

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DA FAMÍLIA p53 E SUA VIA REGULATÓRIA
COMO FATORES DE RISCO PARA ANEUPLOIDIA**

JULIANO ANDRÉ BOQUETT

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau do Mestre em Genética e Biologia Molecular

ORIENTADORA: PROF^a. DRA LAVÍNIA SCHÜLER-FACCINI
CO-ORIENTADORA: DRA. ANA PAULA CARNEIRO BRANDALIZE

PORTO ALEGRE, MARÇO DE 2013

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Humana e Evolução do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e contou com o suporte financeiro do CNPq e INaGeMP.

O aluno recebeu bolsa de estudos concedida pelo CNPq vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora, Lavínia, por ter aceitado me orientar mesmo antes de me conhecer, com a disposição e alegria que conhecemos. Por ter me confiado este projeto e pelos ensinamentos ao longo destes dois anos. Ser seu orientado, além de um privilégio, é uma honra. Muito obrigado!

A Ana Paula Brandalize que, entre muitas coisas, me co-orientou também sempre com disposição, sendo fundamental para a realização deste trabalho. Por ter sido minha guia em Porto Alegre, facilitando a minha adaptação quando cheguei aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, em especial ao Elmo, que sempre colaborou desde quando eu era apenas um candidato deste programa.

Aos colegas do Laboratório 113: Bibi, Fernanda, Anderson, Mariana, Flavia, Marcelo, Luiza e Nicole, pelo companheirismo, pelas distrações necessárias, pelas discussões mais (e menos) filosóficas, tornando sempre o ambiente de trabalho o mais agradável possível. Em especial ao Lucas, que com sua ajuda facilitou a realização deste trabalho. Ao professor Nelson, pelo companheirismo e pelas conversas científicas e/ou esportivas.

Aos meus pais e meu irmão, pelo apoio e suporte dispensados nas minhas tomadas de decisão, acreditando que este é o melhor caminho.

Por fim, meu agradecimento mais do que especial à minha esposa Juliana, pelo apoio incondicional, por ter encarado esta mudança ao meu lado, por fazer sempre de tudo por nós dois, por ser a pessoa compreensiva e paciente que eu conheço. Impossível não amar você!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	5
Resumo	6
Abstract	7
Capítulo 1 - Introdução	8
1.1. Aneuploidia	9
1.2. Aneuploidia do 21	10
1.2.1 Característica, etiologia e fatores de risco	10
1.3. Família p53	13
1.4. Regulação da família p53	16
1.4.1 <i>MDM2</i>	17
1.4.2 <i>MDM4</i>	17
1.4.3 <i>USP7</i>	18
1.4.4 Regulação de p63 e p73	18
1.5. A família p53 e sua importância na reprodução, desenvolvimento e aneuploidia	19
1.6. Polimorfismos nos genes da família p53 e de sua via regulatória	22
Capítulo 2 - Objetivos	25
2.1. Justificativa	30
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
Capítulo 3 - Maternal SNPs in the p53 pathway: risk factors for trisomy 21?	27
Capítulo 4 - Análise do Polimorfismo c.43-4742T>G de <i>TP63</i>	53
Capítulo 5 - Discussão	57
Referências Bibliográficas	62
Anexo	74

LISTA DE ABREVIATURAS

A – Adenina

ADULT – *A*cro-*d*ermato-*u*ngual-*l*acrimal-*t*ooth

AEC – *A*nkyloblepharon, *e*ctodermal dysplasia and *c*lefting

C – Citosina

C. elegans – *Caenorhabditis elegans*

CEP-1 – proteína *C. elegans* p53-like-1

Cks2 – *Cyclin-dependent kinase subunit 2*

DBD – Domínio de ligação do DNA (*DNA Binding Domain*)

EEC – *E*ctrodactyly, *e*ctodermal dysplasia, *c*left lip/palate

G – Guanina

HAUSP – *Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease*

LIF – *Leukemia-inhibitory factor*

MDM2 – *Mouse double minute 2 homolog*

MDM4 – *Mouse double minute 4 homolog*

NA – Não disponível

OD – Domínio de oligomerização

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

SAM – Motivo alfa estéril (*Sterile alpha motif*)

SD – Síndrome de Down

SNP – Polimorfismo de base única (*Single Nucleotide Polymorphism*)

T – Timina

TA – Domínio transativação

TID – Domínio de inibição da transcrição

TP53 – *Tumor Protein p53*

TP63 – *Tumor Protein p63*

TP73 – *Tumor Protein p63*

tRNA – ácido ribonucleico transportador

USP 7 – *Ubiquitin-specific protease 7*

UV – Ultravioleta

RESUMO

A aneuploidia é o distúrbio cromossômico mais comum em humanos e ocorre em pelo menos 5% de todas as gestações clinicamente reconhecidas. A trissomia é o tipo de aneuploidia mais frequente, sendo a trissomia do 21 a mais comum entre os nascidos vivos. A não-disjunção meiótica é a principal causa da trissomia livre do 21, sendo responsável por 95% dos indivíduos afetados. Apesar de poder ocorrer em qualquer um dos genitores, em 90% dos casos a não-disjunção meiótica é de origem materna. A idade materna é o único fator comprovadamente ligado à aneuploidia em humanos. Estudos recentes indicam que a família gênica p53 exerce importante função como reguladora de processos de reprodução e desenvolvimento, limitando a propagação de células aneuplóides. Sua disfunção ou desequilíbrio pode levar a anomalias patológicas em humanos.

Este estudo teve como objetivo avaliar polimorfismos nos genes da família p53 e sua via regulatória como fatores de risco para Síndrome de Down (SD) em um estudo caso-controle. Foram analisados os polimorfismos c.215G>C do gene *TP53*, c.43-4742T>G do gene *TP63*, c.-30G>A e c.-20C>T do gene *TP73*, c.14+309T>G do gene *MDM2*, c.753+572C>T do gene *MDM4* e c.2719-234G>A do gene *USP7* em 263 mães de portadores da SD e 196 mães de crianças sem malformações. As frequências dos polimorfismos foram determinadas pelo método TaqMan de discriminação alélica através de PCR *real-time*.

A distribuição alélica e genotípica dos polimorfismos testados foi similar entre os grupos caso e controle, e não apresentou diferença estatisticamente significativa quando avaliada individualmente, mesmo quando controlado para idade materna. Entretanto, quando testada a interação gene-gene, a combinação dos alelos *TP53* C e *MDM2* G, e *TP53* C e *USP7* A foi associada a um aumento no risco de ter filho com SD (OR = 1,84 e 1,77; 95% IC; $P < 0,007$ e $0,018$, respectivamente).

Nossos resultados sugerem que, embora os polimorfismos estudados não estejam associados com o aumento no risco de trissomia do 21, seus alelos combinados podem ter um efeito sinérgico de maneira multifatorial. Neste trabalho, buscamos por diferentes fatores de susceptibilidade que poderiam predispor a nascimentos aneuplóides. Este é o primeiro trabalho a estabelecer uma relação entre polimorfismos na família gênica p53 e sua via regulatória como fator de risco para aneuploidia do 21.

ABSTRACT

The aneuploidy is the most common chromosomal disorder in humans, and occurs in at least 5% of all clinically recognized pregnancies. Trisomy is the most frequent type of aneuploidy, trisomy being 21 the most common among newborns. The meiotic nondisjunction is the leading cause of free trisomy 21, accounting for 95% of affected individuals. Although it can occur in any one parent, in 90% of cases the meiotic nondisjunction has maternal origin. Maternal age is the only factor demonstrably linked to aneuploidy in humans. Recent studies indicate that the p53 gene family plays an important role as a regulator of reproduction and development, limiting the spread of aneuploidy cells. Its dysfunction or imbalance can lead to pathological abnormalities in humans.

This study aimed to evaluate polymorphisms in genes of the p53 family, and its regulatory pathway as risk factors for Down syndrome (DS) in a case-control study. We analyzed the polymorphisms *TP53* c.215G>C (P72R), *TP63* c.43-4742T>G, *TP73* 4 c.-30G>A and 14 c.-20C>T, *MDM2* c.14+309T>G (SNP309), *MDM4* c.753+572C>T and *USP7* c.2719-234G>A in 263 mothers with DS and 196 mothers of children without malformations. The frequencies of polymorphisms were determined using the TaqMan allelic discrimination by real-time PCR.

The allelic and genotypic distribution of these polymorphisms tested was similar between case and control groups, and did not differ statistically when evaluated individually, even when controlling for maternal age. However, when assessed the gene-gene interactions, the combination of the alleles *TP53* C and *MDM2* G, and *TP53* C and *USP7* A was associated with an increased risk of having a child with Down Syndrome (OR = 1.84 and 1.77, 95% CI, $P < 0.007$ and 0.018 respectively).

Our results suggest that, although the evaluated polymorphisms are not associated with the risk of risk of 21 trisomy, the combined alleles may have a synergistic effect in a multifactorial way. In this study, we search by different susceptibility factors that could predispose to aneuploid births. This is the first study to establish a relationship between polymorphisms in the p53 gene family and its regulatory pathway as a risk factor for aneuploidy of 21.

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1.1. Aneuploidia

O processo de divisão meiótica é crucial durante a gametogênese, onde o genoma de uma célula diploide é reduzido pela metade para a formação de gametas haploides. Na primeira divisão meiótica – meiose I –, os cromossomos homólogos se pareiam, recombinaem por *crossing-over* e segregam para formar novos gametas. O pareamento inapropriado pode levar à segregação incorreta dos cromossomos homólogos, resultando na formação de gametas aneuplóides (Gerton & Hawley, 2005; Tsai & McKee, 2011).

A aneuploidia é o tipo mais comum e clinicamente significativo de distúrbio cromossômico humano, ocorrendo em pelo menos 5% de todas as gestações clinicamente reconhecidas (Hassold & Hunt, 2001). A trissomia é o tipo de aneuploidia mais frequente, onde o paciente possui três cromossomos no lugar de um par normal de um cromossomo em particular. Desde a primeira descrição de uma trissomia há 54 anos (Lejeune *et al.*, 1959), a origem das concepções trissômicas viáveis tem sido extensivamente estudadas e as síndromes de malformação são agora bem caracterizadas. A trissomia mais comum em nascidos vivos é a trissomia do 21.

É sabido que as trissomias derivam em sua maioria de erros na segregação dos cromossomos na meiose materna, principalmente na meiose I (Hall *et al.*, 2007; Hulten *et al.*, 2008; Bugge *et al.*, 2007). Embora a maioria das aneuploidias sejam incompatíveis com a vida, os nascidos vivos que possuem um cromossomo autossômico a mais representam as concepções trissômicas menos afetadas, apresentando deficiência mental e física (Hassold & Jacobs, 1984). Além disso, estudos acerca da etiologia e da origem parental da trissomia entre os indivíduos nascidos vivos têm sido realizados, especialmente naqueles com trissomia do cromossomo 21.

1.2. Aneuploidia do 21

1.2.1 Característica, etiologia e fatores de risco

A trissomia do cromossomo 21, conhecida como Síndrome de Down (SD), é a causa genética mais comum de deficiência mental em humanos (Hassold & Jacobs, 1984). Ela afeta muitos aspectos do desenvolvimento, produzindo um amplo e variável grupo de características clínicas nestes indivíduos (Epstein, 1991; Antonarakis & Epstein, 2006). Além de deficiência mental, os indivíduos com SD possuem outras características importantes como dificuldade de aprendizagem, malformações congênitas do coração, hipotonia na primeira infância, etc. (Antonarakis *et al.*, 2004). O fenótipo clássico de portadores da SD inclui estatura reduzida, pescoço curto, baixa implantação das orelhas, ponte nasal baixa, boca aberta, língua protrusa e sulcada, mãos curtas e largas com prega palmar única e clinodactilia (McCormick *et al.*, 1989; Rahmani *et al.*, 1989; Delabar *et al.*, 1993; Korenberg *et al.*, 1994). O fenótipo e as características dismórficas da SD são resultados da síntese excessiva dos produtos gênicos derivados da superexpressão dos genes presentes no cromossomo (Ait Yahya-Graison *et al.*, 2007; Prandini *et al.*, 2007).

A não-disjunção meiótica é a principal causa da trissomia livre do 21, sendo responsável por 95% dos indivíduos afetados (Antonarakis, 1998). Uma pequena proporção da ocorrência da SD (1,8%) se atribui a não-disjunção mitótica pós-zigótica (Hassold & Sherman, 2000). Em cerca de 5% dos casos ocorre uma translocação envolvendo o braço longo do cromossomo 21 e o braço longo de outro cromossomo acrocêntrico (geralmente o 14), formando um cromossomo translocado que substitui o cromossomo normal. Neste tipo de translocação os portadores são trissômicos apenas para os genes localizados no braço longo do cromossomo 21 (Petersen *et al.*, 1991, Shaffer *et al.*, 1992).

A não-disjunção meiótica pode ocorrer em qualquer um dos genitores, porém é mais frequente durante a meiose materna ocorrendo em cerca de 90% dos casos (Antonarakis, 1991; Freeman *et al.*, 2007), predominantemente na primeira divisão

meiótica (Antonarakis *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1996). Aproximadamente 10% dos casos ocorrem na meiose paterna, geralmente na segunda divisão meiótica – meiose II (Hassold & Sherman, 2000). A alta frequência de não-disjunção materna está associada a erros durante o pareamento e recombinação dos cromossomos homólogos, aumentando a chance de haver erros de segregação durante a divisão meiótica (Lamb *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2012).

A primeira divisão meiótica envolve a segregação dos cromossomos homólogos, enquanto que a meiose II envolve a segregação das cromátides irmãs. Nos homens a meiose começa na puberdade, enquanto nas mulheres este processo se inicia durante o desenvolvimento fetal, entre a 11^a e 12^a semana de gestação. Os oócitos avançam para a prófase meiótica, onde ocorrem os eventos de sinapse e recombinação, e entram em um longo estágio de parada, completando a primeira divisão celular apenas após a maturação sexual da mulher, logo após o oócito ser ovulado (Hassold & Hunt, 2001).

Está bem estabelecido que a idade materna avançada é um fator de risco para não-disjunção, e está associada especificamente a erros que ocorrem durante a oogênese (Hunt & Hassold, 2008). Em geral, a porcentagem de trissomias clinicamente reconhecidas sobe de 2% em mulheres com idade menor que 25 anos para 35% em mulheres com idade maior que 35 anos (Hassold & Sherman, 2000; Hunt & Hassold, 2008). Apesar de sua importância clínica, os mecanismos que dão origem à não-disjunção meiótica dependente da idade ainda não são bem compreendidos.

Várias hipóteses foram propostas ao longo dos anos para tentar explicar o efeito da idade materna na trissomia do 21. A maioria dos autores assume que o principal problema ocorre durante a segregação meiótica. Uma hipótese bastante discutida é a de que o efeito da idade avançada na etiologia da não-disjunção pode estar associada ao acúmulo de efeitos tóxicos relacionados ao ambiente no período em que o oócito está retido em prófase I e à degradação da maquinaria meiótica, tornando-a menos eficiente e mais propensa a erros na divisão meiótica (Oliver *et al.*, 2008).

Para que ocorra uma apropriada segregação durante a meiose I, é necessário que os cromossomos homólogos sofram recombinação e se mantenham fisicamente ligados até a segregação para polos opostos durante a anáfase I. O efeito da degradação do centrômero, dos complexos de coesina ou das proteínas do fuso com o envelhecimento do oócito pode

resultar em erros na segregação meiótica (Pan *et al.*, 2008). Uma hipótese que tenta explicar a não-disjunção meiótica dependente da idade seria de que a coesão entre as cromátides é deteriorada com a idade e os homólogos recombinantes se dissociam prematuramente, segregando aleatoriamente durante a primeira divisão meiótica (Subramanian & Bickel, 2008).

