



Universidade de Brasília  
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

**Triagem e monitoramento de mutações no gene GATA1 na  
leucemogênese associada à Síndrome de Down**

BRENNO VINÍCIUS MARTINS HENRIQUE

Brasília - DF

2025

BRENNO VINÍCIUS MARTINS HENRIQUE

**Triagem e monitoramento de mutações GATA1 na leucemogênese associada à Síndrome de Down**

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr. Ciro Martins Gomes

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília – Faculdade de Medicina, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília - DF

2025

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Translacional – Hospital da Criança de Brasília José Alencar, com apoio financeiro do CNPq, CAPES

*Do unto others 20% better than you would expect them to do unto you, to correct for subjective error.*

**Linus Pauling**

**Dedico à minha amada família.**

# AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ciro Gomes, pela disponibilidade e pela compreensão demonstradas ao longo do desenvolvimento deste trabalho, sempre oferecendo apoio nos momentos em que mais precisei.

Ao Dr. Agenor, agradeço profundamente pelo apoio emocional, pela inspiração constante e pelo suporte dedicado ao longo desta trajetória. Sua amizade foi essencial em muitos momentos, transmitindo não apenas incentivo científico, mas também confiança e serenidade para seguir em frente.

Ao Dr. Ricardo Camargo, expresso minha profunda gratidão pelo incentivo, pela inspiração científica e pela amizade construída ao longo desta trajetória. Seu apoio foi decisivo para o desenvolvimento deste trabalho e contribuiu de maneira significativa para o meu crescimento acadêmico.

Às agências de fomento e à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, agradeço pelo suporte e apoio que possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Hospital da Criança de Brasília (HCB), agradeço imensamente pelo apoio e pela estrutura fornecidos, que foram essenciais para a realização desta pesquisa e para o meu crescimento científico. É uma honra trabalhar em uma instituição que cultiva valores tão raros e inspiradores.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa Translacional do HCB, onde encontrei um ambiente de aprendizado, troca de ideias e, sobretudo, de amizade, agradeço pelas contribuições técnicas, pelo companheirismo e pelas discussões que enriquecem minha formação científica.

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF), agradeço especialmente aos meus superiores pela compreensão, apoio e suporte ao longo desta trajetória, que me permitiram conciliar minhas responsabilidades profissionais com a execução deste estudo. Estendo também minha gratidão a todos os amigos do laboratório, com quem tenho a honra de trabalhar diariamente, pelo companheirismo e pela parceria que tornam este ambiente ainda mais especial.

Ao meu pai, Marcelo Henrique, agradeço pelo exemplo de determinação, pelo incentivo constante e pelo apoio em todas as etapas da minha vida. Sua presença e ensinamentos foram fundamentais para que eu tivesse a coragem e a perseverança necessárias para trilhar este caminho.

À minha mãe, Lúcia Maria, expresso minha mais profunda gratidão pelo amor incondicional, pela dedicação incansável e pelo apoio em cada momento. Sua força e cuidado foram essenciais para que eu chegasse até aqui, servindo de inspiração diária em minha vida pessoal e profissional.

À minha irmã, Brenda Aissa, agradeço pela amizade sincera de toda a vida, pelo amor e pelo carinho que sempre me acompanharam. Sua presença constante é motivo de alegria e apoio, tornando esta trajetória ainda mais especial.

À minha amada Marina Paixão, deixo um agradecimento muito especial. O seu sorriso encantador é fonte constante de inspiração e alegria. Seu apoio indispensável ao longo deste caminho tornou possível superar obstáculos com mais leveza e esperança. O amor que compartilhamos é um alicerce fundamental, trazendo equilíbrio e motivação. Obrigado por existir!

Aos amigos que fiz ao longo da vida, deixo meu sincero agradecimento. Cada amizade, em seus diferentes momentos e contextos, contribuiu de forma única para minha caminhada, trazendo apoio, alegria e aprendizado.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma maneira, me apoiaram, incentivaram. Cada gesto de confiança, palavra de incentivo ou demonstração de carinho foi essencial para que eu chegasse até aqui.

# Lista de abreviaturas e siglas

AE-PCR – Allele-Specific PCR

AML – Acute Myeloid Leukemia

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAM – Binary Alignment/Map

CFM – Citometria de Fluxo Multiparamétrica

ClinVar – Clinical Variants

cDNA – Complementary DNA

CNV – Copy Number Variation

DRM – Doença Residual Mínima

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DS – Síndrome de Down

FOG1 – Friend of GATA1

GATA1 – GATA Binding Protein 1

GATA1s – Isoforma curta/truncada do GATA1

GRCh38 – Genome Reference Consortium Human Build 38

HC – Hemograma Completo

HRM – High Resolution Melting

Indel – Inserção/Deleção

LM-SD – Leucemia Mieloide associada à Síndrome de Down

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

ML-DS – Myeloid Leukemia of Down Syndrome

mRNA – RNA mensageiro

NGS – Next Generation Sequencing

PCR – Polymerase Chain Reaction

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA-Seq – RNA Sequencing

SD – Síndrome de Down

SNV – Single Nucleotide Variant

TAM – Transient Abnormal Myelopoiesis

Taq – Taq DNA Polimerase

WT – Wild Type

|  |           |
|--|-----------|
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....                          | <b>6</b>  |
| <b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....          | <b>1</b>  |
| <b>RESUMO</b> .....                                  | <b>4</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                | <b>6</b>  |
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....                              | <b>12</b> |
| Síndrome de Down.....                                | 12        |
| Trissomia do cromossomo 21 e a patogênese da SD..... | 14        |
| Hematopoiese e a Síndrome de Down.....               | 16        |
| Leucemogênese na Síndrome de Down.....               | 18        |
| O gene GATA1.....                                    | 20        |
| <b>JUSTIFICATIVA</b> .....                           | <b>23</b> |
| <b>OBJETIVOS</b> .....                               | <b>25</b> |
| <b>METODOLOGIA</b> .....                             | <b>26</b> |
| Seleção de Amostras.....                             | 26        |
| Análise inicial e triagem das amostras.....          | 26        |
| Imunofenotipagem.....                                | 27        |
| Preparo e Extração de Ácidos Nucleico.....           | 27        |
| Rastreamento de mutações por HRM.....                | 28        |
| Sequenciamento dos éxons 2 e 3 do Gene GATA1.....    | 29        |
| Monitoramento de doença residual mínima por PCR..... | 29        |
| Sequenciamento de Nova Geração.....                  | 30        |
| Fluxo de diagnóstico e monitoramento.....            | 31        |
| <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....                  | <b>33</b> |
| Pacientes recrutados para o estudo.....              | 33        |
| High Resolution Melting.....                         | 36        |
| Análise de mutações no gene GATA1.....               | 39        |
| Análise de DRM por AE-PCR.....                       | 50        |
| <b>CONCLUSÃO</b> .....                               | <b>54</b> |
| <b>PERSPECTIVAS</b> .....                            | <b>57</b> |
| <b>Referências Bibliográficas</b> .....              | <b>58</b> |
| <b>ANEXOS</b> .....                                  | <b>61</b> |

# RESUMO

**Introdução:** Crianças portadoras da síndrome de Down apresentam risco significativamente elevado para o desenvolvimento de malignidades hematológicas, destacando-se, em particular, uma forma rara e específica de leucemia mieloide, denominada leucemia mieloide associada à síndrome de Down (ML-DS). Entre os múltiplos eventos biológicos envolvidos na patogênese, a combinação da trissomia do cromossomo 21 com mutações localizadas nos éxons 2 e 3 do gene *GATA1*, que codifica um fator de transcrição essencial para a hematopoiese, desempenha papel determinante ao promover proliferação celular desregulada. Essas mutações alteram a produção da proteína GATA-1 em sua forma canônica, resultando em redução de sua abundância e concomitante aumento da expressão de uma isoforma truncada, conhecida como GATA1s. A ocorrência dessas variantes é mais frequente nos éxons 2 e 3, e sua manifestação pode ocorrer por diferentes mecanismos, incluindo substituições, duplicações ou deleções. Dessa forma, tais alterações moleculares configuram potenciais marcadores diagnósticos e de monitoramento da patologia, permitindo a identificação de células malignas tanto no diagnóstico inicial quanto na detecção de recidivas. No presente estudo, exploramos esse panorama molecular, fundamentado na análise de mutações específicas em *GATA1*, com o objetivo de monitorar pacientes diagnosticados com ML-DS e submetidos a protocolos terapêuticos. **Métodos:** Neonatos hematologicamente normais e com o diagnóstico da síndrome de Down foram incluídos. As amostras de sangue que possuíam viabilidade celular foram analisadas por citometria de fluxo (CFM) para imunofenotipagem e posterior avaliação de mutações no gene *GATA1* por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) com análise de curva *melting* de alta resolução. As variantes finais foram anotadas utilizando a plataforma Varsome (<https://varsome.com/>), que fornece classificação clínica baseada nas diretrizes da ACMG, bem como informações sobre frequência populacional, patogenicidade e literatura associada. **Resultados:** O estudo incluiu um total de 213 pacientes, divididos em três grupos distintos. O primeiro grupo foi composto por recém-nascidos com síndrome de Down (SD), sem alterações hematológicas,

encaminhados para triagem de mutações no gene GATA1 (triagem neonatal). O segundo grupo incluiu pacientes com até 6 meses de idade, com alterações hematológicas que suportem a suspeita de transtorno mieloproliferativo transitório associada à SD (TAM). O terceiro grupo foi formado por pacientes entre 6 meses e 5 anos com alterações hematológicas, classificados como suspeitos de leucemia mieloide associada à síndrome de Down (LM-SD). Na análise realizada, um total de 58 variantes foram classificadas conforme segue: 26 variantes foram consideradas patogênicas, 22 variantes como provavelmente patogênicas, e 10 variantes foram classificadas como de significado incerto. Não foram identificadas variantes nas categorias de provavelmente benigna ou benigna.

**Discussão:** Ao longo deste estudo, conseguimos reunir informações importantes sobre as mutações no gene GATA1 em crianças com síndrome de Down, mas muitos pontos ainda precisam ser melhor compreendidos. Um dos principais desafios que enfrentamos foi a quantidade expressiva de variantes classificadas como de significado incerto.

**Palavras-chave:** leucemia mieloide; síndrome de Down; GATA1; mutação; doença residual mínima.

# ABSTRACT

**Introduction:** Children with Down syndrome are at a significantly increased risk for the development of haematological malignancies, notably a rare and specific form of myeloid leukaemia known as myeloid leukaemia associated with Down syndrome (ML-DS). Among the biological factors involved in pathogenesis, the combination of trisomy of chromosome 21 with mutations located in exons 2 and 3 of the GATA1 gene—which encodes a transcription factor essential for haematopoiesis—plays a decisive role by promoting dysregulated cell proliferation. These mutations alter the production of the canonical GATA-1 protein, resulting in reduced abundance and a concomitant increase in the expression of a truncated isoform known as GATA1s. The occurrence of such variants is most frequently found in exons 2 and 3, and their manifestation can arise through various mechanisms, including substitutions, duplications, or deletions. In this way, these molecular alterations constitute potential diagnostic and monitoring markers for the disease, allowing the identification of malignant cells both at initial diagnosis and during relapse detection. In the present study, we explore this molecular landscape focused on the analysis of specific GATA1 mutations with the aim of monitoring patients diagnosed with ML-DS and undergoing therapeutic protocols. **Methods:** Haematologically normal neonates and those diagnosed with Down syndrome were included. Blood samples with viable cells were analysed by flow cytometry (FCM) for immunophenotyping and subsequent assessment of mutations in the GATA1 gene by real-time polymerase chain reaction (PCR) with high-resolution melting curve analysis. The final variants were annotated using the Varsome platform (<https://varsome.com/>), which provides clinical classification based on ACMG guidelines, as well as information on population frequency, pathogenicity, and associated literature. **Results:** The study included a total of 213 patients, divided into three distinct groups. The first group consisted of newborns with Down syndrome (DS) without haematological alterations, referred for screening of GATA1 gene mutations (neonatal screening). The second group included patients up to 6 months of age with haematological changes consistent with suspicion of transient myeloproliferative disorder associated with

DS (TMD). The third group comprised patients aged 6 months to 5 years with haematological alterations, classified as suspected of myeloid leukaemia associated with Down syndrome (ML-DS). In the analysis performed, a total of 58 variants were classified as follows: 26 variants were considered pathogenic, 22 variants probably pathogenic, and 10 variants were classified as of uncertain significance. No variants were identified in the categories of probably benign or benign. **Discussion:** Throughout this study, we gathered important information regarding GATA1 gene mutations in children with Down syndrome, but many issues still require further clarification. One of the main challenges encountered was the significant number of variants classified as of uncertain significance.

**Keywords:** myeloid leukemia; Down syndrome; GATA1; mutation; minimal residual disease.

# INTRODUÇÃO

## Síndrome de Down

A síndrome de Down (SD) é o transtorno do neurodesenvolvimento mais prevalente, com uma causa genética conhecida. Além de dismorfologias faciais e condições médicas congênitas e/ou adquiridas, a síndrome é caracterizada por deficiência intelectual, envelhecimento acelerado e uma maior probabilidade de início precoce da doença de Alzheimer na idade adulta (WINDSPERGER; HOEHL, 2021).

A SD ocorre em aproximadamente 1 a cada 800 nascimentos em todo o mundo, sendo a causa mais frequente de deficiência intelectual de origem genética. A condição foi descrita pela primeira vez por John Langdon Down em 1866, e, mais de 90 anos depois, foi identificada a causa cromossômica associada à presença de uma terceira cópia do cromossomo 21. Este cromossomo extra resulta em características fenotípicas distintas, que afetam múltiplos sistemas corporais, incluindo os sistemas musculoesquelético, neurológico e cardiovascular. Essa condição está associada a uma variedade de características fenotípicas e a um aumento do risco para várias doenças, incluindo condições hematológicas. Os indivíduos com SD frequentemente apresentam estatura baixa, hipotonia muscular, instabilidade atlantoaxial, alterações cardíacas congênitas e deficiência intelectual. Além disso, apresentam características faciais distintas, como orelhas pequenas e de inserção baixa, dobras epicânticas, ponte nasal achatada, occipício plano, boca pequena e fissuras palpebrais inclinadas para cima (“About Down Syndrome”, 2017; ANTONARAKIS et al., 2020). A figura 1 mostra os principais sintomas e manifestações descritas para a SD.

