização dos pacientes e suas alterações no éxon 2 do gene <i>GATA1</i>	59
Tabela 7. Análise estatística da coorte estudada.....	65
Tabela 8. Análise estatística da técnica utilizada.....	66
Tabela 9. Amostras seqüenciais da coorte estudada.....	67
Tabela 10. Estudos de mutações em <i>GATA1</i> e síndrome de Down.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema sumário da hierarquia dos principais genes envolvidos na diferenciação das células mielóides e linfóides.....	21
Figura 2. Diferenciação megacariocítica.....	23
Figura 3. Representação esquemática de <i>GATA1</i> e suas proteínas.....	24
Figura 4. Co-fatores e sua interação com <i>GATA1</i>	27
Figura 5. Aspectos morfológicos das células malignas de LMA-M7.....	29
Figura 6. Síndrome Mielodisplásica.....	31
Figura 7. Sistema Hematopoiético.....	34
Figura 8. Mutações encontradas no gene <i>GATA1</i>	35
Figura 9. Modelo de progressão de LT para LMA-M7.....	36
Figura 10. Segmento genômico do <i>GATA-1</i> Éxon 2 e Éxon 3.....	48
Figura 11. Formação dos heteroduplexes.....	49
Figura 12. Padronização da temperatura dos éxons 2 e 3.....	50
Figura 13. Foto do programa BioEdit.....	52
Figura 14. Cromatograma das mutações previamente analisadas como controle das reações.....	56
Figura 15. Alterações encontradas no éxon 2 <i>GATA1</i>	60

Figura 16. Cromatogramas e os eletroferogramas das alterações ainda não descritas na literatura.....	61
Figura 17. Análise seriada do caso 490/04.....	63
Figura 18. Análise seqüencial do paciente 623/06.....	64
Figura 19. Análise seqüencial do paciente 301/06.....	68
Figura 20. Hipótese da cinética blástica de recém nascidos com LT.....	70
Figura 21. Modelo da GATA-1 na hematopoese e leucemogênese.....	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome de Down

Em 1959 Lejeune, Gautier e Turpin descobriram a associação entre a síndrome de Down (SD) e um terceiro cromossomo 21 (Lejeune *et al.*, 1959). A SD é a mais comum aneuploidia autossômica encontrada na população geral afetando 1 a cada 1000 nascimentos. Possui uma série de características fenotípicas como retardo mental, hipotonia e face dismórfica.

Indivíduos com SD apresentam sérios distúrbios que precisam ser avaliados logo ao nascimento como cardiopatias, perda de audição e problemas oftalmológicos. Outras doenças como deficiência do sistema imune, disfunção da tireóide, diabetes, leucemia e doença de Alzheimer também cursam com a SD sendo necessários vigilância e monitoramento constante (Roizen e Petterson, 2003).

De acordo com observações feitas em 17.897 indivíduos com SD no *US Centers for Disease Control and Prevention National for Health Statistics*, a média de idade de óbito subiu de 29 anos em 1983 para 49 anos em 1997. Baseado em certidões de óbitos, as relações da probabilidade (*odds ratios*) de mortalidade do indivíduo com SD comparada com o indivíduo sem SD são: defeitos congênitos coronarianos (22.6), hipotireoidismo (20.3) e leucemia (1.6) (Yang *et al.*, 2002).

A presença do cromossomo extranumerário em suas células constitucionais é decorrente de uma não disjunção meiótica (Hassold *et al.*, 2000 e 2002). Destas aproximadamente 90% resultam de erros na meiose materna (75% na meiose I e 25% na meiose II) e o restante é devido a erros na meiose paterna ou erro mitótico (Yoon *et al.*, 1996; Hassold e Sherman 2000).

A recente conclusão do seqüenciamento da seqüência do Ácido Desoxirribonucléico (DNA) do cromossomo 21 humano revelou a presença de 225 genes candidatos à participação no genótipo da SD (Hattori *et al.*, 2000). O segmento 21q22 é referido como a região crítica da SD sendo definida por conter genes relevantes no fenótipo desta síndrome (Delabar *et al.*, 1993).

Destes 225 genes muitos deles estão relacionados a diferentes patologias mais freqüentes no indivíduo com SD. Sumarizamos na tabela 1, os principais genes envolvidos nestas patologias bem como genes envolvidos na regulação de metilação do DNA e no ciclo do folato, além de destacar genes envolvidos com neoplasias e

fatores transcricionais que juntamente com o fator transcricional *GATA binding protein 1* (GATA1) apresentam papel fundamental na leucemogênese.

Tabela 1: Descrição sumária do principais genes envolvidos na patogênese da SD.

Categoria Funcional	Genes
Fatores Transcricionais	<i>RUNX1</i> (<i>AML1</i> ; interação com <i>GATA1</i>); <i>BACH1</i> (supressor tumoral); <i>ETS2</i> (proto-oncogene); <i>ERG</i> (proto-oncogene)
Mal de Alzheimer	<i>AAP</i> (amyloid precursor protein) <i>S110B</i> (S100 calcium binding protein)
Resposta Imune	<i>CCT8</i> (subunidade do complexo-T); <i>TIAMI</i> (proteína indutora de invasão e metástase de linfoma-T);
Grupo Metil	<i>DNMT3L</i> (metilação de DNA)
Metabolismo do Folato	<i>SLC19A1</i> (Família de carreadores de folato).

1.2 Hematopoese

A hematopoese é a produção dos elementos celulares do tecido sanguíneo. A atividade hematopoética gera mais de nove tipos celulares diferentes, divididos em: linhagem linfóide e linhagem eritro-mielóide, a partir de uma entidade denominada célula-tronco hematopoética (CTH) ou célula hematopoética pluripotente (CHP).

As células hematopoéticas estão presentes no início do desenvolvimento embrionário logo depois da gastrulação quando os três folhetos embrionários são formados. Estas têm sua origem, mais propriamente, no saco vitelínico. Na parede destas estruturas, ocorre a primeira onda de diferenciação das células sanguíneas, se destacando uma atividade proliferativa de eritrócitos nucleados e macrófagos primitivos. Por ser derivada da placa mesodérmica apresenta um precursor comum entre linhagem endotelial e hematopoética conhecida como hemangioblasto (Muller *et al.*, 1994 e Choi *et al.*, 1998).

Evidências moleculares sustentam essa associação através de experimentos em genes alvos além de receptores específicos como: receptor tirosina quinase flk-1, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), CD34, que, apresentam sua expressão nos dois tipos de linhagem celular (Orkin, 2000).

Logo após a detecção da hematopoese primitiva, células sanguíneas podem ser detectadas na região denominada aorta-gonada-mesonefron (AGM) que é o sítio onde se inicia a hematopoese definitiva já que são capazes de gerar células adultas eritróides, mielóides e linfóides e começam a povoar o fígado fetal (Lécuyer e Hoang, 2004).

Ao longo da vida fetal o sistema hematopoético é encarregado cronologicamente por diversas estruturas: saco vitelínico, AGM, fígado, baço e medula óssea (MO).

A hematopoese definitiva se dá na medula óssea de ossos longos e chatos e o sucesso da atividade hematopoética é creditado às funções das células estromais ou mesenquimais por possibilitar um microambiente favorável às células sanguíneas através de fatores solúveis, interação célula-célula ou células-matriz extracelular (Pombo-de-Oliveira e colaboradores. Leucemias Agudas, 2008). O sistema hematopoético apresenta uma hierarquia bem definida onde a CHP dá origem a progenitores multipotentes e então a precursores de diversas linhagens. A CHP recebe esta denominação por ser capaz de reconstituir o sistema hematopoético,

enquanto as multipotentes apresentam capacidade de auto-renovação por breve período e que se diferenciam irreversivelmente em precursoras de linhagens.

Todo este sistema apresenta um controle gênico intenso desde o desenvolvimento embrionário como ao longo da hematopoese adulta. Como exemplos desse controle estão os genes da família homeobox *Hox* que são reguladores transcricionais que atuam na célula pluripotente estimulando a proliferação e a diferenciação, assim como, exercem funções no desenvolvimento embrionário hematopoético. Outros genes como *GATA1*, 2 e 3 (GATA binding protein), *Pu-1* (membro da família de fatores transcricionais Ets), *RUNX1* (AML1 - acute myeloid leukemia 1) atuam na diferenciação das células hematopoéticas, atuando na diferenciação de células eritróides e mielóides, na proliferação e manutenção das células hematopoéticas, no desenvolvimento de células T, na diferenciação de células granulocíticas, monocíticas e linfóide, respectivamente como mostra a figura 1.

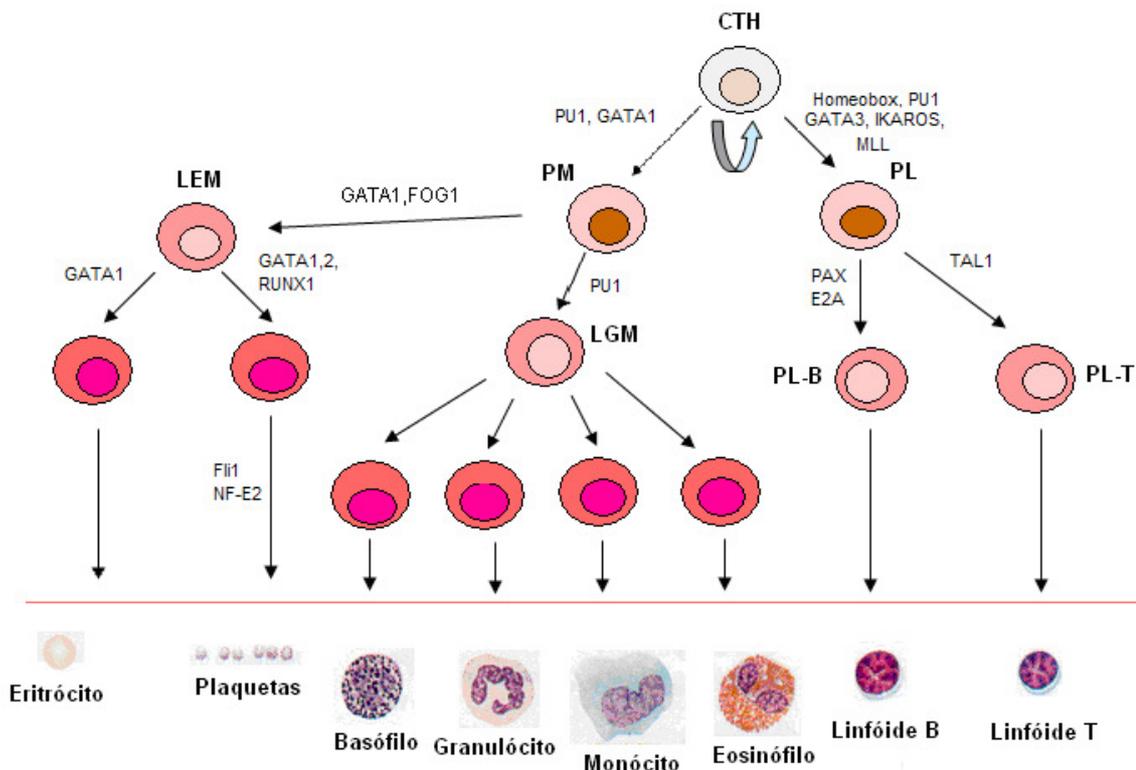


Figura 1: Esquema sumário da hierarquia dos principais genes envolvidos na diferenciação das células mielóides e linfóides.

Abreviaturas: CTH – célula-tronco-hematopoética; PM – progenitor mielóide; PL – progenitor linfóide; LEM – linhagem eritróide-mielóide; LGM – linhagem granulocítica monocítica; PL-B – progenitor linfóide B; PL-T – progenitor linfóide T

Com isso, se torna claro, que qualquer desregulação dentro do sistema hematopoético pode levar a uma incontável proliferação, sem a apropriada diferenciação, resultando em leucemia. Dentro desse contexto podemos citar mutações no gene *GATA1* que interferem na diferenciação normal da linhagem megacariocítica.

1.2.1 Megacariopoese

O processo da megacariopoese e da produção de plaquetas ocorre dentro da MO onde fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e interações adesivas apresentam um enorme papel. Este processo é caracterizado pela maturação megacariocítica onde há a endoreduplicação do DNA, maturação e expansão do citoplasma e a liberação de fragmentos citoplasmáticos como plaquetas circulantes (Deutsch VR e Tomer A, 2006)

A marca da maturação dos megacariócitos é a poliploidização e a expansão do citoplasma. Este ploidismo alcança uma taxa de até 128N fazendo com que os megacariócitos sejam facilmente identificados no esfregaço de MO. Quando este ainda está em um estágio maturativo inicial apresenta um tamanho menor sendo possível sua identificação através de anticorpos como: CD41a, CD41b, CD61, CD42a, CD42b e CD51 (Tomer, 2004).

A liberação das plaquetas ocorre quando o citoplasma dos megacariócitos formam pró-plaquetas, podendo liberar cerca de 2000 a 5000 novas plaquetas por célula (Long, 1998). Este processo é estimulado por um fator de crescimento conhecido como trombopoetina.

A trombopoetina é o primeiro fator de crescimento fisiológico da linhagem eritróide e megacariocítica, apresentando papel central na maturação e proliferação dos megacariócitos com o aumento da estimulação do tamanho celular, ploidia e formação do processo pró-plaquetário (Kaushansky, 2005). Para que ocorra esse processo de diferenciação da linhagem megacariocítica se faz necessário diversos fatores transcricionais como o gene *GATA1*, seu cofator *FOG1* (friend of *GATA1*), *RUNX1* e *Fli1* (Friend leukemia integration 1) Além destes, outros fatores como o *PU1*, que interage com *GATA1* e apresenta papel na diferenciação final da linhagem eritróide e megacariocítica e regula a linhagem granulocítica e monocítica (Nutt *et al*,

2005) e, por fim, o NF-E2 (fator nuclear eritróide 2) que controla o estágio final de maturação, como mostrado na figura 2.

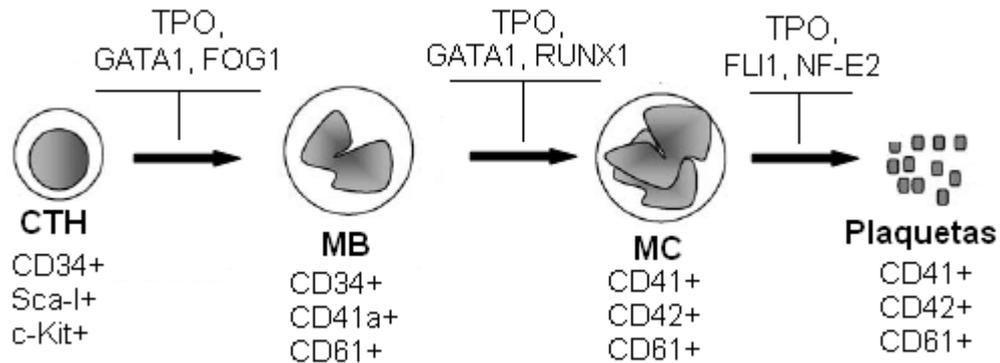


Figura 2: Diferenciação megacariocítica

Abreviaturas: CTH – célula-tronco-hematopoética; MB – megacarioblasto; MC – megacariócitos

O gene *GATA1* apresenta papel central na diferenciação megacariocítica e já foi visto que em animais com ausência de *GATA1* leva ao decréscimo do número de plaquetas e o acúmulo de blastos no baço e na medula surpreendentemente similar à mielodisplasia da SD.

1.3 O gene *GATA1*

A família *GATA*, das proteínas regulatórias nucleares, serve como protótipo para ação de fatores transcricionais restritos de linhagens sendo composta de seis membros divididos em dois subgrupos, baseada no perfil de expressão e na estrutura do gene. *GATA1*, *GATA2* e *GATA3* são expressos principalmente em linhagens hematopoéticas, enquanto *GATA 4-6* estão associados a linhagens endodermiais.

O gene *GATA1*, localizado no cromossomo X (X p11.23), faz parte da família de fatores *GATA*. Originalmente identificado pela habilidade de se ligar a regiões promotoras do gene globina, hoje é conhecido como fator transcricional em diversos tipos celulares (Crispino, 2005a). Ele se estende por 7Kb, possui seis éxons, transcreve 1.239 nucleotídeos a partir do éxon 2. Traduz duas proteínas: uma proteína maior constituída de 413 aminoácidos e outra menor, como uma isoforma

alternativa, de 330 aminoácidos, que são denominadas de GATA-1 e GATA-1s, respectivamente. A produção desta proteína menor ou GATA-1s pode ocorrer de duas formas: a partir da transcrição alternativa através da metionina 84 situada no início do éxon 3, ou a partir de um *splicing* alternativo do éxon 2 como mostrado na figura 3 (Rainis *et al*, 2003).

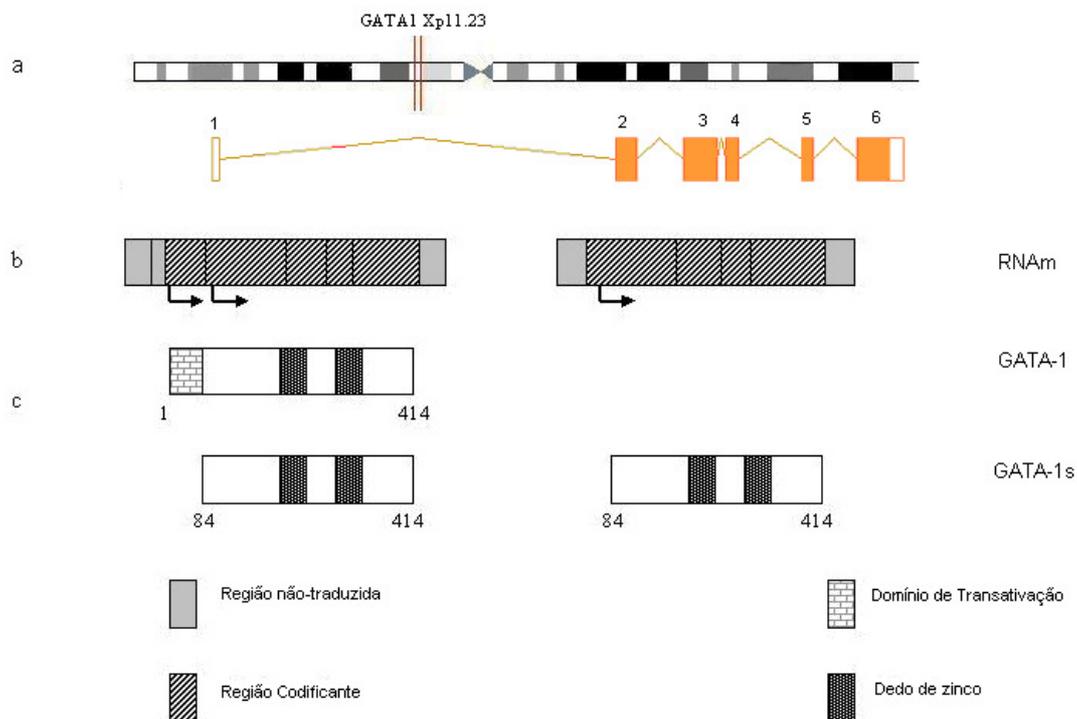


Figura 3: Representação esquemática de *GATA1* e suas proteínas (modificado de Splendore *et al*, 2005). a. localização e representação dos 6 éxons codificados pelo *GATA1* localizado no cromossomo X; b. RNAm (RNA mensageiro) transcritos a partir do éxon 2 e 3 do *GATA1*; c. proteínas traduzidas a partir dos RNAm.

GATA1 é essencial para a maturação de células do sistema hematopoético principalmente as células eritróides, megacariócitos, eosinófilos e mastócitos, através de regulação cooperativa de moléculas chave associadas à proliferação, diferenciação e apoptose. Constitucionalmente, apresenta tanto ligantes de DNA quanto atividade de transativação dentro de três domínios funcionais: dois dedos de zinco (*zinc fingers*), um domínio dedo de zinco N-terminal e um C-terminal e um domínio de ativação N-terminal (AD). O dedo de zinco N-terminal (NT) apresenta tanto uma função de ligante de DNA quanto a função de recrutador de cofatores, seguido da ajuda do dedo de zinco, C-terminal (CT), que dá estabilidade para estas associações. Cabe ressaltar a função do NT que é de recrutar um dos mais

importantes cofatores do *GATA1*, o *FOG1*. Estes, juntamente com NF-E2, FLI1, GFI1B, desempenham papel central no controle transcricional da megacariopoese conforme descrito a seguir (Crispino, 2005 (a) e Hitzler e Zipursky, 2005).

1.3.1 GATA1 e suas interações

Wechsler *et al* (2002) a partir de observações em indivíduos com leucemia megacarioblástica aguda e SD relatou a importância de se entender melhor os mecanismos de ação do *GATA1*. Neste sentido foram identificadas mutações que são cruciais no desenvolvimento das alterações clínicas e funcionais deste gene. A partir disso, a associação com outros genes começou a ser observada e muitos genes começaram a ser estudados e relatados interagindo com *GATA1*. Estas interações, bem como os domínios em que os genes interagem, estão ilustrados na figura 4.

A interação física entre o gene *GATA1* e o *FOG1* é essencial para o desenvolvimento de células eritróides. O cofator *FOG1* é primeiramente expresso em células hematopoéticas progenitoras e apresenta quatro dos seus nove dedos de zinco interagindo com *GATA1* para o desenvolvimento de eritrócitos e megacariócitos (Hong, 2005).

Em modelos murinos, com animais nocaute para o *GATA1* ou para *FOG1*, observa-se a morte durante a fase embrionária devido a anemia grave conseqüente da parada maturativa em nível de pró-eritroblásticos (Greene *et al.*, 2003). Além disso, Hong *et al* (2005) observou que mutações pontuais na região valina do dedo-de-zinco N-terminal de *GATA1* impede a interação com *FOG1* (tanto em pacientes quanto de camundongos) e como conseqüência ocorre o bloqueio de interações entre outras proteínas com *GATA1*.

Para entender melhor a base molecular dessa interação física entre *GATA1* e *FOG1* estudos examinaram os efeitos destes genes através do gene promotor *allb*. Este estudo demonstrou que a interação física entre *GATA1* e *FOG1* requer a ativação deste promotor tanto *in vitro* quanto *in vivo* e que elementos específicos da família *Ets* determina tal reconhecimento transcricional (Wang Xu *et al*, 2002).