Usando *Drosophila* como modelo, Subramanian e Bickel (2008) testaram esta hipótese e observaram um aumento significativo na não-disjunção em meiose I quando a coesina *smc1* foi reduzida em oócitos envelhecidos. Além disso, o estágio onde os oócitos de *Drosophila* estão mais vulneráveis a erros relacionados à idade é análogo ao estágio em que os oócitos humanos permanecem em parada por décadas. Este achado reforça a hipótese de que os quiasmas são desestabilizados com a gradual perda de coesão ao longo do tempo. Estes dados suportam a hipótese de que o envelhecimento causa a perda prematura de conexões entre os cromossomos meióticos, sendo um importante fator para erros na segregação em oócitos de *Drosophila* e humanos (Subramanian & Bickel, 2008). Da mesma maneira, outros estudos recentes reforçaram a importância da quantidade de coesina para manutenção do processo de disjunção cromossômica, bem como sua relação com idade materna avançada (Hodges *et al.*, 2005; Chiang *et al.*, 2010; Garcia-Cruz *et al.*, 2010; Lister *et al.*, 2010)

Outras hipóteses buscam relacionar a idade materna à taxa e localização da recombinação dos cromossomos homólogos (Hassold *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 2004; Lamb *et al.*, 2005; Oliver *et al.*, 2008). A taxa de recombinação cromossômica é aproximadamente 1,6 vezes mais alta em mulheres do que em homens. O local da recombinação também difere, ocorrendo mais trocas nas regiões distais na recombinação meiótica dos homens (Coop & Przeworski, 2007). Nas mulheres, os locais de recombinação entre os cromossomos homólogos são estabelecidos no oócito fetal, mas são segregados apenas após anos de parada meiótica. Alguns cromossomos homólogos parecem exibir trocas em pontos que não são ideais, próximos ao centrômero ou aos telômeros. Essas trocas são mais susceptíveis a estarem associadas aos eventos de não-disjunção (Hassold *et al.*, 2007, Hussin *et al.*, 2011).

Oliver e colaboradores (2008) sugerem que o risco de erro na meiose I materna em que não há trocas, ou apenas um sítio de recombinação no cromossomo 21, é independente

da idade. Em contraste, erros na meiose II estão associados ao aumento da idade materna entre os cromossomos 21 que exibem apenas uma troca pericentromérica. Recentemente, um estudo demonstrou que o local de recombinação se aproxima do centrômero com o aumento da idade em oócitos com erros de segregação em meiose II, mas o mesmo não foi observado na meiose I, onde oócitos com erros de segregação apresentam locais de recombinação semelhantes aos de oócitos normais (Oliver *et al.*, 2012).

Cerca de 10 a 30% dos zigotos humanos possuem alguma alteração no número de cromossomos devido a erros durante a divisão meiótica. Como consequência, aproximadamente um terço de todos os abortos espontâneos são aneuplóides, sendo principal causa de perda gestacional (Hassold & Hunt, 2001). Além disto, aproximadamente 80% das concepções com trissomia do 21 são abortadas espontaneamente (Hassold & Jacobs, 1984).

1.3. Família p53

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53* (*Tumor protein p53*, OMIM 191170), foi identificada em 1979 em células de vírus de símios (SV40) associada a antígenos T. A partir do seu descobrimento, *TP53* passou a ser um dos genes mais estudados, tendo seu papel estabelecido como chave na supressão tumoral, também conhecido como “o guardião do genoma” (Lane, 1992). Durante quase uma década após seu descobrimento, *TP53* foi erroneamente intitulado como oncogene, sendo identificado como supressor tumoral apenas no final da década de 1980. Posteriormente, pesquisas revelaram que *TP53* codifica fatores de transcrição que atuam na regulação transcricional de um grupo de genes em resposta a sinais celulares (Levine & Oren, 2009).

A proteína p53 tem conhecida importância no controle do desenvolvimento de células tumorais e consequente estabilidade genômica em células somáticas, atuando como um fator de transcrição que regula um grande número de genes em resposta a uma variedade de danos celulares, incluindo a ativação de oncogenes e danos no DNA (Bullock & Fersht, 2001; Oren, 2003). O papel de p53 não está limitado à resposta a estresses e

danos celulares, mas também em manter a homeostase no organismo sob condições normais (Olovnikov *et al.*, 2009). Danos no DNA induzem a ativação funcional de p53 (Lane, 1992; Zheltukhin & Chumakov, 2010). Quando ativada, p53 dá início a várias respostas celulares como a parada do ciclo celular, reparo do DNA, senescência e apoptose (Levine *et al.*, 2006, Vousden & Lane, 2007).

Identificados apenas em 1997, os genes *TP63* (OMIM 603273) e *TP73* (OMIM 601990) compõem a família de genes que codificam fatores de transcrição relacionados a *TP53* (Kaghad *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1998). Suas proteínas, p63 e p73, também desempenham importante função em resposta a danos no DNA nas células, sendo capazes de induzir a parada no ciclo celular e apoptose independente de p53, embora o façam através de diferentes mecanismos (Flores *et al.*, 2002; Levine *et al.*, 2011). Em metazoários, o gene *TP53* deriva de um gene ancestral mais relacionado a uma combinação entre os genes *TP63* e *TP73* (Belyi *et al.*, 2010).

Em humanos, o gene *TP53* está localizado no cromossomo 17p13.1, possui 19.198 nucleotídeos e 11 éxons. Os genes *TP63* e *TP73* estão localizados nos cromossomos 3q27-29 e 1p36.3, respectivamente. *TP63* possui 265.822 nucleotídeos e 14 éxons, enquanto *TP73* conta com 80.728 e 14 éxons. Os genes *TP63* e *TP73* são maiores por possuírem íntrons maiores, além de um maior número de éxons, o que confere maiores níveis de recombinação no gene *TP63* e níveis intermediários em *TP73* quando comparados aos níveis de recombinação de *TP53* (Belyi *et al.* 2010).

As proteínas da família p53 apresentam grande similaridade de sequência no domínio de ligação do DNA (aproximadamente 55-58% entre p53 e p63/p73 e aproximadamente 87% entre p63 e p73) (Yang *et al.*, 2002). A arquitetura geral da proteína é altamente conservada desde *Drosophila* até humanos, consistindo em um domínio de ligação de DNA (DBD), um domínio de transativação N-terminal (TA) e um domínio de oligomerização C-terminal (OD). As proteínas p63 e p73 contêm ainda um domínio SAM (*sterile alpha motif*) na porção C-terminal, que participa nas interações proteína-proteína e um domínio de inibição da transcrição (TID), ambos sem equivalentes estruturais em p53 (Straub *et al.*, 2010) (figura 1).

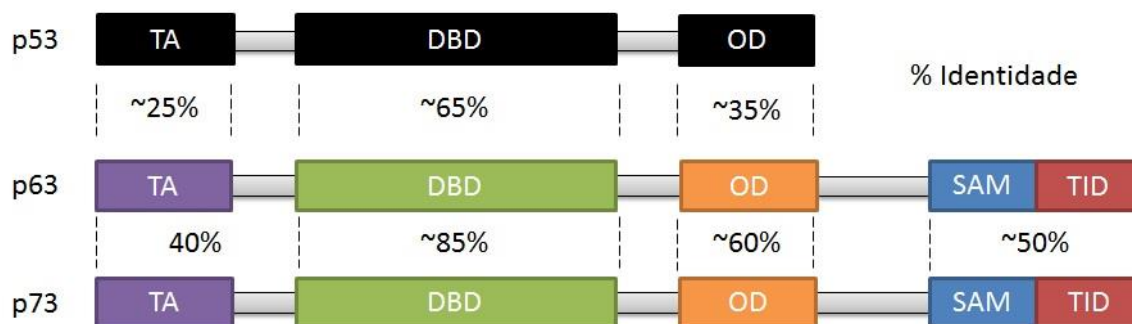


Figura 1. Estrutura gênica da família p53 (adaptado de Yang *et al.*, 2002).

As proteínas da família p53 ligam-se a sequências de DNA muito similares para regular a transcrição de um subgrupo de genes em comum e de um subgrupo de genes únicos para cada proteína (Wu *et al.*, 2011). A similaridade estrutural entre seus DBDs sugere que as proteínas da família p53 devem competir ou cooperar entre si na regulação de alvos transcricionais em comum (Yang *et al.*, 2002).

As proteínas p53 são conservadas evolutivamente. Homólogos dos genes da família p53 já foram descritos em vários organismos, incluindo moluscos, *C. elegans*, *Drosophila*, sapos e zebrafish (Derry *et al.*, 2001; Fernandes & Atchley, 2008; Nedelcu & Tan, 2007), sendo o domínio de ligação de DNA o mais conservado entre organismos diferentes (Wu *et al.*, 2011). Baseando-se na similaridade de sequência, as proteínas p53-like são mais proximamente relacionados com p63/p73 do que p53 em organismos primitivos e invertebrados (Rutkowski *et al.*, 2010; Belyi *et al.*, 2010). Portanto, provavelmente p63/p73 são mais antigas evolutivamente, e possivelmente p53 evoluiu de um gene p63/p73-like. A existência de proteínas “antigas” homólogas de p53 em organismos que não tem ameaças de câncer dentro de seu curto tempo de vida sugerem que as funções primordiais de p53 não sejam de supressor tumoral (Wu *et al.*, 2011).

Estudos em proteínas p53-like em organismos menores, incluindo *C. elegans* e *Drosophila*, observaram que a função do gene ancestral do qual *TP53* se origina é de disparar a apoptose em resposta a danos no DNA como medida de proteger a integridade genômica da linhagem germinativa e (Lu & Abrams, 2006; Junttila & Evan, 2009; Lu *et al.*, 2009) e a fidelidade dos processos de desenvolvimento garantindo o sucesso da prole (Feng *et al.*, 2011). Esta função é encontrada em invertebrados, como insetos e vermes, e

em vertebrados inferiores até humanos, mostrando a importância desta função durante a evolução de um bilhão de anos (Pintus *et al.*, 2007; Belyi *et al.*, 2010). Devido a sua conservação a partir de invertebrados até vertebrados, sugere-se que supressão tumoral não seja a função original do gene *TP53* (Feng *et al.*, 2011).

Assim, a função realizada pelo gene *TP53* em células somáticas teria sido adquirida a partir da função desempenhada pelo gene ancestral em células da linhagem germinativa. Com o desenvolvimento dos vertebrados as funções destes genes foram ampliadas, podendo atuar como reguladores transcricionais como, por exemplo, o *TP63* na produção da pele e outros órgãos, e o *TP73* na formação de partes dos sistemas nervoso e imune (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Os mamíferos contêm os três membros da família *TP53* em seu genoma, enquanto em invertebrados apenas um membro foi identificado, indicando que estes genes em mamíferos derivaram da triplicação de um gene ancestral (Bourdon *et al.*, 2005; Murray-Zmijewski *et al.*, 2006).

1.4. Regulação da família p53

Devido à importância e ao grande número de funções desempenhadas pela proteína p53, sua regulação é crucial para o correto funcionamento dos eventos celulares em que está envolvida. Uma regulação inapropriada dos níveis de p53 pode trazer consequências danosas para toda a comunidade celular. O controle central da via regulatória das proteínas p53 é formado por três genes principais e seus produtos: *MDM2* (*Mouse double minute 2 homolog*, OMIM 164785), *MDM4* (*Mouse double minute 4 homolog*, OMIM 602704) e *USP7* (*ubiquitin-specific protease 7*, OMIM 602519), também conhecida como *HAUSP* (*herpesvirus-associated*) (figura 2) (Brooks *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009).

1.4.1 MDM2

O gene *MDM2*, localizado no cromossomo 12q14.3-q15, codifica a proteína Mdm2, principal regulador negativo de p53. A proteína Mdm2 atua na proteína p53 como uma E3 ubiquitina ligase, induzindo a ubiquitinação de resíduos de lisina na sua região carboxi-terminal, degradando assim p53 (Kussie *et al.*, 1996; Rippin *et al.*, 2002; Brooks & Gu, 2006). A proteína Mdm2 é regulada positivamente pelo gene *TP53*, onde o aumento dos níveis de p53 leva a uma transcrição aumentada de *MDM2*. Assim, seu produto degrada p53 inibindo novamente seus níveis, resultando em um *feedback* negativo (Lahav *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2007). Este *feedback* negativo mantém a proteína p53 em baixos níveis na ausência de sinais de estresse, permitindo uma proliferação celular normal (Marine *et al.*, 2006; Toledo & Wahl, 2006).

1.4.2 MDM4

O gene *MDM4*, homólogo estrutural do gene *MDM2*, está localizado no cromossomo 1q32 e também está envolvido na regulação de p53. A proteína Mdm4 afeta indiretamente p53 modulando os níveis e atividade de Mdm2 (Marine *et al.*, 2006; Toledo & Wahl, 2006), não apenas estimulando a ubiquitinação de p53 mediada por Mdm2, mas também a auto-ubiquitinação de Mdm2 (Linares *et al.*, 2003). Mdm4 interage com Mdm2 formando um heterodímero com uma alta capacidade de ubiquitinação, levando assim, a degradação da p53 (Marine *et al.*, 2007; Wade *et al.*, 2010). A ativação transcricional de *TP53* pode ser inibida por Mdm4 independentemente de Mdm2, ligando-se ao domínio de transativação de *TP53*, o que contribui para a inibição total de p53 (Marine & Jochemsen, 2005; Francoz *et al.*, 2006; Toledo & Wahl, 2006).

1.4.3 USP7

Outro importante regulador da rota de sinalização p53, o gene *USP7*, localizado no cromossomo 16p13.3, atua na estabilização de Mdm2, Mdm4 e p53. A proteína Usp7 é uma protease ubiquitina específica, que reconhece e remove moléculas de ubiquitina de proteínas. Embora Usp7 tenha vários substratos, os mais estudados são a ubiquitina ligase E3 de p53 e Mdm2. Através de sua atividade de deubiquitinase, Usp7 protege p53 da degradação. Usp7 tem a capacidade de deubiquitinar também Mdm2 e Mdm4, sendo um importante componente regulador da via de sinalização de p53 (Li *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006b; Brooks *et al.*, 2007).

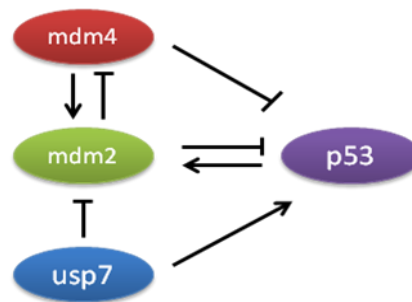


Figura 2. Via de sinalização de p53 (adaptado de Kang *et al.*, 2009).

1.4.4 Regulação de p63 e p73

As proteínas p63 e p73 são reguladas de forma semelhante à de p53. As funções desempenhadas pelas proteínas Mdm na via de p53 são compartilhadas com as proteínas p63 e p73. Tanto p63 quanto p73 contêm domínio transativação homólogo ao de p53. Os domínios transativação de p63 e p73 se ligam às proteínas Mdm de maneira semelhante ao domínio TA de p53. Mdm2 e Mdm4 formam complexos com o domínio TA de p63, embora as interações sejam mais fracas que com p53 e p73. A afinidade de p53 por Mdm2 é semelhante à afinidade com Mdm4, enquanto p63 e p73 interagem mais fortemente com

Mdm4, sugerindo que este tenha mais impacto na regulação intracelular de p63 e p73 (Zdzalik *et al.*, 2011). Ainda não se sabe se Usp7 também atua na regulação de p63 e p73.

1.5. A família p53 e sua importância na reprodução, desenvolvimento e aneuploidia

Estudos indicam que p53 desempenha papel chave na proteção de embriões a teratogênicos e diversos estresses ambientais, mostrando que as vias de resposta a danos no DNA p53-dependentes são altamente ativas no desenvolvimento do embrião (Nicol *et al.*, 1995; Norimura *et al.*, 1996; Hall & Lane, 1997). Uma grande quantidade da proteína p53 é produzida pela placenta humana em gestações anormais. Desta maneira, suspeita-se que p53 seja um importante fator para a patogênese de doenças placentárias através da indução da apoptose trofoblástica (Fulop *et al.*, 1998; Qiao *et al.*, 1998; Levy *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2006a). Defeitos neurodegenerativos e do sistema imune de portadores da Síndrome de Down estão relacionados com um índice aumentado de apoptose (Helguera *et al.*, 2005; Antonarakis & Epstein, 2006; Zana *et al.*, 2006; Roat *et al.*, 2007) , que pode estar relacionado ao aumento dos níveis pro-apoptóticos da proteína supressora tumoral p53 (Sawa *et al.*, 1997; Seidl *et al.*, 1999).

