

ANÁLISE COMPARATIVA DE POPULAÇÕES DISSÔMICA E  
TRISSÔMICA UTILIZANDO DUPLICAÇÕES SEGMENTARES:  
RELAÇÃO ENTRE O CROMOSSOMO CHRISTCHURCH (CH<sup>1</sup>) E A  
TRISSOMIA 21

**LUÍSA MIGNONE PAIXÃO**

Enrique Medina-Acosta

Orientador

Filipe Brum Machado

Coorientador

Laboratório de Biotecnologia  
Centro de Biociências e Biotecnologia

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO DE 2018

ANÁLISE COMPARATIVA DE POPULAÇÕES DISSÔMICA E  
TRISSÔMICA UTILIZANDO DUPLICAÇÕES SEGMENTARES:  
RELAÇÃO ENTRE O CROMOSSOMO CHRISTCHURCH (CH<sup>1</sup>) E A  
TRISSOMIA 21

**LUÍSA MIGNONE PAIXÃO**

Dissertação desenvolvida no Centro de  
Bióciências e Biotecnologia da Universidade  
Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como  
parte das exigências para obtenção do título de  
Mestrado.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO DE 2018



ANÁLISE COMPARATIVA DE POPULAÇÕES DISSÔMICA E  
TRISSÔMICA UTILIZANDO DUPLICAÇÕES SEGMENTARES:  
RELAÇÃO ENTRE O CROMOSSOMO CHRISTCHURCH (CH<sup>1</sup>) E A  
TRISSOMIA 21

**LUÍSA MIGNONE PAIXÃO**

Dissertação desenvolvida no Centro de  
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade  
Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como  
parte das exigências para obtenção do título de  
Mestrado.

Aprovada em 17 de julho de 2018

Comissão Examinadora

---

Prof. Dr. Víctor Martins Quintana Flores (Doutor em Engenharia Genética/ UENF)

---

Prof. Dr. Regina Célia de Souza Campos Fernandes (Doutora em doenças infecciosas e parasitárias/ FMC)

---

Prof. Dr. Fabrício Moreira Almeida (Doutor em Biotecnologia/UENF)

---

Prof. Dr. Felipe Brum Machado (Doutor em Ciências Biológicas/UEMG) - coorientador

---

Prof. Dr. Enrique Medina Acosta (Doutor em Parasitologia Médica e Molecular) - orientador

“Descobrir não é algo fácil, mas é a única coisa que vale a pena” – Dra. Ursula  
Downs

## DEDICATÓRIA

Para Helena,  
Raio de Sol que me guiava de volta para casa, e que agora ilumina meu  
caminho inteiro.

## AGRADECIMENTOS

Esta lauda de agradecimentos não é suficiente para o tamanho da minha gratidão. Os desafios não foram poucos durante o tempo do mestrado, mas fui abençoada com uma quantidade ainda maior de amigos.

Meu agradecimento inicial vai para a minha família, um farol e porto seguro após minhas viagens. Obrigada Edmilson, Marisa, Henrique, Paulo e Naná, por todo amor, colo, conselhos, e por me ensinarem a ter sempre fé e não sofrer pelo amanhã. O amanhã trará suas próprias preocupações. Basta a cada dia seu próprio mal.

Coloco aqui meu agradecimento as minhas amigas-irmãs Amanda, Bruna, Carla, Isabela e Maria Carolina, que me aguentaram nas horas de desespero e que me lembrarem sempre que a distância é um mero detalhe.

Agradeço aos amigos conquistados na graduação e no mestrado: Carol, Vinícius, Rhayane, Julia e Igor, que compartilharam das mesmas lágrimas e comemorações que vivenciei.

Aos amigos virtuais Anna Isa e Gabriel, por transformarem a tela fria de um computador num refúgio caloroso.

A Hemerson, pelas doses de amor e confiança diárias.

À equipe do Nudim, que me ensinou o que é ser pesquisadora, aos colegas que viraram amigos: Thais, Cinthya, Juliana, Pedro, Douglas, Ronaldo, Antonio, Thiago e demais colegas.

Um agradecimento especial ao meu orientador e corientador prof. Enrique Medina-Acosta e Dr. Filipe Brum Machado, que me acolheram, lapidaram e valorizaram durante este processo.

À professora Olga, Dra Laís Fardim, Dra Vanessa Coelho e Dra Rosalee, por toda a ajuda.

E finalizo aqui com meus agradecimentos a UENF, pela oportunidade de crescimento e pelo exemplo de perseverança. A luta continua.

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Aneuploidias humanas.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Trissomia 21 .....</b>	<b>3</b>
<b>2.3. Histórico .....</b>	<b>4</b>
<b>2.4. Meiose e Gametogênese .....</b>	<b>5</b>
<b>2.5. Fatores de risco .....</b>	<b>12</b>
2.5.1. Risco associado com a idade materna .....	12
2.5.2. Mosaicismo ovariano .....	13
2.5.3. Polimorfismos na família do gene TP53 .....	13
2.5.4. Polimorfismos nos genes do metabolismo do ácido fólico .....	14
2.5.5 Fatores extrínsecos.....	16
2.5.6. Recombinação gamética .....	16
<b>2.6. Métodos de Diagnóstico para a síndrome De Down.....</b>	<b>17</b>
2.6.1. Detecção de padrões de recombinação do cromossomo através de marcadores STR .....	18
<b>2.7. Padrões normais e alterados de recombinação.....</b>	<b>18</b>
<b>2.8. Estrutura do braço curto .....</b>	<b>25</b>
2.8.1. Organização .....	25
2.8.2. Duplicações .....	26
2.8.3. Cromossomo Christchurch .....	27
<b>CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE RECOMBINAÇÃO E BUSCA DE NOVOS MARCADORES DO TIPO STR NO 21p .....</b>	<b>30</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>31</b>
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos .....	31
<b>4. Material e Métodos.....</b>	<b>31</b>
4.1. Análise genômica comparativa de genomas do cromossomo 21.....	31
4.2. Predição do potencial polimórfico .....	33
4.3. Avaliação da unicidade dos novos marcadores STR .....	33
4.4. Desenho dos iniciadores .....	34
4.5. Dados.....	34
4.6. Determinação dos locais físicos dos eventos de recombinação em 21q dos dados de Hou <i>et al.</i> , 2013 .....	34
<b>5. Resultados .....</b>	<b>35</b>
5.1. Alinhamento manual do 21p .....	35
5.2. Seleção e desenho de iniciadores no 21p .....	35
5.3. Alinhamento pSTR.....	38
5.4. Resultados da genotipagem .....	38
5.5. Análises em oócitos .....	39
5.6. Comparações do mapa de recombinação dos oócitos com o <i>Rutgers</i> <i>map</i> .....	42
5.7. Comparação dos padrões de recombinação .....	44
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>

<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO II – UNICIDADE DO 21p E MARCADORES PROVENIENTES DE DUPLICAÇÕES SEGMENTARES.....</b>	<b>50</b>
<b>3.OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Objetivo Geral .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>51</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Material biológico .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2. Varredura do braço curto do cromossomo 21 por sequências únicas. ....</b>	<b>51</b>
<b>4.3. Mapeamento das duplicações segmentares presentes no 21p.....</b>	<b>52</b>
<b>4.4. Busca de inserções e deleções (indels) para o uso dentro das duplicações segmentares.....</b>	<b>54</b>
<b>4.5. Identificação da presença da aneuploidia por SD-QF-PCR .....</b>	<b>54</b>
<b>4.6. Desenho dos iniciadores .....</b>	<b>55</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1. Varredura do conteúdo do 21p.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2. Unicidade do 21p .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3. Busca de duplicações segmentares .....</b>	<b>61</b>
<b>5.4. Resultados das genotipagem de controles .....</b>	<b>65</b>
<b>5.5. Resultado das genotipagens em amostras trissômicas .....</b>	<b>69</b>
<b>5.6. Busca de mais amostras com a possível deleção .....</b>	<b>75</b>
<b>5.7. Comparação dsos resultados das amostras dos controles dissômicos e amostras trissômicas.....</b>	<b>76</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>78</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Boneco de argila representando indivíduo com trissomia 21. ....	5
<b>Figura 2.</b> Meiose.....	6
<b>Figura 3.</b> Organização dos cromossomos em grupos .....	10
<b>Figura 4.</b> Formação de uma Translocação Robertsoniana.....	11
<b>Figura 5.</b> Ciclo do ácido fólico.....	15
<b>Figura 6.</b> Comparação do comprimento do mapa de recombinação entre as populações normais de mulheres com mães de casos de trissomia.....	19
<b>Figura 7.</b> Resultados da ausência de recombinação.....	20
<b>Figura 8.</b> Resultados de recombinações proximais.....	21
<b>Figura 9.</b> Resultado de recombinações distais.....	22
<b>Figura 10.</b> Mapa genético dos locais de recombinação em todo cromossomo 21. ..	24
<b>Figura 11.</b> Ideograma do cromossomo 21.....	25
<b>Figura 12.</b> Duplicações segmentares presentes no braço curto do cromossomo 21.	27
<b>Figura 13.</b> Cariograma de uma mulher com a presença do cromossomo Ch <sup>1</sup> . ....	28
<b>Figura 14.</b> Ch <sup>1</sup> identificado por Ballantyne, Parslow <i>et al.</i> (1977). ....	29
<b>Figura 15.</b> Unicidade das sequências dos marcadores STR em potencial.....	37
<b>Figura 16.</b> Eletroferograma do gradiente de temperaturas do marcador D21S9834378 .....	39
<b>Figura 17.</b> Representação gráfica da distribuição de recombinações ao longo do braço longo do cromossomo 21. ....	40
<b>Figura 18.</b> Distribuição espacial dos eventos de recombinação dos oócitos de Hou <i>et al.</i> , 2013.....	45
<b>Figura 19.</b> Linhas de pista da varredura das duplicações segmentares.....	53
<b>Figura 20.</b> Técnica de SD-QF-PCR. ....	55
<b>Figura 21.</b> Localização dos marcadores em relação ao centrômero.. ....	64
<b>Figura 22.</b> Resultados do tetraplex.....	65
<b>Figura 23.</b> Eletroferograma da genotipagem do triplex em controles dissômicos.....	66
<b>Figura 24.</b> Eletroferograma da genotipagem do triplex dos marcadores moleculares de duplicações segmentares em trissômicos.....	70
<b>Figura 25.</b> Eletroferograma das seis amostras trissômicas com perfis diferenciados .....	74

<b>Figura 26.</b> Possível deleção num eletroferograma dissômico .....	75
<b>Figura 27.</b> Comparação das razões de altura do sinal dos alelos entre indivíduos dissômicos e trissômicos.....	76
<b>Figura 28.</b> Comparativo da razão das áreas entre trissômicos e dissômicos.....	77

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Prevalência de nascimentos de indivíduos trissômicos em relação a idade materna. ....	12
<b>Gráfico 2.</b> Média de números de recombinação por cromossomo em oócitos.....	23
<b>Gráfico 3.</b> Posições das recombinações simples em cada oócito. ....	40
<b>Gráfico 4.</b> Posição das duplas recombinações entre cada oócito. ....	41
<b>Gráfico 5.</b> Número de recombinações por megabase no 21q. ....	42
<b>Gráfico 6.</b> Mapa genético do braço longo do cromossomo 21. ....	43
<b>Gráfico 7.</b> Comparação do número de eventos de recombinação entre os estudos de Hou, Fan <i>et al.</i> , 2013 e Oliver, Middlebrooks <i>et al.</i> , 2013.....	44
<b>Gráfico 8.</b> Porcentagem identidade as sequências do 21p.. ....	61

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação dos achados clínicos e suas distribuições entre mosaicos e não mosaicos para trissomia 21.....	8
<b>Tabela 2.</b> Genomas para alinhamento.....	32
<b>Tabela 3.</b> Sequências de genomas ainda não organizadas .....	32
<b>Tabela 4.</b> Microssatélites alvo do 21p.....	35
<b>Tabela 5.</b> Iniciadores dos marcadores 21p .....	35
<b>Tabela 6.</b> Microssatélites encontrados no braço curto pelo pSTR.....	38
<b>Tabela 7.</b> Sequências do braço curto do cromossomo 21 .....	57
<b>Tabela 8.</b> Duplicações segmentares alvo .....	62
<b>Tabela 9.</b> Marcadores alvo.....	62
<b>Tabela 10.</b> Resultados das médias das alturas das triplicatas dos controles dissômicas .....	67
<b>Tabela 11.</b> Resultados das médias das áreas dos controles dissômicos .....	68
<b>Tabela 12.</b> Médias das Altura e áreas dos dissômicos .....	69
<b>Tabela 13.</b> Resultados das médias das alturas das triplicatas trissômicas.....	71
<b>Tabela 14.</b> Resultados da média das áreas das triplicatas dos trissômicos .....	72
<b>Tabela 15.</b> Média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada marcador na população trissômica.....	73
<b>Tabela 16.</b> Média, desvio padrão e coeficiente de variação nas amostras trissômicas com perfil dissômicos .....	75

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Comparação dos achados clínicos e suas distribuições entre mosaicos e não mosaicos para trissomia 21.....	8
<b>Quadro 2.</b> Iniciadores dos marcadores 21p.....	35
<b>Quadro 3.</b> Microssatélites encontrados no braço curto pelo pSTR.....	38
<b>Quadro 4.</b> Duplicações segmentares alvo.....	62
<b>Quadro 5.</b> Marcadores alvo.....	62
<b>Quadro 6.</b> Médias das Altura e áreas dos dissômicos.....	69
<b>Quadro 7.</b> Média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada marcador na população trissômica.....	73
<b>Quadro 8.</b> Média, desvio padrão e coeficiente de variação nas amostras trissômicas com perfil dissômicos.....	75

## RESUMO

A Trissomia 21 é causada pela não disjunção do cromossomo 21 por um erro em algum estágio de divisão celular. Em quase 90% dos casos é dada por um erro meiótico e materno. Padrões alterados de recombinação no 21q têm sido propostos como um fator de risco idade-independente associado a não disjunção. A ausência de recombinação ou eventos muito pontuais aumenta o risco desta aneuploidia. Esses chamados padrões alterados de recombinação são quase indistinguíveis dos padrões normais revelados em mapas físicos de ligação em alta resolução do genoma e estudos de sequenciamento e mapeamento de oócitos. Ainda, nenhum desses estudos avaliou recombinações ao longo do braço curto (21p). A falta de análise nessa região motivou a elaboração dessa dissertação, que foi dividida em duas partes. A primeira busca a identificação de *loci* de marcadores do tipo microsatélites (STR) di, tri, tetra- e pentanucleotídeos polimórficos no 21p por análise computacional comparativa de sete montagens de sequências desse cromossomo. Foram selecionados os STRs mais polimórficos e únicos no 21p, e a unicidade de cada *locus* foi determinada por PCR *in silico* e experimentalmente por QF-PCR. Dos STR encontrados, um marcador foi apto para teste, contudo, apresentou picos inespecíficos. Mesmo os resultados das análises *in silico* mostrando este marcador como único, possivelmente ele se repete ao longo do genoma. A partir deste resultado, uma nova estratégia foi aplicada na segunda parte: beneficiando-nos do grande número de duplicações presentes, uma varredura nas duplicações segmentares do braço curto buscou sequências que pudessem ser utilizadas como marcadores para a técnica de SD-QF-PCR. Esta técnica se baseia na co-amplificação de uma mesma sequência de duplicações segmentares, que se encontra em dois cromossomos diferentes, utilizando o mesmo par de iniciadores, e identifica a aneuploidia pela diferença de dosagem dos alelos. A varredura localizou quatro marcadores dentro das características esperadas. Destes, três levaram a formação de um triplex, que diferenciou as populações de controles dissômicos e pacientes trissômicos com sucesso. Ainda, através do uso deste triplex, foi identificada uma deleção na região em ambos os fenótipos. Essa deleção está mais presente na população trissômica (30% dos trissômicos contra 2% dos dissômicos). Menos de 50% do 21p foi mapeado, e apenas 4% destas sequências são únicas. Esse buraco científico desencoraja

estudos no braço curto deste cromossomo. A descoberta destes três novos marcadores potencializa o diagnóstico para anomalias genéticas utilizando novas abordagens moleculares, valida e revitalizam estudos genéticos numa região antes encarada como geneticamente vazia. Ela mostra também uma possível susceptibilidade à não disjunção quando existe a perda do 21p, reforçando a importância dos estudos nele para melhor entendimento da trissomia 21.