Um dos elementos da família *Ets* de fatores transcricionais é o *Fli1* que através de vários estudos se mostrou importante no desenvolvimento normal de

megacariócitos. Uma evidência convincente deste papel é que animais nocaute para este gene apresentam produção de megacariócitos indiferenciados com características estruturais anormais resultando na morte destes animais por hemorragia cerebral e apresentam disfunção endotelial (Spyropoulos *et al*, 2000).

Como descrito anteriormente, o GATA1 apresenta dois dedos de zinco, um NT e outro CT. Estes dedos de zinco apresentam papel fundamental em interações proteína-proteína: estudos *in vitro* demonstraram que tanto FOG1 quanto Fli1 apresentam interação com o dedo de zinco NT, porém em regiões distintas, sendo o primeiro interage com o dedo de zinco na sua região central enquanto o outro interage na região caudal formando o que muitos estudos acham possível um complexo tri-molecular, GATA1-FOG1-Fli1, mediando a expressão das células progenitoras megacariocíticas (Eisbacher *et al*, 2003). Além disso, Wang *et al* [2002] ainda demonstraram que esta região de ligação de fatores transcricionais da família *Ets* apresenta importante papel na determinação se *FOG1* pode ativar ou reprimir *GATA1*.

Outro membro desta família é o gene *PU1* que apresenta interessante interação com o *GATA1*. Esta interação apresenta um antagonismo recíproco que vai direcionar a diferenciação de cada linhagem mielóide (Rekhtman *et al*, 2003). Ela ocorre através do domínio de transativação onde *PU1* utiliza seu domínio para reprimir *GATA1*. Um exemplo disso é a expressão forçada de *PU1* na linhagem eritróide que resulta na eritroleucemia em camundongos, podendo ser explicado através do bloqueio de *GATA1* (Orkin, 2000).

Além destes, existem outros fatores que interagem com *GATA1* na diferenciação da linhagem megacariocítica onde o papel do gene *RUNX1* é de crucial importância. O gene *RUNX1*, previamente conhecido como *AML1*, é requerido para a maturação de megacariócitos, além da diferenciação de células T e B (Ichikawa *et al.*, 2004). Além disso, ele é alvo freqüente de translocações cromossômicas resultando na fusão protéica dominante negativa (Lutterbach *et al*, 2000). Recentemente, foi demonstrado uma interação física entre o domínio dedo de zinco do *GATA1* e o domínio *Runt* do *RUNX1* no processo normal de diferenciação megacariocítica. Além disso, *RUNX1* está localizado em uma região do cromossomo 21 conhecida como “região crítica da SD”. Já existem dados sugerindo que o aumento de *RUNX1* pode ter um papel importante nas leucemias da criança com SD (Gurbuxani *et al.*, 2004).

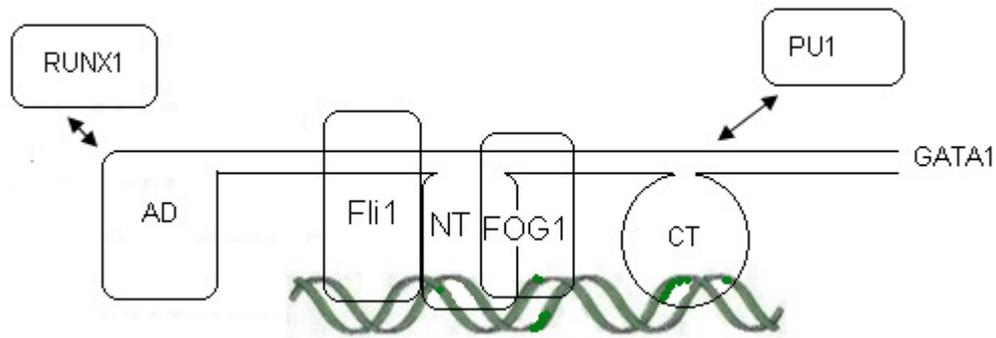


Figura 4: Co-fatores e sua interação com *GATA1* (modificado de Crispino , 2005 (a))

Outro fator que apesar de não interagir diretamente com *GATA1*, mas que apresenta papel na eritromegacariopoese é o fator transcrricional NF-E2. NF-E2 é um fator transcrricional específico da hematopoese que apresenta um papel importante na expressão de genes eritróides. Porém, camundongos nocaute para este fator transcrricional não desenvolvem anemia, mas apresentam grave trombocitopenia com a MO contendo megacariócitos displásicos e imaturos em excesso (Shivdasani *et al*, 1995).

1.4 Síndromes Mieloproliferativas

- **Leucemias Mielóides Agudas (LMAs)**

As LMAs são classificadas em oito subtipos de acordo com aspectos morfológicos, citoquímicos e imunofenotípicos sendo estes que definem o grau de maturação e a linhagem. O diagnóstico de LMA é feito de acordo com os critérios do grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) onde blastos representam mais de 30% de células nucleadas na MO como mostra resumidamente na tabela 2.

Tabela 2: Resumo das características das LMAs de acordo com o FAB

LMA	Características
M0=Mielóide indiferenciada	Blastos $\geq 30\%$ TCN na M.O; $< 3\%$ blastos positivos MPO/NS; Negatividade para células B e T; aMPO ⁺ , CD13 ⁺ , CD33 ⁺ e CD117 ⁺
M1=Mielóide sem maturação	Blastos $\geq 30\%$ do TCN na M.O; A soma dos blastos $\geq 90\%$ do TCN, excluídas CNE, linfócitos, plasmócitos, mastócitos e macrófagos; MPO/NS $\geq 3\%$ dos blastos; $< 10\%$ das células podem ter componente maturativo granulocítico + monócitos
M2=Mielóide com maturação	Blastos $\geq 30\%$ do TCN; blastos entre 30 e 89% das CNE+; componente monocítico $< 20\%$; componente granulocítico (pró-mielócitos a segmentados) $> 10\%$ das CNE positivo
M3=Pró-mielocítica M3v=Pró-mielocítica variante	Pró-mielócitos anormais são maioria na M.O; $\geq 30\%$ do TCN ou das CNE na MO; MPO/NS intensamente positivos; (Variante hipogranular-pró-mielócitos anômalos) I) MO com padrão M4 e SP com um dos padrões A ou B: <u>MO</u> : Blastos $\geq 30\%$ do TCN; blastos $\geq 30\%$ das CNE; Soma mieloblastos e segmentados neutrófilos: 30 a 79% CNE; Soma monoblastos, pró-monócitos e monócitos: 20 e 80% CNE <u>SP</u> : Padrão A - monoblastos e monócitos $> 5.000/\text{mm}^3$; Padrão B - monoblastos e monócitos $< 5.000/\text{mm}^3$, mas com componente monocítico confirmado por lisosima sérica $> 11,5 \text{ ug/ml}$ ou urinária $> 2,5 \text{ ug/ml}$ e ANAE $> 20\%$
M4=Mielomonocítica M4v (Critério I ou II)	II) MO com padrão M2 e SP > 5.000 células monocíticas/ mm^3 e comprovação por um dos testes laboratoriais (lisosima ou ANAE); (leucemia mielomonocítica aguda variante eosinofílica); Blastos $\geq 30\%$ TCN; Componente eosinofílico anormal $\geq 5\%$ das CNE
M5=Monocítica	Blastos $\geq 30\%$ do TCN da MO Monoblastos + pró-monócitos + monócitos $\geq 80\%$ CNE; M5a: $\geq 80\%$ células monocíticas são monoblastos; M5b: $< 80\%$ células monocíticas são monoblastos
M6=Eritroleucemia	Blastos $> 30\%$ CNE na M.O; eritroblastos $> 50\%$ TCN na M.O; CD 71, CD31, α -glico positivo
M7= Megacariocítica	Blastos $\geq 30\%$ do TCN da M.O, excluindo linfócitos e plasmócitos; Blastos M7 identificados por um dos marcadores monoclonais específicos (CD42 ou CD42a ou CD61)

- **Leucemia Megacarioblástica Aguda (LMA-M7)**

O diagnóstico de LMA-M7 pode ser realizado através de análise morfológica e marcadores imunofenotípicos. Os marcadores de linhagem mielóide CD13 e CD33 freqüentemente estão presentes, e o diagnóstico de LMA-M7 é definido pela positividade para os antígenos de linhagem megacariocítica CD41 (complexo glicoprotéico IIb/IIIa), CD42 (glicoproteína Ib) e/ou CD61 (glicoproteína IIIa). Alguns casos podem ser HLA-DR negativo. Sua morfologia apresenta blastos de tamanhos variáveis, com citoplasma geralmente agranular, podendo apresentar protusões como mostrado na figura 5. A MO freqüentemente apresenta aumento das fibras de reticulina, e comumente o aspirado de MO é de difícil obtenção. Em alguns casos, a realização de biópsia de MO se faz necessária para o diagnóstico (revisto em Pombo-de-Oliveira MS e colaboradores. Leucemias Agudas: 2008).

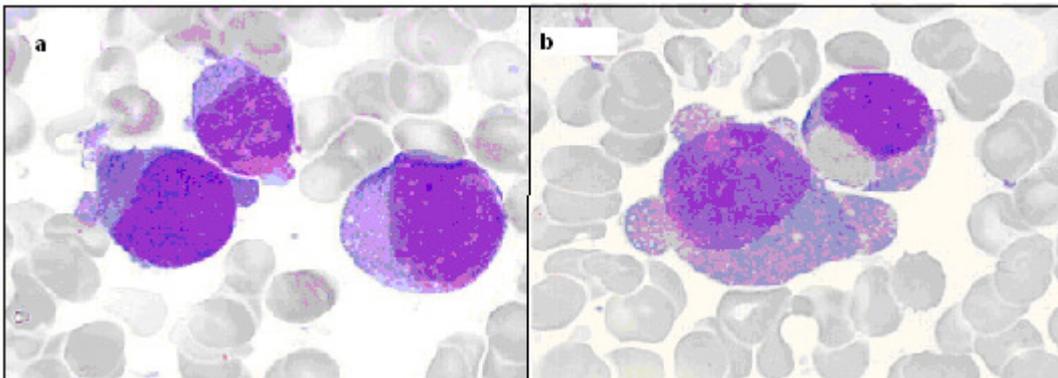


Figura 5: Aspectos morfológicos das células malignas de LMA-M7 (a, b);

- **Leucemia Mielóide Crônica (LMC)**

A LMC é uma doença clonal maligna caracterizada por uma excessiva proliferação da linhagem mielóide (Fase Crônica - FC), seguida por evolução clonal onde se adquirem novas alterações cromossômicas (Fase Acelerada - FA) e terminando num quadro de leucemia aguda (Fase Blástica - FB). A FC, benigna, é caracterizada por marcada hiperplasia medular e capacidade de maturação das células mielóides; a FA é resistente à terapia medicamentosa, tendo por características a evolução clonal e, no sangue periférico apresenta $\geq 15\%$ de

blastos, $\geq 30\%$ de blastos e pró-mielócitos, $\geq 20\%$ de basófilos; FB é resistente à terapia convencional. A representação blástica periférica é de natureza linfóide ou mielóide, e o tratamento administrado de maneira correspondente. Essa fase se caracteriza por $\geq 30\%$ de blastos no sangue periférico.

A doença é associada a uma anormalidade citogenética específica, o cromossomo Philadelphia (Ph), que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, isto é, a t(9;22) e leva à formação de um oncogene, o *BCR-ABL*, detectável por reação em cadeia da polimerase (PCR) e citogenética (Sawyers, 1999).

1.5 Síndromes Mielodisplásicas

- **Síndrome Mielodisplásica (SMD)**

A SMD representa um espectro heterogêneo de doenças clonais hematopoéticas que apresentam em comum graus variáveis de citopenias no sangue, displasia celular em pelo menos duas linhagens hematopoéticas e predisposição para transformação em leucemia, geralmente do tipo mielóide aguda. As diferentes formas foram categorizadas baseadas em critérios morfológicos estabelecidos pelo FAB (Novitzky N e Prindull G, 2000).

Os aspectos clínicos laboratoriais são divididos em quatro subgrupos: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T) como mostra a figura 6. Os subtipos são caracterizados pela presença de blastos e o corte para distinção entre as diferentes categorias é o quantitativo inferior a 5% de blastos, havendo na ARSA pelo menos 15% de sideroblastos em anel. Na AREB há entre 5%-20% de blastos e, na AREB-T, 21%-29% de blastos. Qualquer número de blastos com bastonete de Auer é considerado LMA quando há 30% de blastos (Bortolheiro, 2006).

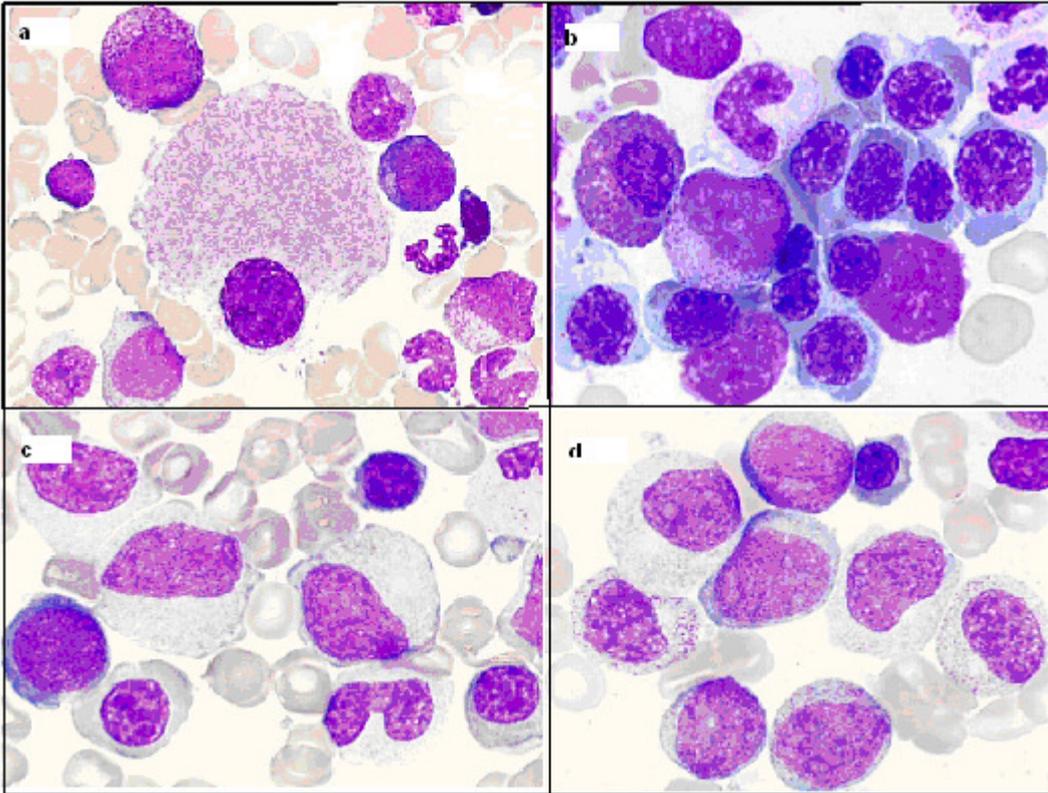


Figura 6: Síndrome Mielodisplásica. a. AR; b. ARSA; c. AREB; d. AREB-t

- **Trombocitopenia (TCP)**

As plaquetas participam dos processos de hemostasia e coagulação do sangue, sendo seu valor em média é de 250.000/mm³. A trombocitose é o aumento do número de plaquetas do sangue (superior a 350.000/mm³) através de distúrbios fisiológicos, como em pacientes esplenectomizados. A trombocitopenia é a redução do número de plaquetas (abaixo de 150.000/mm³).

A TCP é provocada por distúrbios na produção de plaquetas, quando há hipoplasia das células hematopoéticas primordiais, substituição da medula normal por tecido anormal ou devido à morte dos megacariócitos; na distribuição, quando há passagem dificultada das plaquetas pelos vasos do baço apresentando esplenomegalia; ou na destruição de plaquetas por distúrbios imunológicos ou ainda doenças não imunológicas (Zago *et al*, 2001).

1.6 Epidemiologia das leucemias na síndrome de Down

Crianças com SD apresentam o risco elevado para desenvolver leucemia na infância. Este risco é estimado entre 10 a 20 vezes maior em crianças com SD em relação a crianças sem SD (Little, 1999), calculado tanto para leucemias de uma forma geral, quanto estratificado de acordo com o subtipo de leucemia e a faixa etária.

Relatos mostram que as leucemias agudas (LAs) correspondem a 31% de todas as malignidades na população pediátrica geral com idade inferior a 15 anos enquanto representam 97% dos cânceres nesta mesma faixa em crianças com SD (Hasle *et al.*, 2000). Estas, ainda, apresentam uma taxa 33 vezes maior quanto a incidência de leucemia linfóide aguda (LLA) do que as sem SD. Apesar de apresentarem características clínicas e moleculares semelhantes, as crianças com SD apresentam melhor resposta terapêutica e bom prognóstico (Vyas e Roberts, 2006).

Quando se analisam os riscos estratificados por faixa etária, a idade é um fator preponderante para as análises referentes ao desenvolvimento das leucemias. A incidência de leucemia em crianças com SD é maior naquela com idade inferior a 4 anos. Dentro desta faixa etária, a probabilidade de desenvolver LMA-M7 é 500 vezes maior do que o risco em crianças sem SD (Lange *et al.*, 1998). A hipótese sugerida para explicar este fato é a de um subclone latente persiste tempo o bastante para adquirir mutações adicionais, que resultariam em um fenótipo de MDS seguindo para LMA-M7. Além disso, a idade pode ser relacionada com o prognóstico da doença, já que o grupo de crianças com SD nesta faixa etária apresenta um prognóstico ruim (Zeller *et al.*, 2005).

A distribuição de câncer em pacientes com SD é única, sendo relatado um alto risco de leucemia em crianças estendendo para adultos jovens e um decréscimo no risco de tumores sólidos em todas as idades. A literatura ainda ressalta que crianças com SD apresentam probabilidade menor que crianças ditas normais de não desenvolver tumores sólido (Hasle *et al.*, 2000). Diversos institutos, como o *British Registry of Childhood Tumours*, já relataram esta baixa incidência de tumores sólidos em indivíduos com SD apesar de alguns tipos de tumor como o de testículo, pâncreas, ovários, e pele já terem sido relatados (Sullivan *et al.*, 2006)

Aproximadamente, 10% dos neonatos com SD apresentam um distúrbio hematopoiético caracterizada por leucocitose, plaquetopenia, anemia e hepatoesplenomegalia denominada síndrome mieloproliferativa transitória (SMT) ou leucemia transitória (LT). Este distúrbio apresenta no sangue periférico (SP) uma população clonal de células blásticas circulantes que não apresentam diferenças morfológicas e imunofenotípicas de blastos leucêmicos da LMA-M7. Estas células imaturas expressam na superfície de membrana glicoproteínas como CD34, CD41, CD42 ou CD61.

Clinicamente e na maioria dos casos não há sintomas ou fenótipo clínico que alerte para o distúrbio, embora haja um número grande de blastos no SP e na MO. Este clone anômalo regride espontaneamente nos primeiros 3 meses de vida sem tratamento específico, porém o processo que leva a esta regressão ainda não é bem estabelecido. Com o progressivo conhecimento da história natural das síndromes mieloproliferativas na SD, já é consenso que em muitos casos de regressão espontânea da LT há persistência de alterações plaquetárias como presença de TCP, anemia e hepatoesplenomegalia (Crispino, 2005a e Hitzler e Zipursky, 2005). A hipótese para esta evolução clínica se baseia nas evidências de um percentual destas células clonais com alteração no GATA1 permanecerem lactentes em órgãos hematopoiéticos ainda imaturos como mostra figura 7. Do ponto de vista clínico, como persiste infiltração em órgãos como fígado, coração, pele dentre outros se faz necessário o acompanhamento clínico-laboratorial das crianças com LT. Em 15% destes casos o acúmulo de blastos induz a fibrose hepática e síndrome cardio-pulmonar. Neste caso há a necessidade de intervenção quimioterápica com baixas doses de citarabina (Hitzler, 2007).

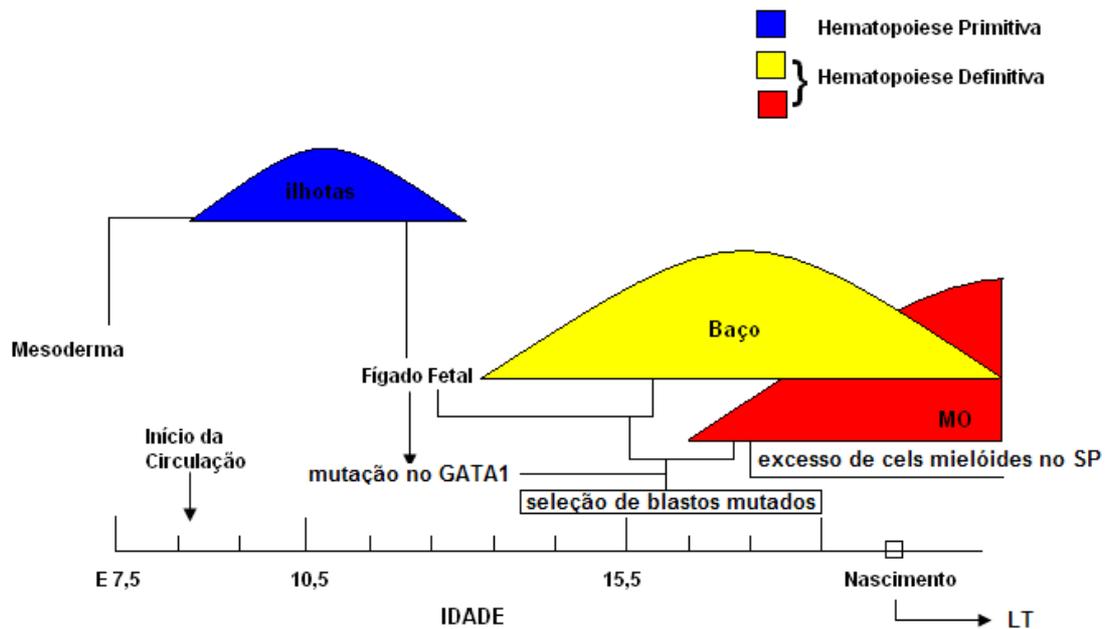


Figura 7: Desenvolvimento hematopoético (adaptado de Lécuyer E e Hoang T, 2004)

Embora não reste dúvida que as alterações cromossômicas que ocorrem na SD desempenhem fator de risco para a ocorrência da leucemia, elas não são o único fator potencialmente leucemogênico, já que somente uma parcela de indivíduos com SD desenvolvem leucemia. A leucemogênese é um processo multifatorial com uma somatória de eventos que exacerbam a susceptibilidade de um fenótipo maligno. Na história natural das SMT da SD um elo de ligação entre as diversas entidades clínicas, LT, SMD e LMA-M7, é a função do GATA1 na hematopoese, já que este é responsável pela diferenciação da megacariocítica

1.7 GATA1 e a leucemogênese no Down

GATA1 apresenta sua função na fase pré-natal do desenvolvimento hematopoético. A aquisição de mutações pontuais, na sua grande maioria na porção de transativação (esquematisado na figura 8), são detectadas em blastos leucêmicos e consistem em várias pequenas deleções, duplicações e inserções no éxon 2 resultando na parada precoce da função do gene e favorecendo a expansão de um clone celular que ao se expandir se traduz clinicamente em leucemia.