Experimentos com camundongos demonstraram o envolvimento dos genes da família p53 na reprodução (Hu, 2009). A atividade de p53 é necessária para a implantação do embrião no útero através da regulação transcricional do gene *LIF* (*Leukemia-inhibitory factor*, OMIM 159540), que codifica uma citocina com papel importante na implantação (Cheng *et al.*, 2002). Estes achados apontam para o papel desempenhado por esta família gênica na reprodução, principalmente na linhagem celular materna. A função dos genes da família p53 parecem ser as mesmas na reprodução de camundongos e de humanos (Feng, *et al.*, 2011).

Algumas evidências suportam o envolvimento funcional de p53 em células da linhagem germinativa. Estudos em *C. elegans* apontam para funções da proteína análoga de p53: cep-1 (*C. elegans* p53-like-1). Durante o desenvolvimento das células germinativas, cep-1 garante a correta segregação meiótica (Derry *et al.*, 2001). Ainda, a

expressão de *CEP-1* no final de paquíteno, associada ao estabelecimento da competência apoptótica, garante que células da linhagem germinativa com danos no DNA ou defeitos na recombinação meiótica sejam eliminadas antes da oogênese. Este processo garante que apenas células germinativas saudáveis avancem para a geração seguinte (Rutkowski *et al.*, 2011). Adicionalmente, proteínas cks2, que são componentes essenciais de complexos de ciclinas e estão envolvidas no controle do ciclo celular, possuem sua expressão controlada negativamente por p53 em nível transcricional e proteico. Essa regulação contribui para o controle da transição de metáfase I para anáfase I na meiose de mamíferos (Rother *et al.*, 2007).

A proteína p63 é o principal regulador do processo que controla a fidelidade da linhagem germinativa feminina através da proteção por eliminação (apoptose). p63 é ativada por fosforilação em resposta a danos no DNA, monitorando, assim, o seu reparo e podendo induzir a apoptose do óvulo para proteger a qualidade das linhagens germinativas femininas durante a parada meiótica (Suh *et al.*, 2006). A expressão de *TP63* também é essencial para a formação dos membros e da morfogênese da epiderme (Mills *et al.*, 1999).

Mutações em *TP63* estão associadas com algumas síndromes autossômicas dominantes como: síndrome EEC (*ectrodactyly, ectodermal dysplasia, cleft lip/palate*), síndrome AEC (*ankyloblepharon, ectodermal dysplasia and clefting*), síndrome ADULT (*acro-dermato-ungual-lacrima-tooth*), síndrome de Rapp-Hodgkin, síndrome de malformações de membros e mamas (*limb-mammary*) e malformação de mão/pé não-sindrômica (*split hand/foot malformation*) (Celli *et al.*, 1999; van Bokhoven *et al.*, 2001; Brunner *et al.*, 2002).

Estudos em camundongos apresentaram o envolvimento de *TP73* na manutenção da estabilidade genômica através do controle do *checkpoint* do fuso. Tomasini e colaboradores (2008) observaram que camundongos nocaute para p73 apresentavam um número diminuído de oócitos ovulados. Além disso, estes oócitos apresentavam um grande número de anormalidades no fuso, como fusos multipolares, fusos relaxados e dispersos, acompanhados de vários graus de desalinhamento. Neste mesmo estudo, culturas celulares 3T3 nocaute para *TP73* apresentaram perda ou ganho de um cromossomo, indicando aneuploidia.

Feng e colaboradores (2011) encontraram resultados semelhantes, onde

camundongos com óvulos deficientes de p73 apresentaram um grande aumento em anormalidades do fuso, aneuploidia e pouca competência no desenvolvimento. Em outro estudo, embriões obtidos a partir de oócitos nocaute para p73 apresentaram blastômeros multinucleados e blastocistos com número celular anormal (Tomasini *et al.*, 2009). Além disso, a expressão de *TP73* diminui naturalmente com o envelhecimento, o que pode contribuir para a ocorrência de aneuploidias em ovócitos envelhecidos (Tomasini *et al.*, 2008; Hu, 2009). Estes achados apontam para um papel de *TP73* na manutenção da estabilidade genômica (Tomasini *et al.*, 2008), atuando no *checkpoint* do fuso meiótico reduzindo a aneuploidia na prole (Tomasini *et al.*, 2009).

Embora todos os membros da família p53 estejam envolvidos no mesmo processo fisiológico de reprodução, eles regulam eventos moleculares distintos que ocorrem em estágios diferentes (figura 3) (Levine *et al.*, 2011).

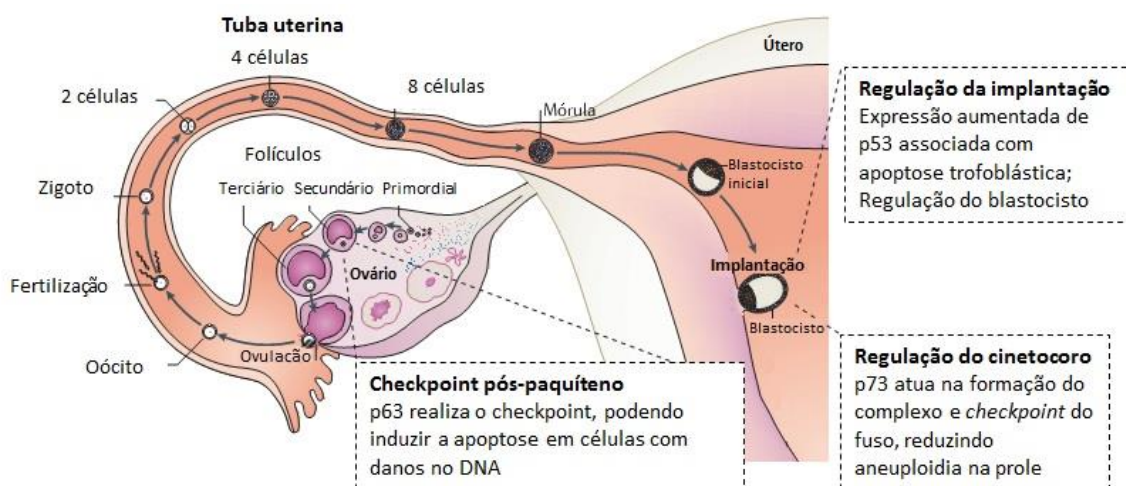


Figura 3: Proteínas da família p53 e sua regulação na reprodução materna (adaptado de Levine *et al.*, 2011).

Devido ao importante papel desempenhado pelas proteínas da família p53 como reguladores de processos cruciais do desenvolvimento, sua disfunção ou desequilíbrio pode levar a anomalias patológicas em humanos. Instabilidade genômica, aneuploidia, e polimorfismos de número de cópias que se originam na linhagem germinativa feminina e contribuem para um número de defeitos no desenvolvimento devem ser monitorados

geneticamente explorando alelos diferentes nos genes da família p53 (Hu, 2009).

1.6. Polimorfismos nos genes da família p53 e de sua via regulatória

Polimorfismos de base única (*single-nucleotide polymorphisms – SNPs*) exercem importante função nos genes da família p53 e nos genes da sua rota de sinalização. Em humanos, o polimorfismo c.215G>C (P72R, rs1042522) no gene *TP53* está localizado no domínio de ativação da proteína p53. A substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C) neste códon resulta na alteração do aminoácido de uma arginina (R72) por uma prolina (P72) (Buchman *et al.*, 1988).

As isoformas de p53 têm diferentes efeitos funcionais: R72 é de cinco a quinze vezes mais eficiente na indução da apoptose (Thomas *et al.*, 1999; Dumont *et al.*, 2003), enquanto P72 é mais efetivo na parada do ciclo celular e senescência (Pim & Banks, 2004). Estudos indicam que indivíduos homozigotos para o alelo P72 são mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores do que indivíduos homozigotos para o alelo R72.

A frequência alélica do polimorfismo R72P de p53 apresenta grande variação em diferentes populações. O alelo R72 de *TP53* tem frequência aproximada de 72% em euro-descendentes e apenas 33% em população em afro-descendentes (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010). Beckman e colaboradores (1994) observaram que a frequência do alelo P72 aumenta de maneira linear em múltiplas populações conforme sua proximidade com a linha do equador. Sua hipótese é de que este polimorfismo deva exercer impacto na função de p53, onde a alta exposição à luz UV em populações próximas ao equador levam à seleção do alelo P72 (Murphy, 2006).

Com relação à reprodução humana, o alelo P72 foi associado como fator de risco para aborto recorrente idiopático (Pietrowski *et al.*, 2005), aborto espontâneo (Firouzabadi *et al.*, 2009), falha de implantação recorrente (Kay *et al.*, 2006; Goodman *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009) e endometriose (Chang *et al.*, 2002; Hsieh & Lin, 2006; Ribeiro *et al.*, 2009; Paskulin *et al.*, 2012), indicando que p53 possa desempenhar um importante papel na reprodução. Recentemente, o alelo P72 foi apontado como fator de risco para gestações

gemelares, onde sua baixa eficiência apoptótica torna mais tolerante a gestação de múltiplos (Tagliani-Ribeiro *et al.*, 2012).

Outro polimorfismo no gene *TP63*, o c.43-4742T>G (rs17506395), foi associado à infertilidade em mulheres independentemente da idade (Feng *et al.*, 2011). *TP63* tem importante papel no controle da fidelidade da linhagem germinativa feminina, podendo induzir a apoptose em oócitos com danos no DNA de maneira independente de p53, como uma medida de proteção da qualidade da linhagem germinativa durante a parada meiótica. A associação deste polimorfismo com infertilidade em mulheres independente da idade sugere que p63 deva exercer outras funções na reprodução além de manter a integridade da linhagem germinativa feminina.

No gene *TP73*, dois polimorfismos completamente ligados nas posições 4 c.-30G>A (rs2273953) e 14 c.-20C>T (rs1801173), formam dois importantes SNPs. Estes polimorfismos estão localizados anteriormente ao códon de iniciação AUG no éxon 2, região que pode formar uma estrutura em forma de grampo com potencial de interferir na expressão gênica (Kaghad *et al.*, 1997). Estudos encontraram associação destes polimorfismos com risco aumentado para Doença de Alzheimer, leucoplasia e diversos tipos de câncer (Hamajima *et al.*, 2002; Misra *et al.*, 2009; Scacchi *et al.*, 2009). Uma recente meta-análise demonstrou que o genótipo AT/AT está significativamente associado com diversos tipos de câncer em diversas populações (Liu *et al.*, 2011).

O gene *MDM2* possui um importante polimorfismo funcional, o SNP c.14+309T>G (SNP309, rs2279744) que resulta em uma alteração de timina (T) para guanina (G) na região promotora (Bond *et al.*, 2004). Linhagens celulares homocigotas para o alelo G possuem uma maior estabilidade da proteína Mdm2. Além disso, esse genótipo aumenta os níveis de expressão de *MDM2* atenuando da função de p53 em resposta a estresse celular e danos no DNA (Bond *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2011).

No gene *MDM4*, o polimorfismo c.753+572C>T (rs1563828), resultante de uma substituição de uma citosina (C) para timina (T) no íntron 9 do gene *MDM4* apresenta relação com a reprodução humana. O alelo T deste polimorfismo está associado com a infertilidade em mulheres, sugerindo que *MDM4* possa regular a reprodução em vias dependentes e independentes de *TP53*, podendo ainda interagir com *TP63* e *TP73* (Kang *et al.*, 2009).

A alteração c.2719-234G>A (rs1529916), resultado da troca de uma guanina (G) por uma adenina (A) no íntron 25 do gene *USP7* resulta em um SNP que pode estar envolvido na reprodução humana através da regulação de p53 e da implantação (Kang *et al.*, 2009).

Na tabela 1 apresentamos os genes e suas variantes investigadas no presente estudo, bem como sua localização e frequência em populações euro e afro-descendentes.

Tabela 1: Polimorfismos investigados no presente estudo

Gene	Localização	Tipo de alteração	rs number	Frequência*	
				Euro-descendentes	Afro-descendentes
<i>TP53</i>	17p13.1	c.215G>C	rs1042522	G: 72%	G: 33%
<i>TP63</i>	3q27-29	c.43-4742T>G	rs17506395	T: 73%	T: 90%
<i>TP73</i>	1p36.3	4 c.-30G>A e 14 c.-20C>T	rs2273953 e rs1801173	G/C: 80%	G/C: 90%
<i>MDM2</i>	12q14.3-15	c.14+309T>G	rs2279744	T: 64%	T: 90%
<i>MDM4</i>	1q32	c.753+572C>T	rs1563828	C: 68%	C: 20%
<i>USP7</i>	16p13.3	c.2719-234G>A	rs1529916	G: 67%	G: 85%

* The 1000 Genomes Project Consortium, 2010

Os polimorfismos relacionados aos genes *TP53*, *TP63*, *TP73*, *MDM2*, *MDM4* e *USP7* estão intimamente associados com reprodução humana (Hu, 2009), onde sua regulação fina é extremamente importante na manutenção da estabilidade genômica da linhagem germinativa. No entanto, sua relação com erros no genoma, como as aneuploidias, ainda não foi descrita.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. Justificativa

Apesar da bem estabelecida associação entre aneuploidia e idade materna, as bases moleculares e bioquímicas dos processos de proteção das células contra alterações no genoma como as aneuploidias ainda não são bem compreendidas. Recentes evidências relacionam o papel desempenhado pela família gênica p53 e seus reguladores na manutenção da estabilidade genômica, estabilidade do fuso durante a meiose e desenvolvimento embrionário. Polimorfismos nos genes da via regulatória de p53 podem estar associados com a reprodução humana, onde sua regulação é importante na manutenção da estabilidade genômica da linhagem germinativa feminina.

2.1. Objetivo Geral

Investigar a relação entre os polimorfismos dos genes da família p53 e da sua via regulatória como fator de risco materno para aneuploidia.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar a frequência dos polimorfismos c.215G>C (rs1042522) do gene *TP53*, c.43-4742T>G (rs17506395) do gene *TP63*, c.-30G>A (rs2273953) e c.-20C>T (rs1801173) do gene *TP73*, c.14+309T>G (rs2279744) do gene *MDM2*, c.753+572C>T (rs1563828) do gene *MDM4* e c.2719-234G>A do gene *USP7* (rs1529916) em uma amostra mães de portadores de Síndrome de Down e de mães de crianças sem malformações;
- Determinar os efeitos destes polimorfismos como fatores genéticos de risco para SD, correlacionando-os com a idade materna ao nascimento do caso;
- Testar possíveis interações entre os genótipos dos polimorfismos estudados, já que estes fazem parte da mesma via metabólica.

CAPÍTULO 3

Maternal SNPs in the p53 pathway: risk factors for trisomy 21?

Artigo publicado na revista Disease Markers, vol. 34(1), p. 41-49, janeiro de 2013.

Maternal SNPs in the p53 pathway: risk factors for trisomy 21?

Juliano André BOQUETT^{1,2,4}, Ana Paula Carneiro BRANDALIZE, PHD^{1,2,3}, Lucas Rosa FRAGA^{1,2,4}, Lavínia SCHÜLER-FACCINI, MD, PHD^{1,2,3,4}.