**Palavras-chave:** cromossomo 21; padrões alterados de recombinação; não-disjunção; braço curto; cromossomo Christchurch;

## ABSTRACT

Trisomy 21 is caused by the chromosome 21 nondisjunction during cell division. In about 90% of its cases come from a maternal origin, during meiosis. Altered patterns of recombination at the 21q has been proposed to be an age-dependent risk factor associated with nondisjunction: absence of recombination or isolated events increase the risk for trisomy 21. These so-called altered patterns of recombination are almost indistinguishable from the normal patterns revealed by high-resolution linkage-physical maps of the human genome and high sequencing and mapping studies of single cells from oocytes. Moreover, none of the studies has assessed the effects of recombination on the short arm. The lack of analyses of this region motivated the execution of this two-part thesis. The first chapter seeks the identification of novel highly polymorphic repeats (STR) loci markers located on the 21p using comparative computational analyses of human references assembly sequences. The uniqueness of each locus was assessed by *in silico* PCR and experimentally by QF-PCR. A single marker was suitable of the assay but it presented unspecific peaks when tested with a control. Possibly this marker is duplicated along the genome spite of all *in silico* tests indicated it as unique. A new strategy was applied for the second chapter after this result: a screening throughout the 21p searched for sequences that could be used as markers for the SD-QF-PCR technique. This technique is based on the co-amplification of the same sequence in two different chromosomes and identifies the aneuploidy by allele dosage. Three of four markers found successfully distinguished trisomic profiles from disomic controls. A remarkable event of deletion of the short arm was also identified by using the triplex. This deletion is more frequent in trisomic population (30% against 2% from the disomic population). Less than 50% of the 21p is mapped and only 4% of it is unique. This scientific hole discourages studies on this region. The discovery of these three markers brings back the Christchurch (Ch<sup>1</sup>) chromosome from a molecular approach and shows a possible susceptibility for disjunction when the 21p is lost

**Keywords:** chromosome 21; altered recombination patterns; nondisjunction; short arm; chromosome Christchurch;

## 1. INTRODUÇÃO

A trissomia 21, apesar de ser a aneuploidia mais comum em nascidos vivos e uma das mais estudadas, apresenta ainda buracos científicos a serem desvendados.

A origem da cópia extra, seja ela livre, parcial, em pacientes mosaicos ou não mosaicos, é recorrentemente originária de um erro meiótico, que leva a não disjunção dos cromossomos ainda na gametogênese. Também, há um desequilíbrio na origem parental da cópia extra: 90% são de origem materna.

O que pode explicar essa origem preferencial da cópia extra seriam as diferenças na formação dos gametas feminino e masculino. Os processos diferenciados da oogênese e sua sensibilidade a mudanças intrínsecas e até comportamentais aumentam o risco de não disjunção nos cromossomos.

Os fatores de risco que causam a não disjunção são muito variáveis. Porém, é mais do que comprovado que, quanto maior a idade materna durante a concepção, maiores as chances de se gerar uma criança com trissomia 21. Este é o principal fator de risco conhecido até então.

Buscando fatores de risco ligados a eventos biológicos e idade-independente, existem teorias sobre mosaicismo ovariano e principalmente sobre eventos de recombinação.

Os eventos de recombinação, por estarem estreitamente ligados ao pareamento correto dos cromossomos, de fato, influenciam a disjunção destes durante a meiose. Muitos estudos comprovaram esta relação, e mudanças tanto no número de eventos quanto no local podem intervir na segregação correta dos pares.

Porém, a diferença entre os perfis normal e alterado de recombinação é muito sutil, levantando mais questionamentos do que convencimentos. O uso de marcadores do tipo STR como metodologia para estas análises, apesar de robusto, ainda não é explorado da melhor forma: os conjuntos de marcadores são escolhidos por uma propensão histórica, não por sua validade como marcador único, ou pela sua exatidão na posição no cromossomo 21.

Outro fator limitante nesses estudos é a falta de informação sobre o braço curto do cromossomo 21. Ainda, de todos os cromossomos acrocêntricos, o cromossomo 21 é o que apresenta o maior número de informações relevantes sobre o seu braço p,

mesmo tendo menos da metade de sua sequência devidamente mapeada. E quase a totalidade do que se é conhecido até então representa duplicações.

As informações inexploradas no cromossomo 21 mais as duplicações ali presentes dificultam a descoberta de marcadores informativos para qualquer tipo de estudo na região do braço curto. Não as levando em consideração, porém, ficam abaladas as conclusões sobre os supostos padrões de recombinação. As trocas de material genético que ocorrem nesse segmento do cromossomo influenciariam nas recombinações encontradas no braço longo, e assim no perfil como um todo.

Para a intrepidez de explorar o braço curto do cromossomo 21, uma nova abordagem teve de ser aplicada. Aproveitando as duplicações tão presentes no 21p, marcadores oriundos destas foram obtidos.

Essa dissertação é dividida em duas partes: a primeira explora os perfis de recombinação do cromossomo 21 buscando entender a diferença dos padrões alterado e normal, e analisando esse perfil pela primeira vez em oócitos, enquanto a segunda parte abrange os estudos no cromossomo 21 a um nível ainda não alcançado: analisando o conteúdo do braço curto deste cromossomo e o aplicando na busca de novos marcadores provenientes de duplicações segmentares para o estudo e entendimento da não disjunção.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Aneuploidias humanas

Aneuploidias são anormalidades cromossômicas numéricas, como a ausência de um cromossomo (monossomias) ou a presença de uma cópia extra (trissomias). Não são causadas por um único fator, mas sim o envolvimento de inúmeras circunstâncias que influenciam a separação dos cromossomos homólogos durante a formação dos gametas (Hassold e Hunt, 2001; Warren e Goringe, 2006).

As incidências reais de aneuploidias em humanos só podem ser definidas por estudos em fertilização *in vitro*. Porém, devido ao número limitado de estudos em cromossomos, esses dados podem divergir dos níveis de aneuploidias em concepções naturais. Apesar disso, é aceito que as aneuploidias são as complicações gestacionais mais comuns, e a principal causa de abortos espontâneos na espécie (Hassold e Hunt, 2001; Borges-Osório e Robinson, 2013).

As aneuploidias mais comuns compatíveis com a vida estão entre as monossomias e trissomias. Das monossomias, as autossômicas (ou seja, em cromossomos que não formam o par sexual), não costumam ser compatíveis com a vida, sendo a monossomia mais comum a Síndrome de Turner, onde há a redução no par sexual. Das trissomias, a alteração no par sexual é conhecida como Síndrome de Klinefelter, e nas autossômicas, são comuns as trissomias dos cromossomos 13, 18 e 21 (Borges-Osório e Robinson, 2013).

### 2.2. Trissomia 21

Trissomia 21 (ou T21) se refere à presença de uma cópia extra inteira ou parcial do cromossomo 21. Cerca de 80% das gestações com trissomia 21 perecem ainda no útero, mas ainda assim, ela é a alteração numérica mais comum entre as aneuploidias, com uma taxa de nascimentos de 1:660 nascidos. Ela também é uma causa notável de abortos espontâneos, resultando em 1-2% dos abortos conhecidos. (Hassold e Sherman, 2000; Antonarakis, Lyle *et al.*, 2004).

De acordo com a região do genoma triplicada, a trissomia pode ser classificada como trissomia completa, parcial ou microtrissomia (Antonarakis, Lyle *et al.*, 2004).

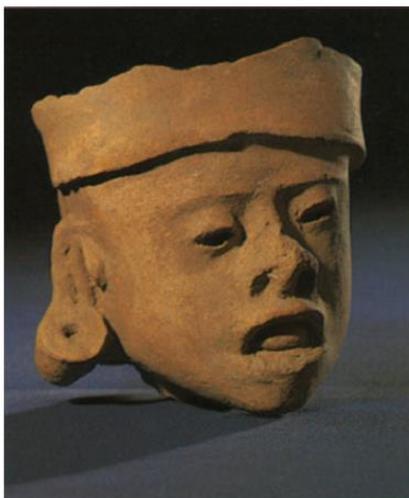
Uma trissomia completa ou livre apresenta a cópia extra do cromossomo 21, sendo a mais comum e resultante de uma não disjunção meiótica. A trissomia parcial é a “replicação” de uma banda do cromossomo de pelo menos 5 megabases (Mb), enquanto as microtrissomias são limitadas a replicação de uma região menor de 3Mb. É menos freqüente que a trissomia livre, e é comumente resultante de uma meiose anormal (Antonarakis, Lyle *et al.*, 2004; Dutta, Nandagopal *et al.*, 2005).

### 2.3. Histórico

John Langdon Down foi o primeiro, em 1886, a descrever e relacionar os fenótipos da anomalia com uma síndrome, e a descreveu erroneamente como *mongolismo*. Este termo foi por muito tempo a principal definição para a síndrome, e devido ao seu cunho racista, foi substituído por síndrome de Down e trissomia 21. Porém, a trissomia 21 está presente na cultura da humanidade desde as civilizações pré-colombianas (Megarbane, Ravel *et al.*, 2009).

Fazendo uma pesquisa sobre os três termos, utilizando a ferramenta *Ngram viewer* pode-se ver que de fato, os termos trissomia 21 e síndrome de Down ganham uso a partir da década de 1960, depois que geneticistas pediram o abandono do termo *mongolismo* por sua denotação racial, mas que ainda é erroneamente utilizado (Michel, Shen *et al.*, 2011).

Os primeiros registros datam a primeira metade do século primeiro, quando artefatos e esculturas de argilas de civilizações Tolteca (México) e Tumaco-La Tolita (região de fronteira entre Equador e Colômbia) foram encontradas, com caracteres do dismorfismo facial da síndrome claramente evidenciados. A figura 5 apresenta uma escultura de argila pertencente à civilização Tolteca, reconhecida como o registro mais antigo da síndrome. Algumas pinturas dos séculos XV e XVI parecem representar crianças com esses fenótipos também característicos (Martinez-Frias, 2005; Megarbane, Ravel *et al.*, 2009).



**Figura 1. Boneco de argila representando indivíduo com trissomia 21.** O boneco foi encontrado no México e é pertencente à civilização Tolteca. Fonte: Martinez-Frias, 2005

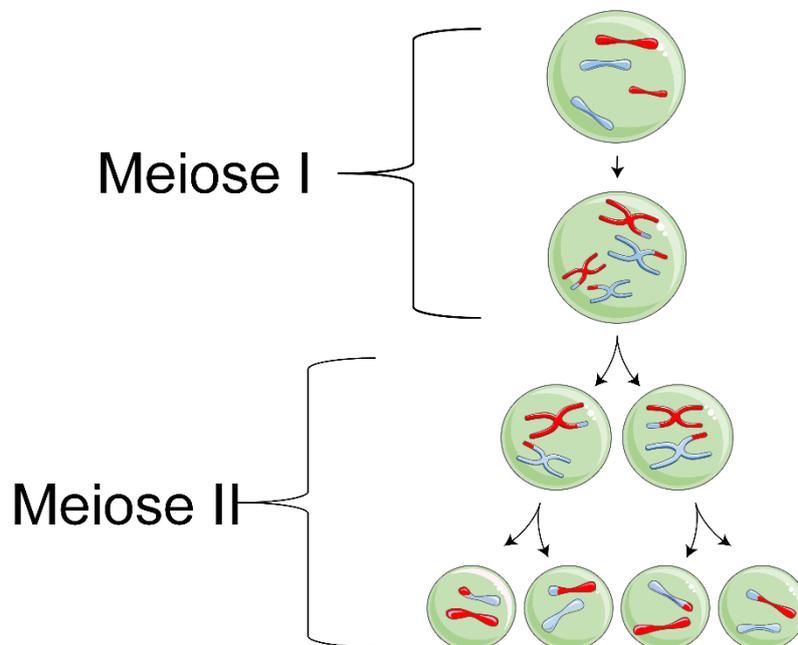
Registros escritos sobre a trissomia 21 não foram encontrados antes do século 19. A primeira descrição do fenótipo foi dada pelo psiquiatra francês Jean Pierre Esquirrol, em anotações sobre doenças mentais. Seus registros se assemelhavam a síndrome ainda décadas antes que Down publicasse seus achados. Em 1846, Edouard Seguin escreveu o trato sobre *educação para idiotas*, com descrições mais detalhadas sobre a trissomia 21 (Berg e Korossy, 2001).

#### **2.4. Meiose e Gametogênese**

Meiose é o processo de divisão celular especializado na formação de gametas, dividido em dois estágios, onde sua finalidade é reduzir o número diplóide em haplóide. A primeira fase do processo é responsável pela separação dos cromossomos homólogos, enquanto a segunda fase leva à divisão das cromátides irmãs. Primeiro todos os cromossomos se replicam, para formar pares de cromátides, e então, os homólogos se pareiam, num processo chamado de sinapse. As sinapses são estruturadas e estabilizadas pelos complexos sinaptonêmicos (Borges-Osório e Robinson, 2013; Ohkura, 2015).

Cada uma das fases da meiose é dividida em 4 subestágios: prófase, metáfase, anáfase e telófase. A prófase I é o subestágio mais longo da meiose I, e o mais importante para as questões evolutivas, pois nela ocorrem os processos de recombinação entre os cromossomos. Os cromossomos homólogos, ligados pelos

complexos sinaptonêmicos, trocam segmentos de cromátides entre si, promovendo assim a diversidade genética (Borges-Osório e Robinson, 2013). A figura 2 ilustra as fases da meiose.



**Figura 2. Meiose.** A figura ilustra o processo de meiose, evidenciando as duas fases do processo, bem como o possível evento de recombinação. Na meiose I, os cromossomos homólogos se separam para células diferentes. É nessa fase também, que possíveis eventos de recombinação ocorrem. Na meiose II temos das cromátides irmãs.

Apesar de os processos meióticos serem os mesmos entre a formação de gametas masculinos e femininos, existem diferenças significativas entre os dois processos. A espermatogênese (formação de gametas masculinos) é ininterrupta a partir da puberdade, enquanto a ovogênese apresenta um número finito de gametas a serem formados (Hulten, Patel *et al.*, 2008; Borges-Osório e Robinson, 2013).

Na ovogênese, a meiose I é suspensa por vários anos, constituindo um período chamado de dictóteno. Ele começa ainda no desenvolvimento embrionário da mulher, e fica estagnado até a maturidade sexual, podendo delongar sua finalização em até 40 anos. A meiose II desse processo ocorre somente depois da fertilização do oócito (Borges-Osório e Robinson, 2013).

Esse tempo prolongado na gametogênese pode estar relacionado com o fato de 90% das anormalidades cromossômicas serem provenientes de erros em meioses

maternas, e também com o aumento da incidência de aneuploidias com a idade avançada da mãe (Oliver, Feingold *et al.*, 2008; Kurahashi, Tsutsumi *et al.*, 2012). Estudos de caso sobre a origem parental da trissomia 21 mostram que a grande maioria dos casos são provenientes de erros no gameta feminino. Aproximadamente 10% são resultados de origem paterna (Hassold e Sherman, 2000).

Os erros de não disjunção que levam a trissomia 21 podem ocorrer nos dois processos de divisão da meiose, tanto meiose I quanto meiose II. Na meiose I, os cromossomos homólogos não se separaram, e na meiose II, não ocorre a divisão das cromátides irmãs (Sherman, Petersen *et al.*, 1994)

Os erros de não disjunção também podem levar a trissomia 21 por mosaicismos, onde o indivíduo apresenta duas ou mais linhagens de células, e uma delas é trissômica (46,XX/47,XX,+21 ou 46,XY/47,XY,+21) (Papavassiliou, Charalsawadi *et al.*, 2014).

Essa aberração cromossômica específica pode ocorrer em indivíduos normais. Hulten, Jonasson *et al.* (2013) demonstraram que o mosaicismos da trissomia 21 está presente em células somáticas da população não-trissômica, mostrando que este traço pode ser comum à população em geral, se não toda.

Ainda, um estudo relativo ao tecido cerebral mostrou que, pelo menos 4% das células apresentam uma cópia extra do cromossomo 21. Pacientes diagnosticados com mal de Alzheimer têm uma incidência de células trissômicas no cérebro 10 vezes maior do que controles de mesma idade e sexo, podendo criar uma relação entre a doença e o mosaicismos no tecido. A proporção de células mosaicas em diferentes tecidos pode influenciar no diagnóstico e prognóstico da população não trissômica (Iourov, Vorsanova *et al.*, 2006; Papavassiliou, Charalsawadi *et al.*, 2014).

Existem hoje duas teorias diferentes que tentam explicar a origem do mosaicismos da trissomia 21. Uma delas trabalha com um único erro mitótico pós zigótico, durante a diferenciação das células somáticas, levando a origem de uma linhagem celular trissômica; e a outra com um erro meiótico de disjunção seguido de um erro mitótico.

Estudos recentes sobre o tema mostraram que, contrário à crença comum, são os erros meióticos de não disjunção a causa mais freqüente de mosaicismos, estando presente em 80% dos casos estudados (Papavassiliou, 2007; Papavassiliou, Charalsawadi *et al.*, 2014).

Os estudos citados anteriormente sobre mosaicismo da trissomia 21 ainda mostraram que, em termos de frequência e distribuição das características fenotípicas da anomalia, não existem diferenças entre as classes de mosaicos e não mosaicos para a trissomia 21. Talvez, a única coisa mais extraordinária seria a relação entre a porcentagem de células trissômicas em diferentes tecidos e desenvolvimento rápido ou tardio de determinados fenótipos. Quanto aos aspectos patognomônicos da anomalia, como o dismorfismo facial, hipotonia, hiper extensibilidade das articulações, e propensão a doenças congênitas cardiovasculares e leucemia (Roizen e Patterson, 2003), não há diferenças entre não-mosaicos e mosaicos para trissomia 21 (Papavassiliou, York *et al.*, 2009).

O quadro 1 relaciona os achados clínicos mais comuns e relacionados à trissomia 21, e suas distribuições entre a população de mosaicos e não mosaicos.