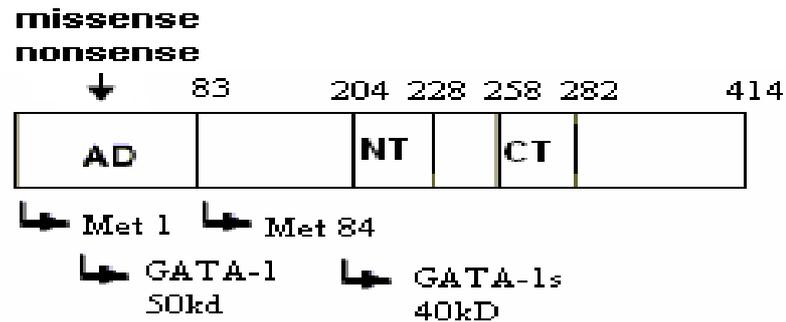


Figura 8: Mutações encontradas no *GATA1* (modificada de Wechsler *et al.*, 2002). Estas mutações são detectadas na porção de transativação localizada no éxon 2 do *GATA1*.

Um fato que corrobora este achado é que a probabilidade de uma criança com SD desenvolver LT e não evoluir para LMA-M7 é de 70% além de existir casos onde se diagnostica M7 sem o quadro anterior de LT. Isto leva a hipótese que se faz necessário outro evento juntamente com a mutação no *GATA1* para que leve ao desenvolvimento e proliferação de megacarioblastos. Entretanto, ainda se faz necessária a realização de várias pesquisas para se entender quais os eventos que estão envolvidos na transição de LT para LMA-M7.

Na tentativa de entender os mecanismos de patogênese desta doença neonatal foi sugerido que este distúrbio se inicia durante a hematopoese fetal; as evidências para esta afirmativa são a presença de infiltração hepática por células fetais hematopoéticas anormais, os distúrbios de adesão celular nas células progenitoras e fibrose medular decorrentes do aumento de megacarioblastos (Hitzler e Zipursky, 2005). Além disso, indivíduos com SD e LT apresentam fibrose hepática com alta expressão do fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e *transforming growth factor-beta 1* (TGF- β 1) nas células blásticas e no fígado. É sabido que TGF- β 1 causa o aumento da síntese de componentes da matriz extracelular e, desta forma, surge a hipótese que a alta expressão de PDGF e TGF- β 1 apresentam maior taxa de síntese de matriz extracelular podendo ter um efeito sinérgico no desenvolvimento da fibrose hepática do indivíduo LT com SD (Hattori *et al.*, 2001)

Outra hipótese está substanciada nos achados onde se constatou que crianças com LT apresentam atividade diminuída da telomerase (Holt *et al.*, 2002).

Nestes estudos, os autores demonstraram índices reduzidos da atividade da telomerase em um coorte de casos com SMT; 15 dos 29 (52%) casos de LMA-M7 apresentaram atividade reduzida da telomerase enquanto em apenas 4 de 34 (12%) nos casos de LT. Estes achados podem fornecer evidências de que a atividade da telomerase pode ser um fator crítico para a conversão do clone da LT em LMA-M7.

Embora ocorra na maioria das vezes remissão espontânea durante o período neonatal, 20% dos casos, porém, podem desenvolver LMA-M7 dentro dos primeiros 4 anos de vida como mostra a figura 9. Desta forma é importante o reconhecimento desta anomalia em crianças com SD (Crispino, 2005 (b)).

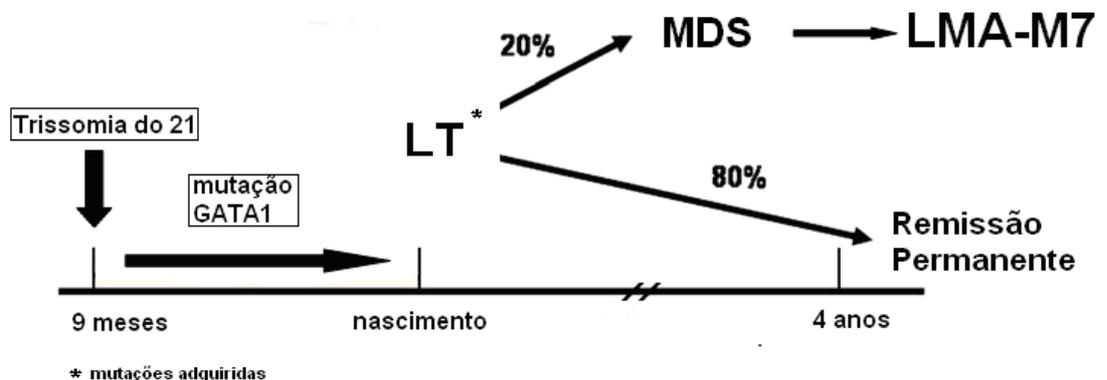


Figura 9: Modelo de progressão de LT para LMA-M7

Como foi dito, a LMA-M7 começa por um processo de diferenciação megacariocítica anormal com fibrose medular e aumento de reticulina, na qual se refere a SMD. Durante este estágio há uma redução no número de plaquetas no sangue e megacariócitos anormais se acumulam na MO. No decorrer deste processo o fenótipo clínico é semelhante a uma SMD que pode evoluir por meses até que o número de megacarioblastos aumentam com uma reposição na MO da LMA-M7. Nesse caso, ocorre redução de plaquetas com conseqüente diminuição da capacidade de coagulação do sangue após lesão, ocorrência de hematomas espontâneos e petéquias.

Devido à semelhança no fenótipo clínico entre as distintas SMT da SD, e por sua vez diferentes das doenças mieloproliferativas de crianças sem SD, Hasle propôs que uma categoria adicional denominada leucemia mielóide da SD (LM-SD) fosse incluída na classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS)

(Hasle *et al.*, 2003). O argumento é que crianças com SMT na SD respondedoras aos tratamentos quimioterápicos apresentam maior sensibilidade e melhor prognóstico (Ge *et al.*, 2005).

Pacientes com LMA-M7 SD respondem melhor à quimioterapia, demonstrando que o respectivo blasto apresenta maior sensibilidade a agentes quimioterápicos, ao contrário dos pacientes que não apresentam trissomia do 21, os quais apresentam pior prognóstico (Ge *et al.*, 2005). Além disso, ainda apresenta uma sobrevida livre de evento de 80 a 100% enquanto que indivíduos portadores da SD esta taxa é extremamente menor se apresentando em torno de 30% (Ge Y. *et al.*, 2006).

Como foi visto anteriormente, o *GATA1* traduz duas proteínas, a isoforma longa GATA-1 e a isoforma curta GATA-1s que estão presentes naturalmente nas células, porém a alteração no *GATA1* impede a formação de GATA-1, mantendo apenas GATA-1s (Gurbuxani *et al.*, 2004; Wechsler *et al.*, 2002). Esta isoforma pode ser funcionalmente relevante durante a transformação leucêmica sendo importante também para se verificar as diferenças funcionais entre esta e sua forma selvagem.

Observações prévias sugerem que células com deficiência em GATA-1 são capazes de resgatar a diferenciação em adultos; camundongos nocautes não apresentam doença hematológica quando produzem em grande quantidade a proteína GATA-1s em substituição à proteína selvagem (Li Z *et al.*, 2005).

Neste experimento, foram criados camundongos que expressavam dois tipos da proteína menor, sendo uma do mesmo tamanho da encontrada quando existe uma alteração no éxon 2 e outra com mais 22 aminoácidos que foram denominadas $GATA^{\Delta e2}$ e $GATA^{\Delta N}$. Diferentemente do modelo que expressa a isoforma $GATA^{\Delta e2}$, animais com a isoforma $GATA^{\Delta N}$ apresentam hiperproliferação de progenitores megacariocíticos no saco vitelínico e no fígado fetal desaparecendo completamente após o fim da gestação. Além disso, animais $GATA^{\Delta N}$ atingem estágio maturativo relativo apesar da hiperproliferação.

Desta forma, alterações encontradas em *GATA1* abolem a proteína selvagem e sugerem que esta perda completa e a incapacidade das células leucêmicas de superexpressão de GATA-1s podem promover a diferenciação, sendo assim, um fator contribuinte para a leucemogênese.

GATA1 é o fator transcricional central na megacariopose e sua disfunção através de alterações genéticas levam à leucemia. Diversos estudos demonstram

que seja quantitativamente ou qualitativamente a disfunção do *GATA1* um pré-requisito para leucemogênese, porém este sozinho não é suficiente para a leucemogênese (Shimizu R *et al*, 2008) Além disso, a população de blastos de LT e LMA-M7 SD carregam tipos simples de mutações *GATA1* indicando que subclones latentes de blastos de LT transformam-se em LMA-M7 num processo de malignização no qual é necessário um segundo fator inserido no contexto da trissomia 21 (Mundschau e Crispino, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

Conforme descrito anteriormente, o *GATA1* encontra-se na via hematopoética onde, juntamente a diversos co-fatores, é responsável pela diferenciação e maturação das vias eritrocítica e magacariocítica. A partir dos achados de mutações herdadas no *GATA1* em síndromes congênitas é consenso que mutações adquiridas estão envolvidas na patogênese de síndromes mieloproliferativas. Estudos foram realizados em amostras de pacientes com eritroleucemia (LMA-M6), LMA-M7 e outras LMAs com antecedente de SMD. Nas primeiras análises foram encontradas mutações silenciosas em pacientes com LMA-M6 e LMA-M7, além de inserção de 4pb no éxon 2 de um paciente LMA-M7 .

As mutações descritas em todos os pacientes LMA-M7 com SD localizaram-se no éxon 2 e resultaram na introdução prematura de um código de parada e na tradução da proteína menor *GATA1s* que apesar de não perder sua habilidade de se ligar ao DNA e recrutar seu cofator *FOG1* apresenta perda na sua capacidade de ativação transcricional pela perda do AD (Wechsler *et al*, 2002).

Diversos grupos de estudos continuaram as investigações tentando melhorar o entendimento dos mecanismos genético-moleculares que expliquem a associação entre *GATA1* e LMA-M7 em crianças com SD. Em um estudo preliminar identificamos mutações no *GATA1* em casos de LT e LMA-M7 em crianças com SD (Magalhães *et al*, 2006). Neste estudo as alterações no *GATA1* foram exclusivamente encontradas em LMA-M7 e LT.

Devido ao pouco conhecimento das diferenças entre LMA-M7 e LT nos propomos a elaborar um estudo cujos critérios diagnósticos e de acompanhamento das crianças com SD pudessem acrescentar novos dados ao entendimento do papel do *GATA1* na leucemogênese.

Com estas premissas este trabalho se insere no desenho de um estudo epidemiológico com a formação de um coorte de crianças com SD, que tem como objetivo principal detectar precocemente alterações no *GATA1* e estimar a magnitude dos riscos do desenvolvimento de doenças hematológicas nas crianças com SD. A necessidade de se detectar precocemente as alterações no *GATA1* nestas crianças pode representar uma informação adicional no acompanhamento das mesmas. Esta abordagem certamente representa mais um passo para se entender as diferenças existentes entre as etapas das SMT em crianças com SD.

Outro aspecto importante na identificação do status do GATA1 neste coorte, é que no acompanhamento clínico, este status tem sua importância também nas abordagens terapêuticas. Crianças com SD e *GATA1* mutado têm maior sensibilidade à citarabina (ARA-C).

No estudo de Magalhães *et al* [2006] não foram detectadas alterações em algumas amostras de LMA-M7 e LT e a partir disso nos propomos a investigar a porção inicial do éxon 3 que faz parte da tradução da proteína GATA-1 representando, portanto, uma região importante no contexto das alterações no *GATA1*, já que esta proteína é abolida quando há mutações tanto no éxon 2 quanto na porção inicial do éxon 3.

Além disso, por se tratar da SD como uma entidade única no que diz respeito a sua leucemogênese, procuramos estabelecer através de um método rápido e altamente sensível como o *Denaturing High Liquid Chromatography* (dHPLC) uma nova forma de se detectar alterações no *GATA1*, além do método *gold standard* que é o seqüenciamento automático. Já é sabido que o dHPLC tem sido empregado com sucesso na detecção de alterações nos mais diversos genes de interesse médico, mostrando-se mais eficiente que outras técnicas utilizadas para este fim. Além disso, esta técnica proporciona uma análise em grande número de amostras de um determinado gene bem como diferentes éxons como foi o intuito do nosso estudo. O dHPLC consiste em uma técnica que compara dois ou mais cromossomos em uma mistura de desnaturação e reanelamento do produto da PCR e apresenta uma sensibilidade e especificidade de 96 a 100%, consistindo-se protocolo ideal para a realização de coorte epidemiológica.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

- Identificar a presença de mutações somáticas nos éxon 2 e 3 do gene que codifica o fator transcricional hematopoético *GATA1* em crianças portadoras de SD;

3.2 Objetivos Secundários

- Validar a técnica de dHPLC no rastreamento de mutações no *GATA1*.
- Adicionar aos critérios de acompanhamento de uma criança com SD, o valor do status do *GATA1*.

4. METODOLOGIA

4.1 Sujeitos

Este projeto foi realizado em amostras de SP e/ou MO retrospectivas e prospectivas, de crianças com síndrome de Down e distúrbios hematológicos, recebidas e diagnosticadas no laboratório do Programa Hematologia-Oncologia Pediátrica da Divisão de Medicina Experimental – CPq – do Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, no período de 2000 a 2007.

As amostras incluídas para realização deste trabalho foram provenientes de 111 crianças, totalizando 127 amostras, sendo estas com idade inferior a 18 anos, porém, na sua grande maioria, na faixa etária entre 0 e 4 anos. As amostras foram procedentes de diversos estados brasileiros, isentas de qualquer tratamento prévio, e fazem parte de um estudo epidemiológico para identificar mutações no *GATA1* em crianças com síndrome de Down (Magalhães *et al*, 2006).

Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa do INCa (Reg CEP: n°56/05) e demais instituições colaboradoras e na CONEP (CONEP: 12087) conforme documento nos ANEXOS.

4.2 Amostras

Descrição das amostras

Amostras de SP crianças recém-nascidas com SD foram obtidas por punção venosa, para exames clínicos convencionais. Também foram encaminhadas amostras de sangue de crianças com SD sem distúrbio hematológico quando estas previamente foram levadas a execução de cariotipagem nos ambulatórios dos respectivos serviços clínicos.

Nos casos de crianças com alterações clínicas e hematológicas com suspeita de leucemia ou mielodisplasia, as amostras correspondiam a aspirados de MO e SP e/ou esfregaço de MO/SP.

Critério de inclusão

- Crianças recém-nascidas com SD sem evidência clínica de doença hematológica;
- Crianças recém-nascidas com SD e com alterações hematológicas (p.ex. LT);
- Crianças com SD e com diagnóstico de leucemia aguda, sem tratamento prévio (idade < 18 anos);
- Crianças com SD apresentando alterações hematológicas com características de mielodisplasia (idade < 18 anos).

Critério de Exclusão

- Crianças sem SD ou crianças com qualquer outra síndrome genética que não seja SD.

Nota Adicional

Foram incluídos neste estudo 10 casos de crianças com leucemia e SD, cujas amostras foram previamente analisadas através de seqüenciamento direto (Magalhães *et al*, 2006); estas têm diferentes mutações no *GATA1*, como mostra a tabela 3, e suas amostras foram utilizadas como controle positivo para este estudo.

Tabela 3: Mutações encontradas previamente no éxon 2 do *GATA1* (Magalhães *et al*, 2006)

Caso	Sexo	Idade	Diagnostico	Mutação
1	F	26 meses	LMA-M7	c.164_178 delins 22
2	M	11 meses	LMA-M7	c.177_189dup13
3	F	17 meses	LMA-M7	c.114dupT
4	M	27 meses	LMA-M7	c.90_91delAG
5	M	11 meses	LMA-M7	c.43_44delCC
6	F	19 meses	LMA-M7	c.121_124dupTTGG
7	M	3 dias	LT	c.182_192dup11
8	F	6 dias	LT	c.138dupC
9	F	3 dias	LT	c.21dupG
10	F	6 dias	LT	c.90_91delAG

Abreviaturas: M= masculino; F = feminino; LMA-M7 = leucemia megacarioblástica aguda; LT leucemia transitória; delins = deleção e inserção; dup = duplicação; del= deleção.

Processamento das amostras

Ao chegar ao laboratório, as amostras de SP/MO passaram por um procedimento operacional padronizado, através do qual foram cadastradas e receberam um número de registro específico de acordo com a ordem de chegada e ano. Após esta etapa as amostras foram analisadas através da morfologia e imunofenotipagem.

A análise morfológica inicial foi feita pela coloração convencional por May-Grünwald-Giemsa (MGG) complementada pela técnica citoquímica pelo Negro de Sudan nos casos de leucemia. Esta análise preliminar permitiu a distinção entre LLA e LMA e a aplicação dos critérios definidos pelo FAB.

Todas as amostras passaram por centrifugação, para retirada do plasma a 1500 rpm por 5 minuto (centrífuga *Jouan C422*, rotor fixo) e então foi retirada uma

alíquota destas amostras para a extração de DNA. Após esta etapa, as amostras foram reconstituídas com RPMI contendo 10,0 % de soro fetal bovino, para então serem submetidas a imunofenotipagem.

A imunofenotipagem foi realizada em tubos apropriados para leitura no citômetro de fluxo. Para realização do ensaio foi utilizada uma concentração de 10^6 células, incubadas durante 30 minutos com 10 μ l do anticorpo primário. As incubações foram feitas com anticorpos monoclonais (AcMos) específicos, marcados com diferentes fluorocromos (fluoresceína ou ficoeritrina). Para as análises citofluorimétricas foi utilizado um painel de AcMos capaz de reconhecer as moléculas intracitoplasmáticas, possibilitando determinar com precisão o subtipo leucêmico da doença em estudo.

Foram acrescentados ao tubo contendo as células separadas 500 μ L de solução de lise FACS Lysing Solution® (Becton Dickinson). O tubo foi agitado repetitiva e vigorosamente e incubado por 15 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 1500 rotações por minuto (rpm) e o sobrenadante foi desprezado. Foram adicionados 500 μ l de solução detergente (TWEEN 20), para permeabilizar a membrana celular, e a solução foi homogeneizada. Procedeu-se a nova centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm, o sobrenadante foi desprezado e então os AcMos a-MPO, CD13, CD3, CD79a, CD22, TdT; IgM foram acrescentados em combinações de acordo com fluorocromo conjugado (PE ou FITC). Nos casos positivos para a-MPO e/ou cCD3, TdT positivo ou negativo, a expressão dos marcadores de membrana foi realizada seguindo técnicas diferentes para a marcação de acordo com a leucometria.

Quando a leucometria estava alta, foram adicionados ao tubo contendo as células separadas, 5 a 15 μ l de cada AcMo, em simples, duplas ou triplas associações, conjugados com os respectivos fluorocromos: FITC, PE e PerC5. O tubo foi homogeneizado e incubado por 20 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz. Foram acrescentados 500 μ l de PBS em cada tubo para então ser centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi descartado. Nos casos onde o AcMo não era conjugado a nenhum fluorocromo, foram adicionados 2,5 μ l de um segundo anticorpo conjugado a FITC ou PE, constituindo a segunda camada e incubou-se por 20 minutos. As células foram ressuspensas em 500 μ l de PBS para serem analisadas no citômetro de fluxo.

Porém, quando a leucometria se encontrava baixa a marcação foi feita por lise de hemácias. Em um tubo de 5 ml foram colocados 50 µl de sangue e 5 a 10 µl de anticorpo. Após 20 minutos, adicionou-se 500 µl de solução de lise de hemácias, deixando o tubo em repouso por mais 10 minutos. O tubo foi centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi descartado. Foram acrescentados 500 µl de PBS e o tubo foi novamente centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm. As células foram ressuspensas em 500 µl de PBS para serem analisadas no citômetro de fluxo.

Tanto em uma quanto em outra técnica foram utilizados os seguintes marcados de membrana: CD3, CD4, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33+13, CD33,CD34, CD41, CD42a, CD45, CD56, CD61, CD117, CD135, glicoforina A e HLA-DR. No estabelecimento dos critérios de positividade, os marcadores de células precursoras como aMPO, CD34 e TdT, por serem muito específicos e sensíveis, foram considerados positivos os valores que excederam 10% das células analisadas, já para marcadores de células mais diferenciadas adotamos para cada AcMo o valor mínimo de 20% das células analisadas. Os AcMos utilizados foram adquiridos com diversos fabricantes como Coulter, Immunotech, Becton-Dickson, Pharmigen e Dako.

Em seguida, alíquotas que variam de 500,0-1500,0µl de acordo com a quantidade de amostra que foi recebida foram encaminhadas para a criopreservação (-195°C em tanques contendo N₂ líquido) com soro fetal bovino e 10,0% de DMSO, para proporcionar a viabilidade celular adequada.

4.3 Métodos

4.2.1 Extração de DNA de amostras congeladas e esfregaços de SP/MO

4.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.2.3 Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance (dHPLC)

4.2.4 Seqüenciamento dos produtos da PCR

4.3.1: Extração de DNA segundo descrição de Miller *et al*, 1988

Esta técnica não utiliza fenol e clorofórmio e é ideal para sangue fresco ou congelado, bem como material obtido dos esfregaços de SP e/ou MO.

O procedimento começa adicionando-se tampão de lise de hemácias previamente gelado em um volume 3,5 vezes o volume total de sangue homogeneizando bem e colocando em um recipiente com gelo, por pelo menos 30 minutos. Após centrifuga-se por 20 minutos a 3000 rpm numa temperatura de 4° C repetindo o procedimento, porém com o tempo de 10 minutos para lavar o *pellet* utilizando apenas 300µl de solução.