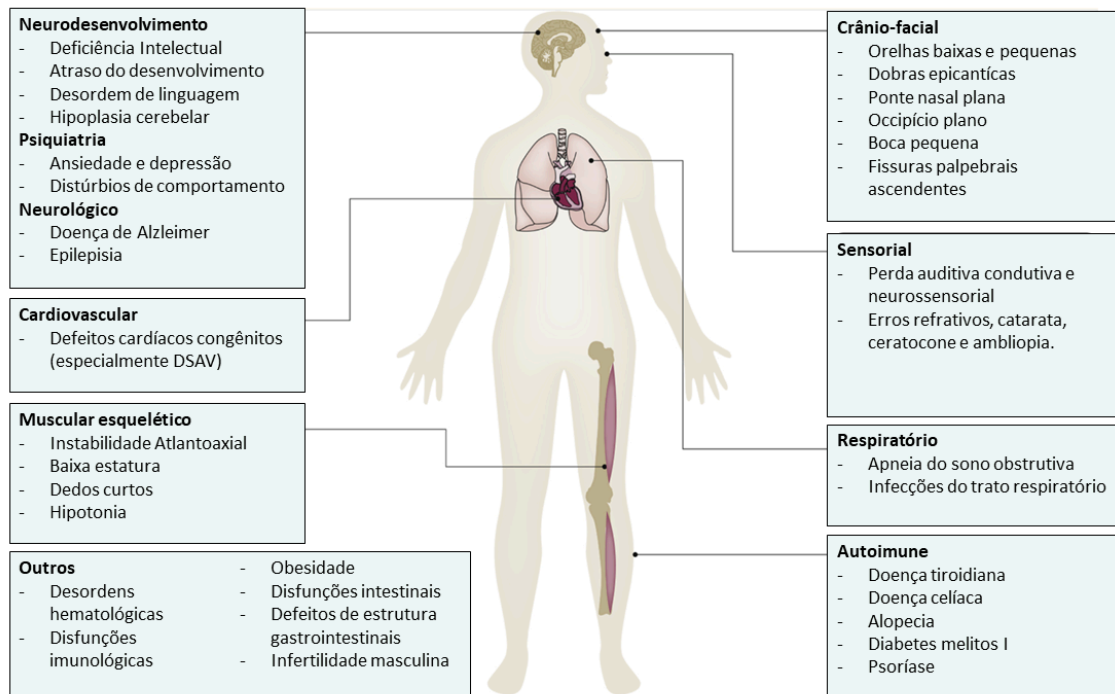


Figura 01 - Sintomas e manifestações na síndrome de Down. Adaptado de (ANTONARAKIS et al., 2020)

Além das características físicas e intelectuais, indivíduos com SD são mais propensos a desenvolver uma série de condições de saúde, como hipotireoidismo, doenças autoimunes, apneia obstrutiva do sono, epilepsia, problemas auditivos e visuais, distúrbios hematológicos, incluindo leucemia, infecções recorrentes, entre outras (ANTONARAKIS et al., 2020).

Apesar das do portadores do SD apresentarem menor ocorrência de tumores sólidos (ANTONARAKIS et al., 2020), tumores hematológicos são mais frequentes. Crianças com SD têm um risco de até 20 vezes maior de desenvolver leucemia, especialmente leucemia mieloide (ML-DS), que geralmente apresenta bom prognóstico, exceto em casos de recidiva. Já a leucemia linfoblástica aguda (DS-ALL) é associada a um prognóstico ruim, com maior taxa de recidiva em comparação a crianças sem a síndrome (BARWE; KOLB; GOPALAKRISHNAPILLAI, 2024).

A descoberta de uma ligação entre a trissomia do cromossomo 21 e o fenótipo da SD foi um marco significativo para o desenvolvimento da medicina genética, permitindo avanços na compreensão da fisiopatologia molecular das diversas manifestações fenotípicas da síndrome. Apesar do progresso nas metodologias de triagem e no manejo dos sintomas, desafios consideráveis ainda persistem, incluindo a compreensão dos mecanismos biológicos precisos de cada componente fenotípico.

## Trissomia do cromossomo 21 e a patogênese da SD

O cromossomo 21, um dos menores cromossomos humanos, desempenha um papel crucial na síndrome de Down (SD). A trissomia do 21 pode ser ocasionada pela erros associados a meiose I (66%) ou meiose II (21%) materna, meiose I (3%) ou meiose II (5%) paterna, bem como por erros de mitose (5%) depois da formação zigoto (ANTONARAKIS et al., 1993; HASSOLD; HUNT, 2001).

A Síndrome de Down ocorre devido à presença de uma cópia adicional do cromossomo 21, podendo se manifestar em três formas. A Trissomia 21 constitucional, responsável por 95% dos casos, afeta todas as células do organismo e não é hereditária (ANTONARAKIS, 1991). Porém, existem casos de SD originados por uma trissomia que se apresenta em mosaico ou mesmo por translocações que envolvem o cromossomo 21.

Nas ocasiões de SD por trissomia do 21 em mosaico, presente em 1 a 2% dos casos, ocorre quando apenas algumas células, ou de um tipo tecidual, apresentam um cromossomo 21 extra, podendo resultar em características menos evidentes. Há descrição de casos de SD originadas por translocações cromossômicas (robertsoniana ou cromossomo isocrômico), essas alterações representam cerca de 3 a 4% dos casos (ASIM et al., 2015). Em todos os casos, o tipo específico da alteração genética responsável pela síndrome pode ser identificado por testes laboratoriais.

A trissomia do cromossomo 21 em indivíduos com SD tem sido usado como um modelo importante no estudo da leucemogênese, uma vez que neonatos e crianças com a

condição frequentemente apresentam leucemia transitória congênita e maior predisposição a leucemias mieloides e linfoblásticas. Por outro lado, a trissomia 21 é um *hit* de alteração somática, também associada a quadros relacionados ao desenvolvimento de leucemias (FONATSCH, 2010).

O cromossomo 21, que contém cerca de 300 genes, está envolvido em diversas aberrações estruturais, como translocações e deleções, associadas a diferentes cânceres, incluindo leucemias e linfomas. Genes como RUNX1, Tmprss2 e TFF, localizados na região 21q, desempenham um papel fundamental na tumorigênese, tanto por mutações somáticas quanto constitucionais (FONATSCH, 2010).

Apesar da relação da trissomia 21 com a leucemia, a baixa incidência de tumores sólidos em indivíduos com Síndrome de Down ainda requer mais investigação (FONATSCH, 2010). A trissomia do 21 apresenta-se como uma alteração genética protetora de tumores sólidos, como câncer de mama e pulmão, isso se dá possivelmente devido ao incremento da expressão de genes na Região Crítica da Síndrome de Down (DSCR) no cromossomo 21. Experimentos de transcriptômica em modelos animais identificaram que os genes ETS2 e RCAN1 podem atuar como potenciais fatores protetores contra esses cânceres. A expressão destes genes está significativamente reduzida em tumores mamários e pulmonares e a um prognóstico mais reservado. Além disso, os genes ETS2 e RCAN estão envolvidos em vias biológicas importantes, como sinalização de TGF- $\beta$ , EGFR, IFN- $\gamma$ , TNF e p53, sugerindo um papel relevante na regulação imunológica e no desenvolvimento tumoral (FOSU et al., 2023).

A trissomia do 21 não impacta somente no desenvolvimento de doenças de caráter oncológico. Entre os genes localizados no cromossomo 21, muitos estão associados a funções críticas no desenvolvimento e funcionamento de vários sistemas orgânicos, cujos genes importantes foram listados no Quadro 01. Um exemplo, o gene APP, que codifica a proteína precursora amiloide, está implicado na predisposição aumentada para a doença de Alzheimer de início precoce observada em indivíduos com SD. Além disso, genes como o DYRK1A estão envolvidos em processos de sinalização celular e desenvolvimento

neuronal, contribuindo para as características cognitivas e neurológicas da síndrome (DORAN et al., 2017; RUIZ-MEJIAS et al., 2016).

Quadro 01 - Categoria funcional e principais genes associados à patogênese da Síndrome de Down proposto por (SINET et al., 1994)

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

## Hematopoiese e a Síndrome de Down

A hematopoiese é o processo responsável pela formação de todas as células sanguíneas a partir de células-tronco hematopoéticas (CTH). Esse processo ocorre predominantemente na medula óssea em adultos, mas durante o desenvolvimento fetal, outros locais como o saco vitelino, o fígado fetal e a região aorta-gônada-mesonefro (AGM) também desempenham papéis cruciais. As CTHs são capazes de se auto-renovar e diferenciar em todos os tipos de células sanguíneas, incluindo eritrócitos, leucócitos e plaquetas, através de uma série de divisões celulares e diferenciações controladas por sinais moleculares e interações com o nicho da medula óssea (ORKIN; ZON, 2008).

Na embriogênese, a hematopoiese se dá em etapas sucessivas, iniciando no saco vitelino (hematopoiese primitiva), e posteriormente ocorre no fígado fetal (hematopoiese definitiva) e, na véspera do nascimento, migra para a medula óssea. Embora tradicionalmente se acreditasse que as CTH fossem originárias exclusivamente do saco vitelino, outra fonte intraembrionária, na AGM, pode ser responsável pela hematopoiese definitiva. O sistema hematopoiético depende da expansão e manutenção das CTH, e entre os fatores de crescimento importantes para esse processo figuram moléculas como Kit, IL-3 e IL-11, bem como fatores de transcrição, como GATA-2, importante para a hematopoiese embrionária. Outros fatores, como c-Myb, GATA-1, PU.1 e Ikaros, também possuem papéis importantes na diferenciação de células hematopoiéticas específicas, promovendo a maturação de eritrócitos, de das outras células de linhagem mieloides e linfócitos(ORKIN, 1995).

O desenvolvimento das CTHs segue uma hierarquia bem definida, começando com células multipotentes que podem gerar todos os tipos de células sanguíneas, passando por progenitores comprometidos que são restritos a determinadas linhagens celulares, até alcançar precursores que se diferenciam em células sanguíneas maduras. Fatores de transcrição, como GATA1, RUNX1 e PU.1, desempenham papéis essenciais na regulação dessa hierarquia, direcionando a diferenciação celular em respostas a sinais externos e internos (ORKIN; ZON, 2008). Além disso, a interação das CTHs com o microambiente da medula óssea, que inclui células estromais, osteoblastos e fatores solúveis, é fundamental para a manutenção da homeostase hematopoética e a resposta a situações de estresse, como infecções ou danos teciduais.

Uma hematopoiese clonal (CH), que é a expansão de uma única célula progenitora, pode acontecer em decorrência de mutações somáticas. Normalmente, essas mutações são observadas em um limitado grupo de genes, normalmente envolvidos na regulação epigenética, reparo de DNA, genes sinal do crescimento celular e fatores de splicing entre outros (JOO et al., 2023).

A relação entre a hematopoiese e a síndrome de Down (SD) é de particular interesse devido à alta incidência de desordens hematológicas em indivíduos portadores. Especificamente, a desordem mieloproliferativa transitória (TAM), uma condição pré-leucêmica exclusiva de neonatos com SD, está associada a mutações no gene *GATA1*, que resultam em uma proteína truncada (*GATA1s*) que interfere na regulação normal da hematopoiese (ORKIN, 2008)., mais tardiamente, após dos 6 meses e até 5 anos de idade, alterações já levará ao diagnóstico da Leucemia Mieloide da Síndrome de Down. Nesse contexto, mutações no gene *GATA1*, associadas a trissomia do 21, pode levar à expansão descontrolada de megacariócitos e outras células precursoras mieloides, aumentando o risco de progressão para LMA. Portanto, a compreensão dos mecanismos de hematopoiese e suas disfunções específicas em indivíduos com SD é crucial para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas eficazes.

## Leucemogênese na Síndrome de Down

A leucemogênese em portadores da síndrome de Down é um processo complexo caracterizado por mutações em genes específicos e proliferação celular anormal. Uma característica central deste fenômeno é a presença da terceira cópia do cromossomo 21 que desencadeia um risco aumentado para o desenvolvimento de vários tipos leucêmicos, particularmente a Leucemia Megacariocítica Aguda (Leucemia Mielóide da síndrome de Down – LM-SD) bem como também para a Leucemia Linfóide Aguda (LLA). As anomalias genéticas que favorecem o surgimento das leucemias frequentemente surgem no período embrionário (MENARD; LEVIN, [s.d.]; XAVIER et al., 2011)

Crianças com SD possuem um elevado risco de desenvolvimento de leucemia comparado a crianças não SD. Aproximadamente 30% dos recém-nascidos com SD desenvolvem uma condição pré-leucêmica, apresentando leucocitose e presença de blastos no sangue periférico, chamada mielopoiese anormal transitória (TAM). Essa

condição ocorre até os 6 primeiros meses de vida e é resultante da interação entre a trissomia do 21 e mutações no gene *GATA1*, condição que geralmente é autolimitada e não necessita de intervenção terapêutica específica (BHATNAGAR et al., 2016; XAVIER et al., 2011).

O diagnóstico de TAM tem sido feito com base na contagem celular por meio do hemograma completo (HC) em recém-nascidos com SD sintomático, e com presença de megacarioblastos no sangue periférico. A pesquisa da alteração molecular em *GATA1* associada à contagem de blastos megacariocíticos por CFM permite o diagnóstico assertivo de TAM (WANG et al., 2015). Porém, atualmente não há rotina bem estabelecida para o uso de citometria de fluxo multiparamétrica (CFM) para uma contagem precisa de blastos ou teste molecular para identificação de mutações em *GATA1*; nem todos os recém-nascidos com SD com TAM terão um HC no período neonatal. Isso significa que, provavelmente, exista uma população de recém-nascidos com SD que apresentam TAM subdiagnosticada.

Até os 5 anos de idade, as crianças com SD tem um risco aumentado 150 vezes de desenvolver a LM-SD uma leucemia megacariocítica aguda, condição também associadas a coexistência de mutações do gene *GATA1* e a trissomia do 21, um quadro leucêmico que em geral possuem boas taxas de cura, mas dependem de protocolos de tratamento próprios, com baixas doses de quimioterapia, visto que portadores da SD apresentam alto risco de toxicidade (MCNULTY; CRISPINO, 2020; XAVIER; TAUB, 2010).