**Quadro 1. Comparação dos achados clínicos e suas distribuições entre mosaicos e não mosaicos para trissomia 21. Modificado de Papavassiliou, York *et al.* (2009)**

Mosaicos trissomia 21		Não mosaico	
Achado Clínico	Proporção	Achado clínico	Proporção
Hipotonia	0,66	Hipotonia	0,85
Mãos e dedos pequenos	0,64	Mãos e dedos pequenos	0,76
Cabelo fino e esparsos	0,67	Cabelo fino e esparsos	0,59
Cardiopatia congênita cianótica	0,019	Cardiopatia congênita cianótica	0,019
Leucemia	0,03	Leucemia	0,019

A presença de tais sintomas se dá devido à super expressão dos genes que se encontram nas DCR, ou *Down Syndrome Critical Region*, regiões que contém os genes responsáveis pela patogênese da síndrome. (Dutta, Nandagopal *et al.*, 2005; Jiang, Liu *et al.*, 2015).

Uma revisão recente, reanalisando sistematicamente casos de trissomias 21 parciais mostrou que a DSCR possivelmente é menor que o esperado. Pelleri, Cicchini *et al.*, (2016) construíram um mapa integrado e comparativo de 125 casos de trissomia parcial publicados entre 1975 e 2015, que apresentavam ou não a síndrome de Down e viram que uma região mínima de 34 kilobases é compartilhada com todos os pacientes com síndrome de Down, e ausente nos pacientes não sindrômicos (Pelleri, Cicchini *et al.*, 2016).

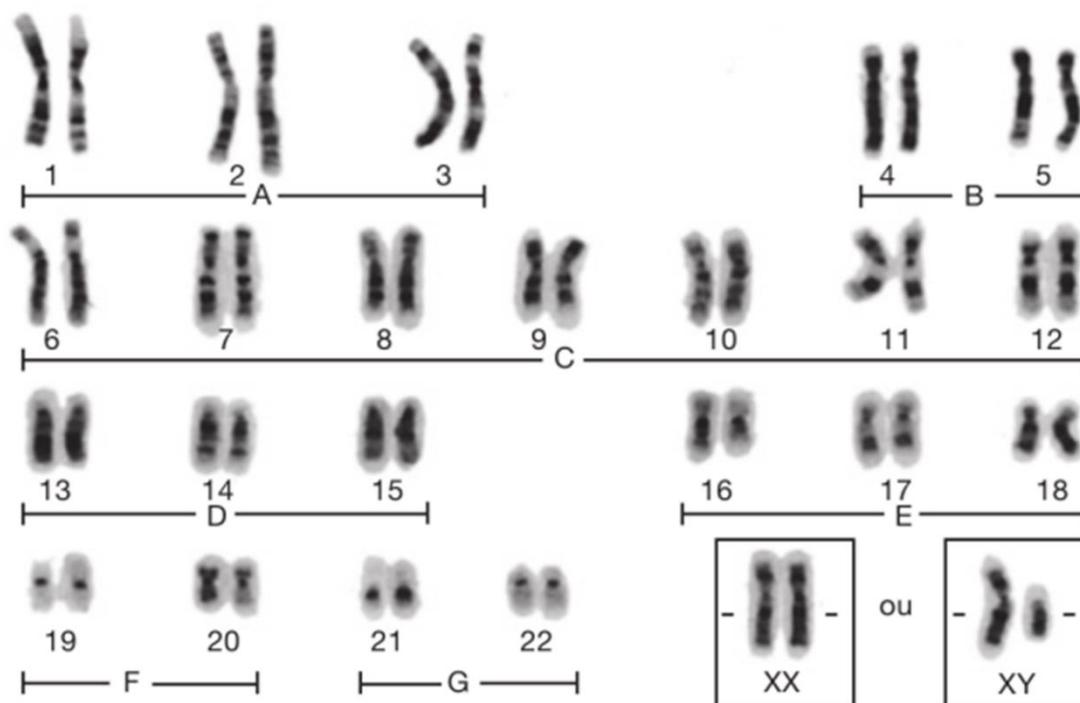
Esta região foi denominada HR-DSCR (*highly restricted Down Syndrome Critical Region*, em inglês Região Crítica para a síndrome de Down altamente restrita) e seus descobridores propõem que, apesar de ser uma região ausente de genes, ela pode apresentar ligação entre as principais características relacionadas a síndrome de Down e ser importante para o entendimento da relação entre fenótipo e genótipo da síndrome de Down (Pelleri, Cicchini *et al.*, 2016).

As trissomias parciais são originadas por alterações estruturais do cromossomo, onde quebras por uma meiose indevida levam a rearranjos do cromossomo, como duplicações, isocromossomos e translocações (Dutta, Nandagopal *et al.*, 2005).

Duplicações são repetições de um mesmo segmento cromossômico, causando um aumento no número de genes, e possivelmente, em sua expressão. Elas são resultantes de um *crossing-over* desigual, que pode levar a segmentos duplicados ou deletados. Isocromossomos são formados a partir de uma divisão transversal do cromossomo, e não uma divisão longitudinal como de costume. O cromossomo originado dessa meiose anormal apresenta braços iguais, duplicados (Borges-Osório e Robinson, 2013).

Translocações são transferências de segmentos de cromossomos, um para o outro, ocorrendo geralmente entre não-homólogos. As translocações Robertsonianas (ou fusões cêntricas) ocorrem entre dois cromossomos acrocêntricos que sofreram quebras em suas regiões centroméricas, levando a troca de seus braços cromossômicos inteiros. São os rearranjos de cromossomos mais comuns em humanos, com uma incidência de 1/1000 indivíduos (Jarmuz-Szymczak, Janiszewska *et al.*, 2014).

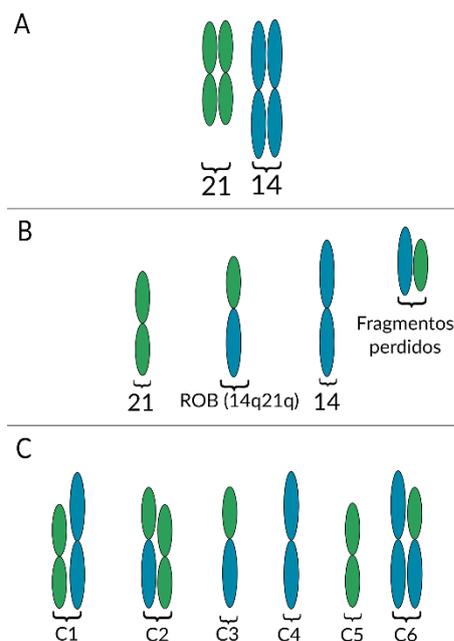
Esse tipo de translocação comumente ocorre entre os cromossomos dos grupos G e D, sendo mais frequentes as translocações entre os cromossomos 14 e 21, embora possa ocorrer entre o 21 ou qualquer um dos cromossomos pertencentes a esses dois grupos. Por este motivo, esse tipo de translocação pode ser também conhecido como translocação D/G. Os cromossomos organizados em grupos se encontram na figura 3.



**Figura 3. Organização dos cromossomos em grupos.** A figura representa um cariógrama, com os pares de cromossomos organizados por tamanhos e pelos grupos que pertencem. Os pares sexuais estão em evidência, e pertencem a grupos diferentes (X pertence ao grupo C enquanto o Y, grupo G). A ordenação dos cromossomos nestes sete grupos se dá pelas suas características: Grupos A (metacêntricos) e B (submetacêntricos) agrupam os cromossomos grandes; C (submetacêntricos) e grupo D (acrocêntricos) organizam os cromossomos médios e; grupos E (submetacêntricos), F (metacêntricos) e G (acrocêntricos), os menores cromossomos. Modificado de Borges-Osório e Robinson (2013).

As combinações entre estes cromossomos levam a inúmeros casos de translocações, porém suas distribuições não são randômicas. Os casos mais comuns de translocações Robertsonianas envolvem os cromossomos 21, 13 e 14, com as distribuições de  $rob(13;14)$  e  $rob(14;21)$  completando 75% e 10% dos casos, respectivamente (Jarmuz-Szymczak, Janiszewska *et al.*, 2014). A figura 4 evidencia dos processos de formação de uma translocação.

Uma translocação robertsoniana em um zigoto normal leva a um cariótipo anormal, mas ainda balanceado: o indivíduo apresenta 45 cromossomos, porém sem alterações fenotípicas. Gametas gerados a partir de um portador da translocação podem apresentar anormalidades, resultando em novos portadores, indivíduos com síndrome de Down ou então alguma letalidade.



**Figura 4. Formação de uma Translocação Robertsoniana.** A. Padrão normal dos cromossomos 14 e 21. B. Formação de uma translocação robertsoniana ROB(14q21q). C. As configurações de gametas possíveis de um carregador da translocação: C1 é o gameta normal, C2 um paciente com trissomia 21, C3 um portador e C4, C5 e C6 são configurações incompatíveis com a vida, letais ainda no meio intrauterino. Modificado de Borges-Osório e Robinson (2013).

O ponto de quebra entre esse rearranjo de cromossomos ainda não é exato, possivelmente porque as sequências dos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos ainda não foram organizadas pelo projeto genoma. Porém, é sabido que existem três mecanismos de que levam à formação de translocações: (1) uma fusão cêntrica no centrômero, (2) fusão após a quebra de um braço curto e um braço longo, e (3) a quebra de dois braços curtos seguida da fusão dos braços longos (Shaw, Chen *et al.*, 2008).

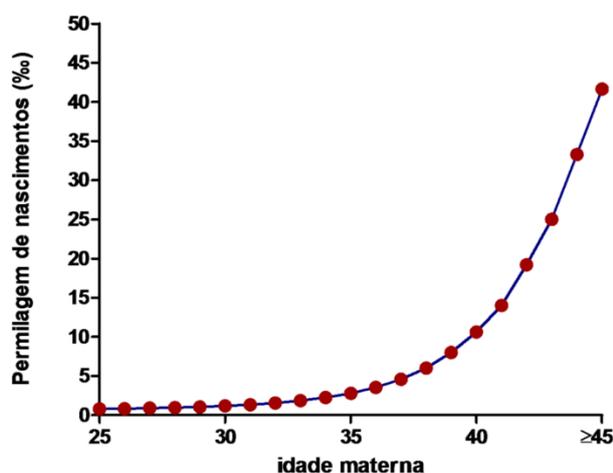
Desses três processos, o mais comum é o terceiro, que leva a formação de um cromossomo dicêntrico, enquanto os outros são mais raros e levam a criação de cromossomos monocêntricos (Shaw, Chen *et al.*, 2008). De fato, (Wolff e Schwartz, 1992), buscaram a caracterização das translocações robertsonianas e viram que, na maioria dos casos de translocação, a composição centromérica era dicêntrica.

## 2.5. Fatores de risco

Diversos fatores de risco, tanto ambientais quanto genéticos são associados a falhas na segregação dos cromossomos, e assim, ao nascimento de crianças com síndrome de Down (Ghosh, Hong *et al.*, 2011).

### 2.5.1. Risco associado com a idade materna

O fator de risco não genético melhor relacionado com o nascimento de uma criança com síndrome de Down é a idade materna avançada na concepção. O gráfico 1 demonstra como a prevalência de nascimentos cresce com a idade materna, tendo um aumento drástico a partir dos 35 e seu pico depois dos 40 (Hecht e Hook, 1996).



**Gráfico 1 .Prevalência de nascimentos de indivíduos trissômicos em relação a idade materna.** Em X são apresentadas as idades maternas e em Y a per milagem de nascimentos. Nota-se o aumento exacerbado da curva a partir dos 35 anos. Modificado de Hetch e Hook, 1996

As duas razões melhores explicadas e publicadas são a idade materna e a alteração na recombinação do cromossomo (Lynn, Kashuk *et al.*, 2000; Lamb, Yu *et al.*, 2005; Sherman, Lamb *et al.*, 2006; Hulten, Patel *et al.*, 2008; Oliver, Feingold *et al.*, 2008; Middlebrooks, Mukhopadhyay *et al.*, 2013).

Muitos estudos tentam relacionar o porquê da idade materna influenciar na não disjunção dos cromossomos. A meiose em mulheres influencia as características do gameta produzido, criando uma relação complexa entre sua idade e a qualidade genética do ovócito (Hulten, Patel *et al.*, 2008). O longo tempo de divisão celular sugere que quatro períodos de tempo podem ser relevantes à não-disjunção materno-dependente: (I) o estágio pré-meiótico, onde uma série de divisões mitóticas muito

rápidas ocorrem; (II) uma meiose I antecipada, onde o pareamento e divisão ocorrem; (III) o dictóteno e; (IV) o estágio pré-ovulatório, de onde a meiose reinicia e procede para a metáfase da meiose II (Hassold e Sherman, 2000).

Vários fatores extrínsecos e intrínsecos têm se mostrado relevantes a essa influência, como desbalanços endócrinos, mosaicismo ovariano, perda de coesão entre as cromátides irmãs, e envelhecimento da maquinaria de recombinação (Lamb, Yu *et al.*, 2005; Hulten, Patel *et al.*, 2008).

### **2.5.2. Mosaicismo ovariano**

Hulten e colaboradores (2008) sugerem que, normalmente, as mulheres apresentam um mosaicismo ovariano, o que implica que já carregam uma proporção de ovócitos com a trissomia. A seleção de ovócitos, como estudada por Zheng e Byers (1992), daria preferência à liberação de gametas euploides na vida fértil da mulher, aumentando assim, a progressão de gametas aneuploides para a liberação com o envelhecimento da mãe. Desta forma, as chances de, caso a gravidez progrida, uma mãe acima dos 30 anos gerar uma criança comprometida, estão aumentadas.

Apesar de ainda precisar ser testado, o modelo se mostra promissor, sendo uma nova relação entre os processos de não disjunção e o mosaicismo encontrado no tecido ovariano.

### **2.5.3. Polimorfismos na família do gene TP53**

Os genes da família TP53 (p53, p63 e p73) são conhecidos como supressores tumorais, mas também atuam na regulação celular, como apoptose, ciclo celular, autofagia e senescência. Alguns desses genes codificam microRNAs ao invés de proteínas (Liao, Zhou *et al.*, 2012; Boquett, Brandalize *et al.*, 2013).

Os genes codificadores de microRNAs desta família já foram associados com a trissomia 21 por regularem a expressão da DYRK1A, uma cinase associada à síndrome de Down, e seu papel na supressão de tumores sólidos em síndromes (Liao, Zhou *et al.*, 2012; Boquett, Brandalize *et al.*, 2013).

Outra associação busca a relação da família p53 com a não disjunção, devido à sua regulação na estabilidade do ciclo celular e reparo no DNA. Em situações anormais na célula, a p53 é ativada pela MDM2 (*mouse double minute p53 binding*

*protein homolog 2*), que pode seguir por dois caminhos para voltar à estabilidade genética da célula: um atraso nesse ciclo celular para que o DNA seja reparado, ou então apoptose, eliminando as células que apresentam danos (Boquett, Brandalize *et al.*, 2013).

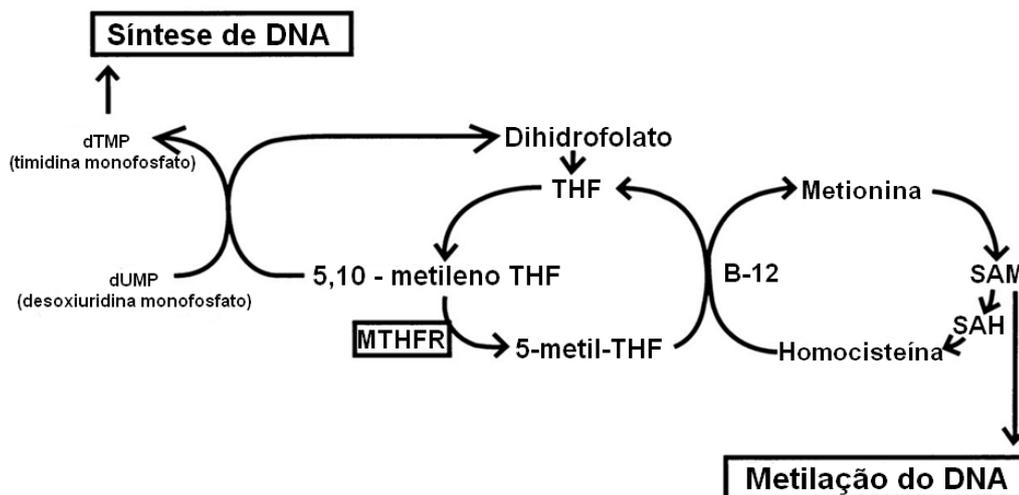
A p73 tem um papel importante na regulação do *check point* nos gametas durante a oogênese, reduzindo as chances de aneuploidias. A perda ou diminuição da função desses genes levaria ao acúmulo de células aneuploides, podendo assim estar relacionada a um papel de defesa contra a propagação de aneuploidias (Boquett, Brandalize *et al.*, 2013).

Polimorfismos tanto nos genes da família TP53 quanto em seus reguladores – *MDM2*, *MDM4* (*mouse double minute p53 binding protein homolog 4*) e *USP7* (*ubiquitin specific peptidase 7*) – podem ser associados a riscos de não disjunção. As influências desses polimorfismos foi investigada por Boquett e colaboradores (2013), analisando o papel dos seguintes SNPs (*single nucleotides polymorphisms*), trocas de um único nucleotídeo, como fatores de risco: *TP53* c.215G>C; *TP73* c.-30G>A e c.-20C>T; *MDM2* c.14+309T>G; *MDM4* c.753+572C>T; e *USP7* c.2719-234G>A.