1 – Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2 – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

3 – Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

4 – INAGEMP – Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to:

Lavinia Schuler-Faccini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Genética

Caixa Postal 15053 – Agencia Campus UFRGS

CEP 91501-970 / Porto Alegre – RS – Brasil

Phone: (51) 33086726 Fax: (51) 33598010

E-mail: lavinia.faccini@ufrgs.br

Abstract

The p53 family and its regulatory pathway play an important role as regulators of developmental processes, limiting the propagation of aneuploid cells. Its dysfunction or imbalance can lead to pathological abnormalities in humans. The aim of this study was to evaluate the effect of maternal polymorphisms *TP53* c.215G>C (P72R), *TP73* 4 c.-30G>A and 14 c.-20C>T, *MDM2* c.14+309T>G (SNP309), *MDM4* c.753+572C>T and *USP7* c.2719-234G>A as risk factors for Down Syndrome (DS) birth. A case-control study was conducted with 263 mothers of DS children and 196 control mothers. The distribution of these genotypic variants was similar between case and control mothers. However, the combined alleles *TP53* C and *MDM2* G, and *TP53* C and *USP7* A increased the risk of having offspring with DS (OR = 1.84 and 1.77; 95% CI; P < 0.007 and 0.018, respectively). These results suggest that, although the individual polymorphisms were not associated with DS birth, the effect of the combined genotypes among *TP53*, *MDM2* and *USP7* genes indicates a possible role of *TP53* and its regulatory pathway as a risk factor for aneuploidy.

Key words: Down syndrome, *TP53*, *TP73*, *MDM2*, *MDM4*, *USP7*.

1. Introduction

Down Syndrome (DS), characterized by trisomy of chromosome 21, is the most common cause of mental retardation in humans [23], occurring in 1 in 700-800 births [30]. The meiotic nondisjunction is the main cause of free 21 trisomy, event responsible for the aneuploidy 21 in 95% of affected individuals [3]. In 95% of cases, the nondisjunction occurs during maternal meiosis [1], mainly in the first meiotic division [2, 59]. It is well established that advanced maternal age is a risk factor for aneuploidy and is associated specifically with errors that occur during oogenesis [59].

Given the important role played by p53 family proteins as regulators of crucial developmental processes, their dysfunction or imbalance can lead to pathological abnormalities in humans. Genomic instability, aneuploidy and copy number polymorphisms that originate in the female germline and contribute to a number of developmental defects can be explored through investigations of the *TP53* gene family [26]. Encoded by *TP53* gene, the p53 protein has known importance in the prevention of tumors and genomic stability in somatic cells, acting as a transcription factor that regulates a large number of genes in response to cell damage, including activation of oncogenes and DNA damage [12, 35, 45]. When activated, p53 initiates cellular responses, such as cell cycle arrest, DNA repair, senescence and apoptosis [22, 27]. The loss of p53 allows the accumulation of aneuploid cells as a result of chromosomal instability. Thus, p53 and its regulatory pathway play a critical role in limiting the propagation of aneuploidy and preserving the nature of diploid human cells [55].

The central control of the p53 regulatory pathway consists of three major genes and their products: *MDM2* (*Mouse double minute p53 binding protein homolog 2*), *MDM4* (*Mouse double minute p53 binding protein homolog 4*) and *USP7* (*ubiquitin specific*

peptidase 7 (herpes virus-associated)), also known as *HAUSP* [10, 29]. The main negative regulator of the *TP53* is the protein *MDM2*, which acts on the p53 as an E3 ubiquitin ligase, leading to degradation of p53 [9, 31]. *MDM2* is upregulated by *TP53*, where the increase in p53 levels leads to increased transcription of *MDM2*. Thus, the product degrades p53 by inhibiting their levels, resulting in a negative feedback loop. This process maintains the p53 protein at low level in the absence of stress signals, allowing normal cell proliferation [42, 47]. Participating in the same metabolic pathway, the *TP73* gene plays a crucial role in maintaining the rate of ovulation and acting on the spindle checkpoint, reducing aneuploidy in the offspring [57]. p73 plays an important role in maintaining genomic integrity as well, which is particularly important when p53 function is compromised [5].

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of the p53 regulatory pathway have been targeted for study in research relating to human reproduction [16, 17, 29]. A common polymorphism in *TP53* c.215G>C (P72R, rs1042522) [11], a substitution at codon 72 that makes the induction of apoptosis less efficient [15, 54]. The *MDM2* gene has an important functional polymorphism c.14+309T>G (SNP309, rs2279744), the result of a thymine to guanine change in its promoter region [7], increasing *MDM2* expression and attenuating the p53 function [7, 16, 29]. A substitution in intron 9 of *MDM4* gene c.753+572C>T (rs1563828) is correlated with human reproduction, as well as c.2719-234G>A change in intron 25 of *USP7* gene (rs1529916) [29]. In *TP73*, two closely linked polymorphisms in position 4 c.-30G>A and 14 c.-20C>T (rs2273953, rs1801173) are located before the initiating codon in exon 2. This region can form a clamp-shaped structure with the potential to interfere in gene expression [28].

Thus, we hypothesized that polymorphisms related to *TP53* and *TP73* genes and

genes in their regulatory pathway - *MDM2*, *MDM4* and *USP7* - may be closely associated with human reproduction, where its fine regulation is extremely important in maintaining genomic stability of germline cells avoiding aberrations in its genome, as aneuploidies. This study investigated the influence of the *TP53* gene family and their regulators as risk factors for aneuploidy of chromosome 21. We analyzed the role of *TP53*c.215G>C polymorphism (rs1042522), *TP73*c.-30G>A (rs2273953) and c.-20C>T (rs1801173), *MDM2*c.14+309T>G (rs2279744), *MDM4*c.753+572C>T (rs1563828) and *USP7*c.2719-234G>A (rs1529916) as maternal risk factors for DS birth in a case-control study.

2. Materials and Methods

2.1 Subjects

All cases were identified through Medical Genetic Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) and local support groups of DS (APAEs). The control group consisted of women with healthy children who were randomly selected to participate in this study during the blood collection for routine laboratorial analyzes in the HCPA. The case-control study was conducted with 263 case mothers and 196 control mothers. Further details on the selection and sample characteristics can be found in our previously published work [8].

This study was approved by the Ethics Committee of HCPA. All mothers who participated in the study signed an informed consent form. We collected 5 mL of peripheral blood in EDTA tubes for genetic analysis.

2.2. Analysis of polymorphisms

DNA was extracted from blood samples as described by Lahiri and Nurnberger (1991) [32]. The SNPs of five genes of the p53 signaling pathway were genotyped,

including *TP53*, *TP73*, *MDM2*, *MDM4* and *USP7*. Genotypes were determined by using the following allelic discrimination Taqman probes (Applied Biosystems): C__2403545_10 (*TP53* gene), C__9493064_10 (*MDM4* gene) and C__9688119_1_ (*USP7* gene). Since these two loci are closely linked, the genotype determination of polymorphisms c.-30G>A (rs2273953) and c.-20C>T (rs1801173) of *TP73* gene was performed with the probe C__16180357_10 determining polymorphism c.-30G>A (rs2273953), a method previously used by Hamajima and colleagues (2002) [21] and Scacchi and colleagues (2009) [51]. To determine the genotype of *MDM2* gene c.14+309T>G, probes were used which were labeled with FAM-TCCCGCGCCGCAG and VIC-CTCCCGCGCCGAAG fluorescence and primers forward 5'-CGGGAGTTCAGGGTAAAGGT-3' and reverse 5'-ACAGGCACCTGCGATCATC-3'. The real-time PCR reactions were performed in 96 well plates in each reaction containing: 10ng of genomic DNA, 2x MasterMix Genotyping TaqMan (Applied Biosystems), probes specific for each polymorphism (40x) and enough water to reach 8 μ L. The reactions were conducted in the StepOnePlus™ PCR Real-Time System, with an initial cycle of 10 minutes at 95°C, followed by 45 cycles at 95°C for 15s and 63°C for 1 minute. The reactions for c.14+309T>G*MDM2* gene were also conducted in 96 well plates in each reaction containing: 10ng of genomic DNA, 2x MasterMix Genotyping TaqMan (Applied Biosystems), 1 μ M of each primer and probe, and sufficient water to reach 25 μ L. This reaction was also conducted in StepOnePlus™ PCR Real-Time Systems, with the initial cycle of 2 min at 50°C for 10 minutes and heating at 95°C, followed by 45 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 1 minute. The reaction products were analyzed on StepOne V2.2.2 Software.

2.3. Statistical Analysis

Statistical analysis were performed using SPSS software, version 14.0. The chi-square was used to test the Hardy-Weinberg equilibrium, to compare allelic and genotypic frequencies, to compare the ethnicity, and the frequency of spontaneous abortions between groups. The gene-gene additive effect was also analyzed by chi-square test and logistic regression models were used to control the effect of maternal age at the time of conception. For maternal age, a dichotomous variable was used (<35 or \geq 35 years) due to high prevalence of children with DS in women aged over 35 years, and t test was performed to compare the mean maternal age. The ORs were used to quantify the association between each polymorphism and the risk of having a DS child. Using Epi-Info software version 6.0, we estimated to be able to detect an OR of 2.5 with a sample size of 150 cases and 150 controls with an assumed power of 80% and confidence level of 95%. The Bonferroni's correction was applied for five tests in logistic regression analysis ($\alpha_{\text{Bonf}} = 0.01$).

3. Results

A total of 263 case mothers and 196 control mothers were studied. As expected, the mean maternal age was higher in case mothers (34.75 years \pm 8.05 vs 28.26 \pm 5.99, $P = 0.000002$) as well as the prevalence of mothers over 35 years of age in the case group (57% vs 20%, OR = 5.31, 95% CI = 3.45 – 8.17, $P < 0.000001$) (6 missing values in control group). The case group contained 237 (90.1%) mothers classified as Euro-descendants, 17 (6.5%) as African-descent and 9 (3.4%) classified as other ethnicity. In the control group, 175 (89.7%) mothers were classified as Euro-descendants, 10 (5.15%) as African-descent and 10 (5.15%) as other ethnicity (1 missing value). The ethnic groups did not differ significantly between groups ($P = 0.569$). A higher frequency of spontaneous abortions was observed in the case group (21.7% vs. 9.7%, $P < 0.001$).

Table 1 shows the distribution of genotypes and allele frequencies of the studied

polymorphisms between case and control groups, as well as in other European and Euro-descendant populations. The allelic and genotypic frequencies of polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium and did not differ between case and control groups when analyzed separately, even when controlled for maternal age, ethnicity and spontaneous abortion. Our observed allele frequencies are in accordance to those described for Euro-descendants.

The gene-gene additive effect was analyzed by a combination of *TP53* risk allele with the risk alleles of other genes of its pathway (*TP53* C and *MDM2* G; *TP53* C and *MDM4* T; *TP53* C and *USP7* A; *TP53* C and *TP73* A / T). As shown in Table 2, the risk of having a child with DS in women with risk alleles for *TP53* + *MDM2* and *TP53* + *USP7* is 1.84 and 1.77 times higher, respectively (95% CI and $P < 0.007$ and 0.018), when adjusted for maternal age. We additionally tested the interaction of *TP53*, *MDM2* and *USP7* risk alleles together. The risk of having a DS child with this genotype is 2.04 higher (95% IC and $P < 0.020$) when controlled for maternal age. Interestingly, women under the age of 35 years at the time of conception showed a higher frequency of *TP53* C allele associated with *USP7* A allele (OR = 1.99; 95% CI = 1.08 – 3.66; $P < 0.026$). When applying the Bonferroni's correction for multiple comparisons, the *TP53/MDM2* additive effect maintained its statistical significance both in the unadjusted and in adjusted for maternal age model. However, the gene-gene additive effect including *USP7* kept its significance only in the unadjusted analysis.

4. Discussion

Recent evidence has shown the important role played by p53 family as regulators of crucial processes related to human reproduction [14, 26]. Our working hypothesis was based on two main pieces of evidence: 1) The loss of p53 function or genes that regulate

this metabolic pathway may be related to the accumulation of aneuploid cells, increasing the risk of DS birth in women with these polymorphisms [55]. This same loss of function could also decrease the action of apoptotic mechanisms that would eliminate aneuploid embryos in women with wild alleles [56]. Even if the inactivation of p53 is not the primary cause of aneuploidy, its dysfunction strongly facilitates a tolerance to this chromosomal instability [5] and, 2) Loss of p73 function due to polymorphisms in its encoding gene may interfere in the control of the meiotic spindle during oogenesis, increasing the risk of aneuploidy in the offspring [56, 57]. The expression of *TP73* naturally decreases with age, therefore the loss of *TP73* function may contribute to the increase of aneuploidy produced by old oocytes [26, 56, 57]. In our sample about 43% of women were younger than 35 years at the time of the trisomic fetus conception. Thus, it becomes evident that mutations affecting the function of *TP73* may be related to increased frequency of aneuploid pregnancies in young women. Supporting this hypothesis, a recent study showed that mice deficient in p73 presented spindle abnormalities, aneuploidy and little competence in fetal development [17].

The present study showed that polymorphisms in *TP53*, *TP73*, *MDM2*, *MDM4* and *USP7* genes do not represent a risk factor in the process of aneuploidy when analyzed separately, even when controlled for advanced maternal age. The distributions of allelic and genotypic frequencies found in this study are consistent with that expected for populations with European ancestry. Despite the ethnic admixture present in the Brazilian population, Southern Brazil has strong European ancestry, and the majority of our cases and controls were classified as Euro-descendants. This was confirmed by the similarity of allele frequencies observed in our sample compared to 1000 Genomes [52] and HapMap [53] databases for europeans and european-descendants.

Taking into account that the p53 pathway studied depends on multiple protein interactions, we found that the combination of *TP53* and *MDM2* polymorphisms, and possibly *TP53* and *USP7* contributes to this increased risk. The effect of *TP53* C allele associated with *USP7* A allele is probably maternal age independent as women under the age of 35 years at the time of conception showed a higher frequency of *TP53* C allele associated with *USP7* A allele. These results indicate a synergistic effect between genes that act in the same pathway in a multifactorial way. The allele P72 reduces the efficiency of p53 to induce apoptosis. Acting in the same signaling pathway, the G allele increases the expression of *MDM2*, degrading more p53 and negatively influencing the induction of apoptosis in these cells [16]. Some studies showed that a large amount of p53 protein is produced by the human placenta in abnormal pregnancies. It is suspected that p53 is an important factor in the pathogenesis of diseases through the induction of trophoblast apoptosis [19, 24, 37, 48]. Thus, the interaction of these polymorphisms could decrease the levels of the pro-apoptotic p53 protein, making it less functional in response to cell damage. As a consequence, the reaction would be attenuated by trophoblastic apoptosis and promote greater tolerance of aneuploidy.

Although these polymorphisms have never been investigated as possible risk factors for aneuploidy in humans, some studies showed an association between SNPs of p53 pathway and fertility, suggesting a specific role of p53 in the regulation of human reproduction. Pietrowski and colleagues (2005) [46] reported an association of the P72 allele and recurrent miscarriages. However, Fang and colleagues (2011) [16] did not find any difference in genotype and allele frequency of *TP53* P72 and R72 forms through a case-control study involving women with miscarriages. They also reported that women with *TP53* P72/P72 genotype and *MDM2* G/G have a significantly higher expression of the

MDM2 protein, which may attenuate the response of apoptosis after DNA damage. The genes *MDM2*, *MDM4* and *USP7*, which produce proteins that regulate p53 level, had their minor alleles enriched in women seeking clinics for *in vitro* fertilization for the same SNPs studied [29, 36].

The R72 and P72 forms of *TP53* have different biological effects: R72 is more efficient in inducing apoptosis while P72 can promote a G1 arrest. This polymorphism seems to increase the chance of miscarriage in healthy women [46]. Thus, it is possible that genes that undergo selection in the *TP53* pathway may affect human reproduction [29]. The G allele of *MDM2*c.14+309T>G SNP is associated with a high risk of spontaneous abortion [16], which supports the combined effect between this *MDM2* polymorphism and R72P of p53 [7, 58]. The *MDM4* gene, that is structurally homologous with the *MDM2* gene, is also involved in the regulation of p53. The *MDM4* protein indirectly affects p53, modulating its levels as well as *MDM2* activity [42], not only stimulating the ubiquitination of p53 mediated by *MDM2*, but also the self-ubiquitination of *MDM2* [39]. The transcriptional activation of *TP53* by *MDM4* can be inhibited regardless of *MDM2* [18], by binding to the *TP53* trans-activation domain, that contributes to the total inhibition of p53 [41]. The T allele of this polymorphism is associated with fertility in women, suggesting that *MDM4* can regulate reproduction in a dependent and independent *TP53* pathways, and may also interact with *TP63* and *TP73* [29]. Another important regulator of the p53 signaling pathway, the *USP7* gene, acts in the stabilization of *MDM2*, *MDM4* and p53 by deubiquitinating these proteins [10, 25, 38]. Other studies also reported an association of *TP73* polymorphisms with increased risk for Alzheimer's disease, leukoplakia and several types of cancer [40,43, 51].