Apesar dos avanços na compreensão da biologia da TAM e da LM-SD, o diagnóstico precoce ainda representa um desafio importante, sobretudo diante da ausência de protocolos universalmente estabelecidos para triagem molecular em recém-nascidos com SD. Nesse contexto, técnicas moleculares de triagem, como a High Resolution Melting (HRM), apresentam um potencial significativo para auxiliar na identificação precoce de variantes no gene *GATA1*. O HRM é capaz de distinguir, com alta sensibilidade e precisão, alterações genéticas sutis entre amplicons de DNA, atuando como um indicativo robusto da presença de mutações na região-alvo da amplificação. Dessa forma, o uso dessa

técnica pode contribuir para ampliar o rastreamento de recém-nascidos com SD, permitindo uma estratificação mais precoce, vigilância adequada e encaminhamento oportuno para avaliação hematológica especializada.

## O gene GATA1

A família GATA de proteínas regulatórias nucleares atua como um protótipo para a ação de fatores transcricionais específicos. Esta família é composta por seis membros, que são divididos em dois subgrupos com base no perfil de expressão e na estrutura genética. Os genes GATA1, GATA2 e GATA3 são predominantemente expressos em linhagens hematopoéticas, enquanto os genes GATA4, GATA5 e GATA6 estão associados a linhagens endodermiais (ZHENG; BLOBEL, 2010).

O gene *GATA1*, localizado no cromossomo X (X p11.23), faz parte desta família de fatores GATA. Foi inicialmente identificado por sua capacidade de se ligar às regiões promotoras do gene globina, e hoje é conhecido como um fator transcricional ativo em diversos tipos celulares (CRISPINO, 2005). O gene se estende por 7 kb, possui seis éxons e transcreve 1.239 nucleotídeos a partir do éxon 2. A tradução resulta em duas proteínas: uma maior, composta por 413 aminoácidos, e uma isoforma menor, composta por 330 aminoácidos, conhecidas como GATA-1 e GATA-1s, respectivamente. As proteínas possuem massa molecular de 42,7kDa e 40kDa, respectivamente. A produção da isoforma menor GATA-1s pode ocorrer por transcrição alternativa a partir da metionina 84 no início do éxon 3, ou por splicing alternativo do éxon 2 (CRUZ HERNANDEZ et al., 2020).

O gene *GATA1* é fundamental para a maturação das células do sistema hematopoético, especialmente as células eritroides, megacariócitos, eosinófilos e mastócitos, regulando cooperativamente moléculas chave associadas à proliferação, diferenciação e apoptose. Esta proteína possui tanto ligantes de DNA quanto atividade de transativação dentro de três domínios funcionais: dois dedos de zinco (zinc fingers), um

domínio dedo de zinco N-terminal e um C-terminal e um domínio de ativação N-terminal (AD). O dedo de zinco N-terminal (NT) apresenta tanto a função de ligante de DNA quanto a função de recrutador de cofatores, com o dedo de zinco C-terminal (CT) proporcionando estabilidade para essas interações. Destaca-se o papel da região N-terminal em recrutar um dos cofatores mais importantes do GATA1, o FOG1. Juntamente com NF-E2, FLI1 e GFI1B, desempenham um papel central no controle transcricional da megacariopoiese (CRISPINO, 2005; HITZLER; ZIPURSKY, 2005).

Indivíduos com leucemia megacarioblástica aguda e síndrome de Down tiveram o status mutacional do gene GATA1 avaliado e esses achados evidenciaram a importância de compreender melhor os mecanismos de ação do GATA1 (WECHSLER et al., 2002). Foram identificadas mutações cruciais para o desenvolvimento das alterações funcionais deste gene. Com isso, começou-se a observar a associação do GATA1 com outros genes, sendo relatadas muitas interações genéticas.

A interação física entre o GATA1 e o FOG1 é vital para o desenvolvimento das células eritroides. O cofator FOG1 é expresso inicialmente em células progenitoras hematopoéticas e possui quatro de seus nove dedos de zinco interagindo com o GATA1 para o desenvolvimento de eritrócitos e megacariócitos (HONG et al., 2005). Em modelos murinos nocaute para GATA1 ou FOG1, observa-se a morte durante a fase embrionária devido à anemia grave, resultante da parada maturativa no nível de pró-eritroblásticos (GREENE et al., 2003). Além disso, mutações pontuais na região do dedo de zinco N-terminal de GATA1 impedem a interação com FOG1, bloqueando interações entre outras proteínas e GATA1.

Para entender melhor a base molecular dessa interação entre GATA1 e FOG1, estudos examinaram os efeitos desses genes através do gene promotor *αIIb*. A interação física entre GATA1 e FOG1 requer a ativação deste promotor tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e elementos específicos da família Ets determinam tal reconhecimento transcricional. Um dos elementos da família Ets, o Fli1, mostrou-se importante no desenvolvimento normal de megacariócitos. Evidências convincentes deste papel incluem a produção de

megacariócitos indiferenciados em animais nocaute para Fli1, resultando na morte por hemorragia cerebral e disfunção endotelial (SPYROPOULOS et al., 2000).

Os dois domínios dedos de zinco, um NT e outro CT, são fundamentais para as interações proteína-proteína. Estudos in vitro demonstraram que tanto FOG1 quanto Fli1 interagem com o dedo de zinco NT, embora em regiões distintas. Acredita-se que formam um complexo tri-molecular, GATA1-FOG1-Fli1, mediando a expressão das células progenitoras megacariocíticas (EISBACHER et al., 2003). Esta região de ligação de fatores transcricionais da família Ets tem um papel crucial na determinação da capacidade do FOG1 de ativar ou reprimir o GATA1 (WANG et al., 2015).

Outro gene desta família, PU1, interage de forma interessante com o GATA1, apresentando um antagonismo recíproco que direciona a diferenciação de cada linhagem mieloide (REKHTMAN et al., 2003). Esta interação ocorre através do domínio de transativação, onde PU1 usa seu domínio para reprimir GATA1. Um exemplo disso é a expressão forçada de PU1 na linhagem eritroide, resultando em eritroleucemia em camundongos, explicada pelo bloqueio do GATA1 (ORKIN; ZON, 2008).

Outros fatores interagem com GATA1 na diferenciação da linhagem megacariocítica, como o gene RUNX1, de crucial importância. RUNX1, conhecido previamente como AML1, é necessário para a maturação de megacariócitos e a diferenciação de células T e B (ICHIKAWA et al., 2004). Frequentemente alvo de translocações cromossômicas, resulta na fusão proteica dominante negativa (LUTTERBACH; HIEBERT, 2000). Foi demonstrado que RUNX1 interage fisicamente com o dedo de zinco do GATA1 no processo normal de diferenciação megacariocítica. RUNX1 está localizado na região crítica da SD no cromossomo 21, e há indícios de que o aumento de RUNX1 pode desempenhar um papel significativo nas leucemias em crianças com SD (GURBUXANI; VYAS; CRISPINO, 2004).

# JUSTIFICATIVA

A importância de se estudar alterações no gene *GATA1* em pacientes com síndrome de Down (SD) é destacada por várias razões críticas, especialmente quando se considera a predisposição aumentada dessa população para desenvolver neoplasias mieloides. Crianças com SD apresentam uma maior probabilidade de desenvolver transtornos mieloproliferativos, como a leucemia mieloide associada à síndrome de Down (ML-DS) e a mieloproliferação transitória (TAM), sendo esta última caracterizada por um aumento transitório de células blásticas no sangue periférico (KANEZAKI et al., 2010).

As mutações no gene *GATA1* são particularmente relevantes em neonatos com SD, pois estas mutações resultam na produção de uma isoforma da proteína *GATA1*, conhecida como *GATA1s*. Estudos demonstraram que a maioria das mutações se localiza nos éxons 2 ou 3 do gene *GATA1*, e essas alterações podem ser distintas para cada paciente. Além disso, há uma correlação direta entre as mutações no gene *GATA1* e o desenvolvimento tanto de TAM quanto de ML-DS (KANEZAKI et al., 2010). Esta relação genética torna a investigação dessas mutações uma ferramenta crucial para a identificação precoce e monitoramento de neonatos com SD em risco de desenvolver neoplasias mieloides.

Uma abordagem de triagem sensível para mutações no *GATA1* pode identificar de forma confiável neonatos com SD que estão em risco de desenvolver ML-DS. Dados mostram que aproximadamente 20% das crianças diagnosticadas com TAM evoluem para ML-DS (GOEMANS et al., 2021). A detecção precoce através da triagem de mutações pode permitir intervenções clínicas mais oportunas, melhorando potencialmente os resultados terapêuticos e a sobrevivência a longo prazo desses pacientes. Além disso, essa triagem pode fornecer informações valiosas para os pais, permitindo-lhes entender melhor os riscos e as possíveis trajetórias de saúde de seus filhos (GOEMANS et al., 2021)

Portanto, estudar as alterações no gene GATA1 em pacientes com síndrome de Down não é apenas fundamental para a compreensão da biologia subjacente dessas neoplasias, mas também para o desenvolvimento de estratégias de manejo clínico que possam melhorar significativamente a qualidade de vida e os prognósticos desses indivíduos.

# OBJETIVOS

Este trabalho tem como principal objetivo investigar alterações no gene *GATA1* em indivíduos com Síndrome de Down. Para isso, propõe-se:

- Empregar a técnica de *High-Resolution Melting* (HRM) como método de triagem inicial para detecção de possíveis mutações no gene *GATA1*, visando identificar variações genéticas com maior agilidade e custo-efetividade;
- Realizar o sequenciamento dos éxons 2 e 3 do gene *GATA1*, complementando os dados previamente obtidos, com o intuito de compor um panorama epidemiológico da frequência e diversidade de mutações nesta região gênica em uma amostra representativa da população brasileira;
- Avaliar a presença de Doença Residual Mínima (DRM) por meio da detecção de mutações específicas e da expressão da isoforma truncada *GATA1s*, contribuindo para o monitoramento e o prognóstico de pacientes;
- Estabelecer relações entre os achados moleculares e os dados clínicos dos pacientes, visando aprofundar a compreensão da relevância funcional dessas mutações no contexto da fisiopatologia e evolução clínica das alterações hematológicas associadas à trissomia do 21.

# METODOLOGIA

## Seleção de Amostras

Neonatos hematologicamente normais (contagem de blastos circulantes < 10%), com síndrome de Down (SD) nas suas primeiras semanas de vida, pacientes pediátricos com SD suspeitos de ter Leucemia Transiente da Infância (TAM) ou Leucemia Mieloide Associada à Síndrome de Down (LM-SD) foram indicados por seus médicos para participar do estudo. A coleta de dados ocorreu entre maio de 2018 e junho de 2024. Foram incluídos na pesquisa 261 pacientes. Para participação do estudo, todos os responsáveis pelos pacientes anuíam o termo de consentimento esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS), sob o número de protocolo 60867716.3.0000.5553.

Os critérios de inclusão estabeleceram que lactentes com até três meses de idade portadores de síndrome de Down e crianças com suspeita de LM-SD seriam o público-alvo do projeto. A casuística estimada para o estudo foi de 200 pacientes.

## Análise inicial e triagem das amostras

Após o consentimento dos responsáveis, os pacientes foram submetidos à coleta de sangue para a primeira avaliação hematológica. As amostras de sangue que possuíam viabilidade celular foram analisadas por citometria de fluxo (CFM) para imunofenotipagem e posterior avaliação de mutações no gene *GATA1*. A avaliação hematológica incluiu a realização do hemograma completo e análise morfológica, conduzido pelo Hospital de Crianças de Brasília (HCB).

## Imunofenotipagem

Para análise de imunofenotipagem por citometria de fluxo, foi realizada uma contagem e caracterização imunofenotípica de células blásticas com marcadores de linhagem específicos, incluindo a co-expressão de CD33, CD7, CD34, CD117 e marcadores megacariocíticos (CD41 e CD61) na região de blastos com baixa expressão de CD45. Os pacientes que apresentaram alteração hematológica (citopenias) ou contagem de células anormais pela citometria de fluxo tiveram suas amostras selecionadas para análise de mutação no gene *GATA1*, conforme recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016).

## Preparo e Extração de Ácidos Nucleico

Amostras de sangue periférico e, eventualmente, aspirados de medula óssea colhidos por indicação clínica específica foram encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa Translacional do Hospital de Crianças de Brasília (HCB) para processamento e análise. As células mononucleares sanguíneas foram isoladas utilizando um gradiente de Ficoll (GE Healthcare Life Sciences), lavadas em PBS 1X e aliqüotadas em dois tubos. Um dos tubos foi destinado à extração de DNA e RNA para a pesquisa de mutações no gene *GATA1* e análise de expressão gênica, enquanto o outro foi reservado para criopreservação e armazenamento no biorrepositório.

O DNA das amostras foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e, posteriormente, acondicionadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios. Para análise de RNA de um dos casos selecionados, o material genético foi extraído utilizando o método TRIzol® de acordo com as especificações do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e, posteriormente, acondicionadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização dos ensaios.

## Rastreamento de mutações por HRM

DNA genômico foi extraído de amostras de sangue periférico ou aspirados de medula óssea utilizando um kit de purificação de DNA genômico Wizard (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A análise de HRM para o gene *GATA1* foi realizada utilizando 120 ng de DNA genômico isolado, 10 µl de 2× MeltDoctor HRM Master Mix (Applied Biosystems), 0,3 µM de cada oligonucleotídico para o éxon 2 (5'-GTCCTCGCAGGTTAATCCCC-3'; 5'-GCCAAGGATCTCCATGGCAACCC-3') e éxon 3 (5'-GGAAGTTGGCCACCATGTTGG-3'; 5'-GAGCTAGGCTCAGCTCAGCTTTAC-3') do *GATA1*, em um volume final de reação de 20 µl, sob as seguintes condições de PCR: desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguida de 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 60 segundos (45×). A desnaturação foi realizada a 95°C por 10 segundos, e os perfis de HRM foram obtidos de 70°C a 95°C a uma taxa de rampa de 0,02°C/s. Um controle de tipo selvagem (WT) foi incluído em cada execução. Os ensaios foram realizados na plataforma LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha).

Os resultados foram analisados pelo software LightCycler 480 Gene Scanning (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha), utilizando curvas de fusão normalizadas e ajustadas pela temperatura, exibidas como gráficos de diferença. Os produtos de HRM de todas as amostras foram submetidos à análise de sequenciamento Sanger. Todas as reações de HRM foram realizadas em triplicatas.

O protocolo aqui descrito foi desenvolvido pelo Laboratório de Pesquisa Translacional e pode ser avaliado em publicação já realizada por Camargo e colaboradores (2023).

## Sequenciamento dos éxons 2 e 3 do Gene *GATA1*

O sequenciamento dos éxons 2 e 3 do gene *GATA1* foi realizado utilizando a técnica

de Sanger, ora inicialmente usando amplicons de PCR convencional, ora usando amplicons resultados pela triagem baseada em HRM que usa PCR em tempo real.