O estudo mostrou que esses polimorfismos, quando combinados podem aumentar o risco de não disjunção, evidenciando assim essa possível conexão entre a trissomia e a família TP53.

#### **2.5.4. Polimorfismos nos genes do metabolismo do ácido fólico**

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B, essencial para a síntese de bases nitrogenadas e metilação do DNA, como evidenciado na figura 5. Sua importância em processos pós concepcionais já é conhecida, mas esse composto pode ter relevância também nos pré concepcionais. James, Pogribna *et al.*, (1999), baseados em evidências que o metabolismo do ácido fólico pode levar a hipometilação do DNA e segregação anormal dos cromossomos, sugeriram a relação entre mutações no gene sintetizante da metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) com síndrome de Down em mães jovens.



**Figura 5. Ciclo do ácido fólico.** (James, Pogribna *et al.*, 1999)

MTHFR é uma proteína dimérica que cataliza a síntese de 5-metiltetrahydrofolato, forma ativa do ácido fólico e doador de metil para síntese de metionina (Martinez-Frias, 2008). Metionina é o precursor de 5-adenosilmetionina (SAM), o maior doador de metil para metilação de DNA, RNA e proteínas. Ela influencia nas duas vias do ciclo do ácido fólico: síntese e metilação (Balduino Victorino, De Godoy *et al.*, 2014).

A troca de uma citosina por uma timina na posição 667 (667 c→t), no domínio catalítico da enzima, faz a substituição de uma alanina para uma valina, o que desestabiliza o dímero e interfere na atividade enzimática. A presença de um alelo mutante reduz a atividade em 35%, enquanto o homocigoto mutante pode ter a atividade enzimática reduzida em 70% (James, Pogribna *et al.*, 1999). Essa redução desestabiliza o complexo folato/homocisteína (Hcy): se a atividade da MTHFR está diminuída, mais ácido fólico é necessário para a metilação da homocisteína para metionina. Baixos níveis de ácido fólico em indivíduos com polimorfismos na MTHFR resultam no aumento nos níveis de homocisteína e diminuição nos de metionina. O acúmulo de homocisteína está associada à inibição da DNA metiltransferase e assim, à hipometilação do DNA. A metilação do DNA nas regiões pericentroméricas é um pré requisito essencial para organização e estabilidade da segregação dos cromossomos (James, Pogribna *et al.*, 1999; Hobbs, Sherman *et al.*, 2000; Balduino Victorino, De Godoy *et al.*, 2014).

Assim, a presença de um alelo para esse polimorfismo, influenciando a regulação e estabilidade das cromatinas devido a uma hipometilação do DNA (Santos-Reboucas, Correa *et al.*, 2008), poderia também estar associada ao aumento do risco de se ter uma criança com síndrome de Down.

### **2.5.5 Fatores extrínsecos**

Estudos citogenéticos e epidemiológicos identificam alguns candidatos como fatores de risco extrínsecos, incluindo fumo, bebida, exposição materna à radiação, tratamentos para fertilidade feminina, anticoncepcionais e espermicidas (Yang, Sherman *et al.*, 1999; Hassold e Sherman, 2000).

Porém, ainda existem poucas informações que provam relação entre esses fatores e T21, devido à limitação desses estudos ou falta de propriedade ao estudá-los (Hassold e Sherman, 2000).

### **2.5.6. Recombinação gamética**

A recombinação, além de sua importância para a diversificação da informação genética, facilita o alinhamento dos cromossomos, sendo um mecanismo importante para evitar a má segregação durante a gametogênese (Oliver, Feingold *et al.*, 2008).

Dessa forma, pela sua importância no processo de formação dos gametas, é esperado que o número de eventos e os locais de recombinação estejam altamente regulados, ou seja, padronizados (Middlebrooks, Mukhopadhyay *et al.*, 2013). Alterações em ambos os casos levam ao aumento do risco de não disjunção entre os cromossomos (Lamb, Yu *et al.*, 2005; Sherman, Lamb *et al.*, 2006).

Warren e colaboradores foram os primeiros em 1987 a fornecer relação entre recombinações e trissomias, quando relataram números reduzidos de recombinações em meioses que levaram a trissomia 21. Hoje é sabido que a maioria das trissomias humanas está associada a alterações de eventos de recombinação (Hassold e Sherman, 2000).

Essa observação também levou à hipótese segundo a qual o cromossomo 21 precisa de dois estímulos que levem a não disjunção: primeiro, a formação de uma bivalente (cromossomos homólogos pareados) vulnerável na prófase I; e o segundo um processo anormal de bivalência na metáfase II. O primeiro estímulo não seria

idade independente, enquanto o segundo poderia receber influência da idade materna (Hassold e Sherman, 2000).

## 2.6. Métodos de Diagnóstico para a síndrome De Down

As técnicas citogenéticas e moleculares são indispensáveis para o diagnóstico que analisam o cromossomo buscando identificar possíveis anormalidades numéricas e estruturais apresentadas pelo paciente envolvem análises genéticas e moleculares.

O exame de cariótipo por banda G, ou bandagem G, é considerado o padrão ouro para o diagnóstico de anormalidades cromossômicas. Esta técnica utiliza o corante *Giensa* (ou derivados deste), que obtém um padrão único de bandas claras e escuras para cada cromossomo. As bandas claras são ricas em citosinas e guaninas, e costumam estar concentradas de genes ativos, enquanto as bandas escuras são ricas em timina e adenina. Além da banda G, existem outros padrões de bandeamento, como banda R, banda NOR e banda Q (Shaw, Chen *et al.*, 2008; Lima, 2011).

Além da citogenética convencional, existem ainda técnicas aliadas à biologia molecular, como a hibridação *in situ* por fluorescência (FISH, do inglês *fluorescence in situ hybridization*). Essa técnica marca cromossomos em intérfase ou metáfase com sondas (ou *probes*, moléculas de DNA de fita simples) ligadas a fluoróforos e específicas para o cromossomo 21, e analisa os núcleos das células através de microscopia de fluorescência (Shaffer e Bui, 2007).

A técnica de reação em cadeia da polimerase, ou PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) tem sido cada vez mais aplicada tanto para o estudo como para o diagnóstico de aneuploidias, como a trissomia 21. Utilizando marcadores informativos, como microssatélites polimórficos, esta técnica se torna uma ferramenta de diagnóstico rápido na detecção de aneuploidias. A PCR quantitativa por fluorescência (*quantitative fluorescence polymerase chain reaction*) tem sido bem aplicada nos diagnósticos pós e pré-natal nas últimas décadas. Além do diagnóstico, ela é capaz de determinar a origem parental da cópia extra, quando relaciona o perfil dos marcadores dos acometidos com os de seus pais. (Alves Da Silva, 2011; Langlois e Duncan, 2011)

### **2.6.1. Detecção de padrões de recombinação do cromossomo através de marcadores STR**

Marcadores do tipo microssatélite ou STR (do inglês single tandem repeats) são regiões repetidas de DNA em unidades entre um a seis nucleotídeos. Os STR se tornaram marcadores populares por serem de fácil amplificação e altamente informativos. Isso se dá porque ambos os alelos do heterozigoto são de tamanhos similares, facilitando a amplificação, e porque o número de repetições entre indivíduos é altamente variável. Eles podem ser simples, compostos ou complexos, de acordo com a sua variação (Butler, 2005). Quando simples, os STR são unidades de repetições idênticas; quando compostos, apresentam dois tipos de blocos de repetição e; quando complexos, apresentam diversos blocos, com comprimento variado entre as unidades de repetição (Butler, 2005).

Marcadores STR podem ser usados para determinar a origem meiótica e parental das cópias extras dos cromossomos 21 na síndrome de Down, quando genotipados e em seguida, tendo o confronto dos genótipos de cada indivíduo do núcleo familiar estudado (Warren, Chakravarti *et al.*, 1987; Lamb, Yu *et al.*, 2005; Sherman, Lamb *et al.*, 2006; Oliver, Feingold *et al.*, 2008; Alves Da Silva, 2011).

### **2.7. Padrões normais e alterados de recombinação**

Um estudo de Warren e colaboradores (1987) estimou a frequência de recombinação entre *loci* identificados no cromossomo 21 e comparou esses mesmos *loci* entre cromossomos 21 normais e cromossomos 21 que se separaram normalmente em famílias que apresentavam pelo menos um indivíduo com a trissomia 21, mostrando que a recombinação é reduzida significativamente em cromossomos que não se separaram.

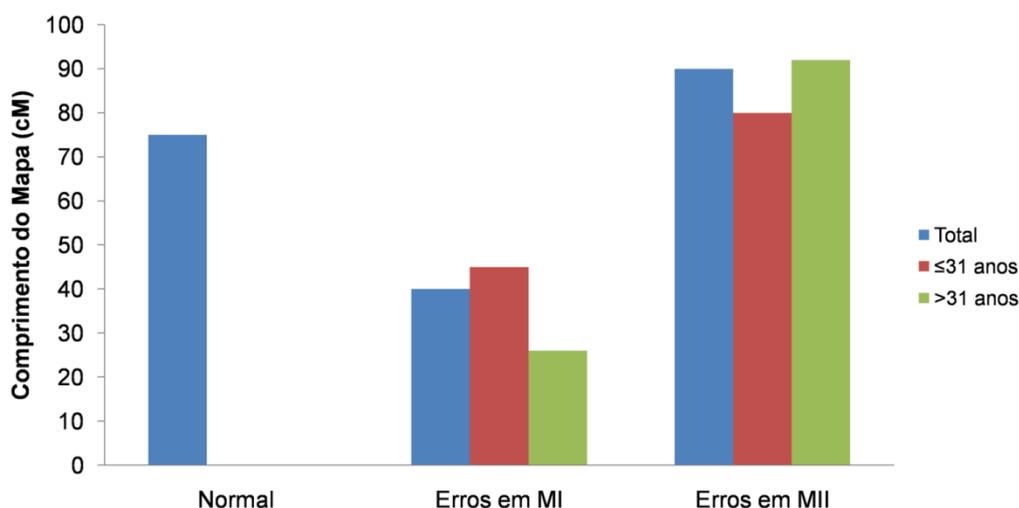
Esta foi a primeira prova de correlação molecular com a não disjunção. A partir desta descoberta, diversas publicações seguiram a abordagem de estudo de Warren e colaboradores, observando a segregação alélica utilizando microssatélites como marcadores.

Para avaliar os aspectos diretos dessa redução da recombinação e não disjunção, Sherman e colaboradores (1991) criaram um mapa utilizando tanto marcas moleculares como citogenéticas. Apesar de conseguirem confirmar a redução de

recombinação em casos de não disjunção materna, eles não conseguiram identificar uma região específica que tivesse sofrido essa redução, nem discriminar os efeitos dos erros em meiose I e meiose II (Sherman, Takaesu *et al.*, 1991).

Com um mapa mais completo utilizando marcadores presentes em toda a extensão do braço longo (figura 6), Sherman e colaboradores conseguiram analisar os efeitos da não disjunção nas fases da meiose de forma separada. Enquanto na meiose I a disjunção foi associada a uma redução na taxa de recombinação, surpreendentemente, em erros de meiose II ela estava próxima ao perfil normal (Sherman, Petersen *et al.*, 1994).

Eles também identificaram uma relação idade-independente da não disjunção com a recombinação: apesar dos efeitos estarem mais evidentes em mulheres com mais de 31 anos, mães mais jovens tinham seus mapas de recombinação alterados em relação ao mapa normal.



**Figura 6. Comparação do comprimento do mapa de recombinação entre as populações normais de mulheres com mães de casos de trissomia.** As populações relacionadas a trissomia 21 foram diferenciadas pela idade materna, mostrando que os efeitos dos erros de não disjunção são independentes da idade. Mesmo que as mães mais jovens (colunas em vermelho) apresentem mapas menos alterados do que as mães com idade acima de 31 anos (colunas em verde), seus mapas estão diferenciados em relação à população normal. Modificado de (Sherman, Petersen *et al.*, 1994)

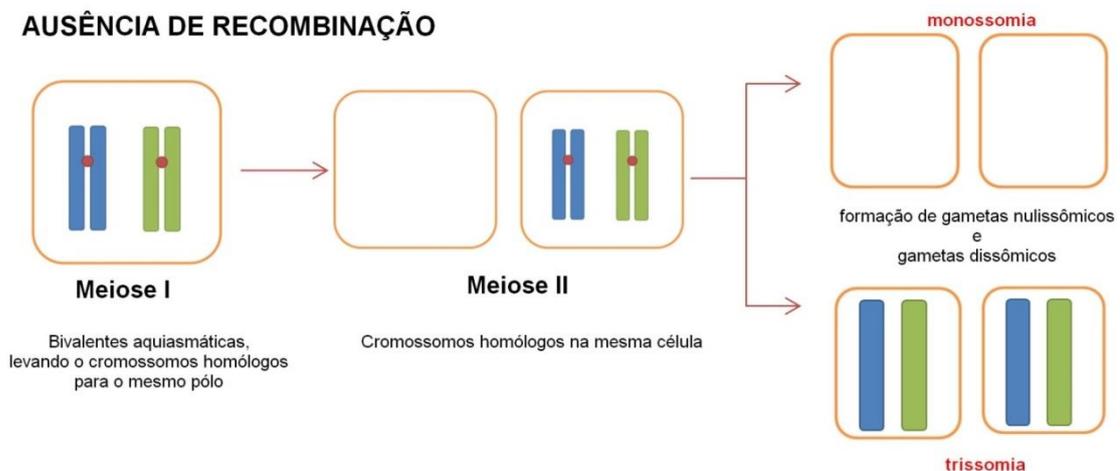
Em 1997, Lamb e colaboradores se dispuseram a criar outro mapa comparativo de recombinação, a fim de determinar se algum padrão específico de trocas genéticas está associado ao maior risco de não disjunção. Através da comparação entre as frequências dos eventos meióticos em mulheres normais, eventos que levam a não disjunção na MI e eventos que levam a não disjunção na MII, eles observaram que o

valor desta frequência na população normal seria de 1,38 enquanto em perfis de MI era 0,73 e em perfis de MII, 1,46. Com um maior número de marcadores do que o mapa anterior de Sherman, foi observado um maior constraste entre as três populações (Lamb, Feingold *et al.*, 1997).

Além da frequência, eles analisaram as configurações mais suscetíveis à não disjunção. Nas populações com erros na MI, um desvio de recombinações foi maior na região telomérica, enquanto na MII esse desvio está na direção oposta (Lamb, Feingold *et al.*, 1997).

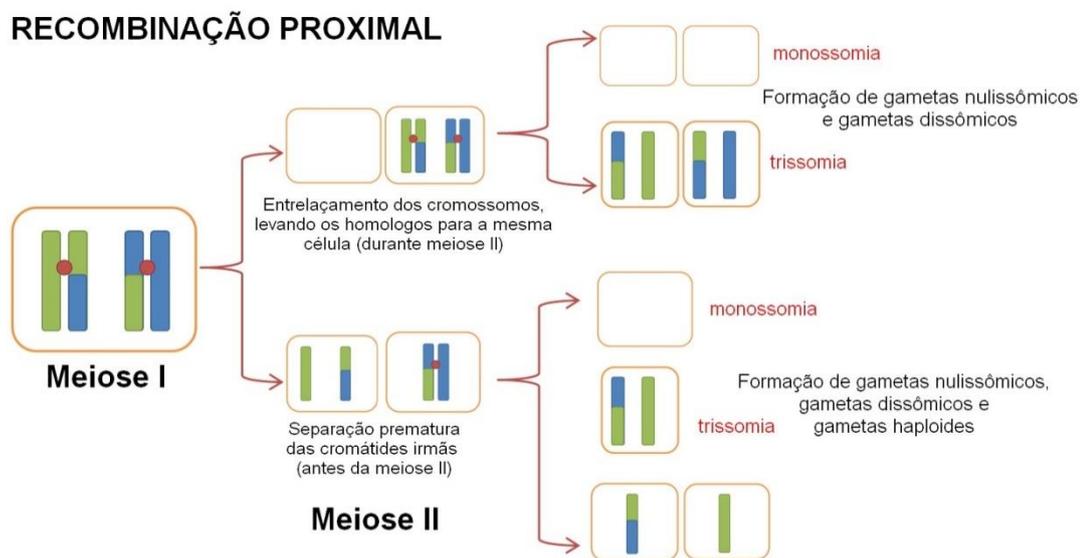
Num estudo publicado em 2008, Oliver e colaboradores viram as diferenças entre as recombinações em núcleos euploides e núcleos onde não houve disjunção. Nos cromossomos disjuntos, as recombinações ocorreram mais no centro do cromossomo, enquanto a ausência de recombinação ou recombinações mais nas pontas do braço q (pericentroméricas e teloméricas) foram encontradas nos casos de famílias trissômicas.

Quando diferenciamos esses erros de acordo com a origem meiótica, a ausência de recombinação aumenta o risco de não disjunção em meiose I, enquanto as recombinações muito pericentroméricas ou teloméricas são riscos de não disjunção para a meiose II. A ausência de recombinação compromete a estabilidade das bivalentes de cromossomos, podendo ter como resultado a presença de dois homólogos no mesmo pólo. Isso leva à formação de gametas dissômicos e nulissômicos (perda total do par de cromossomos), como mostrado na figura 7 (Warren e Gorringe, 2006; Papavassiliou, 2007; Oliver, Feingold *et al.*, 2008).