Nos casos em que não foi possível obter DNA de células de sangue fresco ou congelado, o DNA foi extraído de esfregaços de SP e/ou MO realizados para análises morfológicas anteriores. Para tal os esfregaços de SP e/ou MO foram raspados com bisturi estéril em placa de petri juntamente com PBS estéril, levando a tubo de *ependorf* para seguir o procedimento da extração.

O procedimento segue com a ressuspensão do *pellet* para ser dissolvido com 300µl de tampão de lise de núcleo adicionando-se 1,5µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 1µl de proteinase K para posterior incubação, durante a noite, a temperatura de 56° C. Após a incubação, adiciona-se 60µl de NaCl 5M e centrifuga-se por 30 minutos na rotação de 5000rpm a temperatura de 4° C o que torna o DNA mais puro. Ao término da centrifugação o sobrenadante deve ser retirado e passado para um novo tubo onde se adicionará em torno de 900µl de etanol absoluto que tornará o DNA insolúvel provocando sua precipitação. Homogeneizar vertendo o tudo e incubar por 30 minutos a temperatura de 70° C.

Em seguida deve-se centrifugar por 30 minutos numa rotação de 1000rpm a temperatura de 4° C para então dispensar o etanol absoluto e colocar 1000µl de etanol 70% que tem a função de retirar o excesso do sal centrifugando novamente no mesmo tempo e temperatura, porém numa rotação de 5000rpm.

O procedimento se encerra com o descarte do etanol 70% e a adição de 40µl de Tris - Etilenodiaminotetracético (TE) (10mM Tris pH 8,0; 1mM Etilenodiaminotetracético (EDTA) Na₂) para posterior incubação por 30 minutos numa temperatura de 68° C e armazenamento na geladeira (4° C).

4.3.2: Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR para todas as amostras foi feita com o objetivo de amplificar os éxons 2 e 3 separadamente do *GATA1*. Para tal foram usados os respectivos oligonucleotídeos cujos desenhos foram gentilmente cedidas pelo Dr. Crispino, demonstrado na figura 10:



Figura 10: Segmento genômico do *GATA-1* Éxon 2 e Éxon 3

A amplificação da PCR gera um produto de 317 pares de base (pb) para o éxon 2 e 311pb para o éxon3.

A reação consiste numa desnaturação inicial de 3 minutos a 94^o C outra desnaturação por 30 segundos a 92^o C seguido de um anelamento de 20 segundos a 61^o C e uma extensão de 18 segundos a 74^o C sendo essas três etapas da reação repetida 35 vezes. Após essas etapas há uma extensão final de 10 minutos a 74^o C.

Cabe ressaltar que os reagentes para amplificação dos éxons 2 e 3 são os mesmos, porém seguidos de seus respectivos *primers*: 150ng de DNA, Tampão de PCR 10x (concentração final 1x), 25mM MgCl₂ (concentração final 2,5mM), 20pmol/μl de oligonucleotídeo e 10mM de DNTP, e, além disso, a amplificação do éxon 3 apresenta um reagente a mais que é o DMSO 10%.

4.3.3: Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance (dHPLC)

As amostras foram analisadas nos éxon 2 e 3 do *GATA1* e para tal realizamos uma desnaturação do produto da PCR por 1 minuto a 95°C, no qual foi gradativamente reanelado através do decréscimo da temperatura numa razão de 1°C por minuto até a temperatura final de 45°C, para a formação dos duplexes. Quando o produto da PCR não apresenta mutação, as fitas senso e anti-senso do *amplicon* são completamente complementares e, neste caso, esta molécula é conhecida como homoduplex. Quando é heterozigoto para a mutação a fita mutante senso e anti-senso não formam apenas o homoduplex, mas também o heteroduplex através do reanelamento da desnaturação da fita selvagem e da fita mutada como é mostrado na figura 11 (Kosaki *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar que para a formação dos duplexes e devido ao fato do *GATA1* se encontrar no cromossomo X foi necessário utilizar para os casos do sexo masculino uma mistura com o produto da PCR de um doador saudável na razão 1:1.

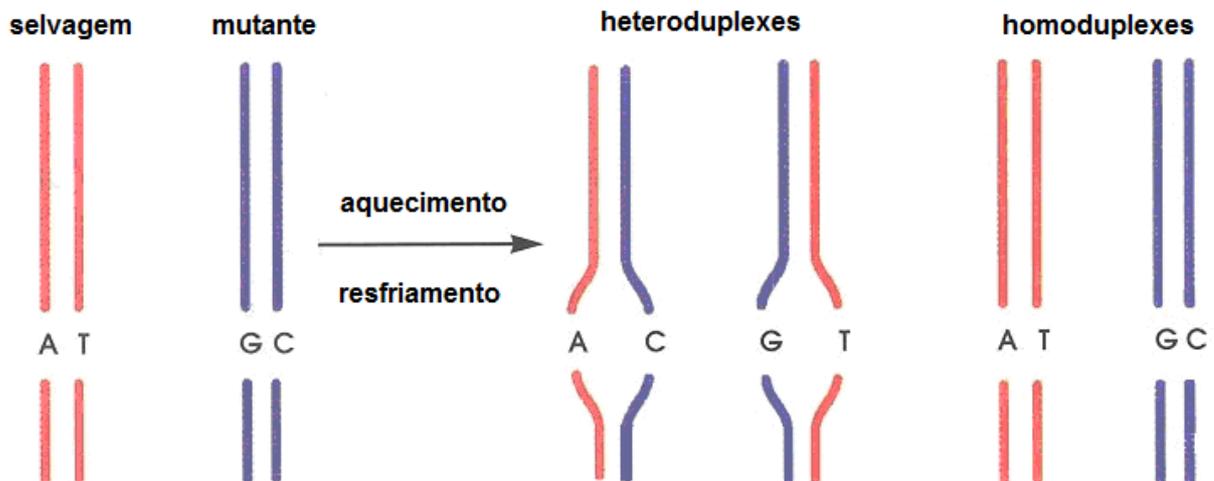


Figura 11: Formação dos heteroduplexes

Após a formação dos duplexes os fragmentos de DNA foram injetados em uma coluna de cromatografia líquida e eluídos através de um gradiente linear de acetonitrila (ACN) fazendo com que a coluna fosse carregada positivamente pela passagem de dois tampões de acetato de trietilamônio (TEAA) os quais apresentavam as seguintes concentrações: Tampão A: 0,1M TEAA; Tampão B: 0,1M TEAA + 25% de ACN. Além destas soluções foram utilizadas mais duas

soluções: a de lavagem de injeção e a de limpeza ativa com as seguintes concentrações, respectivamente: 8% de ACN e 75% de ACN.

A eluição das moléculas de DNA é feita na medida em que aumenta a concentração de ACN diminuindo a atração entre os fragmentos de DNA e o TEAA. Esta diferença físico-química entre o homo e o heteroduplex pode ser detectada através do HPLC devido a coluna de cromatografia ter afinidade pela fita dupla de DNA, sendo assim a força de ligação entre os heteroduplexes, quando comparados aos homoduplexes, faz com que fragmentos sejam eluídos de forma distinta. Através de um detector ultravioleta a absorbância é medida e os resultados mandados para o computador, que fornece gráficos com picos que permite a análise das mutações.

Foi feita curva de temperatura com controles sadios para os éxons 2 e 3 com o intuito de obter o melhor gráfico para detecção de mutação como mostrado na figura 12, sendo escolhido as temperaturas de 61 °C para o éxon 2 e 62 °C para o éxon 3 para em seguida analisar as amostras. Estas temperaturas foram escolhidas com base no padrão de formação dos picos no dHPLC, onde a definição e a voltagem que o pico se encontra forma determinantes para escolha.

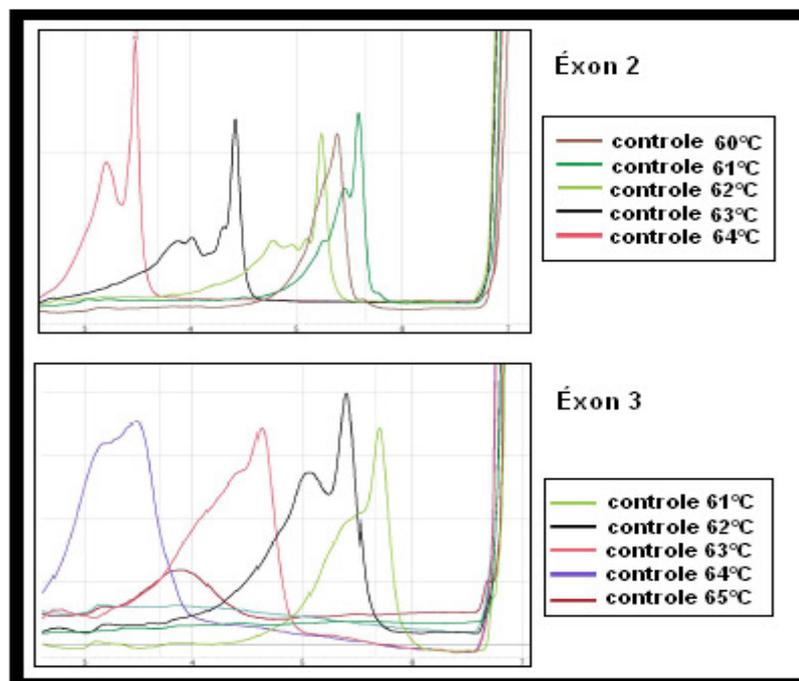


Figura 12: Padronização da temperatura dos éxons 2 e 3

4.3.4: Seqüenciamento dos produtos da PCR

A mistura da reação de seqüenciamento consiste em um volume de 10 μ l sendo 4 μ l de solução para seqüenciamento (DYEnamycTM ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Mega Bace DNA Analysis Systems, Amersham Biosciences), 1 μ l de *primer*, numa concentração de 5pmols/ μ l e 5 μ l do produto de PCR purificado mais água (se necessário, isto porque depende da amplificação do PCR purificado, caso seja expressivo não se faz necessária adição de água).

As amostras foram corridas na máquina de PCR na seguinte programação: 95°C por 20 segundos, 50°C por 15 segundos, e 60°C por 1 minuto sendo repetido em 25 ciclos.

A próxima etapa consiste na preparação das amostras para a aplicação no seqüenciador, etapa denominada precipitação descrita a seguir.

Precipitação: Adiciona-se o tubo de seqüenciamento de 1 μ l de acetato de amônia seguido de 27,5 μ l de etanol absoluto agitando para então centrifugar por 30 minutos a 1400 rpm a 4°C. Descartar o etanol com a pipeta para então adicionar 150 μ l de etanol 70% centrifugando por 15 minutos a 1400 rpm a 4°C. Descartar novamente utilizando a pipeta o etanol e para secar o pellet completamente coloca-se na estufa a 37°C por no máximo 15 minutos ou no bloco de seqüenciamento a 95°C por 2 minutos. Após esse procedimento adiciona-se 10 μ l de tampão de corrida (*Formamide Loading Buffer*).

Para a leitura no seqüenciador *Mega BACE DNA Analysis Systems* são utilizados os programas *Cimarron 1.53 Slim Phredifly* e *Cimarron 3.12* com as seguintes condições de corrida: voltagem de injeção da amostra -2kV por 100s e voltagem da corrida -6kV por 200min. Neste seqüenciador, o procedimento padrão para a realização da leitura seguiu as condições descritas no manual do *kit "DYEnamicTM ET Terminator Cycle Sequencing Premix For MegaBACE DNA Analysis Systems"* (Amersham Biosciences).

A análise foi feita no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* comparando o eletroferograma com uma seqüência referência do *GATA1* (GenBank NM_002049) como ilustrado na figura 13.

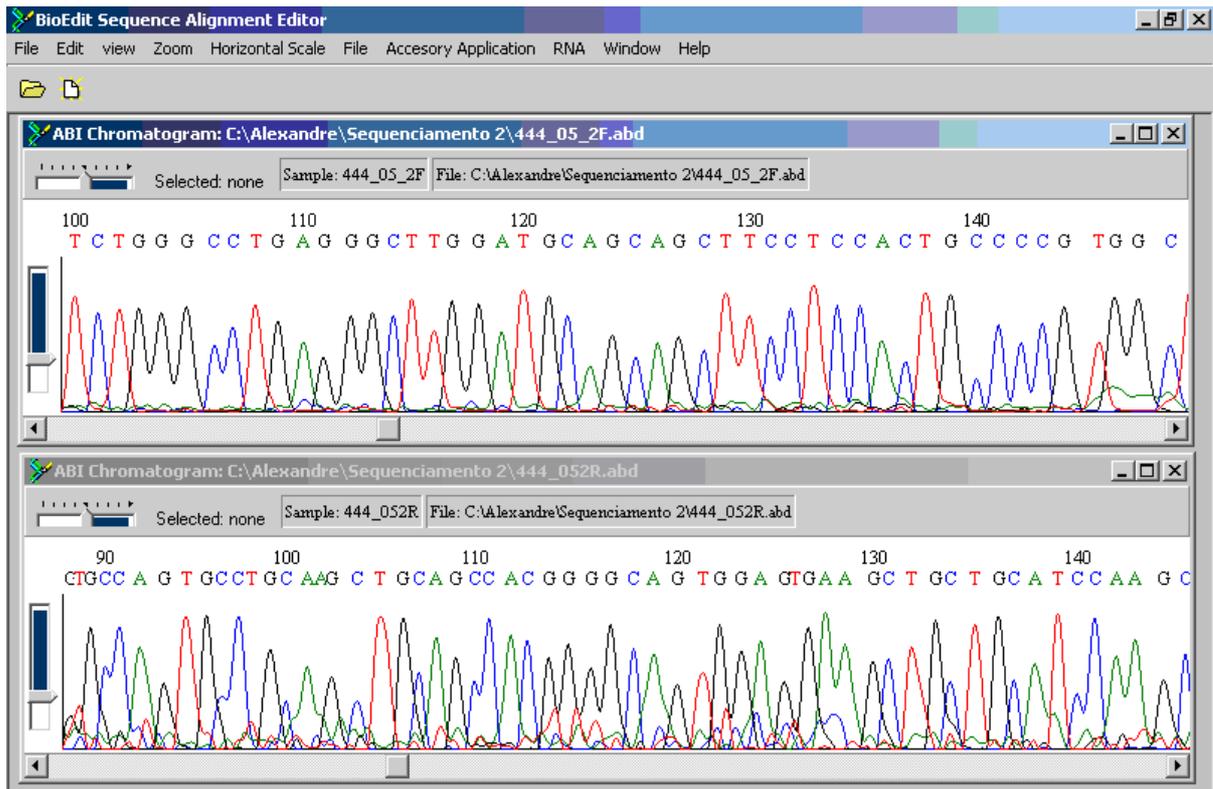


Figura 13: Foto do programa BioEdit onde são feitas as análises do seqüenciamento.

4.4 Análises Estatísticas

Para análise dos dados foi efetuada uma análise bivariada onde foram exploradas as relações do status do *GATA1* (éxons 2 e 3) e idade, cor da pele e diagnóstico de SD com distúrbio hematológico e SD sem distúrbio hematológico. A significância estatística entre os grupos estudados foi calculada utilizando o teste do Qui-quadrado com os intervalos de confiança de 95,0 %. O p valor $\leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

Foram analisadas 111 crianças com idade entre 3 dias e 49 meses, diagnosticadas previamente com SD conforme tabela 4. Em 10 casos foram estudadas amostras colhidas seriadas em diferentes idades, totalizando 127 amostras rastreadas para o éxon 2 e 3 do *GATA1*.

Dos 52 casos de crianças com SD e distúrbio hematológico, 10 neonatos com LT e 16 crianças com LMA-M7 apresentavam contagens de blastos superiores a 30% do total de células nucleadas, e foram identificadas com um dos marcadores monoclonais específicos (CD41, CD42a e CD61). Os casos de LT foram classificados de acordo com a faixa etária, onde crianças com idade inferior ou igual a 3 meses e que tiveram remissão espontânea receberam esta denominação. Além destes, 3 casos de LMA não preenchem os critérios de M7, sendo 2 casos caracterizados como LMA-M0 e 1 como LMA-M2.

Cinco crianças receberam o diagnóstico de SMD baseado em aspectos morfológicos onde o número de células blásticas na MO não preenchia o critério de leucemia aguda; 1 criança com trombocitopenia idiopática (TCP); 17 casos de LLA: pró-B (1), LLA – comum (15), LLA – T (1). Portanto, amostras com SD e doenças hematológicas representaram 52% do coorte analisado, sendo 17,3% de LMA, 13,4% de LT, 7,1% de SMD, 0,8% de TCP e 13,4% de LLA; 48% das amostras analisadas foram provenientes de crianças com SD sem distúrbio hematológico.

Em relação aos aspectos demográficos, houve o predomínio de casos com idade inferior a 24 meses. Em relação aos casos de LLA houve maior prevalência em crianças com idade superior a 25 meses. Observamos uma prevalência do sexo feminino sobre o masculino (1,4 : 1) e do branco sobre o não branco (1,7 : 1) no coorte total.

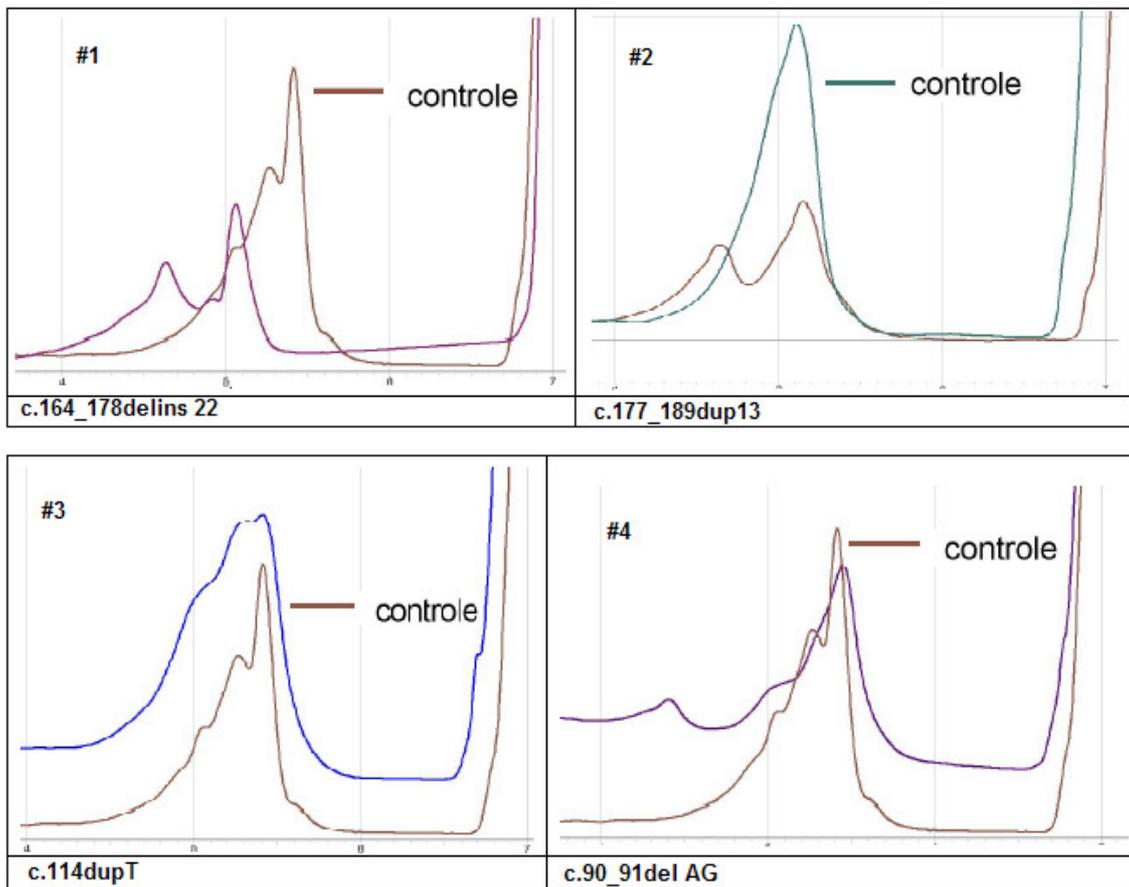
Tabela 4: Distribuição dos casos do coorte analisado

Características das amostras	SD sem distúrbio hematológica	SD com distúrbio hematológica
Idade (meses)		
0-3	19 (32,2)	13 (25)
4-24	29 (49,1)	19 (36,5)
25-48	4 (6,8)	6 (11,5)
≥ 48	7 (11,9)	14 (27)
Sexo		
Masculino	33 (56)	31 (59,6)
Feminino	26 (44)	21 (40,4)
Raça		
Branco	37 (62,7)	30 (57,7)
Não-Branco	22 (37,3)	22 (42,3)
Total	59	52

Abreviaturas: SD = síndrome de Down

5.1 Alterações encontradas no *GATA1*

Inicialmente testamos as 10 amostras previamente seqüenciadas cujo status do *GATA1* já era conhecido pelo seqüenciamento automático direto como mostrou a tabela 3. A partir do estabelecimento do protocolo das reações para as análises pelo dHPLC e pela observação que todas as amostras previamente analisadas para o *GATA1* obtiveram os mesmos resultados concordantes com o seqüenciamento, conforme os cromatogramas do dHPLC ilustrado na figura 14, com isso iniciamos as análises do restante do coorte através do dHPLC.