There are no functional studies regarding the polymorphism c.2719-234G>A of the

USP7 gene. Kang and colleagues (2009) [29] found an association of the mutated A allele with infertility, showing the impact of this SNP on human fertility through the attenuation of the p53 pathway. As in this work, we also found a higher frequency of this allele in women younger than 35 years. The *MDM2*, *MDM4* and *USP7* proteins maintain the levels and activity of p53 that are critical to an appropriate transcriptional response signal after cell stress [29].

In humans, the p53 gene family appears to play other important roles in reproduction: *TP53* is involved in the regulation of the blastocyst and *TP73* regulates the integrity of germ line cells [17]. Some evidence supports the involvement of p53 as functional in germline cells. Studies in *C. elegans* showed similar functions of that analogous to the p53 protein: *cep-1* (*C. elegans* p53-like-1). During the development of germ cells *cep-1* ensures correct meiotic segregation [13]. In addition, the expression of CEP-1 at the end of pachytene, associated with the establishment of apoptotic competence, ensures that the germline cells with DNA damage or defects in meiotic recombination are eliminated before oogenesis. This process ensures that only healthy germ cells advance to the next generation [50]. Additionally, *cks2* proteins, that are essential components of cyclins complexes, and are involved in cell cycle control, have their expression negatively controlled by p53 at transcriptional and proteic level. This regulation contributes to control the transition from metaphase I to anaphase I in mammals' meiosis [49].

Despite the well established association between DS and advanced maternal age, the biochemical and molecular basis of nondisjunction are still not well understood. Altered patterns of recombination are known risks for nondisjunction [33, 34]. More recently, Oliver and colleagues (2008) [44] have added support to the multifactorial etiology of nondisjunction in human meiosis. Their data suggested that pericentromeric

chromatid exchanges during meiosis in females interact with maternal age-related risk factors, altering the susceptibility to nondisjunction. One year later, Gosh and colleagues (2009) [20] tested this hypothesis in an independent and ethnically different population in India and their results were consistent with those of Oliver and colleagues (2008). In our study we searched for different susceptibility factors that could predispose to aneuploidy, and we looked also for a possible interaction with advanced maternal age. However, a logistic regression considering maternal age failed to show an interaction between p53 pathway, maternal age and aneuploidy.

In this article we presented recent evidence linking the role of the *TP53* family and its regulators in the maintenance spindle stability during meiosis and embryo development. Allied to this evidence and because of the lack of studies investigating the relationship of these polymorphisms with the genesis of aneuploidy in humans, this work is the first to establish a relationship between polymorphisms in the *TP53* gene family and its regulatory pathway as a risk factor for aneuploidy of 21. Future studies in other populations should be conducted to confirm our findings, especially to clarify the factors independent of maternal age which may be involved in the development of aneuploid cells.

Acknowledgments

The authors acknowledge INAGEMP – National Institute of Population Medical Genetics (grant CNPq 573993/2008-4) for the support provided to this project.

References

[1] S.E. Antonarakis, Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group, *N Engl J Med* **324** (1991), 872–876.

- [2] S.E. Antonarakis, M.B. Petersen, M.G. McInnis, P.A. Adelsberger, A.A. Schinzel, F. Binkert, C. Pangalos, O. Raoul, S.A. Slaugenhaupt, M. Hafez, M. M. Cohen, D. Roulson, S. Schwartz, M. Mikkelsenj, L. Tranebjaerg, F. Greenberg, D.I. Hoar, N.L. Rudd, A.C. Warren, C. Metaxotou, C. Bartsocas and A. Chakravarti, The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms, *Am J Hum Genet* **50** (1992), 544–550.
- [3] S.E. Antonarakis, 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome, *Genomics* **51** (1998), 1-16.
- [4] G.S. Atwal, GL Bond, S. Metsuyanin, M. Papa, E. Friedman, T. Distelman-Menachem, E. Ben Asher, D. Lancet, D.A. Ross, J. Sninsky, T.J. White, A.J. Levine and R. Yarden, Haplotype structure and selection of the MDM2 oncogene in humans, *Proc Natl Acad Sci USA* **104** (2007), 4524-4529.
- [5] Y. Aylon, M. Oren, p53: guardian of ploidy, *Mol Oncol* **5** (2011), 315-23.
- [6] G. Beckman, R. Birgander, A. Sjölander, N. Saha, P.A. Holmberg, A. Kivelä and L. Beckman, Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* **44** (1994), 266-270.
- [7] G.L. Bond, W. Hu, E.E. Bond, H. Robins, S.G. Lutzker, N.C. Arva, J. Bargonetti, F. Bartel, H. Taubert, P. Wuerl, K. Onel, L. Yip, S.J Hwang, L.C. Strong, G. Lozano and A.J Levine, A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans, *Cell* **119** (2004), 591–602.
- [8] A.P.C. Brandalize, E. Bandinelli, P.A. dos Santos, I. Roisenberg and L. Schüler-Faccini, Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as

maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects, *Am J Med Genet* **149A** (2009), 2080-2087.

[9] C.L. Brooks and W. Gu, p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond, *Mol Cell* **21** (2006), 307-315.

[10] C.L. Brooks, M. Li, M. Hu, Y. Shi and W. Gu, The p53-Mdm2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP, *Oncogene* **26** (2007), 7262–7266.

[11] V.L. Buchman, P.M. Chumakov, N.N. Ninkina, O.P. Samarina and G.P. Georgiev, A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene, *Gene* **70** (1988), 245–252.

[12] A.N. Bullock and A.R. Fersht, Rescuing the function of mutant p53, *Nature Rev Cancer* **1** (2001), 68-76.

[13] W.B. Derry, A.P. Putzke and J.H. Rothman, *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance, *Science* **294** (2001) 591-595.

[14] V. Dötsch, F. Bernassola, D. Coutandin, E. Candi and G. Melino, p63 and p73, the ancestors of p53, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2** (2010), a004887.

[15] P. Dumont, J.I. Leu, A.C. Della Pietra 3rd, D.L. George and M. Murphy, The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential, *Nat Genet* **33** (2003), 357–365.

[16] Y. Fang, B. Kong, Q. Yang, D. Ma and X. Qu, The p53-HDM2 gene-gene polymorphism interaction is associated with the development of missed abortion, *Hum Reprod* **26** (2011) 1252-1258.

[17] Z. Feng, C. Zhang, H.J. Kang, Y. Sun, H. Wang, A. Naqvi, A.K. Frank, Z.

Rosenwaks, M.E. Murphy, A.J. Levine and W. Hu, Regulation of female reproduction by p53 and its family members, *FASEB J* **25** (2011), 2245-2255.

[18] S. Francoz, P. Froment, S. Bogaerts, S. De Clercq, M. Maetens, G. Doumont, E. Bellefroid and J.C. Marine, Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA* **103** (2006), 3232-3237.

[19] V. Fulop, S.C. Mok, D.R. Genest, I. Szigetvari, I. Cseh and R.S. Berkowitz, c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 oncoproteins: expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma, *J Reprod Med* **43** (1998), 101–110.

[20] S Ghosh, E Feingold, S.K. Dey, Etiology of Down syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction, and maternal age across populations, *Am J Med Genet A* **149A** (2009) 1415-1420.

[21] N. Hamajima, K. Matsuo, T. Suzuki, T. Nakamura, A. Matsuura, S. Hatooka, M. Shinoda, Y. Koderac, Y. Yamamura, T. Hirai, T. Kato and K. Tajima, No association of p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p53 Arg72Pro polymorphism with the risk of digestive tract cancers in Japanese, *Cancer Lett* **181** (2002), 81–85.

[22] S.L. Harris and A.J. Levine, The p53 pathway: positive and negative feedback loops, *Oncogene* **24**(2005), 2899–2908.

[23] T. Hassold and P. Jacobs, Trisomy in man, *Ann Rev Genet* **18** (1984), 69–97.

[24] C. Hu, S.D. Smith, L. Pang, Y. Sadosky and D.M. Nelson, Enhanced basal apoptosis in cultured term human cytotrophoblasts is associated with a higher expression and physical interaction of p53 and Bak, *Placenta* **27** (2006), 978–983.

[25] M. Hu, L. Gu, M. Li, P.D. Jeffrey, W. Gu and Shi Y, Structural basis of competitive recognition of p53 and MDM2 by HAUSP/USP7: implications for the regulation of the

p53-MDM2 pathway, *PLoS Biol* **4** (2006) e27.

[26] W. Hu, The role of p53 gene family in reproduction, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1** (2009), a001073.

[27] S. Jin and A.J. Levine, The p53 functional circuit, *J cell sci* **114** (2001), 4139–4140.

[28] M. Kaghad, H. Bonnet, A. Yang, L. Creancier, J.C. Biscan, A. Valent, A. Minty, P. Chalon, J.M. Lelias, X. Dumont, P. Ferrara, F. McKeon and D. Caput, Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers, *Cell* **90** (1997), 809–819.

[29] H.J. Kang, Z. Feng, Y. Sun, G. Atwal, M.E. Murphy, T.R. Rebbeck, Z. Rosenwaks, A.J. Levine and W. Hu, Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans, *Proc Natl Acad Sci USA* **106** (2009), 9761-9766.

[30] E. Krivchenia, C.A. Huether, L.D. Edmonds, D.S. May and S. Guckenberger, Comparative epidemiology of Down syndrome in two United States populations, *Am J Epidemiol* **137** (1993), 815–828.

[31] P.H. Kussie, S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A.J. Levine and N.P. Pavletich, Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain, *Science* **274** (1996), 948–953.

[32] D.K. Lahiri and J.I. Nurnberger Jr, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies, *Nucleic Acids Res* **19** (1991) 5444.

[33] N.E. Lamb, S.B. Freeman, A. Savage-Austin, D. Pettay, L. Taft, Susceptible chiasma configurations of chromosome 21 predispose to nondisjunction in both maternal meiosis I and meiosis II, *Nat Genet* **14** (1996) 400–405.

- [34] N.E. Lamb, E. Feingold, A. Savage, D. Avramopoulos, S. Freeman, Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21, *Hum Mol Genet* **6** (1997) 1391–1399.
- [35] A.J. Levine, W. Hu and Z. Feng, The P53 pathway: what questions remain to be explored?, *Cell Death Differ* **13** (2006), 1027–1036.
- [36] A.J. Levine, R. Tomasini, F.D. McKeon, T.W. Mak and G. Melino, The p53 family: guardians of maternal reproduction, *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (2011), 259-265.
- [37] R. Levy, S.D. Smith, K. Yusuf, P.C. Huettner, F.T. Kraus and Y. Sadovsky, Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression, *Am J Obstet Gynecol* **186** (2002), 1056–1061.
- [38] M. Li, D. Chen, A. Shiloh, J. Luo, A.Y. Nikolaev, J. Qin and W. Gu, Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization, *Nature* **416** (2002), 648-653.
- [39] L.K. Linares, A. Hengstermann, A. Ciechanover, S. Müller and M. Scheffner, HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53, *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (2003), 12009-12014.
- [40] F. Liu, L. Liu, B. Li, Y.G. Wei, L.N. Yan, T.F. Wen, M.Q. Xu, W.T. Wang and J.Y. Yang, p73 G4C14-A4T14 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 27 case–control studies, *Mutagenesis* **26** (2011), 573-581.
- [41] J-C. Marine and A.G. Jochemsen, Mdmx as an essential regulator of p53 activity, *Biochem Biophys Res Commun* **331** (2005), 750-760.
- [42] J-C. Marine, S. Francoz, M. Maetens, G. Wahl, F. Toledo and G. Lozano, Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4, *Cell Death Differ*

13 (2006), 927-934.

[43] C. Misra, M. Majumder, S. Bajaj, S. Ghosh, B. Roy and S. Roychoudhuryet, Polymorphisms at p53, p73, and MDM2 Loci Modulate the Risk of Tobacco Associated Leukoplakia and Oral Cancer, *Molecular Carcinogenesis* **48** (2009), 790-800.

[44] T.R. Oliver, E. Feingold, K. Yu, V. Cheung, S. Tinker, M. Yadav-Shah, N. Masse, S.L. Sherman, New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes, *PLoS Genet.* **4** (2008):e1000033.

[45] M. Oren, Decision making by p53: life, death and cancer, *Cell Death Differ* **10** (2003) 431–442.

[46] D. Pietrowski, H. Bettendorf, E.K. Riener, C. Keck, L.A. Hefler, J.C. Huber and C. Tempfer, Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumor suppressor gene, *Hum Reprod* **4** (2005), 848–851.

[47] C. J. Proctor and D.A. Gray, Explaining oscillations and variability in the p53-Mdm2 system, *BMC Syst Biol* **2**(2008), 75.

[48] S. Qiao, T. Nagasaka, T. Harada and N. Nakashima p53, Bax and Bcl-2 expression, and apoptosis in gestational trophoblast of complete hydatidiform mole, *Placenta* **19** (1998), 361–369.

[49] K. Rother, M. Dengl, J. Lorenz, K. Tschöp, R. Kirschner, J. Mössner and K. Engeland, Gene expression of cyclin-dependent kinase subunit Cks2 is repressed by the tumor suppressor p53 but not by the related proteins p63 or p73, *FEBS Lett* **581** (2007), 1166-1172.

[50] R. Rutkowski, R. Dickinson, G. Stewart, A. Craig, M. Schimpl, S.M. Keyse and A. Gartner, Regulation of *Caenorhabditis elegans* p53/CEP-1-dependent germ cell apoptosis

by Ras/MAPK signaling, *PLoS Genet* **7** (2011):e1002238.

[51] R. Scacchi, G. Gambina, G. Moretto and R.M. Corbo, Association study between P53 and P73 gene polymorphisms and the sporadic late-onset form of Alzheimer's disease, *J Neural Transm* **116** (2009), 1179–1184.

[52] The 1000 Genomes Project Consortium, A map of human genome variation from population-scale sequencing, *Nature* **467** (2010) 1061–1073.

[53] The International HapMap Consortium, Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations, *Nature* **467** (2010), 52-58.

[54] M. Thomas, A. Kalita, S. Labrecque, D. Pim, L. Banks and G. Matlashewski, Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically, *Mol Cell Biol* **19** (1999), 1092–1100.

[55] S.L. Thompson and D.A. Compton, Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism, *J Cell Biol* **188**(2010), 369-81.

[56] R. Tomasini, K. Tsuchihara, M. Wilhelm, M. Fujitani, A. Ruffini, C.C. Cheung, F. Khan, A. Itie-Youten, A. Wakeham, M.S. Tsao, J.L. Iovanna, J. Squire, I. Jurisica, D. Kaplan, G. Melino, A. Jurisicova and T.W. Mak, TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions, *Genes Dev* **22** (2008), 2677–2691.

[57] R. Tomasini, K. Tsuchihara, C. Tsuda, S.K. Lau, M. Wilhelm, A. Ruffini, M.S. Tsao, J.L. Iovanna, A. Jurisicova, G. Melino, T.W. Mak, TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity, *Proc Natl Acad Sci USA* **106** (2009), 797-802.

[58] Y. Wan, W. Wu, Z. Yin, P. Guan, B. Zhou, MDM2 SNP309, gene-gene interaction, and tumor susceptibility: an updated meta-analysis, *BMC Cancer* **11** (2011), 208.

[59] P.W. Yoon, S.B. Freeman, S.L. Sherman, L.F. Taft, Y. Gu, D. Pettay, W.D. Flanders, M.J. Khoury and T.J. Hassold, Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study, *Am J Hum Genet* **58** (1996), 628-633.