**Figura 7. Resultados da ausência de recombinação.** Adaptado de Warren e Gorringe(2006); Papavassiliou (2007).

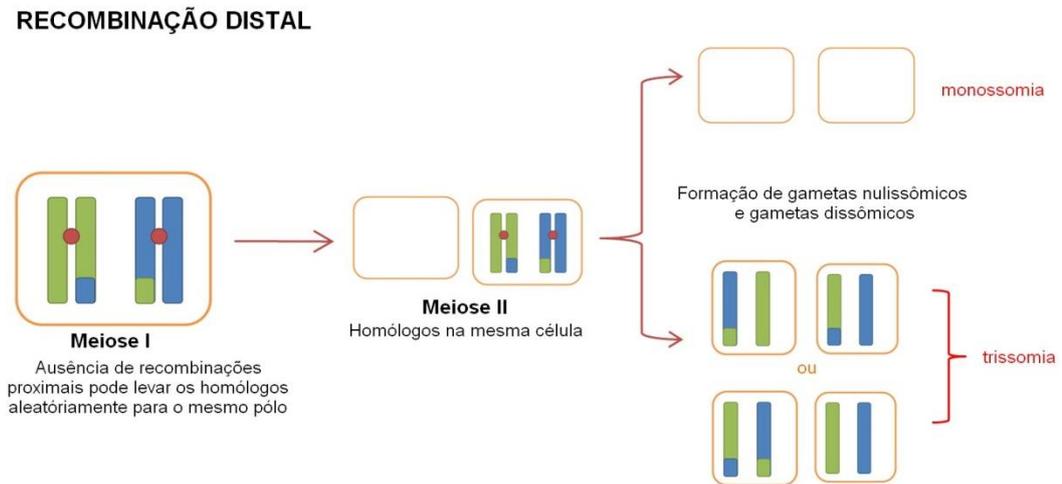
Quando a recombinação é mais próxima ao centrômero, a disjunção pode ser por dois mecanismos diferentes. No primeiro, ela pode ser resultado de um entrelaçamento no cromossomo, que inibe a separação dos cromossomos até a divisão das cromátides irmãs. Ao final da meiose II então, teremos a formação de gametas nulissômicos e dissômicos, que seriam comprometidos porque estariam ainda ligados pelo centrômero. No segundo mecanismo, a recombinação proximal pode interferir no entrelaço das cromátides, levando a separação das cromátides irmãs na meiose I e não na meiose II. Elas migrariam então para o mesmo pólo, levando a produção de 4 gametas: dois normais, um nulissômico e outro dissômico. Os erros de não disjunção proximais podem levar a produção de gametas com centrômeros idênticos. Como hoje os marcadores para identificar as origens da trissomia ainda são limitados à região centromérica e pericentromérica, uma trissomia gerada por este erro seria classificada como de origem na meiose II, mas a recombinação aberrante que a gerou se originou mesmo na meiose I (Papavassiliou, 2007; Oliver, Feingold *et al.*, 2008). Esses processos estão exemplificados na figura 8.



**Figura 8. Resultados de recombinações proximais.** Adaptado de Warren e Gorringe(2006); Papavassiliou (2007).

As recombinações distantes do centrômero (figura 9) contribuem para a instabilidade das bivalentes. A falta de recombinações proximais pode fazer com que os dois homólogos sejam encaminhados para o mesmo pólo de modo aleatório,

gerando ao fim da meiose II gametas nulissômicos e dissômicos (Papavassiliou, 2007; Oliver, Feingold *et al.*, 2008).



**Figura 9. Resultado de recombinações distais.** Adaptado de Warren e Gorringer (2006); Papavassiliou (2007).

Com o intuito de avaliar recombinações e marcadores na região pericentromérica do braço longo do cromossomo (denominado *braço q*, de *queue* – longo em francês), Alves da Silva (2011) demonstrou que para a meiose II, a recombinação pericentromérica é um fator de risco para não disjunção, enquanto a ausência de recombinação dá um efeito protetor. Para a meiose I, a ausência de recombinação é um fator de risco, enquanto os eventos de recombinação pericentroméricos dão um efeito de proteção.

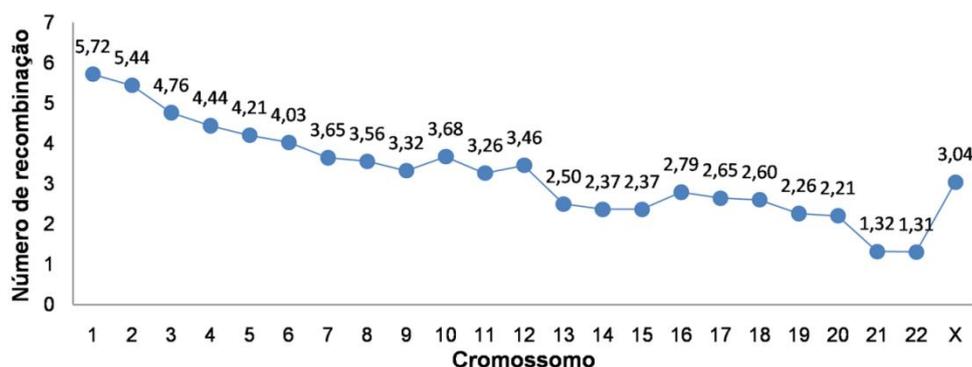
Por uma padronização histórica, esses estudos acabavam por usar um conjunto conhecido de 14-40 marcadores que seriam distribuídos em intervalos (entre seis e 12) de igual extensão física, mas de distribuição aleatória em centiMorgans (cM). Desta forma, marcadores que poderiam ser informativos para diferentes regiões do cromossomo 21 poderiam ter sido omitidos dos mapas construídos, levando a dúvidas quanto à precisão dos mapas até hoje construídos como referência para o padrão normal de recombinação do cromossomo 21 (Alves Da Silva, 2011).

Em todos esses estudos, a construção dos controles para a comparação com os achados nos pacientes trissômicos, se dá pela inferência dos perfis de

recombinação normais através dos padrões encontrados nos pais. Mesmo sendo uma metodologia válida, para se encontrar um padrão de recombinação mais robusto, seria de interesse a construção de um mapa de locais de recombinação a partir de ovócitos, e assim, a comparação com seus achados.

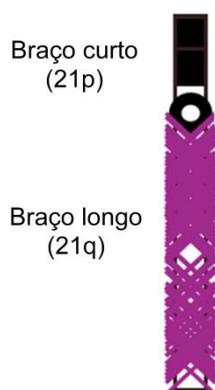
Hou e colaboradores (2013), através de seu estudo por análise genômica em células individuais, dos corpúsculos polares I e II e também do pró-núcleo feminino, conseguiram mapear o genoma de 68 ovócitos, provenientes de oito doadoras, com uma cobertura de quase 92% de cada célula. Eles conseguiram definir os haplótipos de cada doadora, e assim inferir os locais de crossing-over em cada célula.

O número de recombinações é proporcional ao tamanho do cromossomo: quanto maior, mais eventos de recombinação, estando esta informação representada no gráfico 2.



**Gráfico 2. Média de números de recombinação por cromossomo em oócitos.** No eixo X se encontram os cromossomos, enquanto o eixo Y mostra o número das recombinações. É demonstrado para cada cromossomo a média de recombinação. Os eventos de recombinação se mostram correspondentes ao tamanho do cromossomo: enquanto o cromossomo 1 tem o maior número de eventos de recombinação, o cromossomo 22 tem a média mais baixa. Modificado de Hou, Fan *et al.* (2013).

A partir destes dados, o número absoluto de recombinações no cromossomo 21 e sua média foram encontrados, sendo de 90 recombinações e a média de 1,32 recombinações por cromossomo. A figura 10 é uma representação das recombinações ao longo do 21q.



**Figura 10. Mapa genético dos locais de recombinação em todo cromossomo 21.** Os pontos evidenciados em roxo apresentam as 90 recombinações presentes em todos os oócitos estudados. Modificado de Hout et al (2013).

Em 22 oócitos, aconteceram duplas recombinações, enquanto em 45, simples. Recombinações foram ausentes em um dos oócitos. A ausência de recombinação é algo que ocorre normalmente em oócitos saudáveis, assim como um único evento ou dois. A porcentagem fica: 1,47% de ausência de recombinação; 64,70% a ocorrência de um único evento; e 33,82% a ocorrência de 2 recombinações no mesmo cromossomo, mostrando que para o cromossomo 21, um único evento de recombinação é mais freqüente, seguido por um duplo evento e raramente, mas possivelmente, a ausência de recombinação (Hou, Fan *et al.*, 2013). Este resultado se confirma com o que foi previamente descrito, onde a frequência de recombinação desse cromossomo seria de um único evento (Lamb, Feingold *et al.*, 1997; Brown, Feingold *et al.*, 2000; Lynn, Kashuk *et al.*, 2000; Lamb, Yu *et al.*, 2005; Hou, Fan *et al.*, 2013).

O detalhamento dos padrões de recombinação dá uma resolução mais profunda nas investigações genéticas. Esse conhecimento, porém depende de marcadores genéticos, que ainda não são suficientes para preencher essa necessidade (Lynn, Kashuk *et al.*, 2000).

Lynn et al, em 2000, constituiu um mapa de recombinação do cromossomo 21 utilizando marcadores do tipo microssatélite e verificou que, normalmente existia a presença de uma recombinação por meiose. Essa informação é sustentada pelos achados de Hou et al (2013).

Esses estudos, porém, não abrangem o cromossomo 21 como um todo. Apesar de ser o menor dos cromossomos da espécie, e o primeiro a ter sido seqüenciado, as informações até hoje descritas sobre o padrão de recombinação excluem o braço curto do cromossomo (denominado *braço p*, de *petit* – pequeno em francês), uma porção de 11 Mb (Brown, Feingold *et al.*, 2000; Oliver, Feingold *et al.*, 2008; Middlebrooks, Mukhopadhyay *et al.*, 2013; Oliver, Middlebrooks *et al.*, 2013).

A montagem mais atual do genoma humano, o GHRC 38, apresenta menos da metade do braço curto como sequências não conhecidas, porém, é sabido que ele não contém somente heterocromatina (Consortium, 2004). O esquema da figura 11 ilustra o cromossomo 21 e as regiões e bandas de cada braço.



**Figura 11. Ideograma do cromossomo 21.** As letras representam o braço correspondente, q para longo e p para curto, e os números que as seguem são referentes à região, banda e sub-banda respectivamente. Por exemplo, a localização do gene WRB é 21q22.2, indicando que ele está localizado no cromossomo 21, no braço longo, região 2, banda 2 e sub-banda 2. O ideograma foi retirado do *Genome Browser* da *University of California Santa Cruz* – UCSC (no site <http://genome.ucsc.edu>).

## 2.8. Estrutura do braço curto

Embora as funções do braço curto ainda não sejam conhecidas, definir sua estrutura não é só importante para o conhecimento de doenças e mas também para a caracterização de regiões desconhecidas, ainda não sequenciadas pelo projeto genoma. (Lyle, Prandini *et al.*, 2007).

### 2.8.1. Organização

Estudos citogenéticos mostram que estas regiões são ricas em heterocromatina, enquanto evidências moleculares sugerem que eles sejam formados por regiões compostas por satélites, como satélites I, II, e beta satélites, DNA ribossômico e outros tipos de repetição (Gravholt, Friedrich *et al.*, 1992; Lyle, Prandini *et al.*, 2007; Plohl, Luchetti *et al.*, 2008).

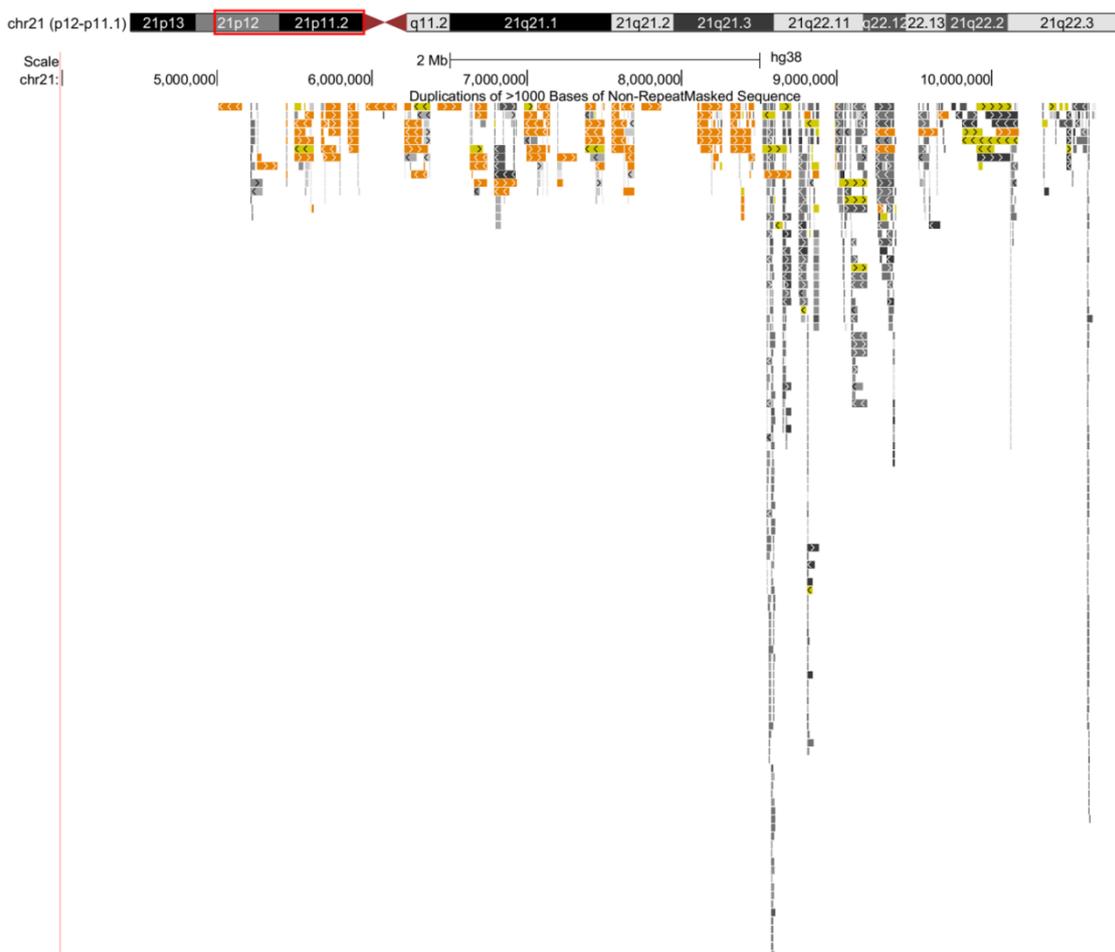
Estas repetições apresentam um padrão complexo de sequências, e comumente são compartilhadas entre outros cromossomos (Lyle, Prandini *et al.*, 2007). Por essa característica, são chamadas de duplicações.

### 2.8.2. Duplicações

Grande parte do conteúdo do braço curto do cromossomo 21 é formado por duplicações. Existem diferentes mecanismos de duplicações dentro de um genoma. Elas podem se limitar a um gene, um segmento ou até mesmo o genoma inteiro. Elas são um mecanismo evolutivo, associado a pseudogenes ou então a novas funções destes. Dentro da evolução de primatas, as duplicações são muito encontradas, e vão “evoluindo” conforme se aproximam ao genoma humano. (Bailey, Yavor *et al.*, 2001; Bailey, Gu *et al.*, 2002; Bailey e Eichler, 2003)

Duplicações segmentares (*segmental duplications*) têm de 100 a 95% de identidade entre os segmentos compartilhados entre diferentes cromossomos. Comumente são geradas por recombinação desigual, podendo também ser originadas por transposição ou retrotransposição. Algumas destas alterações são causadas por deleções ou inserções (indels) nas sequências de nucleotídeos, ou então substituição nas bases. Os indels presentes nas duplicações segmentares podem diferenciar a localização destes segmentos (Bailey, Yavor *et al.*, 2001; Bailey, Gu *et al.*, 2002; Bailey e Eichler, 2003).

As duplicações segmentares no genoma humano já foram mapeadas através de uma *track* da UCSC, através da sessão publicada por Bailey *et al.*, 2002 (figura 12).