As reações de PCR para amplificação das regiões de interesse foram conduzidas de seguindo o seguinte protocolo: 5µL microlitros de cada produto de PCR, previamente diluído em uma proporção de 1:20 em água, foram purificados utilizando o reagente ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (ThermoFisher Scientific, Waltham, EUA) conforme recomendação do fabricante. Seguindo, cada reação de sequenciamento foi preparada utilizando 3µL do produto de PCR purificado, 0,3 µM de primer baseado no protocolo de sequenciamento do reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle (Life Technologies), conforme as instruções do fabricante. As análises de sequenciamento foram realizadas no ABI3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) e foi utilizado o softwarer CLC (Qiagen) para comparação dos resultados obtidos com a sequência de referência.

## Monitoramento de doença residual mínima por PCR

Para a detecção de mutações de ponto (SNV) no gene GATA1, foram realizadas reações de PCR alelo específico (AE-PCR). Essas reações foram projetadas para amplificar seletivamente os alelos mutantes e selvagens, permitindo a distinção precisa entre eles. Cada reação de PCR foi configurada com primers específicos para cada alelo, garantindo a especificidade da amplificação. Os primers foram desenhados de maneira que a mutação SNV de cada paciente fosse correspondesse ao último nucleotídeo do *primer*, além disso, na terceira posição à partir da extremidade 3' foi inserido um *mismatch* com a sequência de referência. Esse tem como objetivo aumentar a especificidade da reação, garantindo que haja a amplificação somente das sequências mutadas e não das sequências selvagens (Liu, et al. 2012).

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25  $\mu$ L, contendo 50 ng de DNA genômico, 1X de tampão de PCR, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,5  $\mu$ M de cada primer específico para os alelos mutante e selvagem, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1 U de Taq DNA polimerase. As condições térmicas do PCR incluíram uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento por 30 segundos com temperatura otimizada para cada variante genética (vide resultados) e extensão a 72°C por 1 minuto, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram então analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta para confirmar a presença dos fragmentos amplificados específicos dos alelos.

## Sequenciamento de Nova Geração

Amostras que não tiveram alterações detectadas pelo método de sequenciamento Sanger, mas cujo paciente apresentava sinais clínicos compatíveis com LM-SD ou TAM foram submetidos ao sequenciamento de nova geração. A construção das bibliotecas foi conduzida com o kit *TruSight RNA Fusion Panel* (Illumina), que além de permitir a detecção de fusões gênicas, também possibilita a análise de variantes pontuais (SNVs) em regiões exônicas dos genes-alvo. As bibliotecas foram sequenciadas na plataforma NextSeq 1000 (Illumina), utilizando a estratégia paired-end (2  $\times$  75 bp).

As sequências brutas (FASTQ) foram submetidas a controle de qualidade com a ferramenta fastQC, que realizou a filtragem de adaptadores e a remoção de leituras de baixa qualidade. O alinhamento ao genoma de referência humano (GRCh38) foi realizado utilizando o alinhador STAR (DOBIN, et al., 2013), configurado em modo de duas passagens para melhorar a acurácia na detecção de splice junctions e aumentar a confiabilidade no mapeamento.

Os arquivos BAM resultantes foram processados com o *Picard Tools* para marcação de duplicatas, ordenação e indexação. Em seguida, foi utilizada a ferramenta *SplitNCigarReads*, parte do GATK, para ajustar os alinhamentos de transcritos contendo splicing, de forma a torná-los compatíveis com as etapas subsequentes de chamada de variantes.

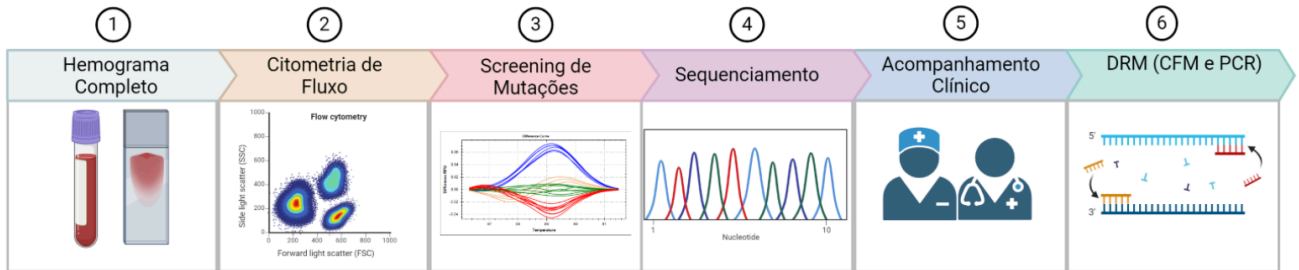
A identificação de variantes somáticas foi realizada com o Mutect2 (GATK), utilizando como entrada os arquivos BAM das amostras.. O Mutect2 foi configurado com filtros otimizados para dados de RNA-Seq. As chamadas de variantes passaram pela etapa de filtragem com o FilterMutectCalls, também do GATK, para remoção de falsos positivos.

As variantes finais foram anotadas utilizando a plataforma Varsome (<https://varsome.com/>), que fornece classificação clínica baseada nas diretrizes da ACMG, bem como informações sobre frequência populacional, patogenicidade e literatura associada. Todas as etapas foram conduzidas com o objetivo de garantir precisão e reprodutibilidade na detecção de variantes somáticas, permitindo a interpretação funcional e clínica dos dados transcriptômicos analisados.

## Fluxo de diagnóstico e monitoramento

O fluxograma linear 01 apresenta uma representação esquemática do fluxo diagnóstico proposto para avaliação hematológica e molecular em crianças com Síndrome de Down, integrando etapas laboratoriais e clínicas essenciais para a identificação precoce de alterações associadas à mielopoiese anormal transitória (TAM) e à Leucemia Megacariocítica Aguda da Síndrome de Down (LM-SD). O fluxo inicia-se pela realização do hemograma completo, utilizado como triagem inicial para detecção de leucocitose e presença de blastos. Em seguida, aplica-se a citometria de fluxo, que permite avaliar a imunofenotipagem e quantificação de blastos megacariocíticos. A terceira etapa compreende o screening molecular de mutações, contemplando técnicas como HRM, voltadas para a detecção rápida de variantes no gene *GATA1*. Posteriormente, quando

indicado, procede-se ao sequenciamento, visando caracterização detalhada das mutações identificadas. As etapas laboratoriais são acompanhadas de monitoramento clínico, fundamental para avaliação do quadro e definição de conduta. Por fim, realiza-se a etapa de DRM, que integra testes por citometria e PCR, consolidando a interpretação diagnóstica e definindo o seguimento apropriado.



Fluxograma 01 - Fluxograma representando o fluxo diagnóstico proposto para recém-nascidos e crianças com Síndrome de Down, incluindo hemograma completo, citometria de fluxo, triagem molecular de *GATA1* (screening), sequenciamento, acompanhamento clínico e testes complementares (DRM).

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

## Pacientes recrutados para o estudo

Os pacientes foram recrutados em 45 diferentes instituições, todos atendendo aos critérios de inclusão preconizados pelo estudo. A *coorte* incluiu pacientes com trissomia do cromossomo 21 com suspeita de TAM ou de LM-SD. Os estados onde estão localizadas as instituições participantes incluem: Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG), Sergipe (SE), Paraná (PR), Rio de Janeiro (RJ), Mato Grosso do Sul (MS), Espírito Santo (ES), Alagoas (AL), Goiás (GO), Bahia (BA), Ceará (CE), São Paulo (SP), Santa Catarina (SC), Paraíba (PB), Piauí (PI) e Pará (PA), como pode ser visto no mapa (Figura 02), e a lista de instituições participantes está disponível no ANEXO I.

O Distrito Federal (DF) teve o maior número de amostras coletadas, totalizando 106. Outros estados com quantidades significativas de amostras incluem São Paulo (SP) com 12 amostras, Paraná (PR) com 17, Bahia (BA) com 10 e Alagoas (AL) com 7. Estados como Espírito Santo (ES) e Pará (PA) apresentaram apenas uma amostra cada, demonstrando uma distribuição não uniforme das coletas, como pode ser visto na Figura 03. O estudo incluiu um total de 213 pacientes, divididos em três grupos distintos. O primeiro grupo foi composto por recém-nascidos com síndrome de Down (SD), sem alterações hematológicas, encaminhados para triagem de mutações no gene GATA1 (triagem neonatal). O segundo grupo incluiu pacientes com até 6 meses de idade, com alterações hematológicas que suportem a suspeita de transtorno mieloproliferativo transitório associada à SD (TAM). O terceiro grupo foi formado por pacientes entre 6 meses e 5 anos com alterações hematológicas, classificados como suspeitos de leucemia mieloide associada à síndrome de Down (LM-SD) (Tabela 02).

Entre os recém-nascidos, houve uma leve predominância de meninas (59) em relação a meninos (51). Apenas 5 pacientes (4,5%) desse grupo apresentaram mutações em GATA1, distribuídas de forma semelhante entre os sexos (2 meninos e 3 meninas).

Esses casos foram caracterizados como TAM silenciosa, em que células com a mutação circulam no sangue, mas sem alterações hematológicas detectáveis (RAZEN et al., 2014). TAM ocorre em aproximadamente 10% dos recém-nascidos com síndrome de Down, e em 65–80% dos casos pode haver remissão espontânea nas primeiras semanas ou meses de vida. No entanto, uma parcela dos pacientes apresenta complicações graves, como insuficiência hepática e coagulopatia, que podem ser fatais no período neonatal, o que reforça a necessidade de acompanhamento clínico e hematológico rigoroso (GREAVES et al., 2013; GINSBURG et al., 2021).

Os pacientes com alterações hematológicas foram divididos entre os grupos suspeitos de TAM e de LM-SD, condições que ocorrem em faixas etárias distintas: TAM é típica até os 6 meses de idade, enquanto LM-SD ocorre entre 6 meses e 5 anos (LEMOS et al., 2023). No grupo suspeito de TAM, foram incluídos 48 pacientes, dos quais 25 (52%) apresentaram mutações confirmadas. Houve predominância de meninos, sendo que 88% das mutações detectadas foram em pacientes do sexo masculino.

No grupo suspeito de LM-SD, 55 pacientes foram sequenciados, e 27 (48%) tiveram mutações confirmadas. Entre esses, 74% eram meninos. Esses dados contrastam com a literatura, que não aponta uma predominância masculina significativa (WATANABE et al., 2019). Essa diferença pode estar relacionada à maior indicação de meninos para o estudo ou a fatores biológicos. Um aspecto a considerar é a baixa quantidade de blastos circulantes em alguns casos. Além disso, o gene GATA1 está localizado no cromossomo X; portanto, em meninas, que possuem duas cópias desse cromossomo, a cópia extra pode reduzir a frequência alélica da mutação, dificultando sua detecção em comparação aos meninos.



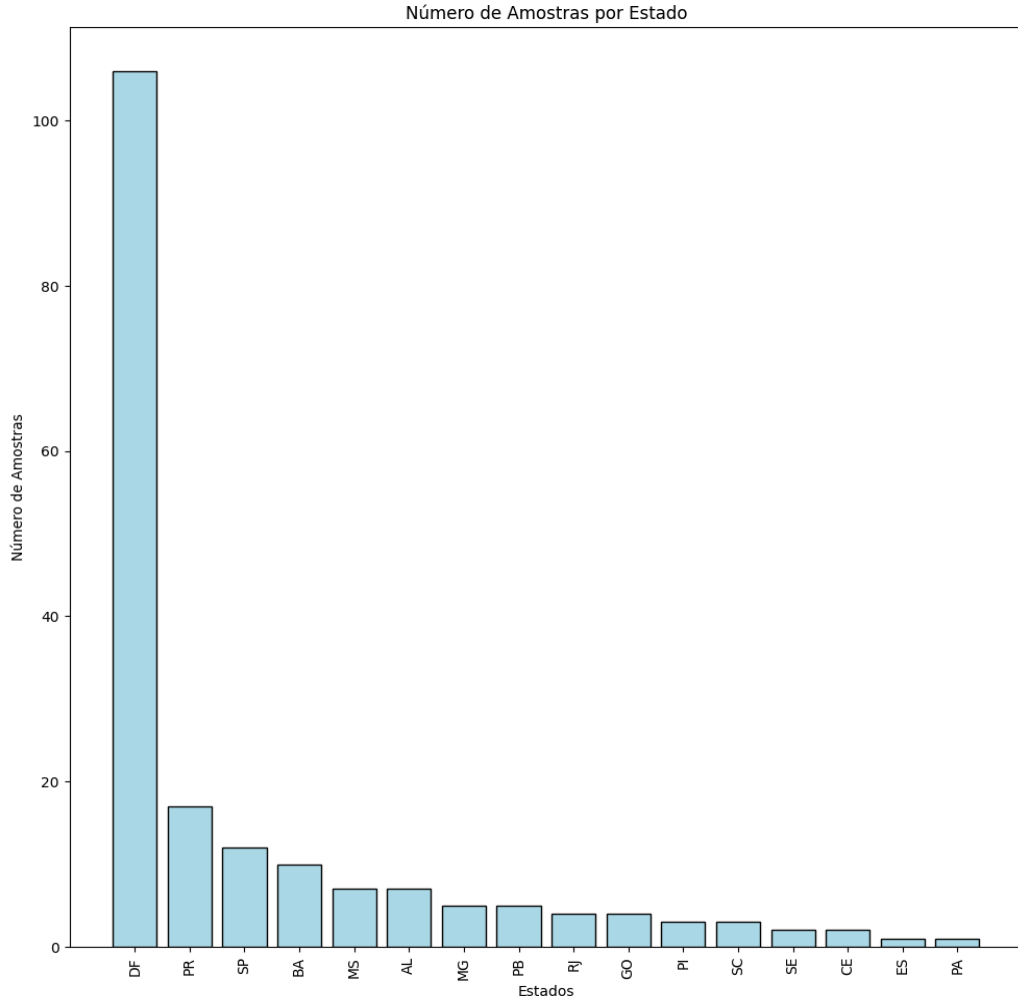


Figura 03 - Quantidade de pacientes recrutados por estado.

## High Resolution Melting

Com o objetivo de desenvolver um fluxo diagnóstico mais sensível e custo-efetivo, propomos a utilização de uma PCR preparatória ao sequenciamento genético, baseada em PCR em tempo real associada à curva de derretimento de alta resolução (High Resolution Melting – HRM). Essa abordagem permite identificar previamente a existência de possíveis variantes, antes mesmo do sequenciamento, orientando o analista a buscar mutações de frequência alélica muito baixa durante a análise por sequenciamento Sanger.