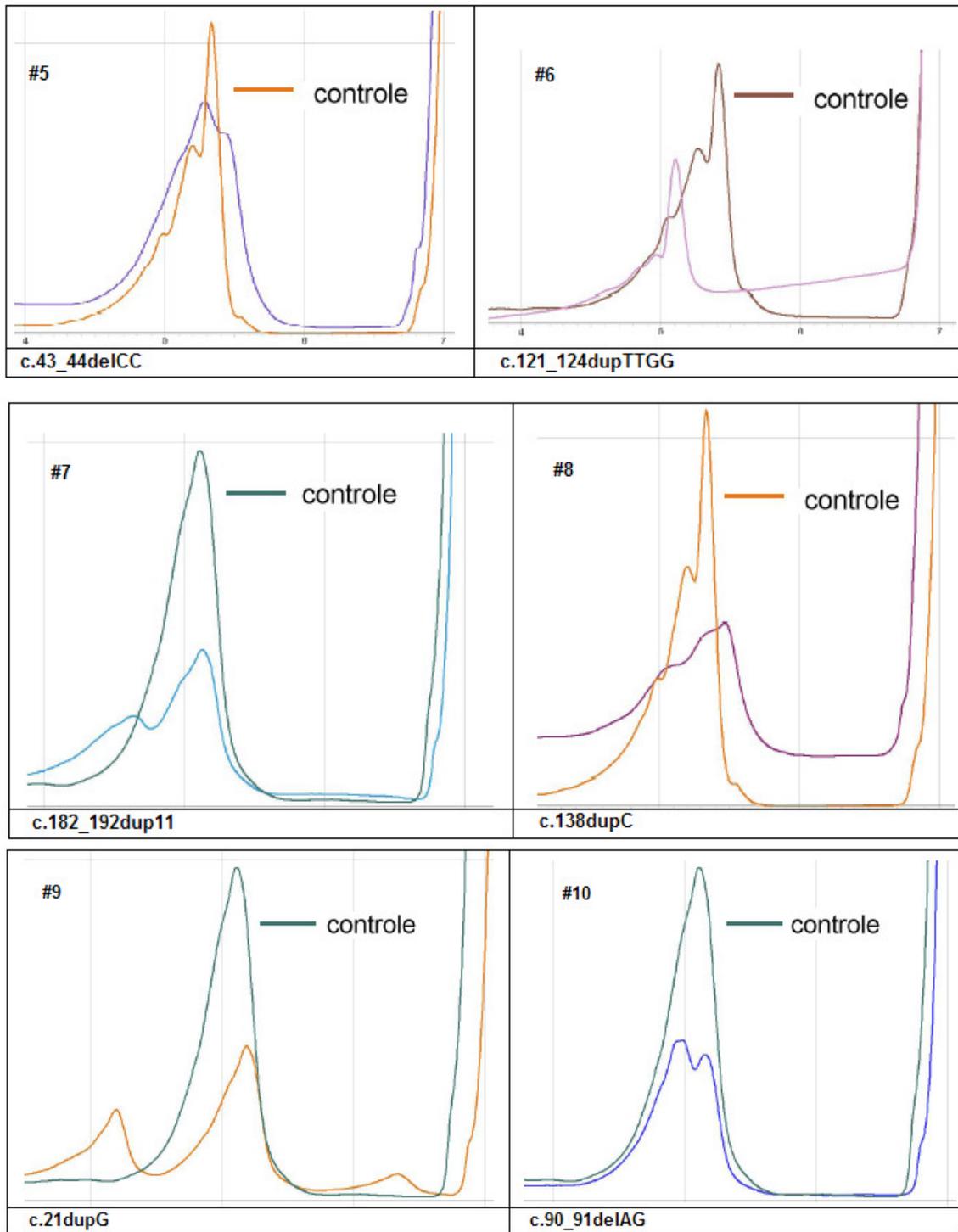


Figura 14: Cromatogramas das mutações previamente analisadas como controle das reações de dHPLC.

Foram detectados 10 casos mutados entre os 111 analisados primeiramente através do dHPLC, sendo detectadas nove mutações no éxon 2 e apenas um caso com alteração no éxon 3. Após este rastreamento, iniciamos o seqüenciamento automático detectando nas mesmas amostras alterações no *GATA1*, desta forma as duas técnicas para rastreamento de mutação apresentaram 100% de concordância conforme tabela 5.

Ao final da análise de 127 amostras referentes a 111 casos foram detectamos 20 mutações, todas correspondentes às amostras de LT e LMA-M7 e, na grande maioria, no éxon 2 com exceção de uma amostra que apresentou alteração no éxon 3, por ambas as técnicas utilizadas, como mostra a tabela 5. Não foi detectada nenhuma mutação em crianças com SD e outro distúrbio hematopoético bem como sem distúrbio hematológico e apenas uma criança onde havia trissomia do 21 no blasto leucêmico apesar da criança não apresentar o fenótipo de SD.

Tabela 5: Análise comparativa entre as técnicas para rastreamento do *GATA1*:

	dHPLC		Seqüenciamento	
	nt/mutação (%)		nt/mutação (%)	
	Exon 2	Exon 3	Exon 2	Exon 3
Idade (meses)				
0-3	8 / 32 (25%)	1 / 32 (3,2%)	8 / 32 (25%)	1 / 32 (3,2%)
4-24	11 / 48 (23%)	0 / 48 (0%)	11 / 48 (23%)	0 / 48 (0%)
25-48	0 / 10 (0%)	0 / 10 (0%)	0 / 10 (0%)	0 / 10 (0%)
>48	0 / 21 (0%)	0 / 21 (0%)	0 / 21 (0%)	0 / 21 (0%)
DH				
LT	8 / 10 (80%)	1 / 10 (10%)	8 / 10 (80%)	1 / 10 (10%)
LMA-M7	11 / 16 (69%)	0 / 16 (0%)	11 / 16 (69%)	0 / 16 (0%)
LMA**	0 / 3 (0%)	0 / 3 (0%)	0 / 3 (0%)	0 / 3 (0%)
LLA	0 / 17 (0%)	0 / 17 (0%)	0 / 17 (0%)	0 / 17 (0%)
SMD	0 / 5 (0%)	0 / 5 (0%)	0 / 5 (0%)	0 / 5 (0%)
TCP	0 / 1 (0%)	0 / 1 (0%)	0 / 1 (0%)	0 / 1 (0%)
Sem DH	0 / 59 (0%)	0 / 59 (0%)	0 / 59 (0%)	0 / 59 (0%)
Total	111	111	111	111

Abreviaturas: dHPLC = Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance; LT = leucemia transitória; LMA = leucemia mielóide aguda; LMA-M7 = leucemia megacarioblástica aguda; LLA = leucemia linfóide aguda; SMD = síndrome mielodisplásica; TCP = trombocitopenia; DH = distúrbio hematológico; nt = número testado.

** leucemia mielóide indiferenciada (M0) e leucemia mielóide com maturação (M2)

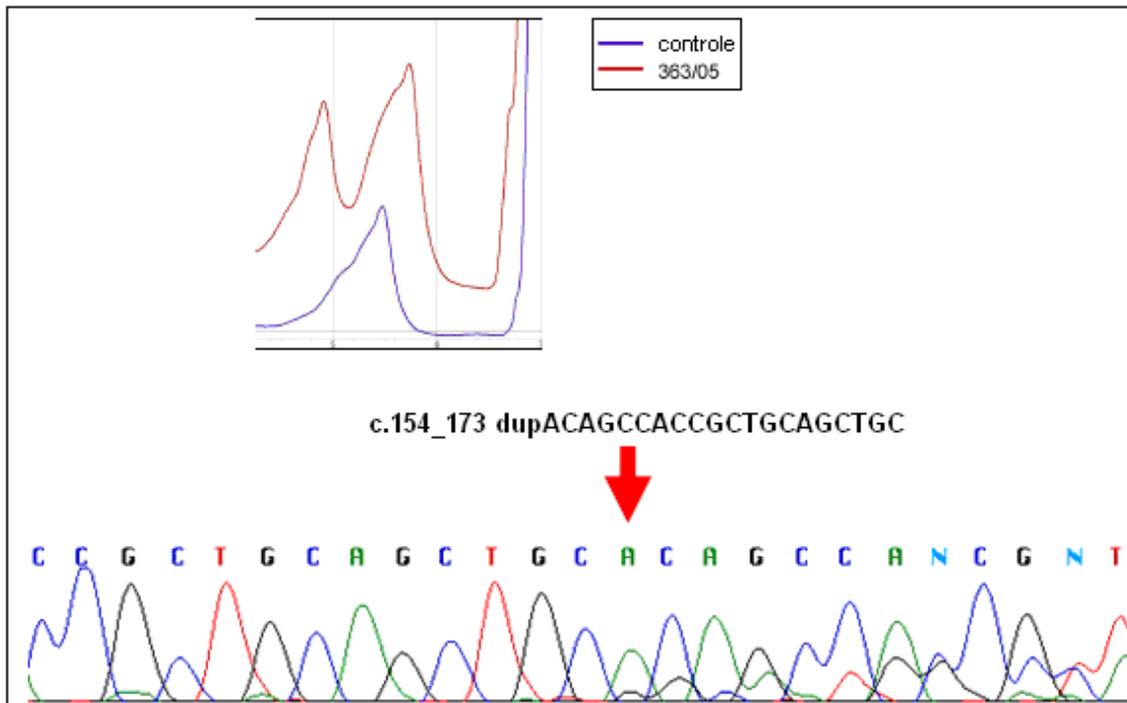
As características das mutações encontradas pelo seqüenciamento estão descritas na tabela 6: foram 3 substituições, 1 duplicação, 3 deleções, e 2 mutações complexas (substituição seguida de deleção). Uma das mutações, a da criança 279/05, resultou em uma mutação silenciosa, entretanto, o resto das alterações levou a uma mudança no código de leitura do gene *GATA1* resultando na tradução prematura de um códon de parada resultando na tradução de uma proteína truncada ou a não tradução da proteína maior do *GATA1* (dado não verificado por técnicas de expressão de proteína) e a expressão da proteína menor *GATA-1s*. Reunimos na figura 15 os cromatogramas e os eletroferogramas das alterações encontradas.

Tabela 6: Caracterização dos pacientes e suas alterações no éxon 2 do gene *GATA1*

Caso	Sexo	Idade	Diagnóstico	Leucometria x10 ³ /mL	Blastos	Mutação
279/05	M	14 m	LMA-M7	ni	ni	c.201 G>A
363/05	M	16 d	LT	53,5	70	c.154-173 dup20pb
444/05	M	3 d	LT	150	ni	c. 151 A>T (c.153-162 del CACAGCCACC)
470/05	M	18 m	LMA-M7	6.4	11	c. 3 G>A
204/06	M	18 d	LT	20.7	14	c. 29-30 del GG
301/06	M	18 d	LT	21	ni	c.155 C>G (C.156_178 del 23pb)
060/07	F	20 m	LMA-M7	ni	95	c.182 C>A
061/07	F	17 m	LMA-M7	46	60	c.90_91del AG
628/07	F	24 m	LMA-M7	18	ni	c.90_91del AG

Abreviaturas: M = masculino; F = feminino; LT = leucemia transitória;

LMA-M7 = leucemia megacarioblástica aguda; ni = não identificado; dup = duplicação; del = deleção



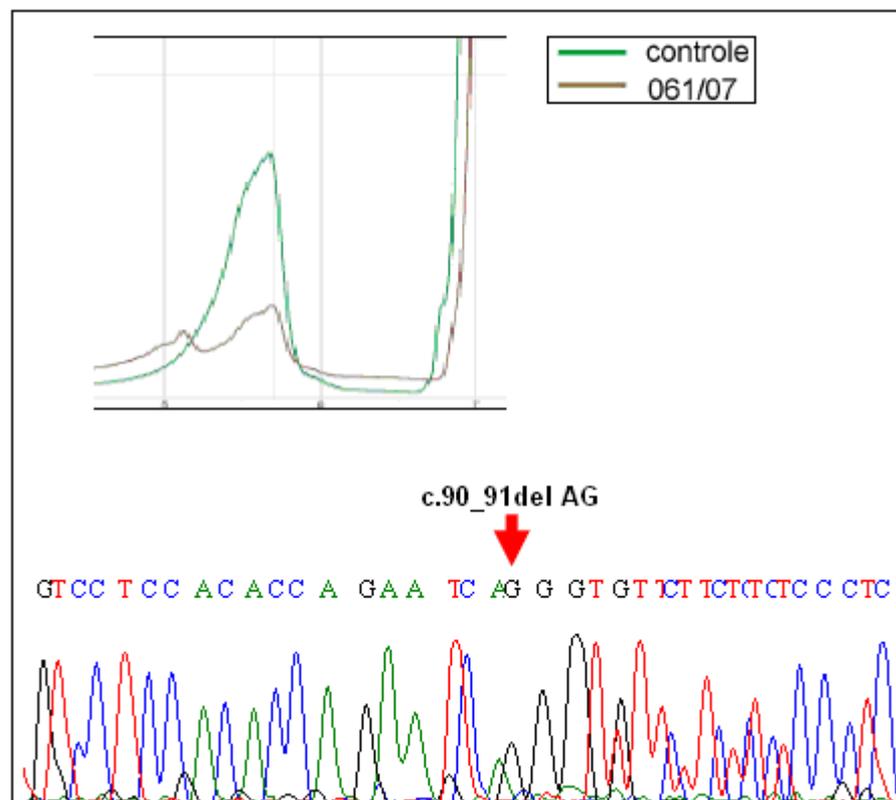
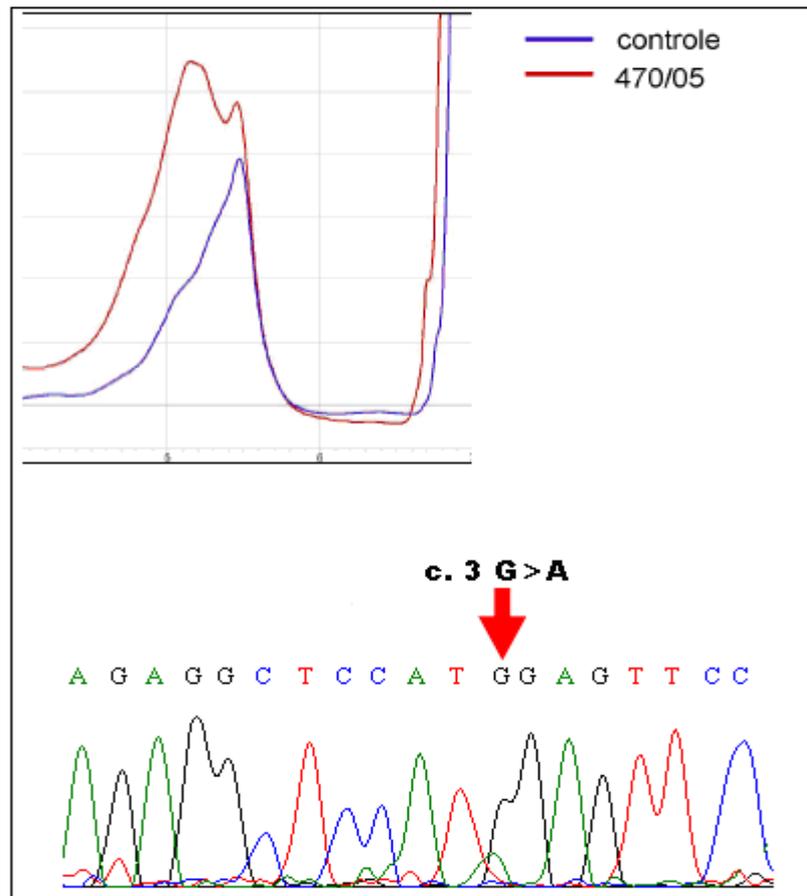


Figura 15: Alterações encontradas no éxon 2 do *GATA1*

Destas 9 mutações encontradas no éxon 2 do *GATA1* quatro são pela primeira vez descritas na literatura. Reunimos estas na figura 16.

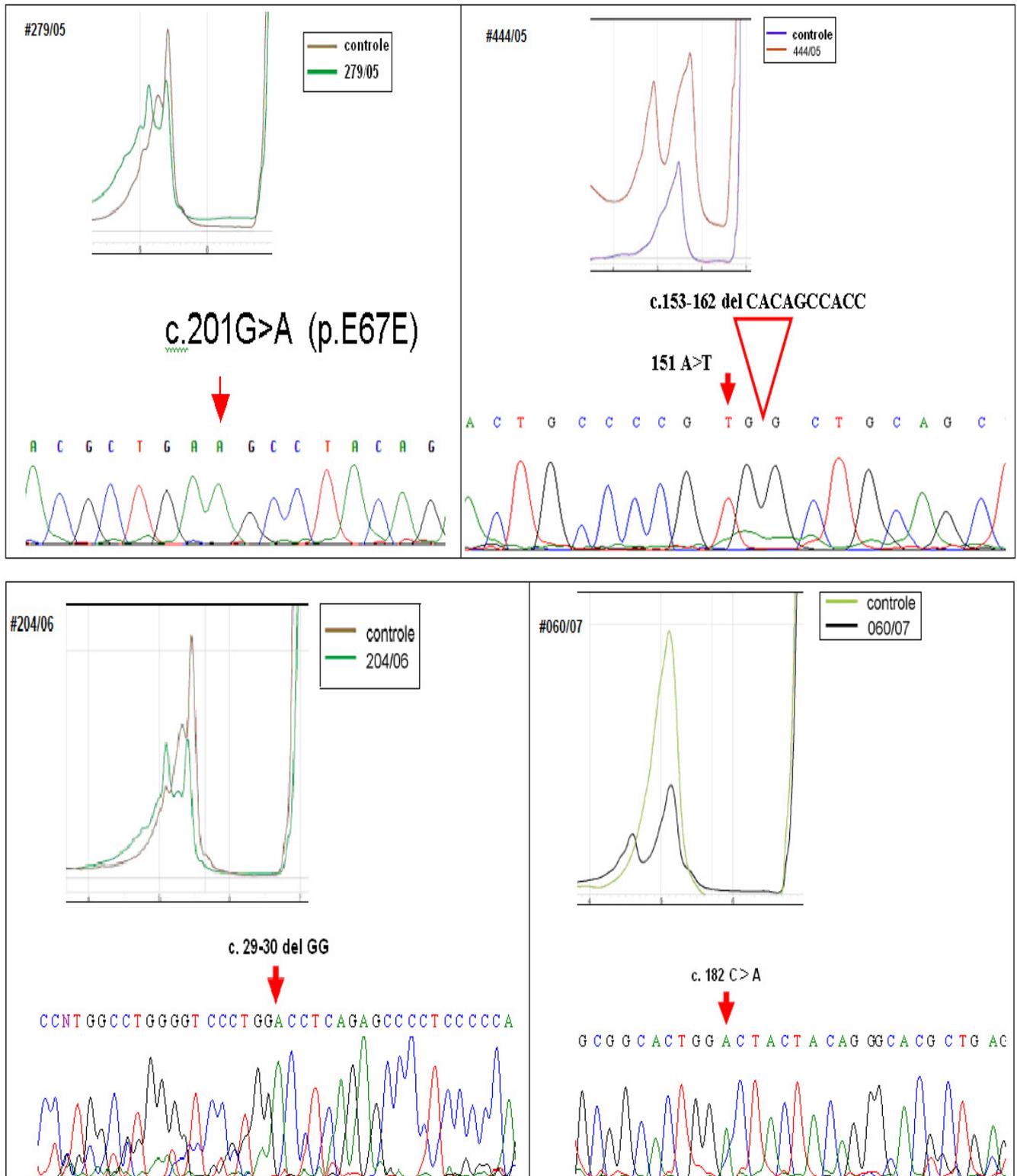


Figura 16: Cromatogramas e eletroferogramas das alterações ainda não descritas na literatura.

Análises seriadas foram possíveis em 10 crianças sendo 6 LT, 1 SMD, 1 LMA-M7 e 2 sem DH. Dos 6 casos de LT, 5 apresentaram mutação no GATA1 na primeira análise, posteriormente estas crianças entraram em remissão e não foi detectada nenhuma alteração em ambos os éxons. Tanto no caso da criança com SMD quanto nos casos das crianças sem DH não foi detectada nenhuma alteração no GATA1. No caso da criança com LMA-M7 não foi detectada alteração quando esta tinha 23 meses de idade para então ser detectada alteração com 3 anos.

Destes casos seriados apresentamos o caso da criança 490/04, que foi diagnosticada com LT evoluindo para a remissão espontânea nos primeiros 3 meses para posterior recaída com o diagnóstico de SMD para por fim ser classificada como LMA-M7 e apresentar mais uma vez a mutação, a mesma quando foi diagnosticada com LT, c.90_91del AG, como mostrado na figura 17.

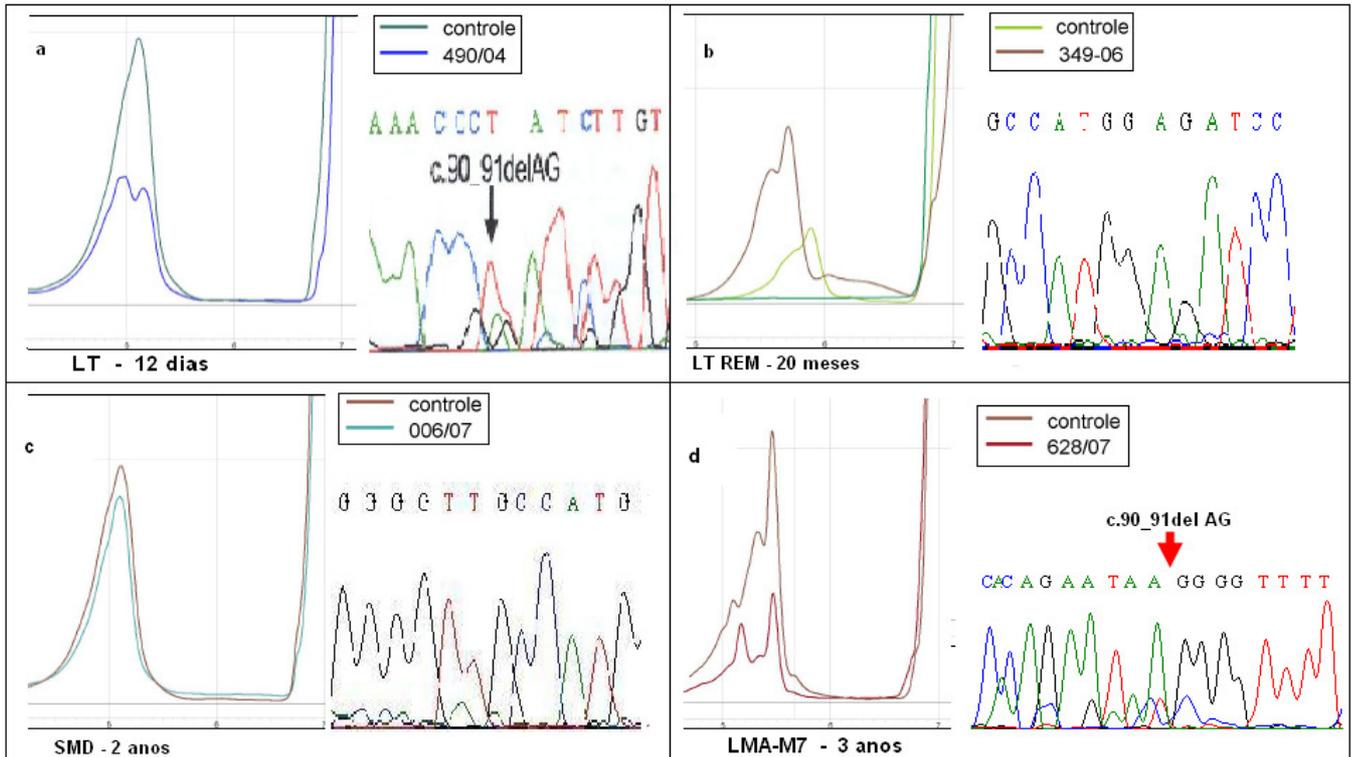


Figura 17: Análise seriada do caso 490/04: **a.** Criança com 12 dias e diagnosticada com LT apresentando mutação no éxon 2 do *GATA1*; **b.** Criança com 20 meses em remissão sem alteração; **c.** Criança com 2 anos diagnosticada com 2 SMD sem alteração; **d.** Criança diagnosticada com 3 anos com LMA-M7 e a mesma alteração no éxon 2 do *GATA1*.