**Figura 12. Duplicações segmentares presentes no braço curto do cromossomo 21.** Pista customizada na UCSC Genome Browser. O ideograma representa o cromossomo 21, com o intervalo de 5Mb a 11Mb evidenciado pelo retângulo vermelho. Cada retângulo representa uma duplicação segmentar compartilhada entre cromossomos. Uma região pode apresentar duplicidade entre diversos cromossomos e não somente uma única vez. A similaridade de cada duplicação é representada com as cores de cada retângulo, que vai de cinza claro a cinza escuro (90-98% de similaridade); amarelo claro a amarelo escuro (98-99% de similaridade) e laranja claro a laranja escuro (mais de 99% de similaridade). Retângulos em vermelho demonstram uma região que contém mais de 98% de similaridade, porém faltam evidências. Mais informações sobre essa linha de pista se encontram no endereço:

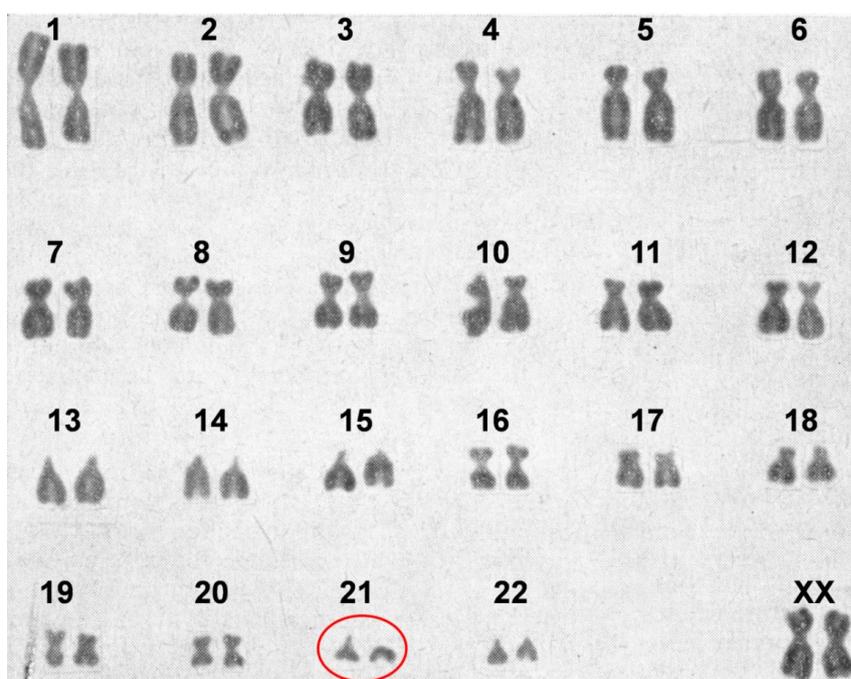
[http://genome.ucsc.edu/cgiin/hgTrackUi?g=genomicSuperDups&hgsid=482164531\\_GtDXQgnRfUPVn cMWSWJ9qW6kiScX](http://genome.ucsc.edu/cgiin/hgTrackUi?g=genomicSuperDups&hgsid=482164531_GtDXQgnRfUPVn cMWSWJ9qW6kiScX)

### 2.8.3. Cromossomo Christchurch

*Christchurch* (Ch<sup>1</sup>) é a deleção do braço curto dos cromossomos que fazem parte do grupo G (21, 22 e Y), originalmente considerado uma rara variação cromossômica. Esta deleção está presente em diferentes fenótipos, relacionados ou não a trissomia 21. Foi descrito pela primeira vez por Gunz e colaboradores em 1962

e discutido pelas décadas seguintes, se tornando, porém, um termo obsoleto durante os anos.

O primeiro relato vem de Gunz e colaboradores, que propuseram esse nome em homenagem a cidade em que encontraram este fenômeno (*Christchurch*, Nova Zelândia), seguindo o modelo do cromossomo Filadélfia ( $Ph^1$ ). Eles o descobriram ao tentar relacionar a Leucemia Linfóide Crônica (LLC) a algum tipo de alteração cromossômica. Estudando os cariótipos de oito integrantes de uma mesma família, a qual dois apresentavam a LLC, Gunz, Fitzgerald e Adam notaram uma perda completa do braço curto de um dos cromossomos acrocêntricos, que aparentava uma ferradura, como evidenciado na figura 13 (Gunz, Fitzgerald *et al.*, 1962).



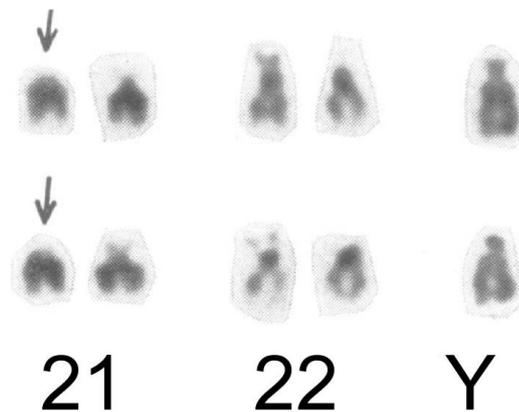
**Figura 13. Cariograma de uma mulher com a presença do cromossomo Ch<sup>1</sup>.** O par 21 está evidenciado pelo círculo na cor vermelha, onde o cromossomo Christchurch apresenta uma forma de ferradura. Modificado de Gunz, Fitzgerald *et al.* (1962).

A relação ente a LLC e o Christchurch foi considerada acidental ao final, já que esse estava ausente em alguns pacientes, e presente em fenótipos diferentes (Gunz, Fitzgerald *et al.*, 1962).

Shaw *et al.* (1962) associou o Ch<sup>1</sup> à síndrome de Down pela primeira vez em 1962, quando estudou uma família formada por pai, mãe e cinco filhos. Destes cinco, dois apresentavam fenótipos normais enquanto três eram portadores da síndrome de

Down. Os cariótipos de toda a família identificaram que a mãe apresentava uma deleção no grupo G, assim como todos os filhos com o cariótipo normal. Das crianças com trissomia 21, uma delas tinha o Christchurch, enquanto a outra e o pai não exibiam a deleção (Shaw, 1962; Ballantyne, Parslow *et al.*, 1977).

Outro relato de caso sobre o tema vem de 1966, onde Neu e colaboradores identificaram a deleção em dois casos não relacionados. O primeiro caso, um paciente com síndrome de Down, apresentou uma deleção consistente com Ch<sup>1</sup> em seu cariótipo. No segundo caso foi observada a deleção em um paciente com pseudoacndroplasia e nanismo. Seus pais também foram submetidos ao cariótipo e a mãe apresentava a deleção (Neu, Leao *et al.*, 1966; Ballantyne, Parslow *et al.*, 1977).



**Figura 14. Ch<sup>1</sup> identificado por Ballantyne, Parslow *et al.* (1977).** Os cromossomos do grupo G estão reunidos na figura, com o cromossomo Christchurch em evidência. Este cariótipo parcial foi proveniente de duas células do acometido. Modificado de Ballantyne, Parslow *et al.* (1977).

Ballantyne sugeriu que presença do Christchurch pode aumentar a susceptibilidade a não disjunção, ao notar que mães portadoras comumente concebiam crianças com síndrome de Down, notado na figura 14 (Ballantyne, Parslow *et al.*, 1977). Para confirmar esta hipótese, estudos que abrangem os efeitos dos eventos de recombinação e não disjunções no braço curto do cromossomo 21 deveriam ser executados.

## **CAPÍTULO I**

### **BUSCA DE NOVOS MARCADORES DO TIPO STR NO 21P E AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE RECOMBINAÇÃO**

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Verificar a presença de recombinação no 21p e avaliar os padrões de recombinação no braço longo do cromossomo 21.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Alinhar sete genomas do cromossomo 21 para definir os STR *in silico*;
- Identificar novos marcadores altamente polimórficos ao longo do braço curto do cromossomo 21;
- Selecionar novos marcadores STR para as recombinações no braço curto;
- Desenho de iniciadores específicos para as regiões flanqueadoras dos marcadores alvos;
- Validação dos STR encontrados;
- Comparar padrões de recombinação em 21q entre tecidos somáticos e oócitos

### **4. Material e Métodos**

#### **4.1. Análise genômica comparativa de genomas do cromossomo 21**

Para identificação de novos marcadores ao longo do braço curto do cromossomo 21, foi realizada uma análise genômica computacional comparada utilizando sete genomas do banco de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas dos Estados Unidos (National Center Information for Biotechnology – NCBI), disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, com os respectivos códigos de acesso apresentados na tabela 2.

Tabela 1. Genomas para alinhamento.

Código de Acesso	Tamanho (pb)	Descrição
NC_000021.9	46709983	Genoma Humano de Referência, montado pelo Consórcio Internacional de Sequenciamento do Genoma Humano, liberado em 2013
CH003468.1	32842498	Montagem do genoma todo pelo método de shotgun ( <i>whole genome shotgun assembly</i> – WGS), liberado para o público em 2004
AC_000153.1	33483523	Genoma diploide humano de um mesmo indivíduo (doador Craig E. Venter), com a exclusão de scaffolds menores que 3Kbp
CM000511.1	33483602	Genoma diploide humano de um mesmo indivíduo (doador Craig E. Venter), incluindo scaffolds menores que 3Kbp
NC_018932.2	47690666	Versão mais recente do genoma haploide proveniente de mola hidatiforme
CH003516.1	34304137	Montagem compartimental do genoma pelo método de shotgun ( <i>compartmental shotgun assembly</i> – CSA), liberado para o público em 2004
AC_000064.1	33216610	Genoma humano sequenciado pela corporação Celera, liberado ao público em 2001, mas que não recebe mais atualizações

Também foram usados quatro genomas não montados (ainda sequências em *contig* e *scaffold*), somando o total de onze sequências.

Tabela 2. Sequências de genomas ainda não organizadas

Genoma	Código de Acesso	Extensão em pares de bases (pb)	Nível de organização
YH_2.0	GCA_000004845.2	2911235363	Scaffold
BGIAF	GCA_000005465.1	2676008911	Scaffold
HsapALLPATHS1	GCA_000185165.1	2786258565	Scaffold
ASM77258v3	GCA_000772585.3	3259501860	Contig

Para a busca de microssatélites, o programa *Tandem Repeat Finder* (Benson, 1999), disponível online (<http://tandem.bu.edu/trf>), foi usado e calibrado nos seguintes parâmetros:

- Tamanho máximo de período = 5
- Parâmetros de alinhamento = 2,7,7
- Score mínimo de alinhamento = 80

O tamanho máximo do período representa o número de nucleotídeos que forma o microssatélite: se o período tem o tamanho máximo de 3, por exemplo, a busca resultará em microssatélites mono, di e trinucleotídicos. Os parâmetros de alinhamento se referem aos valores de combinação, imperfeições e indels (inserções ou deleções) nas sequências, respectivamente. Valores menores que sete nos dois últimos parâmetros são mais permissivos a erros, justificando assim a escolha do valor que filtra melhor os alinhamentos. Quanto maior for o número de repetições e o tipo de repetição, maior será a pontuação final, ou seja, o *score* de alinhamento. Como exemplo: dez repetições de dinucleotídeos (repetições de dois nucleotídeos – AA ou AT, por exemplo) apresentam uma pontuação de 10, enquanto 20 repetições dinucleotídicas fazem 80 pontos, assim como 10 repetições perfeitas e tetranucleotídeos apresentam pontuação também igual a 80. A cada imperfeição da sequência, como troca de nucleotídeos ou indels, pontos são descontados do *score* final (Benson, 1999; Alves Da Silva, 2011).

No braço p, serão selecionados, além de tetra e penta nucleotídeos, di e trinucleotídeos, no intuito de aumentar o número de possíveis alvos. A única diferença entre os parâmetros de busca é o valor do *score* mínimo, que foi reduzido a 60.

A partir desses parâmetros, os setes genomas mais as quatro sequências foram alinhadas, a fim de encontrar os STR alvos no cromossomo 21.

#### **4.2. Predição do potencial polimórfico**

Um índice de polimorfismos foi criado após o alinhamento, com o objetivo de encontrar os microssatélites com maiores polimorfismos e de maior frequência entre os genomas. Os microssatélites com essas características serão selecionados como alvos.

#### **4.3. Avaliação da unicidade dos novos marcadores STR**

A unicidade dos marcadores foi avaliada por PCR *in silico*, na plataforma da *University of California Santa Cruz* (através do endereço: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Esta plataforma busca a sequência em sua base de dados através dos

pares de iniciadores informado e o genoma de interesse. A busca gera a sequência encontrada em forma de texto, contendo da sua extensão entre os primers.

#### 4.4. Desenho dos iniciadores

Iniciadores nas regiões flanqueadoras dos marcadores do tipo STR foram desenhados utilizando as ferramentas online *Oligo Perfect Designer*, da *Invitrogen* (disponível no endereço: <https://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageid=9716&icid=fr-oligo-6?CID=fl-oligoperfect>) e *OligoCalc* - *Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). O *OligoPerfect* possibilita a seleção da melhor sequência de oligonucleotídeos nas regiões flanqueadoras e suas temperaturas, enquanto o *OligoCalc* identifica possíveis anelamentos e formação de grampos.

A unicidade dos iniciadores selecionados foi avaliada pela ferramenta de *In silico PCR*, da UCSC (no endereço: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>). Os iniciadores foram sintetizados pela *Invitrogen*® com a fluorescência FAM.

#### 4.5. Dados

Dados utilizados para o projeto são os dados cedidos para o grupo por Hou e colaboradores (2013), um total de 91 recombinações encontradas pelo sequenciamento de 68 células individuais de ovócitos, cedidas por oito doadoras.

Essas informações foram gentilmente cedidas pelos pesquisadores após o contato via e-mail.

#### 4.6. Determinação dos locais físicos dos eventos de recombinação em 21q dos dados de Hou *et al.*, 2013

Através de análise computacional dos SNPs antes e depois de cada evento de recombinação, um mapa foi criado para encontrar as posições físicas de cada recombinação no cromossomo 21 pela análise de ovócitos. As posições dos SNPs foram comparadas e analisadas no *database of Single Nucleotides Polymorphism* (dbSNP), disponível também banco de dados do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas – NCBI, no seguinte endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

## 5. Resultados

### 5.1. Alinhamento manual do 21p

O alinhamento manual entre os genomas encontrou sete marcadores do tipo microssatélite alvos para o estudo de recombinação no braço curto do cromossomo 21.

**Tabela 3. Microssatélites alvo do 21p**

Nome	Posição	Tipo de microssatélite	Número de alelos	Genomas presentes
<b>Alvo21p01</b>	chr21:6020382-6020431	dinucleotídico	2	4
<b>Alvo 21p02</b>	chr21:6109896-6109939	dinucleotídico	2	3
<b>Alvo 21p03</b>	chr21:8995452-8995674	dinucleotídico	2	4
<b>Alvo 21p04</b>	chr21:9089171-9089219	dinucleotídico	3	4
<b>Alvo 21p05</b>	chr21:9376219-9376249	dinucleotídico	2	3
<b>Alvo 21p06</b>	chr21:9834762-9834791	dinucleotídico	3	3
<b>Alvo 21p07</b>	chr21:10403801-10404136	pentanucleotídico	2	2

### 5.2. Seleção e desenho de iniciadores no 21p

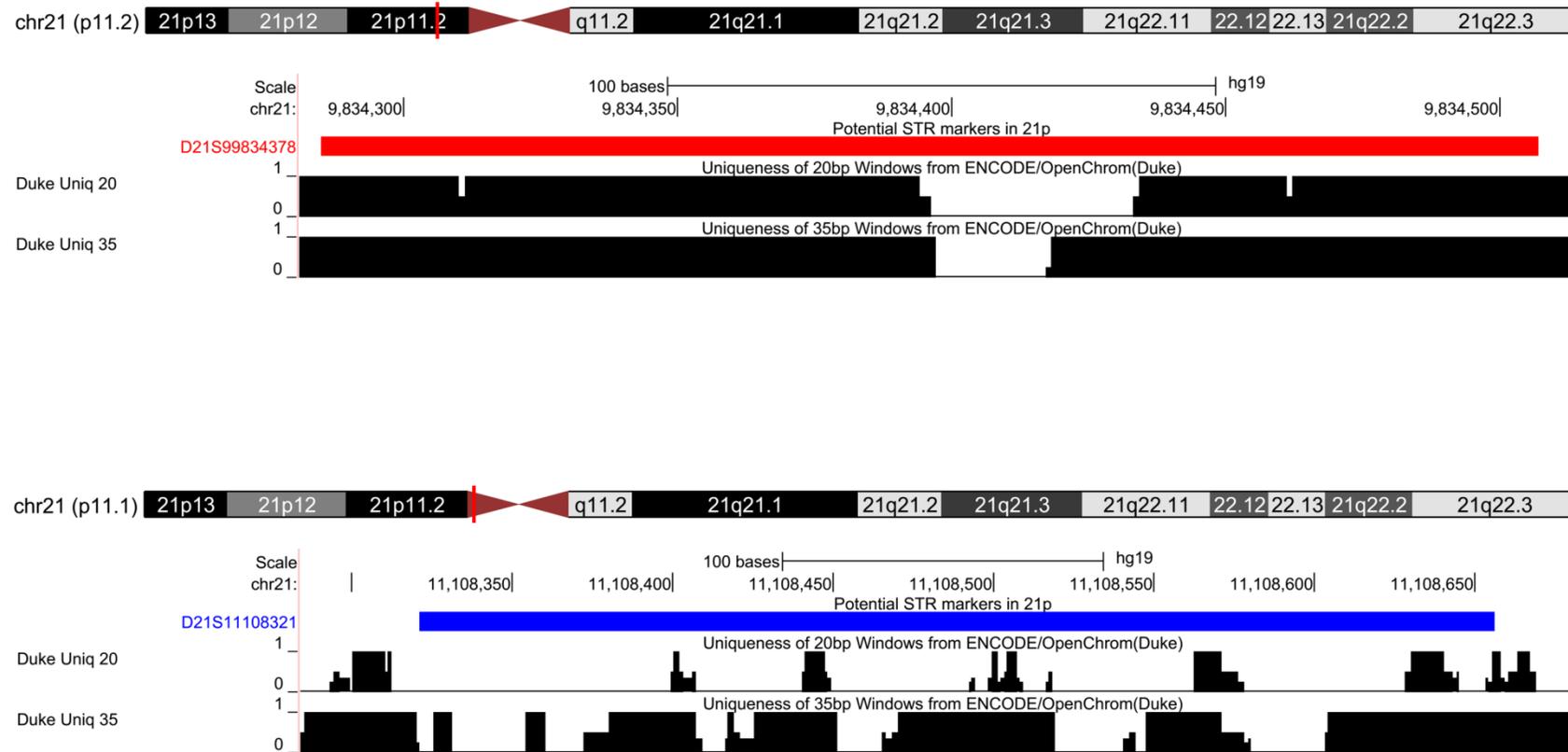
A presença exclusiva dos microssatélites alvo no 21p foi avaliada através da ferramenta de PCR *in silico*. Dos sete, somente dois se mostraram únicos no genoma e passíveis a busca por iniciadores, um pentanucleotídico e outro dinucleotídico.