Para essa etapa do estudo, selecionamos 33 pacientes com mutações previamente confirmadas, desde pequenas inserções/deleções (indels) até alterações mais significativas, em amostras com diferentes proporções de blastos, simulando condições reais de diagnóstico. O HRM foi capaz de discriminar com eficiência seis mutações distintas da sequência selvagem, como ilustrado na Figura 04.

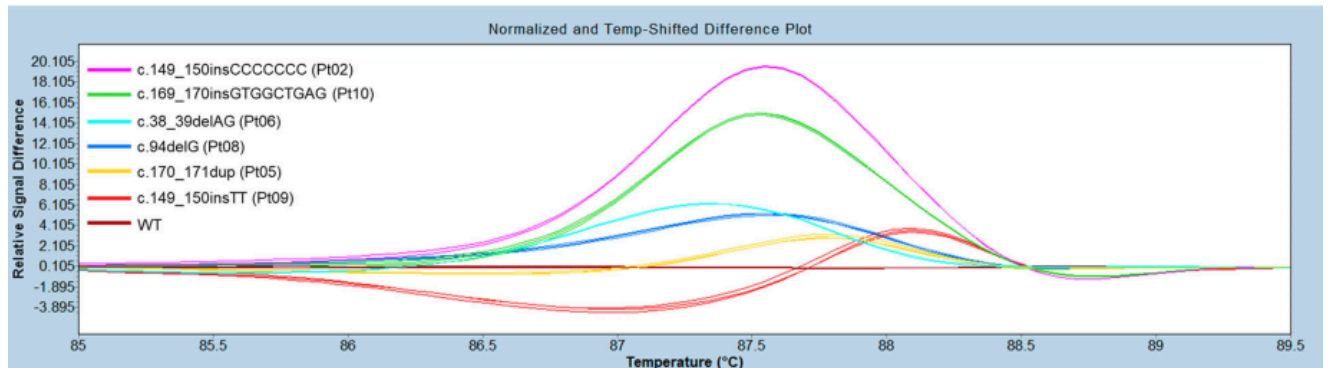


Figura 04 - Análise de curvas diferenciais por *High Resolution Melting* (HRM) para detecção de variantes no gene *GATA1*. As curvas mostram perfis de dissociação distintos entre o tipo selvagem (WT, linha basal) e diferentes mutações específicas: c.149\_150insCCCCCC (Pt02), c.169\_170insGTGGCTGAG (Pt10), c.38\_39delAG (Pt06), c.94delG (Pt08), c.170\_171dup (Pt05) e c.149\_150insTT (Pt09). Cada mutação apresenta um padrão característico de dissociação em função da temperatura, permitindo discriminação entre amostras mutantes e WT.

A técnica também foi avaliada quanto à sua sensibilidade. Para isso, foram realizadas diluições seriadas entre o DNA dos pacientes com mutações confirmadas e DNA de controle (sem mutações), simulando amostras com baixa proporção de blastos circulantes. Essas diluições permitiram estimar a capacidade de detecção da metodologia para diferentes tipos de mutações. Como demonstrado na figura 05, foi possível observar a eficiência do HRM mesmo em cenários de baixa frequência alélica, evidenciando sua aplicabilidade em contextos diagnósticos mais desafiadores.

Ao comparar as curvas de dissociação obtidas por HRM com os eletroferogramas do sequenciamento Sanger, fica evidente que o HRM oferece maior sensibilidade e objetividade na distinção entre amostras mutadas e selvagens, permitindo a detecção de variantes mesmo em baixas frequências alélicas. Já a interpretação pelo Sanger exige maior experiência do analista, uma vez que a análise está sujeita a subjetividade e pode ser menos clara na identificação de mutações em proporções reduzidas, como ilustrado na abaixo.

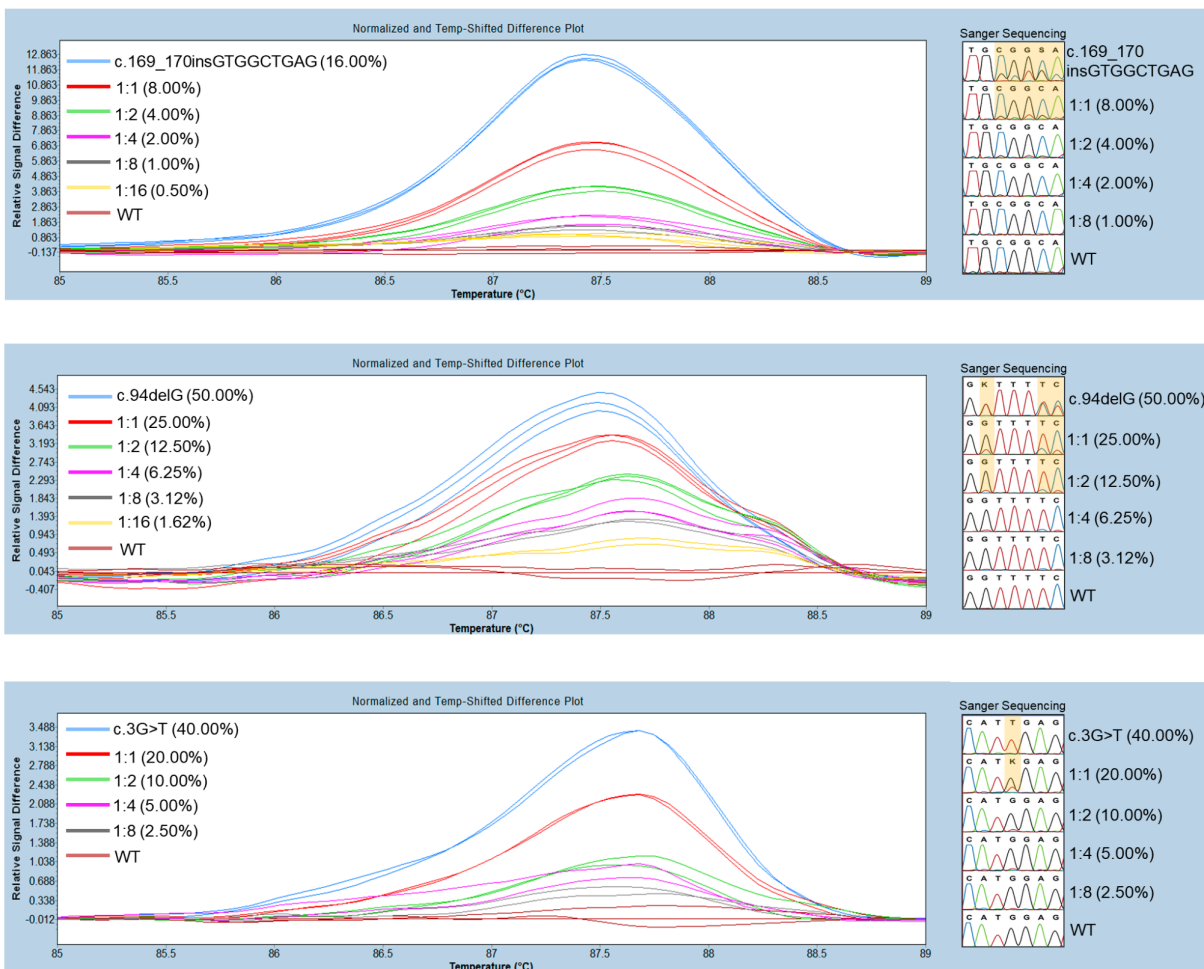


Figura 05 - Análise de sensibilidade por *High Resolution Melting* (HRM) em comparação com o sequenciamento de Sanger. Curvas diferenciais normalizadas obtidas por HRM para as variantes c.169\_170insGTGGCTGAG (painel superior), c.94delG (painel central) e c.3G>T (painel inferior) em diluições seriadas. À direita, os eletroferogramas correspondentes

obtidos por sequenciamento Sanger demonstram a menor sensibilidade desta técnica em relação ao HRM

A sensibilidade do teste demonstra que a associação entre as duas metodologias, HRM para a triagem inicial da presença de mutações e o sequenciamento Sanger para a identificação precisa da variante, pode trazer benefícios significativos para estratégias de diagnóstico molecular de mutações no gene *GATA1*. Isso é especialmente relevante em pacientes com baixa frequência alélica, nos quais a detecção por sequenciamento direto se torna limitada.

Resultados mais abrangentes, assim como a proposta completa da estratégia diagnóstica desenvolvida pelo Laboratório de Pesquisa Translacional do Hospital da Criança de Brasília José Alencar, já foram publicados anteriormente, destacando o uso do HRM como uma ferramenta complementar essencial no fluxo diagnóstico (CAMARGO, et al., 2022).

## Análise de mutações no gene *GATA1*

As mutações no gene *GATA1* associadas aos quadros de TAM e LM-SD são, em sua maioria, pequenas deleções, inserções ou mutações pontuais localizadas nos éxons 2 ou 3. Essas alterações impedem a expressão da isoforma longa da proteína *GATA1*, levando à produção exclusiva da isoforma curta. As mutações ocorrem em diferentes posições ao longo desses éxons, sem evidência clara de *hotspots* ou regiões preferenciais, o que sugere que múltiplos pontos de alteração podem contribuir para o desenvolvimento da doença.

A caracterização funcional e clínica das variantes em *GATA1* tem sido fundamental para compreender os mecanismos moleculares envolvidos na sua disfunção. Contudo, apesar do avanço nas técnicas de sequenciamento, ainda há uma grande proporção de

variantes classificadas como de significado incerto, o que dificulta sua aplicação clínica imediata.

A Figura 06 (baseadas em dados obtidos no VARSOME) apresenta a distribuição das variantes conhecidas no gene *GATA1*, conforme impacto funcional e classificação patogênica, totalizando 339 variantes descritas em bases como UniProt, ClinVar, LOVD, VarSome, MitoMap e PubMed. A maior parte dessas variantes pertence às categorias missense (183) e sinônimas (78), seguidas por frameshift (41), não codificantes (13) e outras menos frequentes, como nonsense, stop-loss, start-loss, indels e alterações em sítios de *splicing*. A análise revela uma diversidade mutacional importante, com impacto funcional variado.

Dentre as variantes classificadas, considerando todas as condições clinicamente associadas ao gene *GATA1*, 16,5% são patogênicas e 6,2% provavelmente patogênicas, enquanto 20,6% são provavelmente benignas e 8,3% benignas. O dado mais expressivo, no entanto, refere-se às variantes de significado incerto, que representam 48,4% do total. Essa elevada proporção evidencia a complexidade na interpretação das mutações no *GATA1*, sugerindo que grande parte das alterações genéticas ainda carece de estudos funcionais ou de dados clínicos robustos para uma classificação mais precisa.

As mutações com maior impacto estrutural, como nonsense e frameshift, mostraram forte associação com patogenicidade. Na Figura 06, observa-se que 71,4% das variantes nonsense e 78% das variantes frameshift são patogênicas. Essas mutações tendem a gerar proteínas truncadas ou com perda de função, o que compromete a atividade reguladora de *GATA1* nos processos hematopoiéticos. Da mesma forma, mutações em sítios de *splicing* apresentam taxas elevadas de patogenicidade (44,4% patogênicas e 44,4% provavelmente patogênicas), destacando a relevância da regulação pós-transcricional no funcionamento do gene.

As variantes missense, por outro lado, representam o grupo mais numeroso, mas com distribuição marcadamente incerta: cerca de 80% estão classificadas como de significado incerto. Apenas 5,5% são patogênicas e 4,9% provavelmente patogênicas. Isso reflete o desafio em prever o impacto funcional de trocas de aminoácidos isoladas, que podem ou não afetar domínios críticos da proteína. Essa incerteza reforça a necessidade de análises complementares, como ensaios funcionais, modelagem estrutural e estudos de segregação familiar.

As variantes sinônimas, conforme esperado, foram majoritariamente classificadas como benignas (16,7%) ou provavelmente benignas (75,6%), somando mais de 90% das ocorrências. Por não alterarem a sequência de aminoácidos, essas alterações tendem a ter baixo impacto biológico, embora não se deva descartar completamente a possibilidade de efeitos sobre splicing ou estabilidade do RNA. Variantes não codificantes, por sua vez, apresentaram distribuição equilibrada entre benignas, incertas e patogênicas, refletindo o caráter ainda pouco explorado das regiões regulatórias no contexto da expressão de GATA1.

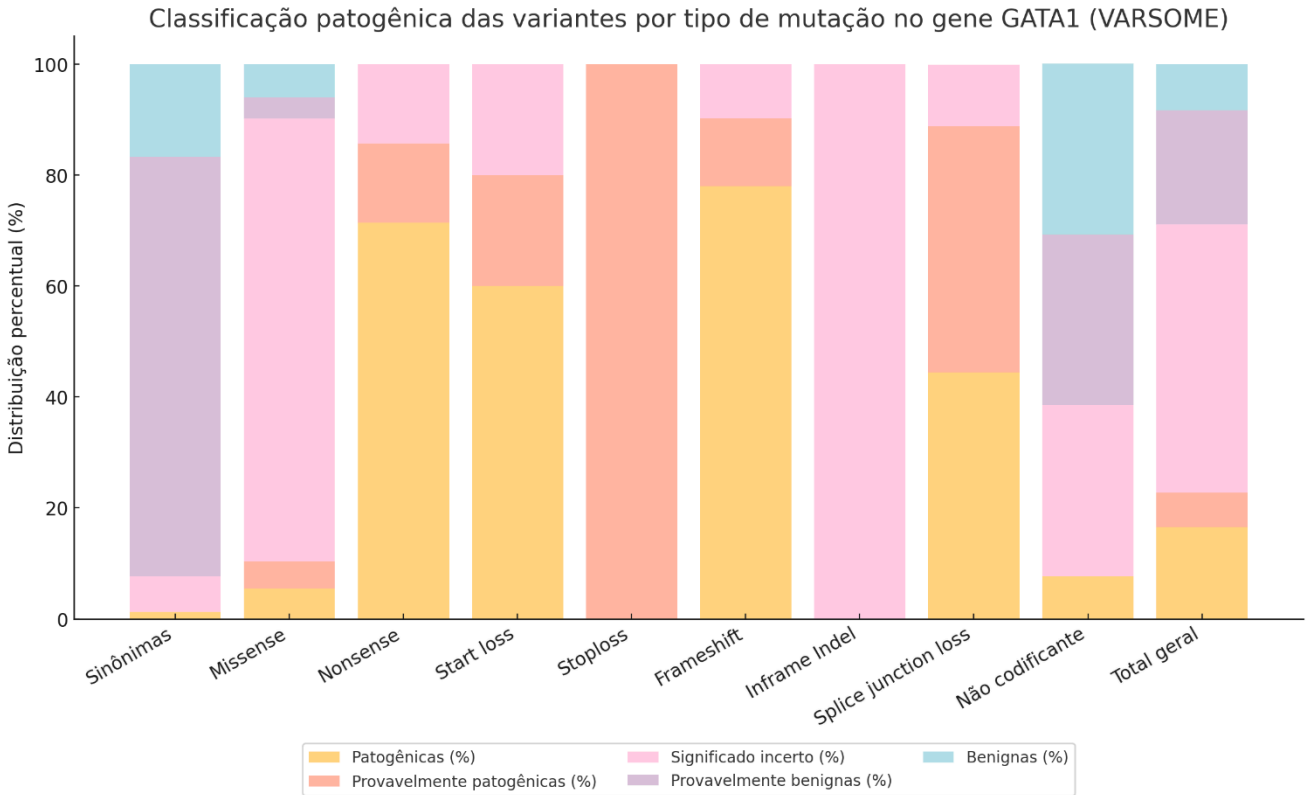


Figura 06 - Distribuição percentual da classificação patogênica das variantes no gene GATA1, agrupadas por tipo de mutação, conforme análise pelo Varsome.