Tables

Table 1
Allelic and genotypic frequencies of SNPs in the *TP53* pathway

Gene	Genotype / Allele	Case n (%)	Control n (%)	<i>P</i> *	Expected allele frequency**	
					1000 Genomes [52]	HapMap [53]
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	116 (44.1)	99 (50.5)	0.322		
	GC	123 (46.8)	78 (39.8)			
	CC	24 (9.1)	19 (9.7)			
<i>MDM2</i> (rs2279744)	G	355 (67.5)	276 (70.4)	0.386	78.9	76.7
	TT	104 (39.5)	82 (41.9)			
	TG	123 (46.8)	81 (41.3)			
<i>MDM4</i> (rs1563828)	GG	36 (13.7)	33 (16.8)	0.949	64.0	NA
	T	331 (62.9)	245 (62.5)			
	CC	88 (33.5)	70 (35.7)			
<i>USP7</i> (rs1529916)	CT	124 (47.1)	87 (44.4)	0.843	67.9	65.0
	TT	51 (19.4)	39 (19.9)			
	C	300 (57.0)	227 (57.9)			
<i>TP73</i> (rs2273953 and rs1801173)	GG	125 (47.5)	101 (51.5)	0.282		
	GA	122 (46.4)	78 (39.9)			
	AA	16 (6.1)	17 (8.6)			
	G	372 (70.7)	280 (71.4)	0.873	67.3	68.9
	GG / CC	161 (61.2)	109 (55.6)			
	GA / CT	87 (33.1)	71 (36.2)			
	AA / TT	15 (5.7)	16 (8.2)	0.181	79.9	NA
	G / C	409 (77.8)	289 (73.7)			

*Chi-square

** Data from european and euro-descendants populations

NA = not available

Table 2
Risk allele combinations in the TP53 pathway

Alleles†	Case n (%)	Control n (%)	P*	OR (IC 95%)	P**	OR (IC 95%)**
<i>TP53C</i> + <i>MDM2G</i>	94 (35.7)	46 (23.5)	0.006	1.81 (1.17 – 2.81)	0.007	1.84 (1.18 – 2.89)
<i>TP53C</i> + <i>MDM4T</i>	96 (36.5)	65 (33.2)	0.521	1.16 (0.77 – 1.74)	0.536	1.14 (0.75 – 1.74)
<i>TP53C</i> + <i>USP7A</i>	80 (30.4)	37 (18.9)	0.007	1.88 (1.18 – 3.00)	0.018	1.77 (1.10 – 2.85)
<i>TP53C</i> + <i>TP73A/T</i>	58 (22.0)	43 (21.9)	0.933	1.01 (0.63 – 1.61)	0.760	1.08 (0.66 – 1.75)
<i>TP53C</i> + <i>MDM2G</i> + <i>USP7A</i>	51 (19.4)	19 (9.7)	0.006	2.24 (1.24 – 4.10)	0.020	2.04 (1.12 – 3.71)

† Includes the presence of the allele in homozygosis or heterozygosis.

* Chi-square (Yates correction).

** P and OR adjusted for maternal age by logistic regression.

Supplementary Tables

Table S1
Allelic and genotypic frequencies of SNPs in the *TP53* pathway in euro-descendants

Gene	Genotype / Allele	Case n (%)	Control n (%)	<i>P</i> *	Expected allele frequency**	
					1000genomes [52]	HapMap [53]
<i>TP53</i> (rs1042522)	GG	106 (44.7)	92 (52.6)	0.164		
	GC	113 (47.7)	67 (38.3)			
	CC	18 (7.6)	16 (9.1)			
<i>MDM2</i> (rs2279744)	G	325 (68.6)	251 (71.7)	0.369	78.9	76.7
	TT	96 (40.5)	75 (42.9)			
	TG	109 (46.0)	73 (41.7)			
<i>MDM4</i> (rs1563828)	GG	32 (13.5)	27 (15.4)	0.991	64.0	NA
	T	301 (63.5)	223 (63.7)			
	CC	83 (35.0)	63 (36.0)			
<i>USP7</i> (rs1529916)	CT	111 (46.8)	81 (42.3)	0.978		
	TT	43 (18.2)	31 (17.7)			
	C	277 (58.4)	207 (59.1)			
<i>TP73</i> (rs2273953 and rs1801173)	GG	111 (46.8)	87 (49.7)	0.482		
	GA	111 (46.8)	73 (41.7)			
	AA	15 (6.4)	15 (8.6)			
	G	333 (70.3)	247 (70.6)	0.982	67.3	68.9
	GG / CC	149 (62.9)	98 (56.0)			
	GA / CT	76 (32.0)	63 (36.0)			
	AA / TT	12 (5.1)	14 (8.0)	0.117	79.9	NA
	G / C	374 (78.9)	259 (74.0)			

*Chi-square

** Data from european and euro-descendants populations

NA = not available

Table S2
Risk allele combinations in the *TP53* pathway showing data for euro-descendants only

Alleles [†]	Case n (%)	Control n (%)	<i>P</i> [*]	OR (IC 95%)	<i>P</i> ^{**}	OR (IC 95%) ^{**}
<i>TP53C</i> + <i>MDM2G</i>	82 (34.6)	38 (21.7)	0.006	1.91 (1.19 – 3.06)	0.009	1.90 (1.17 – 3.06)
<i>TP53C</i> + <i>MDM4T</i>	82 (34.6)	55 (31.4)	0.569	1.15 (0.75 – 1.79)	0.551	1.14 (0.73 – 1.79)
<i>TP53C</i> + <i>USP7A</i>	72 (30.4)	32 (18.3)	0.007	1.95 (1.19 – 3.22)	0.016	1.85 (1.12 – 3.06)
<i>TP53C</i> + <i>TP73A/T</i>	50 (21.1)	34 (19.4)	0.770	1.11 (0.66 – 1.86)	0.502	1.19 (0.71 – 2.02)
<i>TP53C</i> + <i>MDM2G</i> + <i>USP7A</i>	45 (19.0)	15 (8.6)	0.005	2.50 (1.29 – 4.88)	0.016	2.23 (1.16 – 4.60)

[†] Includes the presence of the allele in homozygosis or heterozygosis.

^{*} Chi-square (Yates correction).

^{**} *P* and OR adjusted for maternal age by logistic regression.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DO POLIMORFISMO C.43-4742T>G DE *TP63*

Como apresentado no capítulo 1, mutações em *TP63* estão associadas a algumas síndromes autossômicas dominantes. *TP63* está envolvido na manutenção das células epiteliais e é essencial para o desenvolvimento e formação da pele e membros (Yang *et al.*, 2002). Adicionalmente, estudos em camundongos demonstraram que a proteína p63 é expressa constitutivamente nas células germinativas femininas durante a parada meiótica. A expressão de p63 foi verificada em tecidos do ovário de camundongos, mas não nos testículos. Durante a parada meiótica, p63 pode ser ativada por fosforilação em resposta a danos no DNA, podendo induzir a apoptose em oócitos com danos no DNA de maneira independente de p53 (Suh *et al.*, 2006). p63 é ativada por fosforilação através da tirosina quinase c-abl, e induz um grupo de genes pró-apoptóticos, como *PUMA* (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), e *NOXA*, conduzindo uma apoptose eficiente e independente de p53 (Gonfloni *et al.*, 2009).

Em humanos, o gene *TP63* é o de maior tamanho da família p53, e é o que apresenta maiores taxas de recombinação. *TP63* é um gene altamente polimórfico: segundo dados do HapMap Phase 3, *TP63* possui mais de 160 SNPs em populações euro e afro-descendente (Belyi *et al.*, 2010). Apenas em 2011 foi publicado o primeiro trabalho de associação entre *TP63* e reprodução humana. Feng e colaboradores (2011) encontraram associação entre o alelo T do SNP c.43-4742T>G (rs17506395) e infertilidade. Este polimorfismo consiste em uma substituição do tipo transversão e ocorre no íntron 4 do gene.

Com o objetivo de avaliar a relação de membros da família p53 com aneuploidia, decidimos também investigar o SNP c.43-4742T>G no presente trabalho. O genótipo foi determinado através de discriminação alélica utilizando a sonda TaqMan (Applied Biosystems) C__32460279_10. As reações de PCR *real-time* e as análises estatísticas foram conduzidas como descrito no capítulo 3.

As frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo c.43-4742T>G do gene *TP63* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Como apresentado na tabela 2, o alelo G foi mais frequente no grupo casos, porém, não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas e genotípicas entre casos e controles. As frequências alélicas observadas em casos e controles não diferiram mesmo quando controlado para idade materna, etnia e aborto espontâneo e estão de acordo com o descrito para euro-

descendentes no banco de dados 1000 Genomes (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010).

Tabela 2. Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo c.43-4742T>G do gene *TP63*

Gene	Genótipo	Caso n (%)	Controle n (%)	<i>P</i> *	Frequência alélica esperada**
<i>TP63</i> (rs17506395)	TT	151 (57.4)	119 (62.6)	0.520	73%
	TG	98 (37.3)	63 (33.2)		
	GG	14 (5.3)	8 (4.2)		
	T	400 (76.0)	301 (79.2)	0.297	
	G	126 (24.0)	79 (20.8)		

*Qui-quadrado

** População europeia (The 1000 Genomes Project Consortium, 2010)

O efeito da interação gene-gene foi analisado através da combinação do alelo de *TP63* mais frequente no grupo casos com os alelos de risco dos demais genes da família e da via de p53 (*TP63* G e *TP53* C; *TP63* G e *MDM2* G; *TP63* G e *MDM4* T; *TP63* G e *USP7* A; *TP63* G e *TP73* A/T). Como apresentado na tabela 3, não houve diferença estatisticamente significativa entre casos e controles na análise de interação, mesmo quando realizado ajuste para idade materna por regressão logística.

Tabela 3. Combinações de alelos de risco da via de *TP53* com o alelo G de *TP63*

Alelos [†]	Caso n (%)	Controle n (%)	<i>P</i> *	OR (IC 95%)	<i>P</i> **	OR (IC 95%)**
<i>TP63G</i> + <i>TP53C</i>	58 (22.0)	36 (19.0)	0.492	1.21 (0.74 – 1.98)	0.347	1.27 (0.77 – 2.12)
<i>TP63G</i> + <i>MDM2G</i>	66 (25.1)	38 (20.0)	0.246	1.34 (0.83 – 2.16)	0.183	1.39 (0.85 – 2.27)
<i>TP63G</i> + <i>MDM4T</i>	70 (26.6)	48 (25.3)	0.830	1.07 (0.69 – 1.68)	0.801	0.94 (0.59 – 1.45)
<i>TP63G</i> + <i>USP7A</i>	62 (23.6)	36 (19.0)	0.287	1.32 (0.81 – 2.15)	0.321	1.28 (0.78 – 2.11)
<i>TP63G</i> + <i>TP73A/T</i>	41 (15.6)	28 (14.7)	0.907	1.07 (0.62 – 1.86)	0.988	1.00 (0.57 – 1.77)

[†] Presença do alelo em homozigose ou heterozigose.

* Qui-quadrado (correção de Yates).

** *P* e OR ajustados para idade materna por regressão logística.

Recentemente foram testadas possíveis associações entre SNPs do gene *TP63* e infertilidade. No estudo de Feng e colaboradores (2011) foi encontrada associação entre o polimorfismo c.43-4742T>G do gene *TP63* e infertilidade, onde alelo T deste SNP

apresentou uma frequência maior em mulheres inférteis do que no grupo controle, tanto em mulheres com idade superior quanto em mulheres com idade inferior a 35 anos (78,8% vs. 70,9%; $P = 0,004$). Desta maneira, este polimorfismo pode estar sendo selecionado através de pressão evolutiva (Feng *et al.*, 2011).

De maneira diferente, no nosso estudo o alelo G foi mais frequente no grupo casos do que no grupo controle, porém a diferença não foi estatisticamente significativa (tabela 2). A proteína p63 é controlada pelas proteínas mdm2 e mdm4 de maneira semelhante à regulação de p53 (Zdzalik *et al.*, 2011). Ainda, as proteínas da família p53 cooperam entre si na regulação de alvos transcricionais em comum (Yang *et al.*, 2002). A fim de verificar a relação destes polimorfismos de maneira multifatorial, testamos a interação dos polimorfismos de p63 com os outros genes da família p53 e de sua via regulatória (tabela 3). Não houve diferença estatisticamente significativa entre casos e controles, mesmo quando controlado para a idade materna.

Em conclusão, o SNP c.43-4742T>G do gene *TP63* não está associado ao risco de nascimentos com trissomia do 21 na amostra testada. Até o presente, não existem estudos funcionais com relação a este polimorfismo.

CAPÍTULO 5
DISCUSSÃO

Desde a identificação da trissomia do 21 como etiologia da síndrome de Down, muitos esforços foram realizados a fim de entender seus processos causais. A idade materna ainda é o único fator etiológico reconhecido para a ocorrência da SD. Mulheres com idade superior a 35 anos de idade têm maior chance de ter um filho afetado, o que também foi observado na presente amostra. Sabe-se também que de 30 a 70% das concepções trissômicas são perdidas (Kuo *et al.*, 2002), e que após o processo de abortamento, o risco de uma concepção trissômica nas gestações seguintes aumenta quase duas vezes (Bianco *et al.*, 2006). No presente estudo, o número de mães com história de abortamento prévio também foi maior no grupo casos quando comparados com o grupo controle.

A associação entre o aumento da idade materna e a SD foi reconhecida por Penrose já em 1933, muito tempo antes de Lejeune descrever a trissomia do cromossomo 21 em 1959 (Lejeune *et al.*, 1959). Apesar dos esforços realizados em anos de pesquisa, a idade materna ainda é, até o momento, o único fator indiscutivelmente ligado à aneuploidia em humanos. A forte associação entre idade materna e trissomia, juntamente com as mudanças nas tendências reprodutivas onde a idade materna tem aumentado constantemente ao nascimento do primeiro filho, sugerem que o problema das aneuploidias não tende a diminuir (Hunt & Hassold, 2008).

Muitas pesquisas buscam elucidar fatores que influenciam na taxa de não-disjunção meiótica, responsável por 95% dos casos de SD. Muitas delas se concentram no processo de divisão meiótica, buscando, por exemplo, encontrar relações entre sítios e taxas de recombinação com a idade materna. Além disso, recentes observações mostram uma possível associação de polimorfismos presentes em genes envolvidos no metabolismo do folato/homocisteína como fator de risco materno para SD (James *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2005; Brandalize *et al.*, 2009; Brandalize *et al.*, 2010).

Evidências sugerem que as proteínas da família p53 desempenham importante papel como reguladores de processos cruciais relacionados a reprodução humana (Dötch *et al.*, 2010; Hu 2009). Nesta pesquisa propusemos uma nova abordagem com base nos sistemas que controlam erros no genoma e assim possibilitem uma maior tolerância ao desenvolvimento de embriões aneuplóides. Nossa hipótese de trabalho se baseou em duas evidências principais: 1) A perda da função de p53 e p63 ou de genes que regulam suas

vias metabólicas podem estar relacionadas ao acúmulo de células aneuplóides, aumentando o risco de SD em mulheres portadoras destes polimorfismos (Thompson & Compton, 2010). Esta mesma perda de função poderia ainda estar diminuindo a ação de mecanismos apoptóticos que eliminariam embriões aneuplóides em mulheres com alelos selvagens (Tomasini *et al.*, 2008). A proteína p63 está envolvida no reparo do DNA e controle da apoptose no óvulo, e p53 na implantação do blastocisto e apoptose do trofoblasto. Mesmo que a inativação de p53 não seja a causa primária das aneuploidias, sua disfunção provavelmente facilite uma tolerância à esta instabilidade cromossômica resultante de outros danos celulares (Aylon e Oren, 2011) e, 2) A perda de função de p73 devido a polimorfismos presentes em seu gene codificante podem interferir no controle do fuso meiótico durante a oogênese, aumentando o risco de aneuploidia na prole (Tomasini *et al.*, 2008; Tomasini *et al.*, 2009).