As análises do éxon 3 com o intuito de encontrar possíveis alterações tanto nas amostras de LT e LMA-M7 naqueles casos onde não foram detectadas alterações no éxon 2 também foram realizadas nas amostras de SMD, LLA, LMA, TCP e nos indivíduos sem distúrbio hematológico.

Através da análise pelas duas técnicas de rastreamento encontramos apenas uma alteração no éxon 3 do *GATA1*. Esta criança é um recém-nascido (5 dias) com leucocitose importante ($195,0 \times 10^3/\text{mL}$) e quadro clínico típico de LT. Este apresentou remissão espontânea nos primeiros 3 meses de vida e uma recidiva foi detectada aos 5 meses de idade sendo diagnosticado SMD. A análise mutacional neste caso não detectou nenhuma mutação em ambos os éxons como mostra a figura 18.

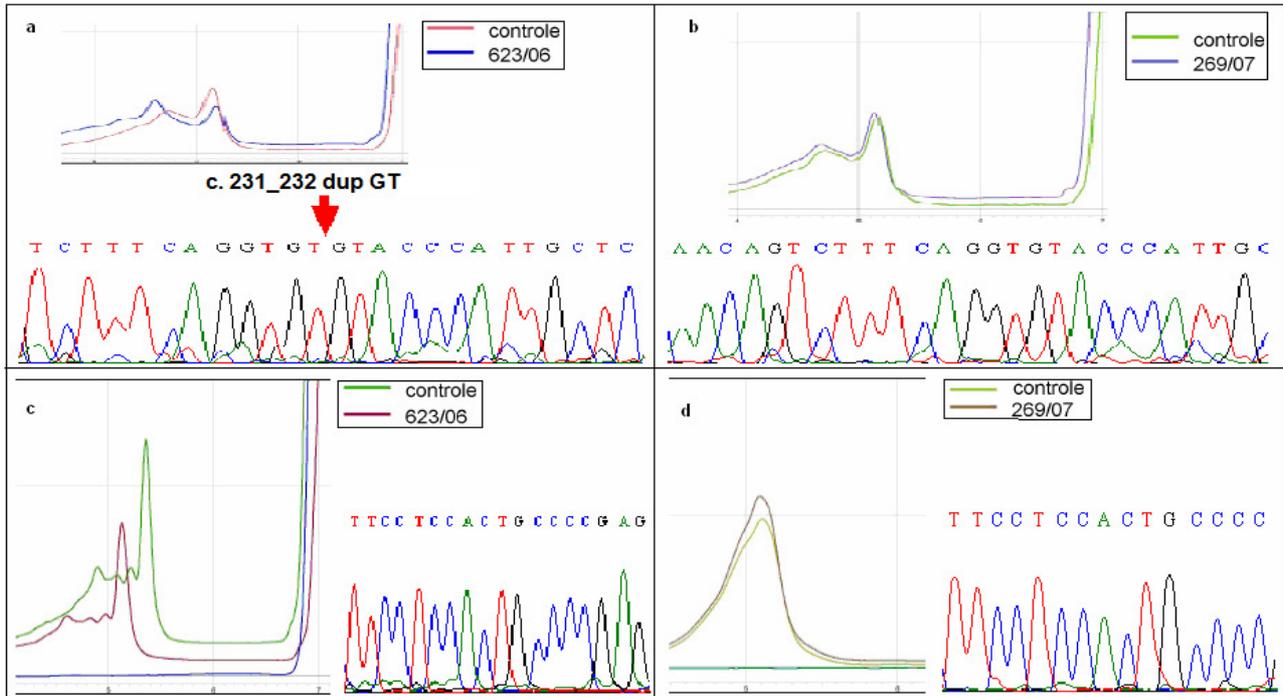


Figura 18: Análise seqüencial do paciente 623/06. a. Paciente 623/06 ao diagnóstico de LT com 5 dias apresentando mutação no gene *GATA1*; b. Paciente 623/06, registrado no nosso banco com o número 269/71, após recaída sendo diagnosticado com SMD aos 5 meses e não apresentando mutação; c e d. Análise mutacional do paciente 623/06 e o acompanhamento, 269/07, não apresentando mutação para o éxon2 tanto aos 5 dias de vida quanto aos 5 meses.

A análise bivariada mostrou que existe diferença estatística significativa por meio do teste Qui-quadrado para as seguintes variáveis independentes ajustadas em relação ao diagnóstico de doenças hematológicas: faixa etária inferior a 24 meses ($p = 0,000$) e mutação do *GATA1* no éxon 2 ($p = 0,000$). Contudo sexo, cor da pele e mutação do *GATA1* para o éxon 3 não apresentou diferença apresentando os seguintes valores de p : $p=0,165$, $p=0,812$ e $p=0,259$, respectivamente, como demonstrado na tabela 7.

Quando realizamos o mesmo teste ajustado em relação à técnica implementada para verificação de alterações no éxon 2 do *GATA1*, verificamos que existe diferença estatística apenas para doenças hematológicas ($p= 0,000$), não apresentando diferença em relação à faixa etária, sexo e cor da pele ($p=0,101$; $p=0,368$; $p=0,674$, respectivamente) como mostra a tabela 8.

Tabela 7: Análise estatística do coorte estudado

	LMA (17,3%) n (%)	LT (13,4%) n (%)	SMD (7,1%) n (%)	TCP (0,8%) n (%)	LLA (13,4%) n (%)	Sem DH (48%) n (%)	p valor
Idade (meses)							0,000
0-3	1 (4,5)	13 (76,5)	2 (22,2)	0 (0)	0 (0)	19 (31,1)	
4-24	16 (72,7)	4 (23,5)	5 (55,6)	0 (0)	2 (11,8)	30 (49,2)	
25-48	3 (13,7)	0 (0)	1 (11,1)	0 (0)	4 (23,5)	5 (8,2)	
>48	2 (9,1)	0 (0)	1 (11,1)	1 (100)	11 (64,7)	7 (11,5)	
Sexo							0,165
Masculino	11 (50)	3 (17,6)	2 (22,2)	1 (100)	8 (47,1)	27 (44,3)	
Feminino	11 (50)	14 (82,4)	7 (77,8)	0 (0)	9 (52,9)	34 (55,7)	
Cor da Pele							0,812
Branco	14 (63,6)	9 (52,9)	7 (77,8)	1 (100)	10 (58,8)	38 (62,3)	
Não-branco	8 (36,4)	8 (47,1)	2 (22,2)	0 (0)	7 (41,2)	23 (37,7)	
Mutação <i>GATA1</i>							
<i>p valor éxon 2</i>							0,000
Sem mutação éxon 2	11 (50)	9 (52,9)	9 (100)	1 (100)	17 (100)	61 (100)	
Mutação éxon 2	11 (50)	8 (47,1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
<i>p valor éxon 3</i>							0,259
Sem mutação éxon 3	22 (100)	16 (94,1)	9 (100)	1 (100)	17 (100)	61 (100)	
Mutação éxon 3	0 (0)	1 (5,9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Total	22 (100)	17 (100)	9 (100)	1 (100)	17 (100)	61 (100)	

Abreviaturas: LT = leucemia transitória; LMA = leucemia mielóide aguda;
 LLA = leucemia linfóide aguda; SMD = síndrome mielodisplásica; TCP =
 trombocitopenia ; DH = distúrbio hematológico

Tabela 8: Análise estatística da técnica utilizada

Características dos casos de SD	Sem mutação éxon 2		Mutação éxon 2		<i>p valor</i>	
	dHPLC n (%)	Sequene n (%)	dHPLC n (%)	Sequene n (%)	dHPLC	Sequene
Idade (meses)					0,101	0,101
0-3	27 (25)	27 (25)	8 (42,1)	8 (42,1)		
4-24	48 (44,4)	48 (44,4)	10 (52,6)	10 (52,6)		
25-48	11 (10,2)	11 (10,2)	1 (5,3)	1 (5,3)		
>48	22 (20,4)	22 (20,4)	0 (0)	0 (0)		
Sexo					0,368	0,368
Masculino	62 (57,4)	62 (57,4)	13 (68,40)	13 (68,40)		
Feminino	46 (42,6)	46 (42,6)	6 (31,6)	6 (31,6)		
Cor da Pele					0,674	0,674
Branco	68 (63)	68 (63)	11 (57,9)	11 (57,9)		
Não Branco	40 (37)	40 (37)	8 (42,1)	8 (42,1)		
DH					0,000	0,000
LMA-M7	8 (7,4)	8 (7,4)	11 (57,9)	11 (57,9)		
LMA-M0	2 (1,9)	2 (1,9)	0 (0)	0 (0)		
LMA-M2	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)		
LT	2 (1,9)	2 (1,9)	8 (42,1)	8 (42,1)		
LT REM	7 (6,5)	7 (6,5)	0 (0)	0 (0)		
SMD	9 (8,3)	9 (8,3)	0 (0)	0 (0)		
TCP	1 (0,9)	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)		
LLA	17(15,7)	17(15,7)	0 (0)	0 (0)		
Sem DH	61 (56,5)	61 (56,5)	0 (0)	0 (0)		
Total	108	108	19	19		

Abreviaturas: SD = síndrome de Down; dHPLC = Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance; DH = distúrbio hematológico; n = número; LMA = leucemia mielóide aguda; LMA-M7 = leucemia megacarioblástica aguda; LMA-M0 = leucemia mielóide indiferenciada; LMA-M2 = leucemia mielóide com maturação LT = leucemia transitória; LT REM = leucemia transitória em remissão; SMD = síndrome mielodisplásica; TCP = trombocitopenia LLA = leucemia linfóide aguda.

Os 10 casos nos quais foi possível o acompanhamento após serem detectadas mutações na primeira análise por ambas as técnicas de rastreamento estão descritos na tabela 9.

Tabela 9: Amostras seqüenciais da coorte estudada

Nº Lab.	Data Inicial	Data Seqüencial	Data Seqüencial	Data Seqüencial
131/00	01-03-00 (2anos) LMA-M7 <i>GATA1</i> sem mutação	17-04-01 (3anos) LMA-M7 <i>GATA1</i> mutado		
490/04	18-12-04 (13dias) LT <i>GATA1</i> mutado	04-08-06 (20meses) LT em remissão <i>GATA1</i> sem mutação	09-01-07 (2anos) SMD <i>GATA1</i> sem mutação	21-07-07 (3anos) LMA-M7 <i>GATA1</i> mutado
363/05	16-08-05 (16dias) LT <i>GATA1</i> mutado	20-07-06 (11 meses) LT em remissão <i>GATA1</i> sem mutação	22-09-06 (14meses) LT em remissão <i>GATA1</i> sem mutação	
444/05	23-09-05 (3dias) LT <i>GATA1</i> mutado	11-08-06 (11meses) LT em remissão <i>GATA1</i> sem mutação		
461/05	04-10-05 (2mese) SMD <i>GATA1</i> sem mutação	20-06-06 (10meses) SMD <i>GATA1</i> sem mutação	14-07-06 (11meses) SMD <i>GATA1</i> sem mutação	
204/06	23-05-06 (18dias) LT <i>GATA1</i> mutado	20-07-06 (2meses) LT em remissão <i>GATA1</i> sem mutação		
301/06	19-07-06 (1 mês) LT <i>GATA1</i> mutado	24-08-06 (2meses) LT em remissão <i>GATA1</i> sem mutação	22-09-06 (3 meses) LT em remissão <i>GATA1</i> sem mutação	
364/06	16-08-06 (23meses) Sem DH <i>GATA1</i> sem mutação	06-10-06 (25meses) Sem DH <i>GATA1</i> sem mutação		
478/06	19-10-04 (2anos) Sem DH <i>GATA1</i> sem mutação	06-10-06 (4 anos) Sem DH <i>GATA1</i> sem mutação		
623/06	08-12-06 (5dias) LT <i>GATA1</i> mutado éxon3	23-05-07 (5meses) LT em remissão <i>GATA1</i> sem mutação		

Abreviaturas: N° = número; Lab = laboratório; LMA-M7 = leucemia megacarioblástica aguda; LT = leucemia transitória; SMD = síndrome mielodisplásica ; DH = distúrbio hematológico.

Um caso particular que não se integrava nos critérios de inclusão do estudo foi a criança 301/06 que foi diagnosticada com 18 dias de idade apresentando um quadro clínico de LT. Esta criança não apresentava o fenótipo do SD, porém exames citogenéticos detectaram a presença do cromossomo extranumerário 21 em suas células blásticas. A análise mutacional apresentou mutação no éxon 2 pelo dHPLC sendo confirmada através do seqüenciamento automático sendo uma substituição seguida de deleção. A análise seqüencial desta criança foi possível em dois períodos quando a criança já estava em remissão espontânea com 2 meses e 3 meses de vida como mostra a figura 19.

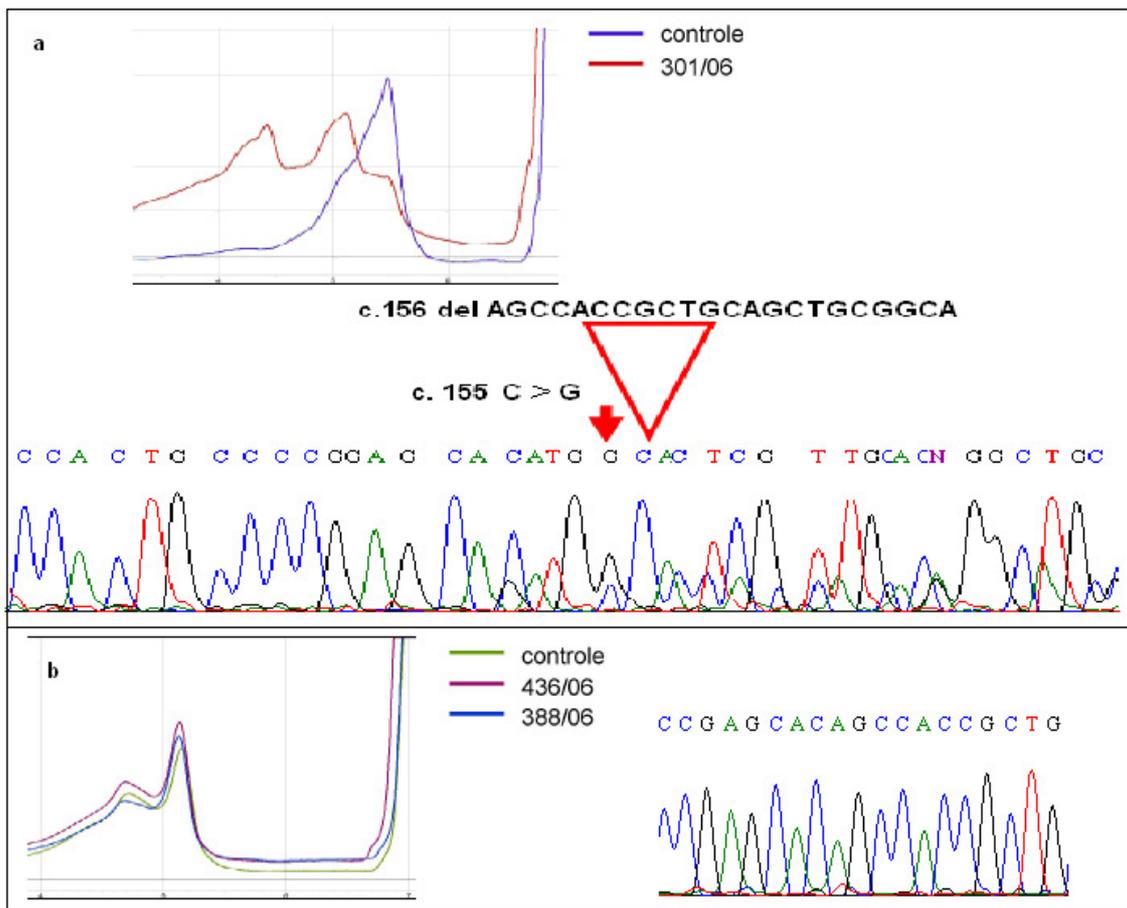


Figura 19: Análise seqüencial do paciente 301/06. a. Paciente 301/06 ao diagnóstico de LT com 18 dias e apresentando mutação no gene *GATA1*; b. Paciente 301/06, registrado seqüencialmente com 2 meses e 3 meses com os números 388/06 e 436/06, respectivamente, não apresentando mutação no éxon 2 do gene *GATA1* através da análise de dHPLC e seqüenciamento.

6. DISCUSSÃO

Recentemente, vem sendo descrito que alterações clonais envolvendo a linhagem megacariocítica e a criança com SD apresentam informações importantes relacionadas ao processo de leucemogênese.

Um estudo preliminar publicado em 2006 por Magalhães e colaboradores confirmou que alterações no gene *GATA1* e a trissomia do 21 são componentes importantes no processo leucêmico. Com este racional nos propomos a continuar e aperfeiçoar o rastreamento das alterações no gene *GATA1* em crianças com SD com distúrbios hematopoéticos clonais ou não.

Nosso estudo procurou através de uma técnica rápida e sensível otimizar a detecção de alterações genéticas no *GATA1*, visto que a alta sensibilidade em detectar alterações no DNA é essencial na análise mutacional. Embora o seqüenciamento automático seja a técnica *gold standard* para a identificação de mutações, este método consome muito tempo para análise, enquanto o dHPLC se mostrou eficaz e rápido para a análise de variações genéticas.

Esta técnica apresenta uma sensibilidade estimada entre 96% e 100% e tem sido empregada com sucesso na detecção de alterações nos mais diversos genes de interesse médico, mostrando-se mais eficiente que outras técnicas utilizadas para este fim. Além disso, esta técnica proporciona uma análise em um grande número de amostras de um determinado gene bem como diferentes éxons como foi o intuito do nosso rastreamento. Neste estudo pioneiro no Brasil e com um caráter epidemiológico através da formação de uma coorte que pretende estimar a magnitude do risco do desenvolvimento de doenças hematológicas clonais nas crianças com SD o padrão pelo dHPLC foi eficiente. Desta forma propomos a inclusão da pesquisa do status do *GATA1* nos critérios de diagnóstico de doenças hematológicas clonais através do dHPLC como um possível indicador da leucemogênese no SD.

No nosso estudo a média de idade de ocorrência dos sinais de distúrbios hematológicos variaram entre os primeiros dias de vida a 48 meses, predominantemente LMA-M7 ($p = 0,000$).

Dados da literatura mostram que apesar de o *GATA1* estar localizado no cromossomo X, não existe diferença de prevalência entre indivíduos do sexo feminino e do masculino. Embora nossos dados mostrem uma maior prevalência do

sexo feminino quando analisada independentemente por desordem hematológica não há diferença estatística em relação à frequência de leucemia ($p=0,165$).

Corroborando os dados da literatura, em nosso coorte foram encontradas alterações do *GATA1* exclusivamente nos casos com distúrbios hematológicos ($p = 0,000$).

O processo de transformação do *GATA1* em um alvo molecular se torna capaz a partir da implementação de novas técnicas de detecção de alterações como estamos propondo e, além disso, como sugerido por Zipursky (2005), pode-se especular os grupos de maior risco através da identificação de mutações no *GATA1* em crianças com SD e LT.

Zipursky *et al* (2005) e Pine *et al* (2005) sugerem que as alterações do *GATA1* são importantes marcadores para detecção de doença residual mínima em crianças com SD, na progressão de LT para LMA-M7, conforme ilustra a figura 20 (Pine *et al*, 2005).

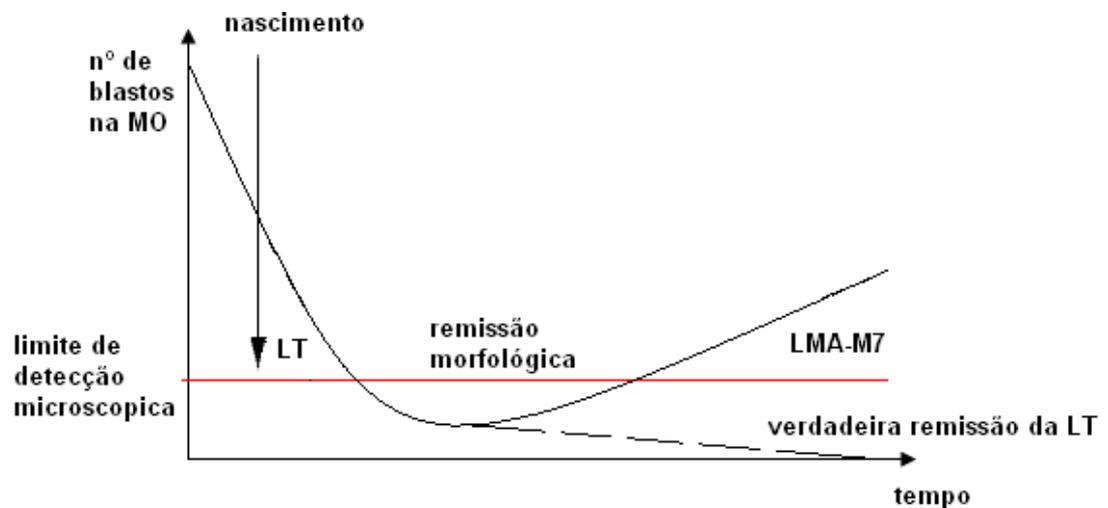


Figura 20: Hipótese da cinética blástica de recém nascidos com LT

Com isso avaliamos os éxons 2 e 3 do gene *GATA1* com o intuito de, além de rastrear possíveis alterações, validar a técnica de dHPLC como uma ferramenta de alta sensibilidade, confiabilidade e rapidez na detecção de alterações no *GATA1* possibilitando desta forma um diagnóstico mais preciso, visto que estudos já comprovaram que mutações no gene *GATA1* foram encontradas em crianças com SD e LT ou LMA-M7.