Na série de amostras deste trabalho, as análises de sequenciamento realizadas revelaram um total de 58 mutações diferentes, distribuídas principalmente nas regiões que flanqueiam os éxons 2 e 3, com uma predominância no éxon 2, o que é característico para os casos da LM-SD. Dentre as mutações identificadas, 66,7% (n=39) correspondem a inserções ou deleções (Indels), que promovem a perda da expressão da isoforma longa do gene *GATA1*, podendo assim ser classificada como patogênica no contexto LM-SD. Nenhuma variante foi descrita em mais de um paciente, evidenciando a diversidade de alterações que podem ocorrer no gene *GATA1*. Como a corte era composta majoritariamente por indivíduos com suspeita de TAM ou LM-SD, como esperado, esse foi o tipo mais frequente de alteração. Além disso, 21,0% (n=12) das mutações são duplicações, enquanto 12,3% (n=7) são SNVs (Single Nucleotide Variations). Esses dados

indicam uma diversidade de alterações genéticas no gene *GATA1*, com uma predominância de indels, que pode ter implicações importantes para a funcionalidade do gene e o desenvolvimento de doenças associadas (Figura 7).

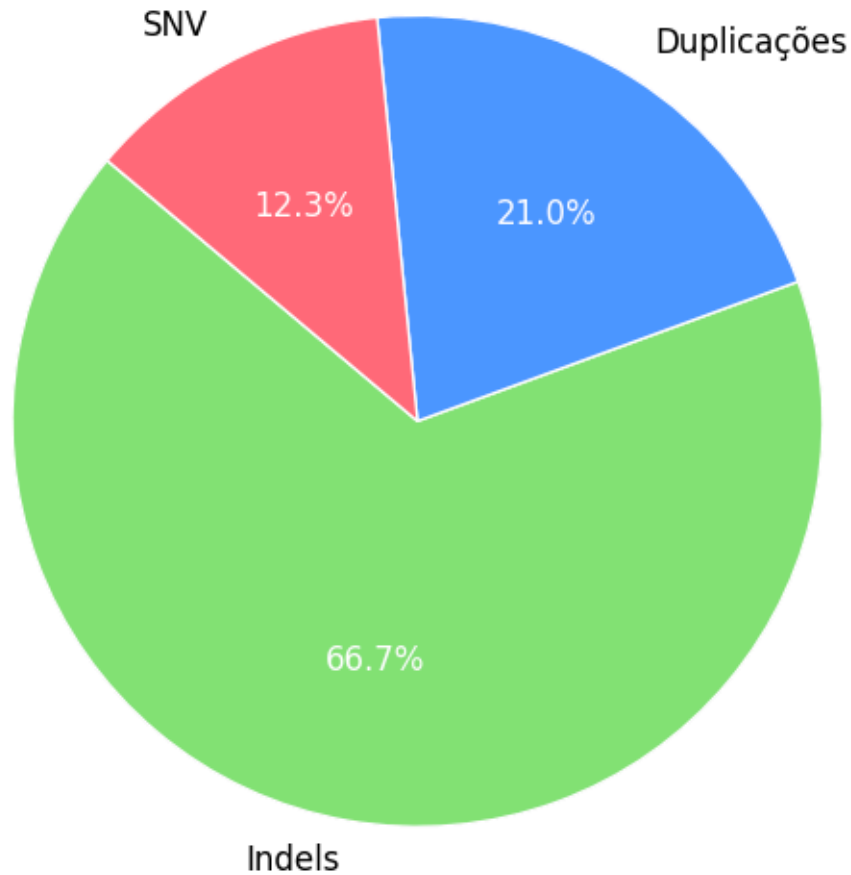


Figura 07 - Quantitativo de alterações genéticas encontradas no gene *GATA1*.

O sequenciamento do gene *GATA1* dos pacientes com TAM ou LM-SD mostrou uma concentração significativa de alterações no éxon 2 onde foi encontrada a maior parte das mutações, concordando com o que já está descrito na literatura que aponta essa região como a região mais afetada por mutações para a doença, sugerindo que essa região é

particularmente propensa a mutações que podem impactar a função do gene. Além disso, identificamos uma única mutação localizada no éxon 3, e também seis mutações em regiões intrônicas e em sítios de splicing, o que indica uma distribuição mais ampla das mutações ao longo do gene. Essas alterações, em sua maioria, estão associadas à produção da isoforma curta do gene GATA1, conhecida como GATA1s. Essa isoforma resulta de uma transcrição alternativa que exclui o éxon 2, levando à tradução de uma proteína que carece da primeira unidade de transativação, essencial para a regulação da expressão gênica. Todas as mutações encontradas estão representadas individualmente na Figura 08.

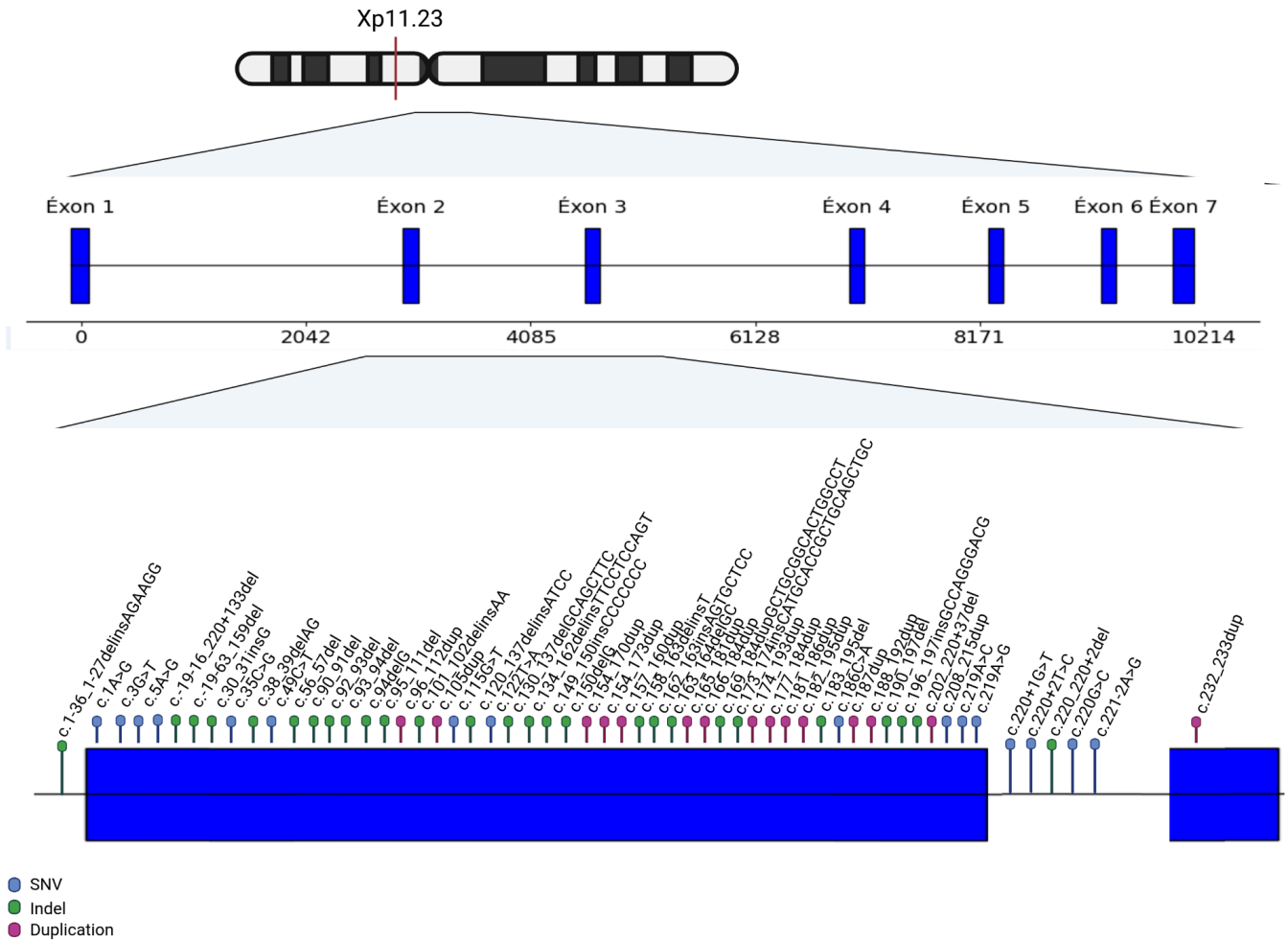


Figura 08 - Quantitativo de alterações genéticas encontradas no gene GATA1, por tipo e

localização ao longo do gene.

As variantes encontradas no gene *GATA1* foram avaliadas utilizando informações disponíveis em bancos de dados clínicos, incluindo o ClinVar. Essas variantes foram classificadas de acordo com o nível de patogenicidade em cinco categorias principais: Patogênica, Provavelmente Patogênica, Significado Incerto, Provavelmente Benigna e Benigna. A classificação "Patogênica" refere-se a variantes com forte evidência de estar associada a doenças; "Provavelmente Patogênica" indica que a variante é muito provavelmente causadora de doença, mas a evidência ainda não é conclusiva; "Significado Incerto" é usada para variantes cujo impacto na saúde não é claro devido à falta de informações suficientes; "Provavelmente Benigna" sugere que a variante é provavelmente inofensiva, e "Benigna" implica que a variante não está associada a condições patológicas.

Na análise realizada, um total de 58 variantes foram classificadas conforme segue: 26 variantes foram consideradas patogênicas, 22 variantes como Provavelmente Patogênicas, e 10 variantes foram classificadas como de Significado Incerto. Não foram identificadas variantes nas categorias de provavelmente benigna ou benigna. Esses dados reforçam a importância do uso de bancos de dados clínicos robustos para a classificação precisa das variantes genéticas e seu potencial impacto na saúde. A classificação das variantes está representada na Tabela 03.

Tabela 03 - Classificação clínica das variantes encontradas no estudo de acordo com ClinVar.

| <b><i>Variante</i></b>                 | <b><i>Classificação</i></b> |
|--|-----------------------------|
| <i>c.169_184dupGCTGCGGCACTGGCCT</i>    | Provavelmente patogênica    |
| <i>c.-19-16_220+133del</i>             | Significado incerto         |
| <i>c.-19-273_-10del</i>                | Provavelmente patogênica    |
| <i>c.-19-63_159del</i>                 | Patogênica                  |
| <i>c.1-36_1-27delinsAGAAGG</i>         | Patogênica                  |
| <i>c.101_102delinsAA</i>               | Significado incerto         |
| <i>c.105dup</i>                        | Provavelmente patogênica    |
| <i>c.115G&gt;T</i>                     | Patogênica                  |
| <i>c.120_137delinsATCC</i>             | Significado incerto         |
| <i>c.122T&gt;A</i>                     | Significado incerto         |
| <i>c.130_137delGCAGCTTC</i>            | Patogênica                  |
| <i>c.134_162delinsTTCCTCCAGT</i>       | Patogênica                  |
| <i>c.149_150insCCCCCCC</i>             | Provavelmente patogênica    |
| <i>c.150del</i>                        | Provavelmente patogênica    |
| <i>c.150delG</i>                       | Patogênica                  |
| <i>c.154_170dup</i>                    | Significado incerto         |
| <i>c.154_173dup</i>                    | Provavelmente patogênica    |
| <i>c.157_160dup</i>                    | Patogênica                  |
| <i>c.158_162dup</i>                    | Significado incerto         |
| <i>c.158_163delinsT</i>                | Patogênica                  |
| <i>c.162_163insAGTGCTCC</i>            | Patogênica                  |
| <i>c.163_164delGC</i>                  | Provavelmente patogênica    |
| <i>c.165_181dup</i>                    | Significado incerto         |
| <i>c.166_184dup</i>                    | Provavelmente patogênica    |
| <i>c.173_174insCATGCACCGCTGCAGCTGC</i> | Significado incerto         |
| <i>c.174_193dup</i>                    | Patogênica                  |

|                               |                          |
|-------------------------------|--------------------------|
| <i>c.177_184dup</i>           | Patogênica               |
| <i>c.181_186dup</i>           | Provavelmente patogênica |
| <i>c.182_195dup</i>           | Provavelmente patogênica |
| <i>c.183_195del</i>           | Patogênica               |
| <i>c.186C&gt;A</i>            | Provavelmente patogênica |
| <i>c.187dup</i>               | Significado incerto      |
| <i>c.188_192dup</i>           | Patogênica               |
| <i>c.190_197del</i>           | Patogênica               |
| <i>c.196_197insGCCAGGGACG</i> | Provavelmente patogênica |
| <i>c.1A&gt;G</i>              | Provavelmente patogênica |
| <i>c.202_220+37del</i>        | Significado incerto      |
| <i>c.208_215dup</i>           | Patogênica               |
| <i>c.219A&gt;C</i>            | Patogênica               |
| <i>c.219A&gt;G</i>            | Patogênica               |
| <i>c.220+1G&gt;T</i>          | Provavelmente patogênica |
| <i>c.220+2T&gt;C</i>          | Provavelmente patogênica |
| <i>c.220G&gt;C</i>            | Provavelmente patogênica |
| <i>c.220_220+2del</i>         | Significado incerto      |
| <i>c.221-2A&gt;G</i>          | Patogênica               |
| <i>c.232_233dup</i>           | Provavelmente patogênica |
| <i>c.30_31insG</i>            | Patogênica               |
| <i>c.35C&gt;G</i>             | Provavelmente patogênica |
| <i>c.38_39delAG</i>           | Patogênica               |
| <i>c.3G&gt;T</i>              | Patogênica               |
| <i>c.49C&gt;T</i>             | Provavelmente patogênica |
| <i>c.56_57del</i>             | Significado incerto      |
| <i>c.5A&gt;G</i>              | Patogênica               |
| <i>c.90_91del</i>             | Patogênica               |
| <i>c.92_93del</i>             | Provavelmente patogênica |

*c.93\_94del*

Patogênica

*c.94delG*

Significado incerto

Tanto os blastos de TAM quanto os de LM-DS carregam mutações truncadas no sítio N-terminal do gene *GATA1*, ou outras alterações que inviabilizam a produção da isoforma longa da proteína. Isso resulta em um desbalanceamento da quantidade de ambas as isoformas, resultando em uma maior disponibilidade da isoforma mais curta (*GATA1s*) (GARNETT; CRUZ HERNANDEZ; VYAS, 2020). Ao se levar em conta que muitas mutações apresentadas na tabela 03, mesmo quando capazes de tirar o gene de fase e consequentemente, resultar em uma proteína truncada, estão classificadas como de significado incerto ou provavelmente patogênica no Clinvar, acreditamos que essa classificação não considerou o contexto da LM-SD, e poderiam ser reclassificadas. Para tanto, testes adicionais que mostram o desbalanceamento da expressão gênica entre as isoformas do *GATA1* podem trazer uma força maior para classificação destas variantes ainda não descritas como patogênicas.