**Quadro 2. Iniciadores dos marcadores 21p**

Locus	Iniciador sentido	Iniciador anti sentido	Amplímer	Tipo de repetição
D21S11108 321	GCACATGCCTATAATCCC AACT	GACAGGTTATCGCTCTCT CGTC	336	pentanucleotídico
D21S98343 78	TCTTAGGCAACCATTACAA ATGA	CCTAGCACACGTGAACAC AA	223	dinucleotídico

A unicidade da sequência dos iniciadores também foi avaliada pela linha de pista da mapeabilidade do genoma, desenhado e fornecido pela *Duke University*. Esta linha de pista está disponível no *Browser* da *University of California Santa Cruz* – UCSC (no site <http://genome.ucsc.edu>). Assim como muitas ferramentas encontradas no *browser*, ela não engloba a versão mais atualizada do genoma de referência, tendo sua última atualização em 2011. Porém, ela é passível de uso caso a sequência encontrada no hg38 esteja presente no hg19. A unicidade das

sequências dos marcadores D21S9834378 e D21S11108321 foi avaliada, como mostra a figura 15.



**Figura 15. Unicidade das sequências dos marcadores STR em potencial.** Pistas customizadas na plataforma UCSC Genome Browser. A figura mostra a unicidade de cada marcador, identificado pela cor e pelo nome: em vermelho, D21S9983478 e D21S11108321 em azul. Os ideogramas do cromossomo 21 indicam as posições de cada marcador, evidenciadas pelas linhas vermelhas. A pista customizada apresenta duas linhas de pista: *Duke uniq 20* e *Duke uniq 35*. Elas apresentam os valores de repetição de uma sequência unidades de bases determinadas, avaliando a repetição desses intervalos dentro do genoma. *Duke uniq 20* se baseia na repetição de uma sequência de 20 nucleotídeos, enquanto *Duke uniq 35* faz referência a uma sequência de 35. Os valores das linhas de pista foram normalizados entre 0 e 1, tendo 1 demonstrando a sequência completamente única e 0 representando a sequência que repete mais de 4 vezes no genoma. Um valor de 0.5 indica que a sequência ocorre exatamente duas vezes, assim como um valor de 0.33 se repete três vezes e 0,25, quatro. A sequência do D21S9834378 se apresenta com maior probabilidade de ser única, enquanto a sequência do D21S11108321 apresenta regiões de alta repetição no genoma humano.

### 5.3. Alinhamento pSTR

Para reforçar a busca desses primers, utilizou-se da ferramenta de busca e alinhamento pSTR, que compara sequências de genoma para procura de microssatélites polimórficos, idênticos ou diferentes entre elas.

Assim como a pesquisa manual, o pSTR apresentou limitações e dificuldades de encontrar microssatélites polimórficos na região do braço curto do cromossomo 21, limitando-se a apenas seis microssatélites (figura 6). Destes, somente um STR dinucleotídico era único. Pelas informações sobre as regiões flangeadoras, o dinucleotídico encontrado pelo pSTR é o mesmo encontrado manualmente.

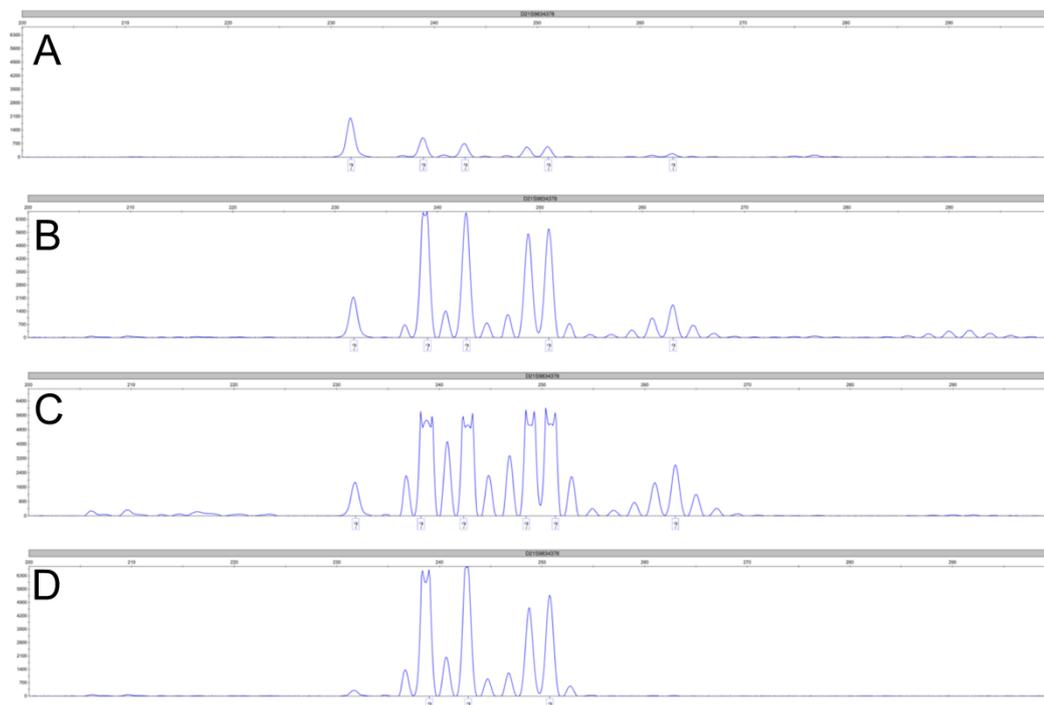
**Quadro 3..** Microssatélites encontrados no braço curto pelo pSTR

<b>Microssatélites encontrados no 21p pelo pSTR</b>	<b>Genomas presentes</b>	<b>Status</b>
Dinucleotídico	2	Único
	2	Duplicação segmentar com o cromossomo 9
Tetranucleotídeos	2	Presente mais de uma vez no cromossomo 21
	3	Presente mais de uma vez no cromossomo 21
	2	Duplicação segmentar com o cromossomo 9
Pentanucleotídico	3	Região não pertencente ao 21p

A avaliação do status de cada marcador se fez pela ferramenta de PCR in silico, da mesma forma que os outros marcadores.

### 5.4. Resultados da genotipagem

A validação do marcador se deu em uma amostra dissômica. Ele deve apresentar até dois picos dentro da região do amplimer, evidenciando os dois alelos pertencentes a cada cromossomo 21 (figura 16).



**Figura 16. Eletroferograma do gradiente de temperaturas do marcador D21S9834378** Para o ensaio, foram testadas as temperaturas de 58 °C (A), 60 °C (B), 62 °C (C) e 64 °C (D). Todos os picos são provenientes de amplificação fora da região do amplimer.

Os microssatélites, apesar de se mostrarem únicos *in silico*, apresentaram vários picos inespecíficos, mostrando que existem pontos de ligação dos iniciadores além do locus esperado no cromossomo 21. Mesmo modificando a temperatura do ensaio, eles continuam em evidência.

### 5.5. Padrões de recombinação em oócitos humanos

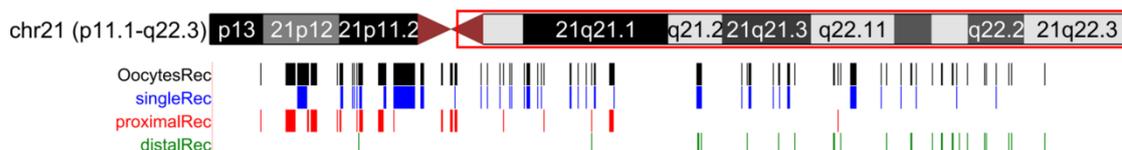
As primeiras análises foram baseadas nos dados cedidos por Hou e colaboradores (2013), uma genotipagem de células individuais de oócitos, utilizando a técnica de MALBAC.

Ao mapearem os eventos de recombinação em todo genoma de 68 oócitos doados, foi visto que o cromossomo 21 tem a média de 1,32 eventos de recombinação, variando de 0 a 2 eventos.

Uma sessão no site da UCSC (*University California Santa Cruz*, no site <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), utilizando o *Genome Browser* (Kent, Sugnet *et al.*, 2002) foi criada com três linhas de pista para representar fisicamente as recombinações ao longo do braço q do cromossomo 21 (figura 17).

Os eventos únicos de recombinação estão representados em azul, enquanto as recombinações proximais de eventos duplos são demonstradas em vermelho e as distais, verdes.

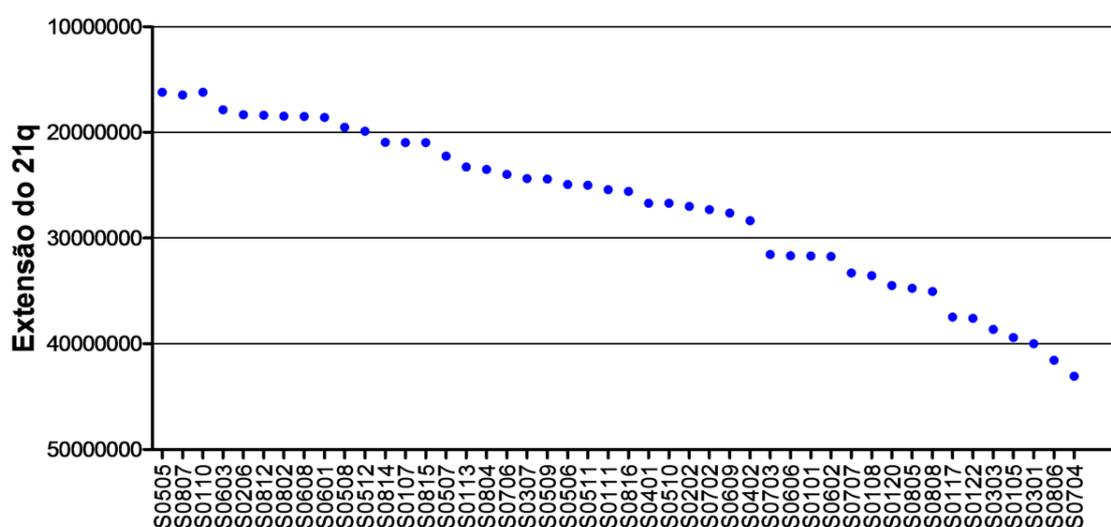
Para a organização e conferência de cada uma dessas recombinações, uma quarta linha de pista foi criada com a totalidade das recombinações, representada em preto.



**Figura 17. Representação gráfica da distribuição de recombinações ao longo do braço longo do cromossomo 21.** Pista customizada na plataforma UCSC Genome Browser. O ideograma representa o cromossomo 21, com a região estudada englobada pelo retângulo vermelho. Em preto, todas as recombinações encontradas no braço longo do cromossomo 21 estão mapeadas. Essas informações foram então estratificadas nas linhas azul, vermelho e verde, que representam as recombinações únicas, proximais e distais respectivamente.

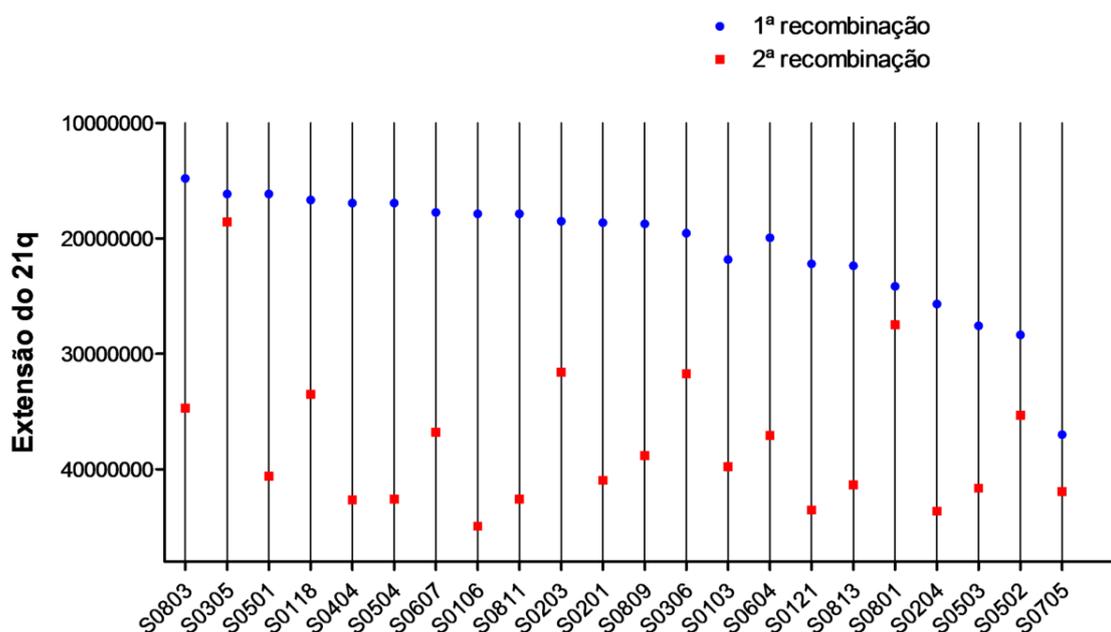
A distribuição dos eventos de recombinação em cada oócito se encontra nos gráficos 3 e 4. A posição das recombinações em ambos os gráficos é a distância comparada à localização do centrômero. As células foram identificadas seguindo o modelo dos autores do estudo, e se encontram no eixo X.

Oócitos que apresentaram um único evento de recombinação se encontram no gráfico 3. Tanto eventos únicos como eventos duplos de recombinação estão bem distribuídos ao longo do 21q.



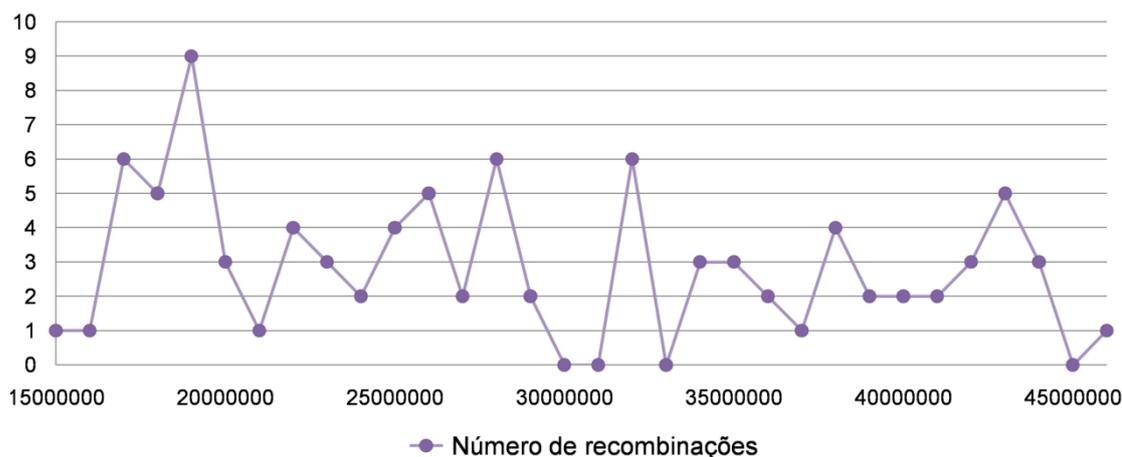
**Gráfico 3. Posições das recombinações simples em cada oócito.** No eixo X são apresentados os oócitos que apresentaram recombinações simples. O eixo Y representa a extensão do 21q em intervalos de 10 Mb. As recombinações simples estão bem distribuídas ao longo do 21q.

Em quase 90% das duplas recombinções, apresentadas no gráfico 4, existe uma interferência do local da 1ª recombinção para a segunda, onde a média de distância entre elas seria de aproximadamente 17 MB.



**Gráfico 4. Posição das duplas recombinções entre cada oócito.** Em X estão os oócitos que apresentaram eventos duplos de recombinção, enquanto Y representa a extensão do braço longo do cromossomo 21. É evidente a interferência de recombinção entre os os eventos em cada oócito, e também uma boa distribuição destes ao longo dos cromossomos.

O gráfico cinco demonstra que o número de recombinções por megabase dentro do braço longo do cromossomo 21 foi variável no estudo em oócitos, com o pico de nove recombinções em 19 Mb, e nenhum evento entre 30 e 31 Mb, 34 e 45 Mb. A região pericentromérica é a que apresenta maiores eventos de troca enquanto a região telomérica apresenta pontos específicos de maior troca genética.