A expressão de *TP73* diminui naturalmente com o envelhecimento, assim, a perda na função de *TP73* pode contribuir para o aumento de aneuploidias produzidas por ovócitos normais envelhecidos (Tomasini *et al.*, 2008; Tomasini *et al.*, 2009; Hu, 2009). Em nossa amostra cerca de 43% das mulheres tinham idade inferior a 35 no ato da concepção do feto trissômico. Desta maneira se torna evidente o fato de que mutações que afetam a função do gene *TP73* podem estar relacionados a maior frequência de gestações aneuplóides em mulheres jovens. p73 também participa na regulação da montagem do *checkpoint* do fuso durante a mitose e meiose. Camundongos deficientes em p73 apresentam defeitos na organização do fuso, o que leva a uma embriogênese desequilibrada. Estudos com camundongos deficientes para p73 sugere que p73 pode estar envolvido na manutenção apropriada dos fusos mitótico e meiótico, necessários para o correto alinhamento e estabilidade genômica (Tomasini *et al.*, 2009).

O presente estudo mostrou que os polimorfismos nos genes *TP53*, *TP63*, *TP73*, *MDM2*, *MDM4* e *USP7* não representaram um fator de risco materno no processo de aneuploidia quando analisados isoladamente, mesmo quando controlados pela idade materna no ato da concepção. Considerando que a via de p53 estudada depende de múltiplas interações de proteínas, a combinação dos polimorfismos de *TP53* e *MDM2*, e possivelmente *TP53* e *USP7* contribuem para este risco em nossa amostra. O efeito do alelo C de *TP53* associado com o alelo A de *USP7* provavelmente é independente da idade materna, pois mulheres com idade inferior a 35 anos no ato da concepção mostraram uma

frequência mais alta do alelo C de *TP53* associado com o alelo A de *USP7*. Estes resultados indicam um efeito de sinergia entre os genes que atuam na mesma via metabólica de maneira multifatorial. O alelo P72 diminuiu a eficiência de p53 na indução de apoptose. Atuando na mesma via de sinalização, o alelo G aumenta a expressão de *MDM2*, degradando mais p53 e influenciando negativamente a indução da apoptose nestas células (Fang *et al.*, 2011).

Baseado nestes resultados, a interação gênica destes dois polimorfismos poderiam diminuir os níveis pró-apoptóticos da proteína p53, tornando-a menos funcional em resposta a danos celulares. Como consequência, a reação de apoptose trofoblástica seria atenuada e promoveria maior tolerância a aneuploidias. Recentemente, um estudo encontrou associação entre o alelo P72 e gemelaridade, apontando para um papel pós-implantação de p53, onde P72 conferiria maior tolerância para gestações de múltiplos (Tagliani-Ribeiro *et al.*, 2012).

Embora estes polimorfismos nunca tenham sido investigados como possíveis fatores de risco para aneuploidia em humanos, alguns estudos apresentaram uma associação entre SNPs da via de p53 e fertilidade, sugerindo um papel específico de p53 na regulação da reprodução humana. Pietrowski e colaboradores (2005) relataram uma associação significativa do alelo P72 com abortos recorrentes. Porém, Fang e colaboradores (2011) não encontraram diferença na frequência alélica ou genotípica das formas R72 e P72 do gene *TP53* em um estudo caso-controle envolvendo mulheres com abortamento. Eles observaram ainda que mulheres com o genótipo P72/P72 para o gene *TP53* e G/G para o gene *MDM2* possuem uma expressão significativamente alta da proteína Mdm2, podendo atenuar a reação de apoptose seguida de danos no DNA. Kay e colaboradores (2006) foram os primeiros a associar o alelo P72 de *TP53* com falha de implantação recorrente. Tais resultados foram posteriormente confirmados por Kang e colaboradores (2009). Um recente estudo realizado com população brasileira encontrou associação entre P72 e endometriose (Paskulin *et al.*, 2012).

O alelo G do SNP309 do gene *MDM2* está associado com um alto risco de abortamento espontâneo (Fang *et al.*, 2011), o que suporta o potencial efeito de interação entre o SNP309 de *MDM2* e o polimorfismo R72P de p53 (Bond *et al.*, 2004; Wan *et al.*, 2011). Linhagens celulares homozigotas para o alelo G do SNP309 de *MDM2* têm uma

resposta transcricional e apoptótica atenuada de p53, devido a uma habilidade diminuída de p53 estabilizar após danos no DNA (Murphy, 2006).

Os fusos mitótico e meiótico em células eucariontes são essenciais para a segregação cromossômica normal e para manter a estabilidade genômica após a divisão celular. Perturbações durante a maturação do oócito podem alterar o seu desenvolvimento, alterando as proteínas motoras do fuso. Estas perturbações podem afetar a expressão dos componentes do fuso, levando à uma segregação cromossômica anormal, podendo resultar em aneuploidia e influenciando na viabilidade do oócito (Baird *et al.*, 2005). Existem cada vez mais evidências na literatura implicando os membros da família p53 na prevenção da instabilidade genômica e aneuploidia, embora os detalhes de suas ligações moleculares ainda não estejam esclarecidos (Duensing & Duensing, 2005).

Neste estudo apresentamos evidências ligando o papel da família p53 e seus reguladores na manutenção da estabilidade do fuso durante a meiose e desenvolvimento do embrião. Aliado a esta evidência, e devido à carência de estudos investigando a relação destes polimorfismos com a gênese da aneuploidia em humanos, este trabalho é o primeiro a estabelecer uma relação entre polimorfismos na família p53 e sua via regulatória como fatores de risco materno para aneuploidia. Estudos em outras populações devem ser conduzidos para confirmar nossos achados, especialmente para esclarecer os fatores independentes da idade materna que devem estar envolvidos no desenvolvimento de células aneuplóides.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ait Yahya-Graison E, Aubert J, Dauphinot L, Rivals I, Prieur M, Golfier G, Rossier J, Personnaz L, Creau N, Blehaut H *et al.* (2007) Classification of human chromosome 21 gene-expression variations in Down syndrome: impact on disease phenotypes. *Am J Hum Genet*, 81:475–491.

Antonarakis SE (1991) Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med* 324: 872–876.

Antonarakis SE, Petersen MB, McInnis MG, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Pangalos C, Raoul O, Slaugenhaupt SA, Hafez M, *et al.* (1992) The meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. *Am J Hum Genet* 50:544–550.

Antonarakis SE (1998) 10 years of Genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomics* 51(1):1-16.

Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Raymond A, e Deutsch S (2004) Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 5:725–738.

Antonarakis SE e Epstein CJ (2006) The challenge of Down syndrome. *Trends Mol Med* 12:473–479.

Aylon Y e Oren M (2011) p53: guardian of ploidy. *Mol Oncol* 5:315-323.

Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, Sunde A, Templeton A, Van Steirteghem A, Cohen J *et al.*; ESHRE Capri Workshop Group (2005) Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 3:261-276.

Beckman G, Birgander R, Sjölander A, Saha N, Holmberg PA, Kivelä A e Beckman L (1994) Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 44(5):266-270.

Belyi VA, Ak P, Markert E, Wang H, Hu W, Puzio-Kuter A e Levine AJ (2010) The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a001198

Bianco K, Caughey AB, Shaffer BL, Davis R, Norton MR (2006) History of miscarriage and increased incidence of fetal aneuploidy in subsequent pregnancy. *Obstet Gynecol* 107:1098-1102.

Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC, Bargonetti J, Bartel F, Taubert H, Wuerl P, *et al.* (2004) A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 119:591–602.

Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville M e Lane DP (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 19:2122–2137.

Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA, Roisenberg I e Schüler-Faccini L (2009) Evaluation of C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene as maternal risk factors for Down syndrome and congenital heart defects. *Am J Med Genet* 149A(10):2080-2087.

Brandalize AP, Bandinelli E, dos Santos PA e Schüler-Faccini L (2010) Maternal gene polymorphisms involved in folate metabolism as risk factors for Down syndrome offspring in Southern Brazil. *Dis Markers* 29(2):95-101.

Brooks CL e Gu W (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* 21:307-315.

Brooks CL, Li M, Hu M, Shi Y, Gu W (2007) The p53-Mdm2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene* 26:7262-7266.

Brunner HG, Hamel BC e Van Bokhoven H (2002) The p63 gene in EEC and other syndromes. *J Med Genet* 39:377-381.

Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP e Georgiev GP (1988) A variation in the structure of the protein-coding region of the human p53 gene. *Gene* 70:245-252.

Bugge M, Collins A, Hertz JM, Eiberg H, Lundsteen C, Brandt CA, Bak M, Hansen C, de Lozier CD, Lespinasse J, Tranebjaerg L, Hahnemann JMD, Rasmussen K, Bruun-Petersen G, Duprez L, Tommerup N, Petersen MB (2007) Non-disjunction of chromosome 13. *Hum Mol Genet* 16:2004-10.

Bullock AN e Fersht AR (2001) Rescuing the function of mutant p53. *Nature Rev Cancer* 1:68-76.

Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, Van Buggenhout G e van Haeringen A *et al* (1999) Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 99:143-153.

Cheng JG, Rodriguez CI e Stewart CL (2002) Control of uterine receptivity and embryo implantation by steroid hormone regulation of LIF production and LIF receptor activity: towards a molecular understanding of "the window of implantation". *Rev Endocr Metab Disord* 3:119-126.

Chiang T, Duncan FE, Schindler K, Schultz RM, Lampson MA (2010) Evidence that weakened centromere cohesion is a leading cause of age-related aneuploidy in oocytes. *Curr Biol* 20:1522-1528.

Coop, G e Przeworski, M (2007) An evolutionary view of human recombination. *Nat Rev Genet* 8:23-34.

Delabar JM, Theophile D, Rahmani Z, Chettouh Z, Blouin JL, Prieur M, Noel B e Sinet PM (1993) Molecular mapping of 24 features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet* 1:114-124.

- Derry WB, Putzke AP, Rothman JH (2001) *Caenorhabditis elegans* p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* 294:591-595.
- Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E e Melino G (2010) p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;00:a004887.
- Duensing A e Duensing S (2005) Guilt by association? p53 and the development of aneuploidy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 331(3):694-700.
- Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC 3rd, George DL e Murphy M. (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 33:357-365.
- Epstein CJ (1991) Aneuploidy and morphogenesis. *Prog Clin Biol Res* 373:1-18.
- Fang Y, Kong B, Yang Q, Ma D e Qu X (2011) The p53-HDM2 gene-gene polymorphism interaction is associated with the development of missed abortion. *Hum Reprod* 26(5):1252-1258.
- Feng Z, Zhang C, Kang HJ, Sun Y, Wang H, Naqvi A, Frank AK, Rosenwaks Z, Murphy ME, Levine AJ *et al.* (2011) Regulation of female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J* 25(7):2245-2255.
- Fernandes AD, Atchley WR (2008) Biochemical and functional evidence of p53 homology is inconsistent with molecular phylogenetics for distant sequences. *J Mol Evol* 67:51-67.
- Firouzabadi RD, Ghasemi N, Rozbahani MA e Tabibnejad N (2009) Association of p53 polymorphism with ICSI/IVF failure and recurrent pregnancy loss. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 49:216-219.
- Flores ER, Tsai KY, Crowley D, Sengupta S, Yang A, McKeon F, Jacks T (2002) p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416:560-564.
- Francoz S, Froment P, Bogaerts S, De Clercq S, Maetens M, Doumont G, Bellefroid E e Marine JC (2006) Mdm4 and Mdm2 cooperate to inhibit p53 activity in proliferating and quiescent cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(9):3232-3237.
- Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL, Tinker SW, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, Royle MH, Torfs CP *et al.* (2007) The National Down Syndrome Project: design and implementation. *Public Health Rep* 122:62-72.
- Fulop V, Mok SC, Genest DR, Szigetvari I, Cseh I e Berkowitz RS (1998) c-myc, c-erbB-2, c-fms and bcl-2 oncoproteins: expression in normal placenta, partial and complete mole, and choriocarcinoma. *J Reprod Med* 43:101-110.
- Garcia-Cruz R, Briño MA, Roig I, Grossmann M, Velilla E, Pujol A, Cabero L, Pessarrodona A, Barbero JL, Garcia Caldés M (2010) Dynamics of cohesin proteins REC8,

STAG3, SMC1 beta and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes. *Hum Reprod* 25:2316–2327.

Gerton JL, Hawley RS (2005) Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nat Rev Gen* 6:477–487.

Gonfloni S, Di Tella L, Caldarola S, Cannata SM, Klinger FG, Di Bartolomeo C, Mattei M, Candi E, De Felici M, Melino G, Cesareni G (2009) Inhibition of the c-Abl-TAp63 pathway protects mouse oocytes from chemotherapy-induced death. *Nat Med*; 15:1179-85.

Goodman C, Jeyendran RS, Coulam CB (2009) P53 tumor suppressor factor, plasminogen activator inhibitor, and vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and recurrent implantation failure. *Fertil Steril* 92(2):494-498.

Hall HE, Chan ER, Collins A, Judis L, Shirley S, Surti U, Hoffner L, Cockwell AE, Jacobs PA, Hassold TJ (2007) The origin of trisomy 13. *Am J Med Genet A* 143A(19):2242–2248.

Hall PA e Lane DP (1997) Tumour suppressors: a developing role for p53? *Curr Biol* 7:144–147.

Hamajima N, Matsuo K, Suzuki T, Nakamurab T, Matsuurab A, Hatoookac S, Shinodac M, Koderac Y, Yamamurac Y, Hirai T et al. (2002) No association of p73 G4C14-to-A4T14 at exon 2 and p53 Arg72Pro polymorphism with the risk of digestive tract cancers in Japanese. *Cancer Lett* 181:81–85.

Hassold T e Hunt P (2001) To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2(4):280-291.

Hassold T e Jacobs P (1984) Trisomy in man. *Ann Rev Genet* 18:69–97.

Hassold T e Sherman S (2000) Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. *Clin Genet* 57(2):95-100.

Hassold T, Merrill M, Adkins K, Freeman S, Sherman S (1995) Recombination and maternal age-dependent nondisjunction: Molecular studies of trisomy 16. *Am J Hum Genet* 57:867–874.

Hassold T, Hall H, Hunt P (2007) The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet* 16:203-208.

Helguera P, Pelsman A, Pigino G, Wolvetang E, Head E e Busciglio J (2005) ets-2 promotes the activation of a mitochondrial death pathway in Down's syndrome neurons. *J Neurosci* 25:2295–2303.

Hodges CA, Revenkova E, Jessberger R, Hassold TJ, Hunt PA (2005) SMC1beta-deficient female mice provide evidence that cohesins are a missing link in age-related nondisjunction. *Nat Genet* 37:1351–1355.

Hsieh YY, Lin CS (2006) P53 codon 11, 72, and 248 gene polymorphisms in endometriosis. *Int J Biol Sci* 2:188–193.

Hu C, Smith SD, Pang L, Sadovsky Y, Nelson DM (2006a) Enhanced basal apoptosis in cultured term human cytotrophoblasts is associated with a higher expression and physical interaction of p53 and Bak. *Placenta* 27:978–983

Hu M, Gu L, Li M, Jeffrey PD, Gu W, Shi Y (2006b) Structural basis of competitive recognition of p53 and MDM2 by HAUSP/USP7: implications for the regulation of the p53-MDM2 pathway. *PLoS Biol* 4(2): e27.

Hu, W. (2009) The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;00:a001073

Hu W, Zheng T, Wang J (2011) Regulation of Fertility by the p53 Family Members. *Genes Cancer* 4:420-430.

Hulten M, Patel S, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson A, Iwarsson E (2008) On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Molecular Cytogenetics* 1:21.

Hunt PA e Hassold TJ (2008) Human female meiosis: what makes a good egg go bad? *Trends Genet* 2:86-93.

Hussin J, Roy-Gagnon MH, Gendron R, Andelfinger G, Awadalla P (2011) Age-dependent recombination rates in human pedigrees. *PLoS Genet* 7(9):e1002251.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, Yi P, Tafoya DL, Swenson DH, Wilson VL *et al.* (1999) Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 70:495–501.

Junttila MR e Evan GI (2009) p53—a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* 9:821-829.

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, *et al.* (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90:809–819.

Kang HJ, Feng Z, Sun Y, Atwal G, Murphy ME, Rebbeck TR, Rosenwaks Z, Levine AJ, Hu W (2009) Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(24):9761-9766.