No nosso coorte de crianças com SD e distúrbio hematológico foi detectado um total de 20 mutações, exclusivamente em pacientes com LT e LMA-M7. No estudo preliminar com as mutações foram detectadas apenas em pacientes LMA-M7 e LT e estas foram encontradas no éxon 2 e consistiram de três duplicações de uma única base, uma duplicação de 4 pb, duas duplicações maiores (de 11 e 13 pb), três deleções pequenas e uma mutação complexa com deleção de 15 pb e inserção de 22 pb. Funcionalmente todas as mutações provocaram uma criação de um códon de parada prematura na tradução do GATA1. (Magalhães, 2006). Na complementação deste estudo onde utilizamos uma nova abordagem de rastreamento de alterações no gene GATA1 encontramos 3 substituições de uma única pb, 2 duplicações sendo uma de 20 pb no éxon 2 e outra de dois pb no éxon 3, 3 deleções de duas bases e 2 mutações complexas (substituição seguida de deleção) sendo uma substituição de uma base e deleção de 10 pb e a outra substituição de um pb e deleção de 20 pb. Estas mutações complexas ainda não foram descritas na literatura: c. 151 A→T (c.153_162 del CACAGCCACC); c.155 C→G (c.156_178 del 23pb), bem como a mutação c.201 G→A, c.29_30delAG e c.182C→A.

Recentemente, Splendore *et al* (2005) revisaram todas as mutações descritas em GATA1 associadas com distúrbios hematológicos e a trissomia do 21, onde reuniram, aproximadamente, 90 mutações diferentes. Os tipos de mutações mais freqüentes encontrados foram: deleções (34%) variando de deleção de um pb a 1.5 kb, duplicações (24%) variando de 1 a 34 pb, inserções (14%) variando de 1 a 22 pb, porém esta podendo ser duplicações, já que a nomenclatura usada por diversos autores segue padrões diferentes. Além disso, substituição de bases parecem ocorrer em todo éxon 2, enquanto deleções, inserções e duplicações tendem a ocorrer na segunda metade do éxon.

Como todas as mutações são adquiridas, a maioria se torna única, mas em alguns casos há exemplos da mesma mutação ocorrer outras vezes, sugerindo algum desequilíbrio em determinadas regiões do éxon 2. Como exemplo desta situação temos a deleção de dois pb (c.90_91delAG) que já foi descrita em nove pacientes na literatura, sendo inclusive relatada em 3 amostras do nosso coorte sendo duas em um caso de uma criança que apresentou LT ao nascer e desenvolveu LMA-M7 com 2 anos de idade.

Este paciente é a 490/04 que apresentou alteração no éxon 2 (c.90_91delAG) do gene *GATA1* quando foi diagnosticada com LT aos 12 dias de vida. Após

remissão espontânea, não apresentou mais mutação em ambos os éxons do gene seguindo assim no período que desenvolveu SMD para então adquirir a mesma mutação (c.90_91 del AG) no éxon 2 quando já havia evoluído a doença para LMA-M7 com a criança apresentando a idade de 3 anos. Com isso, além de ratificar o fato de que o gene GATA1 se encontra, em grande parte, alterado nesses distúrbios também nos mostra que há um processo na leucemogênese da criança com SD onde o clone leucêmico se conserva latente e após adquirir condições ideais para a sua proliferação seja esta através de um microambiente propício ou por adquirir mutações adicionais que favoreçam a proliferação ou pela compilação dos dois fatos, gera a propagação do clone leucêmico levando à LMA-M7.

Além desta, a criança 061/07 foi detectada com a mesma alteração (c.90_91 del AG). Esta alteração acarreta em um *frameshift* que leva à mudança na leitura do gene gerando uma proteína não funcional devido a antecipação ou o retardo do código de parada.

Outra alteração encontrada em nosso coorte foi a da criança 470/05 (c. 3 G>A) que Rainis *et al* (2003) e Hirose *et al* (2003) descreveram em um paciente com LMA-M7 e em dois com LT, respectivamente. No nosso paciente foi detectada quando se encontrava com LMA-M7 e, para tal, foi utilizado DNA genômico tanto na descrição dos autores quanto para o nosso estudo. Esta alteração acarreta a não iniciação do código de leitura no éxon 2 do gene GATA1 por codificar a primeira metionina resultando na não tradução da proteína GATA-1 e apenas na tradução da proteína menor GATA-1s.

Existem casos na literatura onde há a alteração do gene GATA1 sem a presença do fenótipo de SD, como relatado por Harigae *et al* (2004) onde uma paciente de 48 anos, com LMA-M7 que apresentou mutação no gene GATA1, curiosamente a mesma apresentada pela paciente 363/05. Esta alteração resulta em uma parada prematura no código de leitura. Neste estudo foi utilizado cDNA diferentemente do que foi utilizado por nós nas duas análises, tanto no dHPLC quanto no seqüenciamento automático. Esta criança, como mostrado na tabela 9, ainda foi analisada em dois momentos quando tinha 11 meses e se apresentava em remissão e 14 meses quando ainda se apresentava em remissão, não sendo detectada nenhuma alteração no gene GATA1.

No nosso coorte foram detectadas cinco alterações que ainda não foram descritas na literatura. A criança 444/05 que apresentou a alteração c. 151 A□T

(c.153_162 del CACAGCCACC) no éxon2 do *GATA1* com 3 dias de vida o que resultou em um código de parada de leitura. Esta criança foi analisada novamente quando tinha 11 meses de vida não apresentando nenhuma alteração no éxon 2 nem no éxon 3 do *GATA1*.

A alteração detectada na criança 204/06 (c.29_30 del AG) foi descrita pela primeira vez descrita na literatura. Esta alteração leva ao um código de parada prematuro resultando em uma proteína truncada e sem função, portanto só apresentando a tradução correta da proteína menor GATA-1s. Esta criança foi rastreada novamente para os éxons 2 e 3 do *GATA1* quando tinha 2 meses de vida e se encontrava em remissão espontânea, mostrando que a LT se apresenta em remissão nos primeiros 3 meses de vida como relatado na literatura.

Além destas, na criança 060/07 foi detectada uma alteração no éxon 2 do gene *GATA1* (c.182C>A) que resulta em um código de parada prematura resultando em uma proteína truncada que perde sua função e, desta forma, só se traduz a proteína menor GATA-1s. Esta alteração também foi, pela primeira vez, descrita na literatura.

Com isso, cabe alertar a hematologistas e neonatologistas pediátricos a importância da verificação da trissomia do 21 que em células leucêmicas no período neonatal pode se tratar de uma LT mesmo na ausência do fenótipo de SD. Este é o segundo caso no nosso grupo que relatamos a existência da mutação do gene *GATA1* em crianças sem SD, porém com trissomia do 21 nos clones leucêmicos (Magalhães *et al*, 2005).

Dados da literatura mostram que camundongos nocautes para *GATA1* não apresentam doença hematológica quando produz em grande quantidade a proteína menor GATA-1s sugerindo o papel compensatório desta proteína em relação à falta da GATA-1 o que não acontece em indivíduos acometidos com a alteração (Li *et al*, 2005).

A partir disso foi sugerido uma formulação do modelo de progressão da leucemogênese da SD no qual a exclusiva produção de GATA-1s dentro do contexto da trissomia do 21 cria uma grande vantagem do progenitor celular de adquirir mutações adicionais que levam à leucemia como mostra a figura 21 (Mundschau e Crispino, 2006).

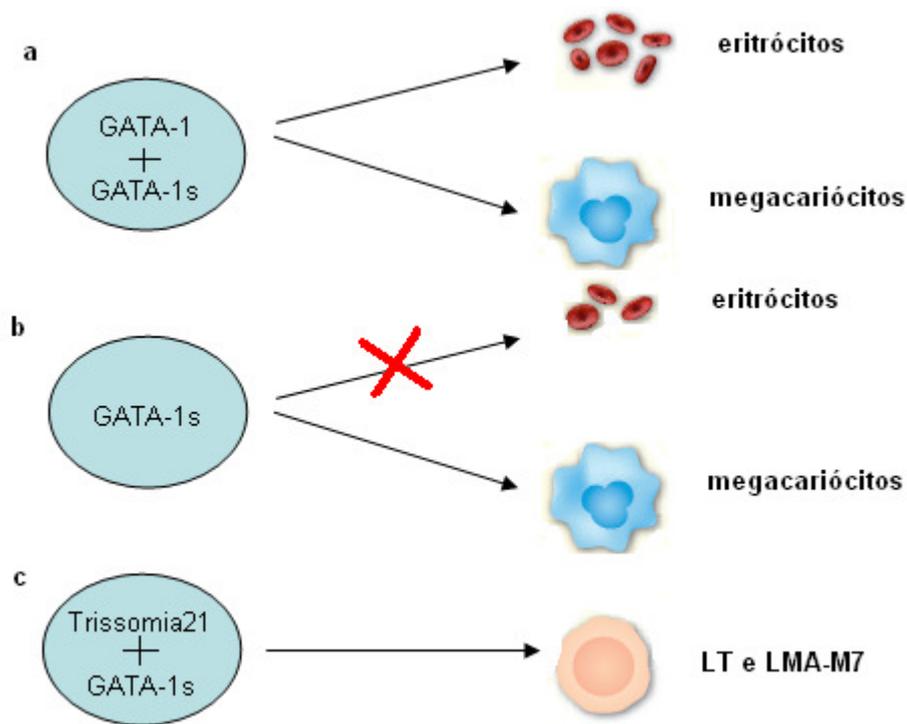


Figura 21: Modelo da GATA-1 na hematopoiese e leucemogênese (modificado de Mundschau e Crispino, 2006). a. Produção normal das duas formas protéicas levando a hematopoiese normal; b. Na ausência da proteína GATA-1, GATA-1s não suporta o desenvolvimento normal sanguíneo levando ao bloqueio de eritrócitos e leve hiperproliferação de megacariócitos; c. Cooperação da GATA-1s e a trissomia do 21 levando a LT e LMA-M7

Estes relatos sustentam, em particular, o caso 279/05, que foi encontrada mutação silenciosa no gene GATA1 (c.201 G> A) que pode acarretar na não alteração da proteína, mas foi diagnosticado como LMA-M7, isto é, algum outro fator significou o terceiro passo para a malignização da doença, já que a trissomia do 21 seguido da mutação intra-uterina do GATA1 mais outro fator ainda não conhecido levam a LMA-M7 de acordo com Izraeli *et al* (2007). Esta alteração é pela primeira vez descrita na literatura.

O caso 279/05 apresentou um cariótipo complexo, 48,XY,der(9)t(1:19)(q21;p13.3),der(20)t(1:20)(q21;q11.2),+21c o que sugere que genes localizados no cromossomo 1 poderiam estar envolvidos no processo leucemogênico (Macedo-Silva, 2008 *submitted*). Além disso, e especificamente nesse caso, as translocações envolvem os cromossomos 19 e 20 atingindo genes específicos tanto para fatores transcricionais (*MTGR1* – *Myeloid translocation gene related protein 1* – que

apresenta relação com o domínio *runt* do *RUNX1*) quanto fatores tirosina kinases (*MATK* – *megakaryocyte associated tyrosine kinase*) apoiando a idéia de que há necessidade de um fator a mais que a trissomia do 21 e a alteração do *GATA1* para a conclusão do processo (Calabi e Cilli, 1998 e Bennet *et al*, 1994).

Este raciocínio se baseia na possibilidade de que na fase transitória da doença, que acontece logo depois do nascimento, clones latentes encontram um microambiente e alterações genéticas adicionais levam ao estágio leucêmico convencendo-se que há um processo de vários estágios na leucemogênese do SD (Shimizu *et al*, 2008).

Estudos nos estágios iniciais do sistema hematopoético em embriões de camundongos se fazem necessário, portanto, para melhor compreensão do mecanismo de seleção dos potenciais clones leucêmicos.

Alguns modelos murinos mostram ainda que *GATA-1*s falha na repressão de alguns fatores transcricionais como *GATA2*, *Myc* e *KIT* apresentando um efeito pró - proliferativo no crescimento hematopoiético (Bourquin *et al.*, 2006). Com isso a identificação de possíveis parceiros protéicos que interajam com cada proteína do *GATA1* irá facilitar o entendimento e tornar mais claro a regulação do controle de crescimento megacariocítico pela via de *GATA1* (Kuhl *et al.*, 2005).

Cabe ressaltar que *GATA2* se apresenta numa fase inicial da hematopoese e que em camundongos nocautes para *GATA1*, *GATA2* pode manter parcialmente na fase inicial da megacariopoese a habilidade de formação de plaquetas, já que os dois genes participam da manutenção de células-tronco hematopoéticas bem como progenitores multipotentes (Weis e Orkin, 1995)

Diversos trabalhos foram desenvolvidos para explicar o grande número de LA em crianças com SD e conseqüentemente a busca por alguma superexpressão de algum gene localizado no cromossomo 21 se tornou o mecanismo principal sugerido para o processo leucemogênico da SD.

A região crítica da SD, 21q22, apresenta três genes com significativa participação em leucemias mielóides que são o *RUNX1*, *ETS2* e *ERG*.

RUNX1 (*AML1*, *PEBP2*) é localizado no braço longo do cromossomo 21 (21q22.3). Este gene apresenta sua expressão reduzida quando se compara LMA-M7 do SD com LMA-M7 sem SD, apesar de que ainda não foi estabelecido seu possível papel na leucemogênese da SD (Vyas e Roberts, 2006).

O gene *ERG* é superexpresso em LMA de adulto o que sugere papel leucemogênico em indivíduos com SD. Esta hipótese se baseia na superexpressão de *ERG3* que na presença da trissomia 21 leva à troca do desenvolvimento eritróide para megacariocítico, bem como, a seleção e a proliferação de progenitores hematopoéticos com alteração no *GATA1* (Rainis *et al*, 2005). Além deste, outro gene que apresenta papel semelhante ao *ERG* é *ETS2* que também leva ao desvio de desenvolvimento de progenitores eritróide para megacariocítico, podendo ser independente de *GATA1*, apesar de recrutar reguladores transcricionais como *NF-E2*, crucial regulador na megacariopoesse (Ge *et al*, 2008).

O gene *ETS2* ainda apresenta um papel intrigante *in vitro* quanto à sensibilidade a drogas quimioterápicas em megacarioblastos Down e não-Down. Já é sabido que blastos de SD apresentam 10 vezes mais sensibilidade a ARA-C que blastos não-SD, isto se dá pelo fato de que genes localizados no cromossomo 21, como cistationa- β -sintetase e superóxido desmutase, apresentam níveis elevados em blastos-SD em relação à não-SD e, além disso, níveis baixos de metionina, homocisteínas, assim como, deficiência relativa de folato aumenta a citotoxicidade de ARA-C. Porém, o silenciamento de *GATA1* e a superexpressão de *ETS2* resulta em um decréscimo na sensibilidade a ARA-C. Apesar disso, se faz necessário mais pesquisas para mostrar a verdadeira relação entre esses genes quanto à sensibilidade a drogas quimioterápicas (Ge *et al*, 2008).

Em estudo recente, pacientes com LMA e SD apresentaram alta taxa de cura através do protocolo AML-BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) 98 com uma intensidade de dose reduzida e apresentando uma baixa toxicidade. Neste estudo, os autores propõem que haja uma quimioterapia padronizada para crianças com SD, já que estas apresentaram menor toxicidade que crianças não SD (Creutzig *et al*, 2005). Esta terapia padronizada já demonstrou uma excelente taxa de sobrevida em crianças com LMA e SD, mas decresce com o aumento da idade mais particularmente, a partir dos 2 anos, quando há uma tendência maior para recaída (Gamis *et al*, 2003).

Ainda em relação ao cromossomo 21, recentemente foi descrito um caso de tetrassomia do 21 em uma menina de 27 meses de idade sem alteração no gene *GATA1* e com LMA-M7. Esta criança foi rastreada para todos os éxons do gene *GATA1* não sendo detectada nenhuma alteração. A tetrassomia do 21 foi a única anormalidade encontrada nesta criança e só foi descrito tal fato em apenas 12 casos

na literatura sendo na maioria em LT e LMA-M7. De acordo com a literatura é comum, na maioria dos casos, aberrações complexas no cariótipo de indivíduos com LMA-M7, mais freqüentemente associada com anormalidades adquiridas ou constitucionais do cromossomo 21 (Shin *et al*, 2008).

Devido ao fato que a maioria das crianças com tal anormalidade tenha sido classificada como LT ou LMA-M7 leva a crer que genes no do cromossomo 21, mesmo na ausência de alterações no *GATA1*, possam levar à leucemogênese e que ao adquirir mais duas cópias do cromossomo 21 possam ter ajudado no desenvolvimento da doença.

O gene *Fli1* tem se apresentado de grande interesse em estudos recentes, já que este interage com *GATA1-FOG1* formando um complexo trimolecular. *Fli1* é membro da família de fatores transcricionais *Ets*, bem como, *PU1*. Estes genes apresentam antagonismo quanto à habilidade de se ligar ao gene *GATA1*, já que um aparece ativando *GATA1* enquanto o outro inibe a ligação de *GATA1* ao DNA, respectivamente. Esta diferença se dá na região onde estes genes se ligam na porção NT (Eisbacher *et al*, 2003).

Além disso, Wang *et al* (2002) demonstraram que o lugar da ligação de *Fli1* em *GATA1* representa um papel importante na determinação se *FOG1* inibe ou estimula a atividade de *GATA1*. Por exemplo, mutação na seqüência 5'-GGAA-3' de *Fli1* converte *FOG1* a inibidor na coativação de *GATA1*. Este mecanismo de mediação de *Fli1* em *FOG1* ainda não é claro, porém é mais um fator que na ausência de alteração no *GATA1* pode contribuir para desregulação na linhagem megacariocítica.

Outro gene importante fora do contexto da região crítica da SD e do cromossomo 21, é o gene tumor de Wilms (*WT1*). Este está localizado 11p13. Ele apresenta 10 éxons e também é um fator transcricional importante no desenvolvimento e sobrevivência normal da célula (Yang *et al.*, 2007). Apesar de ter sido originalmente identificado como um locus supressor de tumor na patogênese do tumor de Wilms embrionário, outros estudos demonstram sua importância quanto à expressão em LMA. Apesar de não haver interação direta com *GATA1*, estudos têm valorizado a expressão de *WT1* como um marcador para monitoramento de pacientes no processo de progressão clínica das MDS da SD, sendo assim, capaz de prever que algumas crianças com LT evoluam para LMA-M7 (Hasle *et al.*, 2005).

Este gene em estudo recente em crianças com SD e LT apresentou considerável aumento de expressão através da análise de PCR em tempo real. Cinco pacientes estudados apresentaram superexpressão de *WT1*, sendo que 3 apresentavam mutação no gene *GATA1*, e um não obteve amostra para essa análise. O único paciente com níveis baixos de *WT1* foi aquele que não apresentava alteração juntamente com dois pacientes SD sem distúrbio hematológico. Além disso, todos voltaram ao seu nível normal de expressão de *WT1* quando entraram em remissão espontânea com exceção de um que desenvolveu posteriormente LMA-M7. Com isso, os autores concluíram que *WT1* pode também ser, juntamente com o *GATA1*, um marcador molecular para diagnosticar a progressão de LT para LMA-M7 (Hasle *et al*, 2005).

Devido ao fato de existir casos na literatura nos quais não são detectadas alterações no éxon 2 do gene *GATA1*, estendemos nosso estudo com o intuito de detectar alterações na porção inicial do éxon 3 e encontramos uma alteração já descrita no estudo de Groet *et al* (2003), no qual em dois pacientes foram encontradas a duplicação de 2pb (c.231_232GT), que foi a mesma encontrada no nosso paciente 623/06 que apresentava LT no período do estudo com apenas 5 dias. Este paciente entrou em remissão não apresentando nenhuma alteração tanto para o éxon 2 quanto para o éxon 3. Cabe lembrar que a probabilidade de se detectar mutações no éxon 3 é muito pequena já que este éxon só possui 29 nucleotídeos antes da metionina 84 que traduz GATA-1s. Entretanto, o éxon 3, assim como, no nosso estudo deve ser incluído nos protocolos de análises principalmente quando não se é detectada alteração no éxon 2 como ocorreu neste caso. Todas as alterações no éxon 2 e também na porção inicial do éxon 3 levam somente à tradução da proteína GATA-1s.

As alterações no gene *GATA1*, de acordo com a literatura, apresentam-se sempre em uma taxa superior a 80% nas análises em pacientes SD com LT e LMA-M7, como mostra a tabela 10. De acordo com os achados iniciais já descritos na literatura, nossas alterações, com exceção da 279/05, mencionada acima, interromperam a tradução da proteína selvagem GATA-1 através da introdução de um códon prematuro de parada através de um alteração no éxon 2 ou no início do éxon 3, porém mantendo a tradução da proteína menor GATA-1s.

Apesar da definição de LMA-M7 e SMD como uma única entidade biológica em crianças com SD, um dos critérios estabelecidos pela FAB para classificar a

LMA-M7 é o número de blastos maior que 30%. Porém de acordo com os nossos resultados e de muitos encontrados na literatura, as alterações no gene *GATA1* acometem crianças com LT e LMA-M7 e apenas em um caso descrito foi encontrada em SMD por Xu *et al* (2003). Sendo assim e propondo *GATA1* mutado como um possível marcador para as leucemias da SD, era de se esperar que nas SMD fossem detectadas alterações, já que se propõe uma progressão da doença. Logo, não necessariamente é preciso a passagem pela SMD para ser considerada uma LMA-M7.