Por outro lado, as variantes encontradas na nossa coorte de pacientes afetados, fornecem evidências do potencial patogênico das alterações, mostrando que mais variantes associadas aos quadros de TAM e de LM-SD devem ser depositadas no banco de dados de variantes, para assim, melhorar informação a respeito das variantes genéticas já descritas.

Para um dos pacientes incluídos no estudo, não foi possível identificar mutações nos éxons 2 e 3 do gene *GATA1* por meio da metodologia de sequenciamento Sanger. Dado que o paciente apresentava um quadro clínico fortemente sugestivo de alterações genéticas, decidimos aprofundar a investigação do status mutacional através da análise da molécula de RNA. Para isso, empregamos a abordagem de RNA-Seq utilizando a tecnologia de sequenciamento de próxima geração (NGS). Nessa análise, foi identificada a

mutação c.1A>G no gene *GATA1*, a qual foi classificada como provavelmente patogênica com base em critérios de predição bioinformática e dados de literatura (Figura 09). As métricas de sequenciamento obtidas apresentaram excelente qualidade, com uma cobertura uniforme ao longo da região de interesse e profundidade de leitura adequada, garantindo a confiabilidade dos dados gerados. A escolha de sequenciar o cDNA, em vez do DNA genômico (gDNA), mostrou-se uma estratégia eficaz na detecção de mutações no gene *GATA1*, especialmente em casos onde a contagem de blastos circulantes é baixa. Esta abordagem permite a análise direta do RNA mensageiro, o que pode ser crucial para identificar mutações que poderiam não ser detectadas em gDNA devido a limitações técnicas ou baixa expressão dos alelos mutantes. Assim, a análise do cDNA por RNA-Seq representa uma ferramenta valiosa para a investigação de alterações genéticas em contextos clínicos desafiadores.

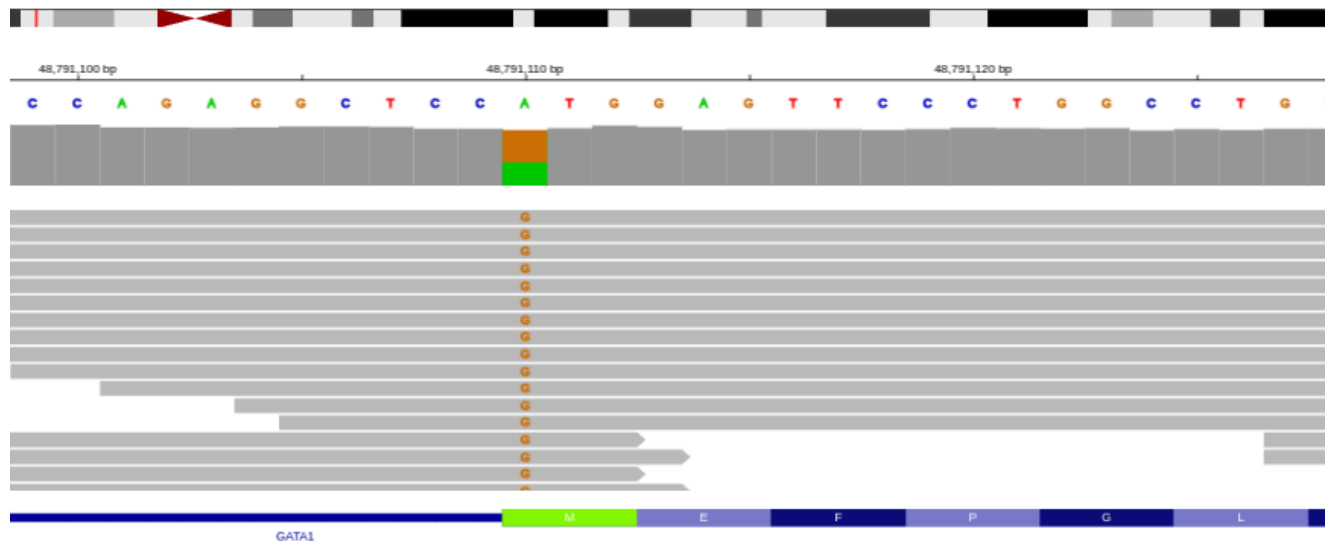


Figura 09 - Visualização em *Integrative Genomics Viewer* (IGV) de variante no gene *GATA1*, evidenciando substituição nucleotídica em região codificante. Os *reads* alinhados (em cinza) destacam a presença do alelo mutado (em laranja/verde) em heterozigose.

## Análise de DRM por AE-PCR

Para investigar a presença de doença residual mínima (DRM), realizamos uma análise utilizando a técnica de PCR alelo-específica (AE-PCR). Essa abordagem foi empregada para detectar mutações específicas em posições previamente identificadas. A AE-PCR permite a amplificação seletiva de alelos mutantes, proporcionando uma sensibilidade aumentada para a detecção de variantes em populações heterogêneas de células, o que é particularmente útil em contextos em que as mutações de interesse estão presentes em baixa frequência. Os primers foram desenhados de acordo com as mutações descritas para cada amostra, e estão representados na tabela X.

Tabela 04 - Lista de oligonucleotídeos desenhados para análise de monitoramento de DRM por PCR

| Amostra                   | Mutação          | Forward                     | T <sub>m</sub> (°C) |
|---------------------------|------------------|-----------------------------|---------------------|
| GT154/1                   | c.115G>T         | CAGGGGTTTTCTTCCCCTCTGGGCGTT | 68,48               |
| GT156/1; GT161/1; GT175/1 | c.90_91del       | GTGTCCTCCACACCAGAATCGGGTT   | 66,47               |
| GT157/1                   | c.158_163delinsT | CACTGCCCCGAGCACAGTCTGC      | 68                  |
| GT163/1                   | c.177_184dup     | TGCGGCACTGGCCTACTGGCCT      | 68                  |
| GT174/1                   | c.187dup         | TGCAGCTGCGGCACTGGCCTAATTA   | 67,3                |
| GT184/1                   | c.56_57del       | GAGCCCCTCCCCAGTTTGA         | 63,9                |

Os oligonucleotídeos foram ressuspensos de acordo com as instruções do fabricante e realizamos a padronização das condições de amplificação. Para as amostras GT142, GT154, GT156, GT161 e GT175, realizamos reações de PCR utilizando um gradiente de temperatura de anelamento, variando entre 65°C, 66°C e 67°C. A maioria das amostras apresentaram resultados positivos nessas condições, exceto a amostra GT156. Esta última exibiu uma banda fraca nas reações realizadas a 65°C e 66°C, e um resultado negativo na reação a 67°C. Esse procedimento foi realizado para as demais amostras (Figura 10).

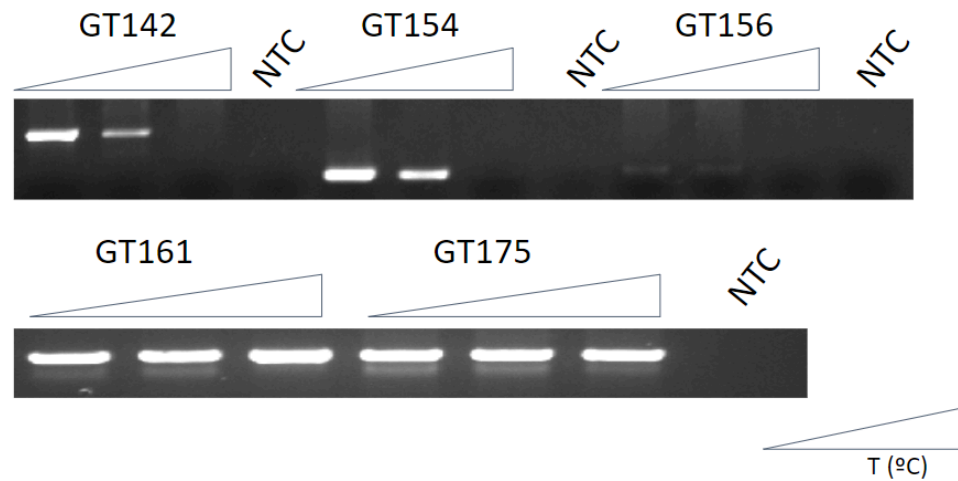


Figura 10 - Padronização de AE-PCR com gradiente de temperatura. (NTC - *No Template Control*)

Após a validação das condições de reação, com ênfase na otimização da temperatura de anelamento, as amostras foram submetidas a testes de especificidade. Para garantir a precisão dos resultados, incluímos controles negativos em todas as reações. Esses controles consistiram em reações de PCR sem a adição de DNA (NTC - *No Template Control*) e em amostras conhecidamente negativas para a mutação alvo da análise (NC - Controle Negativo). Os resultados obtidos foram satisfatórios e confirmaram a especificidade dos oligonucleotídeos, confirmando assim o uso dessa técnica para monitoramento de DRM na coorte em questão (Figura 11).

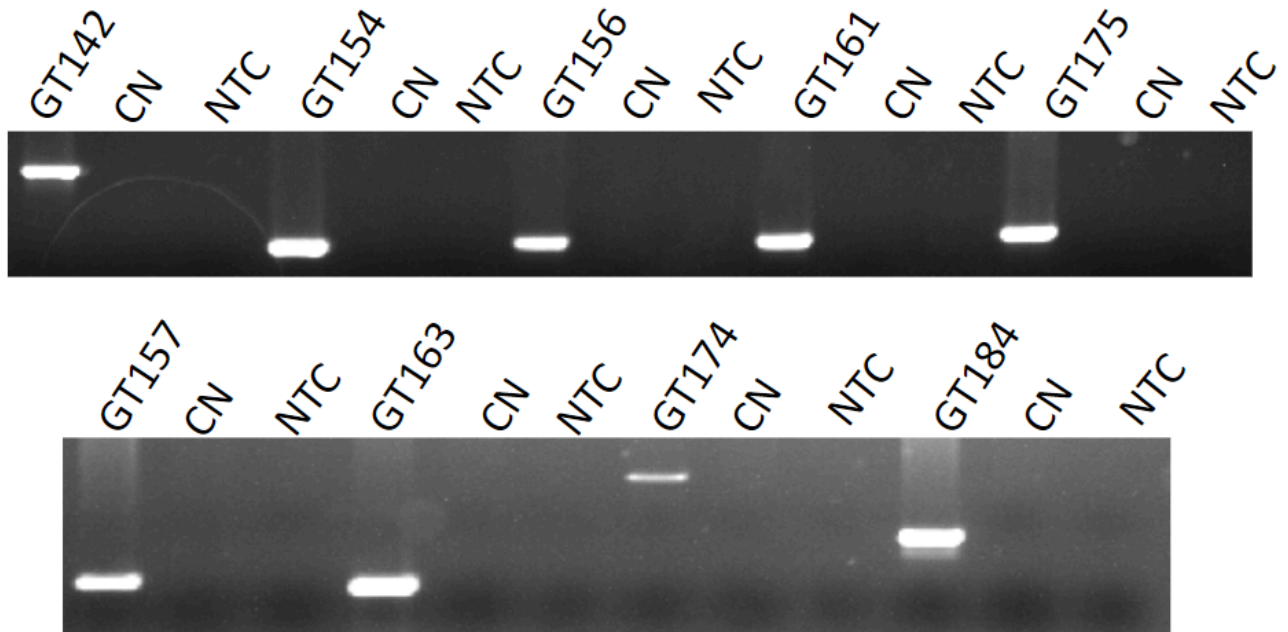


Figura 11 - Validação de AE-PCR com controle negativo (CN). (NTC - *No Template Control*)

Utilizando essa abordagem de AE-PCR, avaliamos temporalmente o acompanhamento do paciente GT138, portador da mutação c.173\_194dup. Os resultados obtidos ao longo do tempo para as amostras analisadas, incluindo medula óssea (MO), sangue periférico (SP), e swab bucal (SWB) estão apresentados na figura 12. As datas de coleta variam de 19/06/2018 a 02/12/2022. Os testes realizados incluem sequenciamento do éxon 2 do gene *GATA1*, PCR alelo-específico, e citometria para a detecção de DRM.

Os resultados mostram a presença da mutação detectada por sequenciamento de *GATA1* em algumas amostras, com resultados variáveis de detecção por AE-PCR e citometria. Especificamente, a mutação foi detectada pelo AE-PCR em várias amostras ao longo do tempo, apresentando sensibilidade superior à detectada em algumas amostras por citometria, por exemplo (Figura 13).