Kay C, Jeyendran RS, Coulam CB (2006) p53 tumour suppressor gene polymorphism is associated with recurrent implantation failure. *Reprod Biomed Online*. 4:492-496.

Kong A, Barnard J, Gudbjartsson D, Thorleifsson G, Jonsdottir G, Sigurdardottir S, Richardson B, Jonsdottir J, Thor-geirsson T, Frigge M, Lamb N, Sherman S, Gulcher J,

- Ste-fansson K (2004) Recombination rate and reproductive success in humans. *Nat Genet* 36:1203–1206
- Korenberg JR, Chen XN, Schipper R, Sun Z, Gonsky R, Gerwehr S, Carpenter N, Daumer, C, Dignan P, Disteché C *et al.* (1994). Down syndrome phenotypes: The consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4997–5001.
- Kuo PL (2002) Maternal trisomy 21 mosaicism and recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 78:432-433.
- Kussie PH, Gorina S, Marechal V, Elenbaas B, Moreau J, Levine AJ e Pavletich NP (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* 274: 948–953.
- Lahav G, Rosenfeld N, Sigal A, Geva-Zatorsky N, Levine AJ, Elowitz MB e Alon U (2004) Dynamics of the p53-Mdm2 feedback loop in individual cells. *Nature Genetics* 36(2):147-150.
- Lahiri DK e Nurnberger JI Jr (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19(19):5444.
- Lamb NE, Sherman SL, Hassold TJ (2005) Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet Genome Res* 111:250-255.
- Lane DP (1992) p53: guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.
- Lejeune J, Turpin R, Gautier M (1959) Mongolism; a chromosomal disease (trisomy). *Bull Acad Natl Med* 143:256-265.
- Levine AJ e Oren M (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* 9(10):749–758
- Levine AJ, Hu W, Feng Z (2006). The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ* 13(6):1027–1036
- Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW e Melino G (2011) The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:259-65.
- Levy R, Smith SD, Yusuf K, Huettner PC, Kraus FT e Sadovsky Y (2002) Trophoblast apoptosis from pregnancies complicated by fetal growth restriction is associated with enhanced p53 expression. *Am J Obstet Gynecol* 186:1056–1061.
- Li M, Chen D, Shiloh A, Luo J, Nikolaev AY, Qin J e Gu W (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416:648-653.
- Linares LK, Hengstermann A, Ciechanover A, Müller S e Scheffner M (2003) HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:12009–12014

Lister LM, Kouznetsova A, Hyslop LA, Kalleas D, Pace SL, Barel JC, Nathan A, Floros V, Adelfalk C, Watanabe Y, Jessberger R, Kirkwood TB, Höög C, Herbert M (2010) Age-related meiotic segregation errors in mammalian oocytes are preceded by depletion of cohesin and Sgo2. *Curr Biol* 20:1511–1521.

Liu F, Liu L, Li B, Wei YG, Yan LN, Wen TF, Xu MQ, Wang WT e Yang JY (2011) p73 G4C14-A4T14 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis based on 27 case-control studies. *Mutagenesis* 26(4):573-81.

Lu WJ e Abrams JM (2006) Lessons from p53 in non-mammalian models. *Cell Death Differ* 13:909-912.

Lu WJ, Amatruda JF, e Abrams JM (2009) p53 ancestry: gazing through an evolutionary lens. *Nat Rev Cancer* 9:758-762.

Marine J-C e Jochemsen AG (2005) Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochem Biophys Res Commun* 331:750-760.

Marine J-C, Dyer MA, Jochemsen AG (2007) MDMX: from bench to bedside. *J Cell Sci* 120(3):371-378.

Marine J-C, Francoz S, Maetens M, Wahl G, Toledo F e Lozano G (2006) Keeping p53 in check: essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. *Cell Death Differ* 13:927–934.

McCormick MK, Schinzel A, Petersen MB, Stetten G, Driscoll DJ, Cantu ES, Tranebjaerg L, Mikkelsen M, Watkins PC e Antonarakis SE (1989). Molecular genetic approach to the characterization of the “Down syndrome” region on chromosome 21. *Genomics* 5:325–331.

Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR e Bradley A (1999) p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398:708–713.

Misra C, Majumder M, Bajaj S, Ghosh S, Roy B e Roychoudhury S (2009) Polymorphisms at p53, p73, and MDM2 Loci Modulate the Risk of Tobacco Associated Leukoplakia and Oral Cancer. *Molecular Carcinogenesis* 48:790–800.

Murphy ME (2006). Polymorphic variants in the p53 pathway. *Cell Death Differ* 6:916-920.

Murray-Zmijewski F, Lane DP e Bourdon JC (2006) p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* 6:962-72.

Nedelcu AM, Tan C (2007) Early diversification and complex evolutionary history of the p53 tumor suppressor gene family. *Dev Genes Evol* 217:801-806.

- Nicol CJ, Harrison ML, Laposa RR, Gimelshtein IL e Wells PG (1995) A teratologic suppressor role for p53 in benzo[a]pyrene-treated transgenic p53-deficient mice. *Nature Genet* 10:181–187.
- Norimura T, Nomoto S, Katsuki M, Gondo Y e Kondo S (1996) p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis. *Nature Med* 2:577–580
- Oliver TR, Feingold E, Yu K, Cheung V, Tinker S, Yadav-Shah M, Masse N, Sherman SL (2008) New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. *PLoS Genet* 4:e1000033.
- Oliver TR, Tinker SW, Allen EG, Hollis N, Locke AE, Bean LJ, Chowdhury R, Begum F, Marazita M, Cheung V, Feingold E, Sherman SL (2012) Altered patterns of multiple recombinant events are associated with nondisjunction of chromosome 21. *Hum Genet* 131(7):1039-1046.
- Olovnikov IA, Kravchenko JE e Chumakov PM (2009) Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense. *Semin Cancer Biol* 19:32-41.
- Oren M (2003) Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10:431–442.
- Pan H, Ma P, Zhu W, Schultz RM (2008) Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol* 316:397–407.
- Paskulin DD, Cunha-Filho JS, Souza CA, Bortolini MC, Hainaut P, Ashton-Prolla P (2012) TP53 PIN3 and PEX4 polymorphisms and infertility associated with endometriosis or with post-in vitro fertilization implantation failure. *Cell Death Dis* 3, e392.
- Penrose, L (1933) The relative effects of paternal and maternal age in mongolism. *J Genet* 27: 219–224.
- Petersen MB, Adelsberger PA, Schinzel AA, Binkert F, Hinkel GK e Antonarakis SE (1991) Down syndrome due to de novo Robertsonian translocation t(14q;21q): DNA polymorphism analysis suggests that the origin of the extra 21q is maternal. *Am J Hum Genet* 49:529–536.
- Pietrowski D, Bettendorf H, Riener EK, Keck C, Hefler LA, Huber JC e Tempfer C (2005) Recurrent pregnancy failure is associated with a polymorphism in the p53 tumor suppressor gene. *Hum Reprod* 4:848–851.
- Pim D, Banks L (2004) p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 108:196–199.
- Pintus SS, Fomin ES, Oshurkov IS e Ivanisenko VA (2007) Phylogenetic analysis of the p53 and p63/p73 gene families. *In Silico Biol* 7:319–332.

- Prandini P, Deutsch S, Lyle R, Gagnebin M, Delucinge VC, Delorenzi M, Gehrig C, Descombes P, Sherman S, Dagna BF *et al.* (2007) Natural gene-expression variation in Down syndrome modulates the outcome of gene-dosage imbalance. *Am J Hum Genet* 81:252–263.
- Qiao S, Nagasaka T, Harada T e Nakashima N (1998) p53, Bax and Bcl-2 expression, and apoptosis in gestational trophoblast of complete hydatidiform mole. *Placenta* 19:361–369.
- Rahmani Z, Blouin JL, Creau-Goldberg N, Watkins PC, Mattei JF, Poissonnier M, Prieur M, Chettouh Z, Nicole A, Aurias A *et al.* (1989) Critical role of the 21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(15):5958–5962.
- Ribeiro CL Jr, Arruda JT, Silva CT, Moura KK (2009) Analysis of p53 codon 72 gene polymorphism in Brazilian patients with endometriosis. *Genet Mol Res* 8:494–499.
- Rippin TM, Freund SM, Veprintsev DB e Fersht AR (2002) Recognition of DNA by p53 core domain and location of intermolecular contacts of cooperative binding. *J Mol Biol* 319:351–358.
- Roat E, Prada N, Ferraresi R, Giovenzana C, Nasi M, Troiano L, Pinti M, Nemes E, Lugli E, Biagioni O *et al.* (2007) Mitochondrial alterations and tendency to apoptosis in peripheral blood cells from children with Down syndrome. *FEBS Lett* 581:521–525.
- Rother K, Dengl M, Lorenz J, Tschöp K, Kirschner R, Mössner J Engeland K (2007) Gene expression of cyclin-dependent kinase subunit Cks2 is repressed by the tumor suppressor p53 but not by the related proteins p63 or p73. *FEBS Lett* 581:1166-1172.
- Rutkowski R, Hofmann K, Gartner A (2010) Phylogeny and function of the invertebrate p53 superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a001131.
- Rutkowski R, Dickinson R, Stewart G, Craig A, Schimpl M, Keyse SM, Gartner A (2011) Regulation of *Caenorhabditis elegans* p53/CEP-1-dependent germ cell apoptosis by Ras/MAPK signaling. *PLoS Genet* 7 e1002238.
- Sawa A, Oyama F, Cairns NJ, Amano N e Matsushita M (1997) Aberrant expression of bcl-2 gene family in Down's syndrome brains. *Brain Res Mo. Brain Res* 48:53–59.
- Scacchi R, Gambina G, Moretto G e Corbo RM (2009) Association study between P53 and P73 gene polymorphisms and the sporadic late-onset form of Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 116:1179–1184.
- Seidl R, Fang-Kircher S, Bidmon B, Cairns N e Lubec G (1999) Apoptosis-associated proteins p53 and APO-1/Fas (CD95) in brains of adult patients with Down syndrome. *Neurosci Lett* 260:9–12.

Shaffer LG, Jackson-Cook CK, Stasiowski BA, Spence JE e Brown JA (1992) Parental origin determination in thirty de novo Robertsonian translocations. *Am J Med Genet* 43:957–963.

Silva LR, Vergani N, Galdieri LC, Ribeiro Porto MP, Longhitano SB, Brunoni D, D'Almeida V e Alvarez Perez AB (2005) Relationship between polymorphisms in genes involved in homocysteine metabolism and maternal risk for Down syndrome in Brazil. *Am J Med Genet* 135:263–267.

Straub WE, Weber TA, Schafer B, Candi E, Durst F, Ou HD, Rajalingam K, Melino G and Dotsch V (2010) The C-terminus of p63 contains multiple regulatory elements with different functions. *Cell Death Dis* 1:e5.

Subramanian VV e Bickel SE (2008) Aging predisposes oocytes to meiotic nondisjunction when the cohesin subunit SMC1 is reduced. *PLoS Genet* 4(11):e1000263.

Suh EK, Yang A, Kettenbach A, Bamberger C, Michaelis AH, Zhu Z, Elvin JA, Bronson RT, Crum CP e McKeon F (2006) p63 protects the female germ line during meiotic arrest. *Nature* 444(7119):624-628.

Tagliani-Ribeiro A, Paskulin DD, Oliveira M, Zagonel-Oliveira M, Longo D, Ramallo V, Ashton-Prolla P, Saraiva-Pereira ML, Fagundes NJ, Schuler-Faccini L, Matte U (2012) High twinning rate in Candido Godoi: a new role for p53 in human fertility. *Hum Reprod* 27:2866-2871.

The 1000 Genomes Project Consortium (2010) A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 467:1061–1073.

Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L e Matlashewski G (1999) Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 19:1092–1100.

Thompson SL e Compton DA (2010) Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J Cell Biol* 188:369-381.

Toledo F e Wahl GM (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* 6:909–923.

Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Ruffini A, Cheung CC, Khan F, Itie-Youten A, Wakeham A, Tsao MS *et al.* (2008) TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev* 22:2677–2691.

Tomasini R, Tsuchihara K, Tsuda C, Lau SK, Wilhelm M, Ruffini A, Tsao MS, Iovanna JL, Jurisicova A, Melino G *et al.* (2009) TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:797–802.

Tsai JH, McKee BD (2011) Homologous pairing and the role of pairing centers in meiosis. *J Cell Sci* 124:1955-1963.

van Bokhoven H, Hamel BC, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf PH, Vanmolkot KR, van Beusekom E, van Beersum SE, Celli J (2001) p63 Gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 69:481–492.

Vousden KH e Lane DP (2007) p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(4):275-83.

Wade M, Wang YV, Wahl GM (2010) The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends Cell Biol* 20(5):299-309.

Wan Y, Wu W, Yin Z, Guan P, Zhou B (2011) MDM2 SNP309, gene-gene interaction, and tumor susceptibility: an updated meta-analysis. *BMC Cancer* 11:208.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D e McKeon F (1998) p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 2:305–316.

Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C *et al.* (1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398:714–718.

Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F (2002) On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* (2):90-95.

Yoon PW, Freeman SB, Sherman SL, Taft LF, Gu Y, Pettay D, Flanders WD, Khoury MJ e Hassold TJ (1996) Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. *Am J Hum Genet* 58:628–633.

Zana M, Szecsenyi A, Czibula A, Bjelik A, Juhasz A, Rimanoczy A, Szabo K, Vetro A, Szucs P, Varkonyi A *et al.* (2006) Age-dependent oxidative stress-induced DNA damage in Down's lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 345:726–733.

Zdzalik M, Pustelny K, Kedracka-Krok S, Huben K, Pecak A, Wladyka B, Jankowski S, Dubin A, Potempa J, Dubin G (2010) Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and p73. *Cell Cycle* 9(22):4584-4591.

Zhang LJ, Yan SW e Zhuo YZ (2007) A dynamical model of DNA-damage derived p53-Mdm2 interaction. *Acta Physica Sinica* 56(4):2442-2447.

Zheltukhin AO e Chumakov PM (2010) Constitutive and induced functions of the p53 gene. *Biochemistry (Mosc)* 75(13):1692-721.

CONSENTIMENTO INFORMADO

Justificativa e os Objetivos da pesquisa:

Os defeitos congênitos são defeitos que aparecem, normalmente, uma única vez nas famílias afetadas, porém em alguns casos, pode haver repetição do problema. O entendimento dos mecanismos que levam a formação destas malformações, nos seus aspectos genéticos, poderá contribuir para o planejamento de uma estratégia de prevenção destas anomalias no nosso meio. O objetivo deste trabalho é compreender as causas da Síndrome de Down, o que poderá auxiliar na prevenção desta anomalia em casos futuros.

Procedimentos e Riscos ou desconfortos potenciais:

Serão coletados 10 ml de sangue, em dois frascos para estudos moleculares. As amostras serão analisadas no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias.

As coletas de sangue serão realizadas pelo pessoal especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Benefícios esperados:

Este trabalho poderá beneficiar minha família, visto que há um componente genético nestas anomalias. Esse benefício não será direto para minha pessoa, mas poderá beneficiar outras famílias em risco de apresentarem casos semelhantes. Caso alguma informação derivada deste estudo for importante para minha família todo esforço será realizado para informá-la.

Entendo que tenho direito de recusar a participar deste projeto e que minha recusa não afetará de nenhuma maneira o cuidado comigo ou de minha família no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Pelo presente Consentimento Informado, declaro que fui esclarecido, de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Fui igualmente, informado(a):

- ◆ da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa;
- ◆ da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuação do meu cuidado e tratamento;
- ◆ da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com minha privacidade;

Os pesquisadores responsáveis por este projeto de pesquisa são a Dra. Lavinia Schüler-Faccini e Ana Paula Brandalize (Fone: 51 33168008 ou 51-91438403), tendo este documento sido revisado e aprovado pela Comissão Científica e Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Data: ___/___/_____

Nome e assinatura do Paciente ou Responsável

Nome e assinatura do Responsável legal, quando for o caso