Tabela 10: Estudos de mutações em *GATA1* e síndrome de Down

Autor	Diagnóstico	Mutações/Testados	material	Éxon testado
Weschler <i>et al</i> 2002	LMA-M7	6/6	DNA	todos
Mundschau <i>et al</i> 2003	LT	7/7	DNA	2 e 3
Xu <i>et al</i> 2003	LT	21/22	DNA/cDNA	todos
	LMA-M7	13/19		
	MDS	2/5		
Rainis <i>et al</i> 2003	LT	16/17	DNA	2
	LMA-M7	16/17		
Hitzler <i>et al</i> 2003	LT	11/12	DNA	2
	LMA-M7	3/3		
Ahmed <i>et al</i> 2004	LT	4/4	DNA	2
	LMA-M7	12/12		
McElwaine <i>et al</i> 2004	LT	2/2	cDNA	1 a 3
	LMA-M7	4/6		
Hasle <i>et al</i> 2005	LT	4/5	DNA	2
Pine <i>et al</i> 2005	LT	2/2	DNA	2
	LMA-M7	2/3		
Magalhães <i>et al</i> 2006	LT	4/6	DNA	2 e 3
	LMA-M7	6/8		
Pine <i>et al</i> 2007	SD	22/590	DNA	2
Hama <i>et al</i> 2008	LMA-M7	17/17	DNA	2

De acordo com os nossos resultados, das 20 mutações detectadas 7 apresentavam número de blastos menor que o estabelecido para o diagnóstico de LMA-M7 sendo 4 estabelecidos como LMA-M7 e 3 LT e, mesmo assim, os dois métodos utilizados no nosso estudo foram eficazes quanto à detecção de alterações no gene *GATA1*, já que o número reduzido de blastos pode resultar na não identificação de mutações.

A não identificação de alterações no gene *GATA1* em amostras LT, LMA-M7 e SMD pode ser explicada devido a alguns fatores. Primeiramente, quanto à questão de alterações genéticas adquiridas junto ou independente de mutações no *GATA1*. Um recente estudo demonstrou que para a transformação leucêmica é necessário, pelo menos, a cooperação de duas mutações, onde uma exerce o bloqueio da diferenciação e a outra promove a proliferação e a sobrevivência do clone leucêmico (Gilliland e Tallman, 2002). Baseado nisso, e lembrando-se da interação de *RUNX1* e *GATA1*, estudos têm mostrado que deleções no *RUNX1*, sendo esta uma perda completa ou parcial de uma cópia do gene, foram encontradas em pacientes com SD (Berger *et al*, 2006). Apesar destas mutações serem encontradas numa frequência baixa nesta população, a haploinsuficiência de *RUNX1* pode significar um caminho para melhor compreensão das conseqüências destas alterações na diferenciação megacariocítica, sendo, portanto, interessante estender esta pesquisa a um número maior de pacientes.

Ainda há a possibilidade que alguns autores sugerem a análise de seqüências de cDNA para mutações em *GATA1* seja mais sensível que o DNA genômico, já que deleções completas do éxon 2 ou grandes deleções no éxon 2 além de alterações em seqüências intrônicas circunvizinhas, não seriam amplificadas por PCR usando oligonucleotídeos que, assim como os nossos, reconhecem regiões intrônicas (Xu *et al*, 2003). Porém, a análise do DNA genômico apresenta a vantagem de ser mais apropriada para triagem de amostras de arquivos criopreservados e até células de esfregaço de medula óssea obtidos ao diagnóstico (Taub *et al*, 2004 e Ahmed *et al*, 2004).

Nas 7 amostras que classificamos como LT REM não foram encontradas alterações no *GATA1*, mesmo sendo encontrada em primeira instância mutações em todos estes pacientes. Mostrando que há remissão da doença com extinção do clone leucêmico, com exceção de um caso que após os 2 anos de vida houve recidiva como já descrito anteriormente no caso 490/05.

Além disso, nos 17 casos diagnosticados com LLA e nos 3 casos de LMA não megacarioblástica não foi encontrada nenhuma alteração no gene *GATA1* o que está de acordo com a descrição da literatura.

Neste estudo ainda realizamos o rastreamento dos éxons 2 e 3 em 59 crianças com SD sem nenhum distúrbio hematológico, com o intuito de propor que

crianças com SD sejam avaliadas quanto à chance de desenvolver leucemias, bem como, são de desenvolver cardiopatias, diabetes e doença de Alzheimer.

Ahmed *et al* (2004) analisaram um coorte de SD com LMA-M7, LT e SD sem nenhum distúrbio hematopoético. Das 21 crianças com SD sem distúrbio hematológico encontraram 2 mutações quando estas se encontravam com a idade de 26 e 31 meses de vida. Estes dados apesar do número pequeno sugerem que a mutação do *GATA1* pode ocorrer sem que haja sinais concretos da doença.

Alem deste estudo, Pine *et al* (2007) com a intenção de verificar a real frequência de LT na SD analisou 590 recém-nascidos com SD para determinar a incidência da mutação no gene *GATA1* e sua associação com o risco de desenvolver LMA-M7 e, para isso, foram utilizados cartões do teste do pezinho. Vinte e dois (3,8%) apresentaram a mutação e apenas 2 desenvolveram LMA-M7 após a detecção da alteração. Os autores concluíram que fatores técnicos podem ter determinado a baixa frequência de mutações no gene *GATA1* e nós concordamos que se faz necessário um estudo em grande escala para comparar o desenvolvimento da LT para LMA-M7 quanto ao prognóstico de alterações no *GATA1*.

Com relação a análise da criança 301/06 do nosso estudo, que apresentava ao nascer um quadro clínico típico de LT, mas não foi diagnosticada como SD incluímos ela no estudo por se tratar de um quadro onde existia a presença da trissomia do 21 apenas nos seus blastos leucêmicos de acordo com a citogenética. Após análise foi detectada a mutação do *GATA1* e foi realizado o acompanhamento da mesma. A alteração c.155 C>G (C.156_178 del 23pb) foi pela primeira vez descrita na literatura.

Após o acompanhamento da remissão, a criança não desenvolveu LMA-M7 confirmando, portanto, que existe a complementaridade da trissomia do 21 e a alteração no gene *GATA1* em um processo que se inicia intra-uterinamente e se apresenta no período pós-natal.

Baseado nisso, temos como pretensão utilizar as nossas observações sobre as mutações em *GATA1* como um futuro marcador molecular facilitando o diagnóstico precoce bem como a indicar ao médico o melhor delineamento do tratamento da leucemia da criança com SD.

7. Conclusões

- A técnica de dHPLC se mostrou eficaz para o rastreamento de alterações no gene *GATA1* tanto para o éxon 2 quanto para o éxon 3, com 100% de concordância com o seqüenciamento automático. Sendo assim, validamos esta técnica para a detecção de mutações no gene *GATA1*;
- As mutações em *GATA1* na Síndrome de Down são específicas do subtipo de leucemias megacarioblásticas e leucemia transitória neonatal;
- A associação da mutação no gene *GATA1* e a trissomia do 21 parece cooperar para o caráter proliferativo inicial do processo leucêmico, visto que, encontramos alterações genéticas em uma criança não SD, porém com trissomia do 21 no clone leucêmico;
- A mesma mutação detectada nos primeiros dias de vida e após 3 anos corroboram a hipótese de que a origem da mutação ocorra intra-uterinamente e que o clone leucêmico se mantém em estado latente, proliferando após condições ditas ideais;
- A detecção de cinco novas mutações no *GATA1* demonstra a importância do rastreamento completo dos éxon 2 e 3, já que as alterações podem ocorrer ao longo de toda região codificadora;
- A partir disso, podemos considerar o gene *GATA1* como um marcador molecular importante no acompanhamento da criança com SD.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmed M, Stenberg A, Hall G, Thomas A, Smith O *et al*: Natural history of GATA1 mutations in Down Syndrome. *Blood*, 103: 2480-2489, 2004

Bennett BD, Cowley S, Jiang S, London R, Deug B, Grabarek J, Groopman JE, Goeddel DV, Avraham H. Identification and characterization of a novel tyrosine kinase from megakaryocytes. *The Journal of Biology Chemistry*, 269: 1068-1074, 1994

Berger R, Busson M, Dastugue N, Weiss IR, Michaux L, Hagemeijer A, Quilichini B, Benattar L, Bernard O, Romana SP. Acute megakaryoblastic leukemia and loss of the RUNX1 gene. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 164: 71-73, 2006

Bortolheiro TC Classificações morfológicas das síndromes mielodisplásicas: da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 28(3):194-197, 2006

Bourquin JP, Subramanian A, Langebrake C, Reinhart D, Bernard O, Bellerini P, *et al*. Identification of distinct molecular phenotypes in acute megakaryoblastic leukemia by gene expression profiling. *PNAS*, 103: 3339-3344, 2006

Callabi F e Cilli V. CBFA2T1, a gene rearranged in human leukemia, is a member of a multigene family. *Genetics*, 52: 332-341, 1998

Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G: A common precursor for hematopoietic and endothelial cells: *Development*, 125: 725-732, 1998

Creutzig V, Reinhard TD, Diekaup S, Dworzak M, Stary J, Zimmermann M. AML patients with Down syndrome have high cure rate with AML-BFM therapy with reduced dose intensity. *Leukemia*, 19: 1355-1360, 2005

Crispino JD: GATA1 mutation in Syndrome: Implications for biology and diagnosis of children with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*, 44: 40-44-, 2005 (a)

Crispino JD: GATA1 in normal and malignant hematopoiesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16:137, 2005 (b)

Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, Noel B, Sinet PM: Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *European Journal of Human Genetics*, 1:114-124, 1993

Deutsch VR & Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *British Journal of Haematology*, 134: 453-466, 2006

Eisbacher M, Holmes ML, Newton A, Hogg PJ, Khachigian LM, Crossley M, Chong BH. Protein-Protein Interaction between Fli-1 and GATA-1 Mediates Synergistic Expression of Megakaryocyte-Specific Genes through Cooperative DNA Binding. *Molecular and Cellular Biology*, 23: 3427-3441, 2003

Elagib KE, Racke F, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, and Goldfarb AN: RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood*, 101: 4333-4341, 2003

Gamis AS, Woods WG, Alonso TA, Buxton A, Lange B, Barnard DR, Gold S, Smith FO, Children's Cancer Group Study 2891. Increased age at diagnosis has a significantly negative effect on outcome in children with Down's Syndrome and acute myeloid leukemia: a report from the Children's Group Study CCG 2891. *Journal of Clinical Oncology*, 21: 3415-3422, 2003

Ge Y, Stout ML, Tatman DA, Jensen TL, Buck SA, Thomas RL: GATA1, Cytidine Deaminase, and the high cure rate of Down syndrome children with acute megakaryocytic leukemia: *Journal of National Cancer Institute*, 97:226-231, 2005

Ge Y, Dombkowski AA, LaFiura KM, Tatman D, Yedidi RS, Stout ML *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 KM, Dombkowski AA, Chen Q, Payton SG, Buck SA, Salagrama S, Diakow AE, Matherly LH e Taub JW. The role of the proto-oncogene ETS2 in acute megakaryocytic leukemia biology and therapy. *Leukemia*, 22: 521-529, 2008

Greene ME, Mundschau G, Wechsler J, McDevitt M, Gamis A, Karp J, Gurbuxani S, Arceci R, and Crispino JD: Mutation in GATA1 in both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia of Down Syndrome: *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 31: 351-, 2003

Gilliland, D. G. & Tallman, M. S. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell*, 1, 417–420, 2002

Groet J, McElwaine S, Spinelli M, Rinaldi A, Burtscher I, Mulligan C, Mensah A, Cavani S, Dagna-Bricarelli F, Basso G, Cotter FE, Nizetic D. Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet*, 361:1617–1620, 2003

Gurbuxani S, Vyas P, and Crispino JD: Recent insights into mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down Syndrome: *Blood*, 103: 399-406, 2004

Harigae, H., Xu, G., Sugawara, T., Ishikawa, I., Toki, T., Ito, E. : The *GATA1* mutation in an adult patient with acute megakaryoblastic leukemia not accompanying Down syndrome. (Letter) *Blood*, 103: 3242-3243, 2004.

Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M: Risks of leukaemia and solid tumors in individuals with Down's syndrome. *Lancet*, 355: 165-169, 2000

Hasle, H. *et al.* A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*, 17: 277–282, 2003

Hasle H, Lund B, Nyvold CG, Hokland P, Ostergaard M. *WT1* gene expression in children with Down syndrome and transient myeloproliferative disorder, *Leukemia Research*, 30: 543-546, 2005

Hassold T, Sherman S: Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clinical Genetics*, 57: 95-100, 2000

Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park H-S, Toyoda A, Ishii K, Totoki Y, Choi DK, *et al.*: The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature*, 405: 311-319, 2000

Hattori M, Matsuzakia, Siminoe A, Ihara K, Nakayama H, Hara T. High expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in blast cells from patients with Down Syndrome suffering from transient myeloproliferative disorder and organ fibrosis. *British Journal of Haematology*, 115: 472-475, 2001

Hirose Y, Kudo K, Kiyoi H, Hayashi Y, Naoe T, Kojima S. Comprehensive analysis of gene alterations in acute megakaryoblastic leukemia of Down's syndrome. *Leukemia*, 17: 2250–2252, 2003

Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, and Zipursky A: GATA 1 mutations in transiente leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down Syndrome. *Blood*, 101: 4301-4304 , 2003

Hitzler JK and Zipursky A: Origins of leukaemia in children with down syndrome. *Nature Reviews*, 5: 11-20, 2005

Hitzler JK. *GATA1* mutation as a clonal markers of minimal residual disease in acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome – a new tool with significant potential applicantions. *Leukemia Research*, 29: 1239-1240, 2005

Hitzler JK: Acute megakaryoblastic in Down syndrome. *Pediatric Blood & Cancer*, 49: 1066-1069, 2007

Holmes DK, Bates N, Murray M, Ladusans EJ, Morabito A, Bolton-Maggs PHB, Johnston TA, Walkenshaw S, Wyann RF, Bellantuono I. Hematopoietic progenitor cell deficiency in fetuses and children affected by Down's syndrome. *Experimental Hematology*, 34: 1611-1615, 2006

Holt SE, Brown EJ, Zipursky A: Telomerase and the benign and malignant megakaryoblastic leukemias of Down syndrome. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 24: 14-17, 2002

Hong W, Nakazawa M, Chen YY, Kori R, Vakoc CR, Rakowski C e Blobel GA. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *The EMBO Journal*, 24: 2367–2378, 2005

Ichikawa M, Asai T, Saito T, Seo S, Yamazaki I, Yamagata T, *et al.* AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nature Medicine*, 10: 299-304, 2004

Izraeli S, Rainis L, Hertzberg L, Smooha G, Briger Y. Trisomy of chromosome 21 in leukemogenesis. *Blood Cells Molecules & Diseases*, 39: 156-159, 2007

Kaushansky, K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *Journal of Clinical Investigation*, 115: 3339–3347, 2005

Kuhl C, Atzberger A, Iborra F, Nieswandt B, Porcher C, Vyas P. *GATA1* mediated megakaryocyte differentiation and growth control can be uncoupled and mapped to different domains in *GATA1*. *Molecular and Cellular Biology*, 25: 8592-8606, 2005

Lange BJ, Kobrinisky N, Barnard DR, Arthur DC, Buckley JD *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

Lécuyer E, Hoang T. SCL: From the origin of hematopoiesis to stem cells and leukemia. *Experimental Hematology*, 32: 11-24, 2004

Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 248: 1721-22, 1959

Li, Z. *et al.* Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nature Genetics*, 37, 613–619, 2005

Little J: Medical history of the index child in Little J (Ed): *Epidemiology of Childhood Cancer*. Lyon, France, IARCS Scientific Publications, 1999, p313

Long, M.W: Megakaryocyte differentiation events. *Seminars in Hematology*, 35: 192–199, 1998

Lutterbach B, Hiebert SW. Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene*, 245: 223-235, 2000

Macedo-Silva ML, Pombo-de-Oliveira MS, Raimondi S, Abdelhay E, Groos M, Ribeiro RC, Figueiredo AF, Figueiredo A, Amorim M, Souza MT, Souza AM, Liehr T. Chromosome 1 abnormalities in four infants with Down syndrome from acute megakaryoblastic leukemia, 2008 submitted

Magalhães IQ, Splendores A, Emerenciano M, Cordoba MS, Córdoba JC, Allemand PA, Ferrari I, Pombo-de-Oliveira MS. Transient neonatal myeloproliferative disorder without Down syndrome and detection of *GATA1* mutation. *Journal of Pediatric Hematology Oncology*, 27: 50-52, 2005

Magalhães IQ, Splendore A, Emerenciano M, Figueiredo A, Ferrari I, Pombo-de-Oliveira MS: *GATA1* mutations in acute leukemia children with Down syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 166: 112-116, 2006

McElwaine S, Mulligan C, Groet J, Spinelli M, Rinaldi A, Denyer G, Mensah A, Cavani S, Baldo C, Dagna-Bricarelli F, Hann I, Basso G, Cotter FE, Nizetic D: Microarray transcript profiling distinguishes the transient from the acute type of megacarioblastic leukaemia (M7) in Down's syndrome, revealing PRAME as a specific discriminating marker. *British Journal of Haematology*, 125: 729-742, 2004

Miller AS, Dykes DD, Polesky HT: A simple Salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 1215, 1988

Muller AM, Medvinsky A, Strouboults J, Grosveld F, Dzierzak E: Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity*, 1: 291-301, 1994

Mundschau G, Gurbuxani S, Gamis AS, Greene ME, Arcerci RJ, Crispino JD. Mutagenesis of *GATA1* is an initiating event in Down syndrome leukemogenesis. *Blood*, 10: 4298-4300, 2003

Mundschau G e Crispino JD. *GATA1*s goes germline. *Nature Genetics*, 38: 741-742, 2006

Novitzky N, Prindull G. Myelodysplastic Syndromes in children. A critical review of the clinical manifestations and management. *American Journal of Hematology*, 66: 212-222, 2000

Nutt, S.L., Metcalf, D., D'Amico, A., Polli, M. & Wu, L.: Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *Journal of Experimental Medicine*, 201: 221–231, 2005

Orkin SH. Diversification of hematopoietic stem cells to specific lineages: *Nature Reviews Genetics*, 1: 57-64, 2000

Pine S. R., Guo Q, Yin C, Jayabose S, Levendoglu-Tugal O, Ozkaynak F, Sandoval C. *GATA1* as a new target to detect minimal residual disease in both

transient leukemia and megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Leukemia Research*, 29: 1353-1356, 2005

Pine S. R., Guo Q., Yin C., Jayabose S., Druschel C. M., Sandoval C. Incidence and clinical implications of GATA1 mutations in newborns with Down syndrome. *Blood* 15, 110(6): 2128 – 2131, 2007.

Pombo-de-Oliveira MS e colaboradores. *Leucemias Agudas: Abordagem Imunomolecular no Diagnóstico e na Pesquisa*, 2008

Pombo-de-Oliveira MS, Koifman S and Brazilian Collaborative Study Group of Infant Leukaemia. Environmental exposures and risk of Infant leukaemia in Brazil. *Bood*. 102:886 (Abstr 3223), 2003

Rainis L, Bercovich D, Strehl S, Teigler-Schiegel 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 JE, Rosenthal E, Machol K, Strehl S, Gottgens B, Ito E, Izraeli S. The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. *Cancer Research*, 65: 7596–7602, 2005

Rekhtman N, Choe KS, Matushansky I, Murray S, Stopka T, Skoultchi AI. PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 23:7460–7474, 2003

Ribeiro R, Oliveira MS, Fairclough D, Hurwitz C, Mirro J, Behn FG, Head D, Silva ML, Ramond SC, Crist W, Krance R. Acute megakaryoblastic leukemia in children and adolescents: a retrospective analysis of 24 cases. *Leukemia and Lymphoma*, 10: 299-306, 1993

Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 340:1330-1340, 1999

Shimizu R, Engel JD e Yamamoto M. GATA1-related leukaemias. *Nature Reviews*, 8: 279-287, 2008

Shin MG, Choi HW, Kim HR, Klim MJ, Baek HJ, Han DK, Kook H, Hwang TJ, Kim HJ, Kim SH, Shin JH, Suh SP, Ryang DW. Tetrasomy 21 as a sole acquired abnormality without *GATA1* gene mutation in pediatric acute megakaryoblastic leukemia: A case report and review of the literature. *Leukemia Research*, 32:1615-1619, 2008

Shivasani RA *et al.* Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of trombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell*, 81: 695-704, 1995

Splendore A, Magalhães IQ, Pombo-de-Oliveira MS, *GATA1* mutations in myeloproliferative disorders: Nomenclature standardization and review of the literature. *Human Mutation*, 26: 390-392, 2005

Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, Jackers P, Papas TS, Ogawa M, e Watson DK. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos a targeted disruption of the *Fli1* transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 20: 5643-5652, 2000

Sullivan SG, Hussain R, Glasson EJ e Bittles AH. The profile and incidence of cancer in Down syndrome. *Journal of Intellectual Disability Research*, 51: 228-231, 2006

Taub JW, Mundschau G, Ge Y, Poulik JM, Qureshi F, Jensen T, James SJ, Matherly LH, Weschler J, Crispino JD: Prenatal origin of *GATA1* mutations may be an initiating step in the development of megakaryocytic leukemia in Down Syndrome. *Blood*, 104: 1588-1589, 2004

Tomer, A. Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2 N and 4 N) megakaryocytes. *Blood*, 104: 2722–2727, 2004

Vyas P, Roberts I. Down myeloid disorders: A paradigm for childhood preleukaemia and leukaemia and insights into normal megakaryopoiesis. *Early Human Development*, 82: 767-773, 2006

Wang X, Crispino JD, Letting DL, Nakazawa M, Poncs M e Blobel GA. Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA1 and FOG1: role of Ets transcription factors. *EMBO*, 21: 5225-5234, 2002

Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, Karp JE, Le Beau MM, Crispino JD. Acquired mutations in GATA-1s in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome: *Nature Genetics*, 32:148-152, 2002

Weiss MJ e Orkin SH. GATA transcription factors : key regulators of hematopoiesis. *Experimental Hematology*, 23: 99-107, 1995

Xu G, Nagano M, Kanazaki R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T *et al*: Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down Syndrome: *Blood*, 102: 2960-2968, 2003

Yang Q, Rasmussen SA, Friedman JM: Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study: *Lancet*, 23:1019-1025, 2002

Yang L, Han Y, Saurez F and Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia*, 21: 868-876, 2007

Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL, Taft LF, Gu Y, Pettay D, Flanders WD, Khoury MJ, Hassold TJ: Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. *American Journal of Human Genetics*, 58: 628-633,1996

Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. *Hematologia Fundamentos e Prática*. Editora Atheneu, 2001

Zeller B, Gustafsson G, Forestier E, Abrahamsson J, Clausen N, Heldrup J *et al.* Acute leukaemia in children with Down syndrome: a population-based Nordic study. *British Journal of Haematology*, 128: 797–804, 2005

9 ANEXOS

- **Banco de Dados**
- **Cromatogramas**
- **Eletroferogramas**
- **Artigos Publicados**
- **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**
- **Carta de Aprovação - CONEP**