A imagem de eletroforese em gel de agarose mostra os resultados das reações de AE-PCR para as amostras coletadas nas datas especificadas. As bandas positivas (indicadas pelas setas vermelhas) correspondem à presença da mutação *GATA1* nas datas

20/07/2018 e 17/10/2022, quando a DRM por citometria de fluxo apresentou resultado negativo. O controle negativo (NO) não apresenta bandas, conforme esperado.

|                              | 19/06/18 | 09/07/18 | 20/07/18 | 08/10/21 | 01/12/21 | 15/12/21 | 13/05/22 | 17/10/22 | 02/12/22 |     |
|------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----|
| Amostra                      | MO       | MO       | SP       | MO       | MO       | MO       | MO       | MO       | MO       | SWB |
| Sequenciamento GATA1         | +        | -        | NR       | +        | -        | NR       | NR       | +        | +        | -   |
| PCR Alelo Específico – GATA1 | +        | +        | +        | +        | -        | NR       | NR       | +        | +        | -   |
| Citometria                   | 10%      | DRM -    | DRM -    | 2,7%     | DRM -    | 0,1%     | DRM -    | DRM -    | 2,8%     |     |

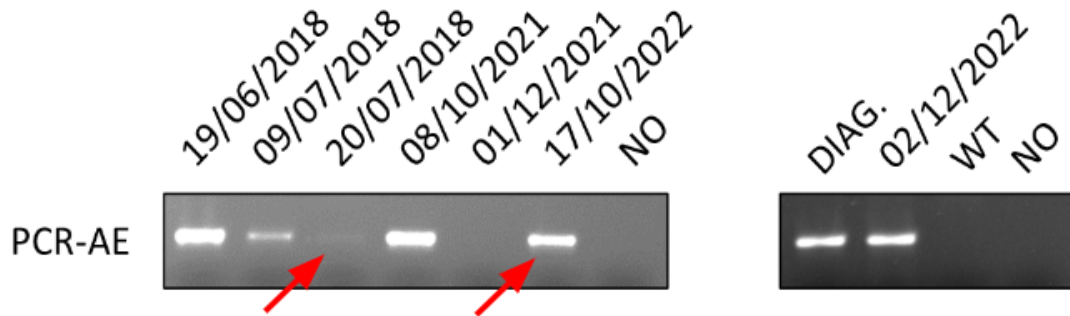


Figura 12 - Análise longitudinal das amostras do paciente GT138 portador da mutação *GATA1.174\_193dup* e detecção de doença residual mínima por AE-PCR, citometria de fluxo e sequenciamento Sanger.

## CONCLUSÃO

O presente estudo investigou as mutações no gene GATA1 em pacientes com Síndrome de Down (SD) e sua associação com a leucemia mieloide associada à Síndrome de Down (LM-SD) e a mielopoiese transitória anormal (TAM). Os resultados demonstraram a importância da triagem e monitoramento dessas mutações para o diagnóstico e acompanhamento clínico. A predominância de mutações no éxon 2 do gene GATA1, bem como a diversidade de alterações genéticas encontradas, reforçam a complexidade da patogênese da LM-SD. A utilização de técnicas como HRM e RNA-Seq mostrou-se eficaz na detecção e caracterização dessas variantes, mesmo em casos de baixa frequência alélica. O monitoramento da doença residual mínima (DRM) por AE-PCR, utilizando mutações GATA1 como marcador, apresenta-se como uma ferramenta promissora para prever recidivas e guiar o tratamento. A discrepância na predominância masculina observada em nossa coorte, em contraste com a literatura, sugere a necessidade de investigações adicionais sobre fatores biológicos e de amostragem. Em suma, este trabalho contribui para o avanço do conhecimento sobre as mutações GATA1 e suas implicações clínicas na SD, abrindo caminho para estratégias diagnósticas e terapêuticas mais precisas e personalizadas.

A detecção de mutações no gene GATA1 é um biomarcador crucial para o diagnóstico e monitoramento da LM-SD e da TAM. A presença dessas mutações, que levam à produção da isoforma truncada GATA1s, é um evento genético inicial e necessário para o desenvolvimento dessas condições hematológicas em indivíduos com SD (WECHSLER et al., 2002; HITZLER et al., 2003). A identificação dessas alterações permite não apenas o diagnóstico precoce, mas também o acompanhamento da DRM, um fator prognóstico fundamental para a avaliação da resposta ao tratamento e a previsão de recidivas (PINE et al., 2005; XU et al., 2021).

A predominância de mutações no éxon 2 do gene GATA1, que resultam na produção da isoforma GATA1s, é um achado consistente com a literatura e reforça o papel central

dessa isoforma na patogênese da LM-SD (GARNETT; CRUZ HERNANDEZ; VYAS, 2020). A diversidade de mutações identificadas, incluindo indels, duplicações e SNVs, sublinha a heterogeneidade genética dessas condições. A alta proporção de variantes de significado incerto destaca a necessidade de estudos funcionais adicionais para uma classificação mais precisa e para a compreensão de seu impacto clínico. A reclassificação dessas variantes, considerando o contexto específico da LM-SD e o desbalanceamento da expressão gênica entre as isoformas do GATA1, é fundamental para aprimorar a precisão diagnóstica e prognóstica.

A aplicação de técnicas moleculares avançadas, como HRM para triagem e o NGS para caracterização detalhada das mutações, tem se mostrado essencial para a detecção precisa e sensível das alterações no GATA1. A capacidade de monitorar a DRM por meio de AE-PCR utilizando mutações GATA1 como marcador é uma ferramenta promissora para prever recidivas e guiar o tratamento, permitindo intervenções mais direcionadas e personalizadas (PINE et al., 2005; XU et al., 2021).

Em suma, este trabalho contribui significativamente para o avanço do conhecimento sobre as mutações GATA1 e suas implicações clínicas na Síndrome de Down. A integração de metodologias moleculares avançadas e o monitoramento da DRM são passos cruciais para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais precisas e personalizadas, visando melhorar os desfechos clínicos para pacientes com LM-SD. Estudos futuros devem focar na elucidação do papel das variantes de significado incerto e na validação de biomarcadores para a predominância masculina observada, a fim de refinar ainda mais as abordagens de manejo e tratamento.



## PERSPECTIVAS

Ao longo deste estudo, conseguimos reunir informações importantes sobre as mutações no gene GATA1 em crianças com síndrome de Down, mas muitos pontos ainda precisam ser melhor compreendidos. Um dos principais desafios que enfrentamos foi a quantidade expressiva de variantes classificadas como de significado incerto.

Para seguir avançando, será essencial realizar mais testes funcionais. Precisamos entender melhor como essas variantes afetam, na prática, o funcionamento do gene e da proteína GATA1, especialmente em relação à produção das isoformas curta e longa. Experimentos que avaliem diretamente esse desbalanço podem ajudar a confirmar o papel patogênico de algumas variantes que hoje ainda estão mal classificadas.

Outro ponto importante é a ampliação do uso de técnicas complementares, como o HRM e a AE-PCR, que mostraram ser muito úteis para detectar mutações mesmo quando elas estão presentes em quantidades muito pequenas. Essas ferramentas podem ser incorporadas à rotina de diagnóstico, tornando o processo mais rápido, sensível e acessível.

Além disso, é importante que mais informações como as obtidas aqui sejam compartilhadas com a comunidade científica. Inserir essas variantes e seus contextos clínicos em bases públicas ajudará outros profissionais ao redor do mundo a interpretar melhor seus próprios casos, contribuindo para uma construção coletiva do conhecimento sobre o GATA1.

## Referências Bibliográficas

ANTONARAKIS, S. E. et al. Down syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 6, n. 1, p. 1-20, 2020.

CAMARGO, R. et al. A sensitive and inexpensive high-resolution melting-based testing algorithm for diagnosis of transient abnormal myelopoiesis and myeloid leukemia of Down syndrome. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 69, n. 11, e29866, 2022. DOI: 10.1002/pbc.29866.

CRISPINO, J. D. GATA1 mutation in Syndrome: Implications for biology and diagnosis of children with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 44, p. 40-44, 2005.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts635.

EISBACHER, M. et al. Protein-Protein Interaction between Fli-1 and GATA-1 Mediates Synergistic Expression of Megakaryocyte-Specific Genes through Cooperative DNA Binding. *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, p. 3427-3441, 2003.

GARNETT, C.; CRUZ HERNANDEZ, D.; VYAS, P. GATA1 and cooperating mutations in myeloid leukaemia of Down syndrome. *IUBMB Life*, v. 72, n. 11, p. 2315-2324, 2020.

GOEMANS, B. F. et al. Sensitive GATA1 mutation screening reliably identifies neonates with Down syndrome at risk for myeloid leukemia. *Leukemia*, v. 35, p. 2812–2815, 2021. DOI: 10.1038/s41375-021-01128-1.

GREAVES M, et al. *Transient abnormal myelopoiesis and AML in Down syndrome: an evolutionary model of disease progression*. Nat Rev Cancer. 2013.

GREENE, M. E. et al. Mutation in GATA1 in both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia of Down Syndrome. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v. 31, p. 351, 2003.

GINSBURG D, et al. *Transient abnormal myelopoiesis and progression to acute myeloid leukemia in Down syndrome*. Blood Rev. 2021.

GURBUXANI, S.; VYAS, P.; CRISPINO, J. D. Recent insights into mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down Syndrome. *Blood*, v. 103, p. 399-406, 2004.

HITZLER, J. K.; ZIPURSKY, A. Origins of leukaemia in children with Down syndrome. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, p. 11-20, 2005.

HITZLER, J. K. et al. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*, v. 101, n. 11, p. 4301-4304, 2003.

HONG, W. et al. FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *The EMBO Journal*, v. 24, p. 2367-2378, 2005.

ICHIKAWA, M. et al. AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nature Medicine*, v. 10, p. 299-304, 2004.

KANEZAKI, R. et al. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood*, v. 116, n. 22, p. 4638-4644, 2010. DOI: 10.1182/blood-2010-05-282426.

LEMONS, D. et al. Down syndrome and leukemia: from basic mechanisms to clinical advances. *Pediatric Blood & Cancer*, 2023.

LIU, J. et al. An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods*, v. 8, n. 34, 2012. DOI: 10.1186/1746-4811-8-34.

LUTTERBACH, B.; HIEBERT, S. W. Role of the transcription factor AML-1 in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene*, v. 245, p. 223-235, 2000.

ORKIN, S. H.; ZON, L. I. Hematopoiesis: An evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, v. 132, n. 4, p. 631-644, 2008. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.025.

PINE, S. R. et al. GATA1 as a new target to detect minimal residual disease in both transient leukemia and megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Leukemia Research*, v. 29, n. 10, p. 1165-1170, 2005.

REKHTMAN, N. et al. PU.1 and pRB interact and cooperate to repress GATA-1 and block erythroid differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, p. 7460-7474, 2003.

ROZEN, L. et al. Transient leukemia in a newborn without Down syndrome: case report and review of the literature. *European Journal of Pediatrics*, v. 173, n. 12, p. 1643–1647, 2014.

SPYROPOULOS, D. D. et al. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos with a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, v. 20, p. 5643-5652, 2000.

WANG, X. et al. Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA1 and FOG1: role of Ets transcription factors. *The EMBO Journal*, v. 21, p. 5225-5234, 2002.

WATANABE, K. Recent advances in the understanding of transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Pediatric International*, v. 61, n. 3, p. 222–229, 2019.

WECHSLER, J. et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nature Genetics*, v. 32, n. 1, p. 148-152, 2002.

XU, J. et al. Post-induction MRD by FCM and GATA1-PCR are significant prognostic factors for predicting ML-DS relapse. *Leukemia Research*, v. 101, 106497, 2021. DOI: 10.1016/j.leukres.2021.106497.

## ANEXOS

ANEXO I - Lista de unidades hospitalares que participaram do estudo e sua respectiva localização

| <b>Hospital</b>   | <b>Estado</b>      |
|---|--------------------|
| <i>Hospital da Criança de Brasília José Alencar</i>               | Brasília           |
| <i>Hospital Pequeno Príncipe</i>                                  | Paraná             |
| <i>Hospital Brasília</i>  | Distrito Federal   |
| <i>INCA</i>   | Rio de Janeiro     |
| <i>Hospital Regional do Mato Grosso do Sul</i>                    | Mato Grosso do Sul |
| <i>Hospital Vitória</i>   | Rio de Janeiro     |
| <i>Hospital Veredas</i>   | Alagoas            |
| <i>Hospital das Clínica da Universidade Federal de Uberlândia</i> | Minas Gerais       |
| <i>Hospital Araujo Jorge</i>                                      | Goiás              |
| <i>Hospital Regional de Sobradinho</i>                            | Distrito Federal   |
| <i>Hospital Martagão Gesteira</i>                                 | Bahia              |
| <i>Hospital São Lucas</i>   | Sergipe            |
| <i>Santa Casa de Misericórdia de Maceio</i>                       | Alagoas            |
| <i>HRU</i>  | Fortaleza          |
| <i>Unimed Fortaleza</i>   | Ceará              |

|  |                |
|--|----------------|
| <i>Hospital Infantil Campinas</i>                    | São Paulo      |
| <i>Hospital do Câncer de Londrina</i>                | Paraná         |
| <i>Hospital do Cancer Infantil de Barretos</i>       | São Paulo      |
| <i>Hospital Quinta D'or</i>                          | Rio de Janeiro |
| <i>Hospital São Marcos</i>                           | Piauí          |
| <i>Hospital Infantil Menino Jesus</i>                | São Paulo      |
| <i>Hospital Infantil Joana de Gusmão</i>             | Bahia          |
| <i>Hospital Erastinho</i>                            | Paraná         |
| <i>Hospital das Clínicas UFMG</i>                    | Minas Gerais   |
| <i>Hospital Estadual da Criança</i>                  | Bahia          |
| <i>Hosp..Albert Urquiza Wanderley</i>                | Paraíba        |
| <i>Hosp. Manoel Novaes</i>                           | Bahia          |
| <i>Hospital Napoleão Laureano</i>                    | Paraíba        |
| <i>Maternidade Dona Evangelina Rosa</i>              | Piauí          |
| <i>Hospital Medimagem</i>                            | Piauí          |
| <i>Hospital Infantil Sabará</i>                      | São Paulo      |
| <i>Hospital Universitário Lauro Wanderley</i>        | Paraíba        |
| <i>Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo</i> | São Paulo      |
| <i>Hospital Santo Antônio</i>                        | Santa Catarina |
| <i>Hospital Santa Izabel</i>                         | Bahia          |
| <i>Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo</i>     | Pará           |
| <i>Hospital Santa Catarina de Blumenau</i>           | Santa Catarina |

*Hospital Regional do Oeste*

Santa Catarina

*Hospital Felício Rocha*

Minas Gerais

*GRAAC - Unifesp*

São Paulo

*IPPMG/UFRJ*

Rio de Janeiro

*AC Camargo Cancer Center*

São Paulo

*Hospital Alvorada Moema*

São Paulo