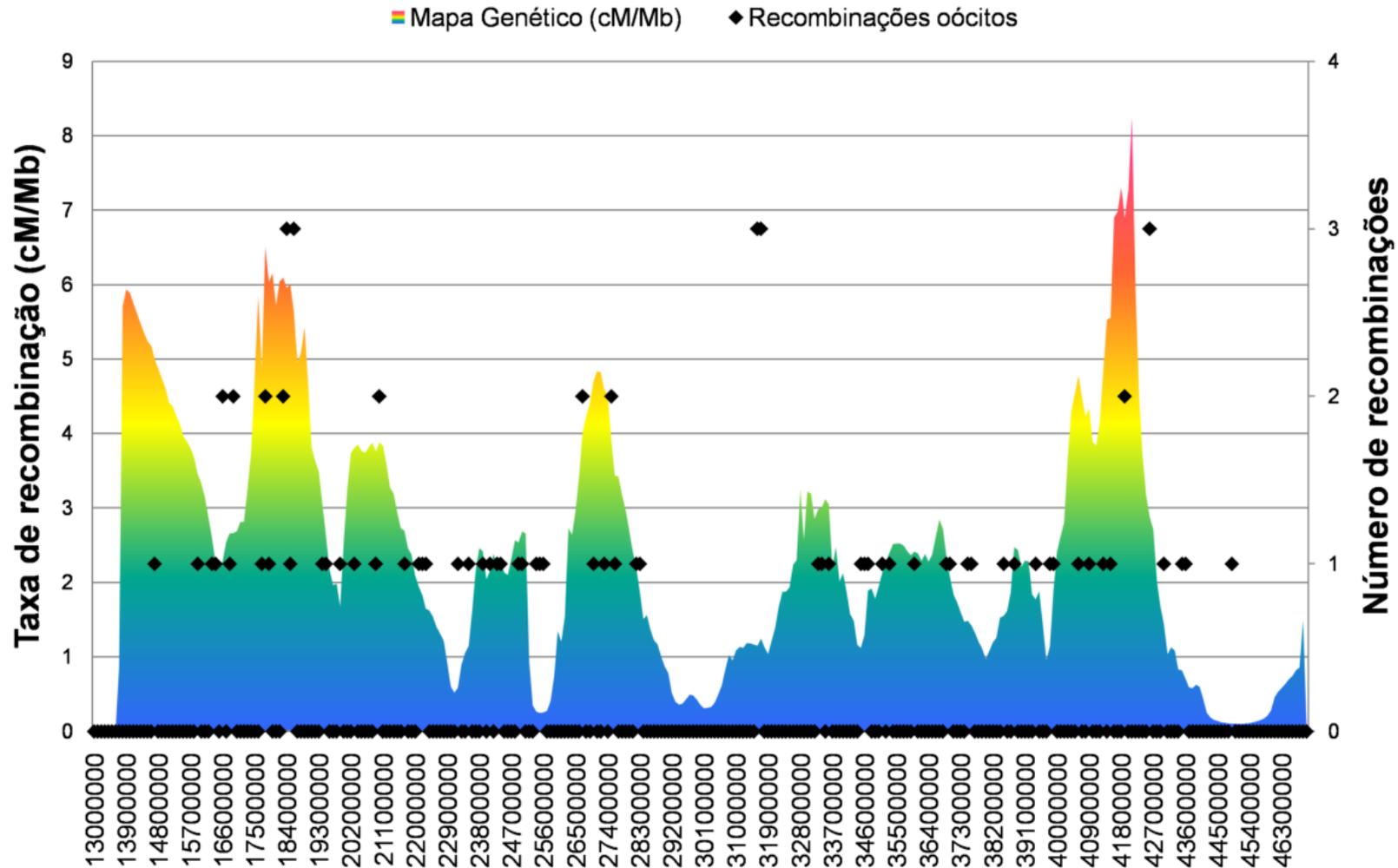
**Gráfico 5. Número de recombinações por megabase no 21q.** No eixo X, a extensão do braço curto se encontra em pares de base, e os pontos demarcados estão em intervalos de 1000000 pares de base, ou 1Mb.

### 5.6. Comparações do mapa de recombinação dos oócitos com o *Rutgers map*

Para a construção do mapa genético do cromossomo, foram utilizadas as informações do *Rutgers Map*, elaborados pela Universidade Rutgers, na Filadélfia (no site: <http://compgen4.rutgers.edu/mapinterpolator>). O *Rutgers map* contém o mapeamento de diferentes marcadores, sendo 425 mapeados somente para o cromossomo 21, montando assim o mapa de ligação mais informativo na atualidade (Matise, Chen *et al.*, 2007).

Através de interpolação, a ferramenta é capaz de dar a distância estimada de cada marcador em centiMorgans. Depois de construído, o mapa será comparado com os locais de recombinação encontrados na análise de células individuais feitas por Hou, Fan *et al.*, (2013).

A comparação entre esses dois dados tem a finalidade de mostrar que eles são similares, mesmo provenientes de abordagens diferentes.



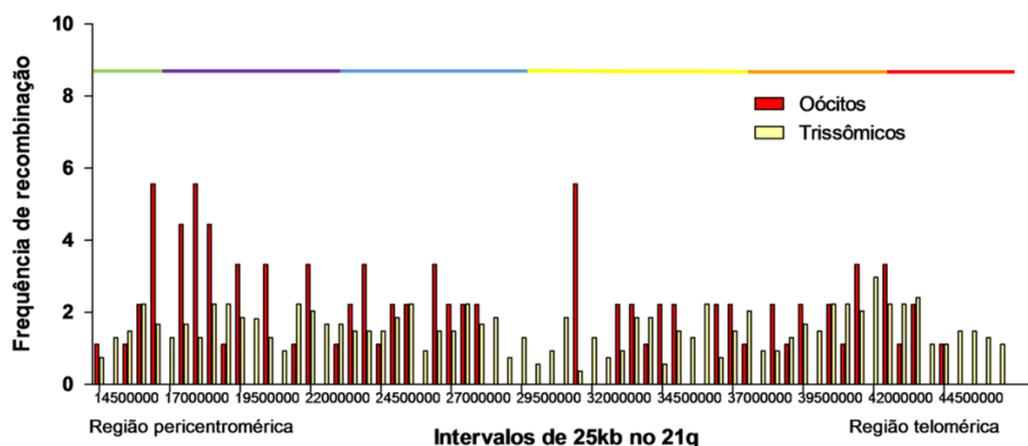
**Gráfico 6. Mapa genético do braço longo do cromossomo 21.** No eixo X se encontra a extensão do braço longo do cromossomo 21, dividido em intervalos de 1,1 Mb. No eixo Y principal, se encontram as taxas de recombinação provenientes do *Rutgers map*, criando o gráfico de onda de calor, que identifica os locais de maior atividade de recombinação com picos avermelhados, e locais de menor atividade com vales frios. O eixo Y secundário representa o número de recombinações encontradas no estudo de oócitos, representados pelos diamantes negros.

## 5.7. Comparação dos padrões de recombinação

Para comparar as diferenças entre o padrão de recombinação dos oócitos e recombinações encontradas em pacientes trissômicos, foram utilizados os dados publicados nos estudos de Oliver et al (2013).

Oliver e colaboradores (2013) avaliaram a influência de características no genoma (como ilhas GpG, fração poli(A)/poli(T), densidade dos genes) com riscos de não disjunção, e usando 1536 SNPs marcaram o braço longo do cromossomo 21, que foi separado em 66 intervalos de 500 kb. Os números de eventos de recombinação foram calculados e distribuídos dentre esses intervalos. Através desta metodologia, eles mapearam 539 pontos frequentes de recombinação distribuídos nesses intervalos.

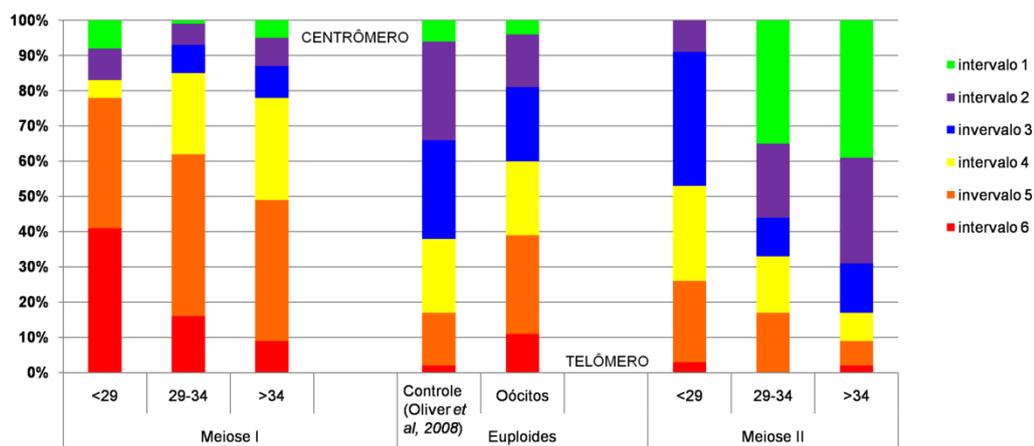
No gráfico abaixo, a frequência de recombinação se encontram no eixo Y, enquanto a distribuição dos intervalos de 550kb em 21q descrita por (Oliver, Middlebrooks *et al.*, 2013) está representada em X. As colunas em amarelo são o número de recombinações encontradas em cada intervalo no estudo de recombinações de Oliver e colaboradores (2013), ao mesmo tempo em que as colunas em vermelho representam as recombinações encontradas em oócitos (Hou, Fan *et al.*, 2013).



**Gráfico 7. Comparação do número de eventos de recombinação entre os estudos de (Hou, Fan *et al.*, 2013) e (Oliver, Middlebrooks *et al.*, 2013).** Em X encontram-se os 66 intervalos de 25kb na extensão do 21q. Em cada um destes intervalos se encontram os valores das frequências de recombinação das populações de oócitos e trissômicos. Em Y, estão as frequências de recombinação.

Para tornar mais precisa a comparação entre os dados de Hou e Oliver, as 91 recombinações encontradas nos oócitos foram distribuídas nos intervalos de Oliver em 2008.

Para isso, as recombinações dos oócitos foram convertidas para o genoma utilizando por Oliver et al (2008), a fim de que as coordenadas das recombinações estejam dentro de mesma referência.



**Figura 18. Distribuição espacial dos eventos de recombinação dos oócitos de Hou et al., 2013.** Os intervalos na extensão do 21q foram designados de acordo com os padronizados por Oliver et al., 2008: intervalo 1: 13667220 a 17137386; intervalo 2: 17137386 a 23735731; intervalo 3: 23735732 a 30122098; intervalo 4: 30122099 a 38649899; intervalo 5: 38649900 a 43060685; e intervalo 6: 43060685 até a última base do cromossomo.

A distribuição espacial dos eventos de recombinação do padrão de Oliver e Hou também apresenta diferenças pontuais nas regiões pericentroméricas e teloméricas.

## 6. DISCUSSÃO

Padrões alterados de recombinação se mostram como um dos primeiros fatores de risco idade independente para a não disjunção do cromossomo 21. Apesar de todos os estudos e esforços para entender quais mecanismos geram perfis mais propícios a este erro meiótico, estes estudos são limitados ao braço longo, e os ditos padrões alterados não são tão diferentes dos padrões normais de recombinação (Warren e Gorringer, 2006; Papavassiliou, 2007; Oliver, Feingold *et al.*, 2008; Alves Da Silva, 2011).

Hoje, é aceito que os perfis mais suscetíveis a não disjunção do cromossomo 21 são um aumento nos eventos de recombinação na região pericentromérica e também a ausência de recombinação na região telomérica.

Uma alternativa para avaliar melhor estes padrões seria compará-los a estudos em gametas femininos, onde os locais de recombinação fossem mapeados de forma robusta. Hou e colaboradores, ao analisar 68 oócitos pela técnica de MALBAC, identificaram que o cromossomo 21, por ser um dos menores cromossomos humanos, apresenta uma maior chance de desenvolver somente um evento de recombinação, mas duplas recombinações e a ausência delas também são possíveis de ocorrer em gametas saudáveis.

As recombinações simples e duplas foram apresentadas no gráfico 3 e 4, respectivamente. Dos 68 oócitos estudados, 45 apresentaram recombinações simples, enquanto 23, duplas recombinações. Nas duplas recombinações, existe uma interferência comprovada entre o local da 1ª recombinação para o 2ª, reforçando que a distância espacial entre múltiplos eventos de recombinação não é dada de forma aleatória (Jones e Franklin, 2006).

Quando avaliamos o total de eventos e o distribuímos nas 47 megabases do braço longo, vemos que a região pericentromérica foi a que mais apresentou um maior número eventos de recombinação (gráfico 5).

A validação do uso dos gametas como um mapa de recombinação confiável se deu pela comparação deste com o mapa construído por Matise, Chen *et al.*, (2007), no gráfico 8. O mapa de Rutgers, ainda considerado o mapa de recombinação mais atual, mostra essencialmente as mesmas informações encontradas nos oócitos, corroborando com o uso destes como padrões normais de recombinação para o cromossomo 21.

Comparando os dados extraídos da análise dos oócitos com o padrão alterado defendido por Oliver, vemos diferença em um local específico: na região telomérica, existe uma menor frequência de recombinação nos gametas quando comparados a perfis trissômicos. Essa informação questiona o padrão alterado de recombinação defendido, onde existiria uma ausência de recombinação na região telomérica em trissômicos quando comparados a padrões normais.

Comparando o perfil de recombinação de oócitos com o da população trissômica, identificamos uma inversão nas regiões mais frequentes de recombinação: enquanto a região centromérica é a mais frequente de recombinação nos oócitos, os trissômicos mostram uma preferência para a recombinação na região telomérica.

Essa observação se faz interessante, pois o padrão alterado defendido atualmente mostra o contrário do observado na população trissômica em questão. Vale ressaltar, porém, que esses dados não estão diferenciando a origem gamética da não disjunção e também não levam em consideração a interferência de recombinação.

Para refinar esta análise, o perfil dos oócitos foi comparado a diferentes populações euploides e trissômicas na publicação de Oliver et al (2008). Os padrões normais de recombinação em todos os estudos sobre eventos de recombinação como fatores de risco são inferências. Quando comparamos estes à avaliação de gametas euploides, vemos que existem diferenças nas regiões ditas mais propensas a erros de disjunção.

Dos perfis que foram apresentados no estudo de Oliver, o controle dissômico é o mais próximo do oócito, porém, existem diferenças entre as porcentagens de recombinação nos intervalos 2 e 5. A possível explicação desse padrão diversificado é a diferença de metodologia entre esses dois estudos. Enquanto Oliver utilizou 21 marcadores STR para a avaliação das recombinações, Hou usou cerca de 1500 SNPs para a mesma avaliação.

A busca de microssatélites no braço curto do cromossomo 21 obteve resultados diferentes do esperado. Apesar da versão mais atual do genoma humano apresentar um volume maior de informações sobre do 21q do que a sua antecessora, e também um acréscimo de mais de 200 novos microssatélites nesta região, esses não foram

identificados como únicos dentro genoma, apesar das ferramentas *in silico* os indicarem com as características necessárias para serem empregados a este estudo.

É possível que estes microssatélites estejam presentes em outros cromossomos acrocêntricos, que ainda não tiveram suas sequências mapeadas completamente, como o cromossomo 21. Também existe a possibilidade destas sequências estarem presentes no próprio cromossomo 21, em segmentos ainda não mapeados, já que a maioria das sequências presentes no 21p são repetições reincidentes no próprio braço curto.

Para o emprego do marcador específico D21S9834378, mais testes, aumentando ainda mais a temperatura na PCR, poderia melhorar o perfil eletroforético apresentado. Senão, testá-lo em uma amostra trissômica e compará-la ao perfil dissômico poderia também validá-lo como um marcador passível para o diagnóstico.

Apesar disso, um bom volume de informações foi adicionado com a atualização do genoma de referência humano. Comparando a sequência mais atual, o hg38, com sua antecessora, o hg19, mais de duzentos microssatélites foram encontrados na região do braço curto.

Ainda assim, essa busca acrescentou um panorama diferente aos estudos com o braço curto deste cromossomo. Descobrir a unicidade de suas sequências amplia o conhecimento sobre duplicações dentro do genoma e instiga a relevância deste evento biológico para nossa evolução.

## 7. CONCLUSÃO

- Os locus STRs identificados em 21p pela análise comparativa das sequências dos genomas foram validados experimentalmente como não sendo únicos. As sequências de DNA de referência, portanto, são muito preliminares, o que dificulta a identificação deste tipo marcadores de DNA nessa região.
- Considerando a distribuição dos eventos de recombinação identificados em oócitos humanos não aneuploides como o padrão controle de recombinação ao longo do cromossomo 21, as nossas análises comparativas não permitiram identificar uma diferença clara entre os padrões de recombinação observados em indivíduos não trissômicos.
- Em relação à origem meiótica da não disjunção, as análises permitiram identificar duas regiões com padrões alterados de recombinação em indivíduos trissômicos comparados com controles. Eventos de recombinação telomérica e na região entre 28Mb e 31Mb foram mais frequentes em trissômicos com origem na meiose I do que em indivíduos controles. Por outro lado, há uma redução das taxas de recombinação telomérica em trissômicos com origem na meiose II.

## **CAPÍTULO II**

### **UNICIDADE DO 21p E MARCADORES PROVENIENTES DE DUPLICAÇÕES SEGMENTARES**

### **3.OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Explorar a aplicabilidade das duplicações segmentares encontradas no braço curto do cromossomo 21 no diagnóstico molecular da trissomia 21.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Mapear as duplicações segmentares presentes no 21p;
- Busca de inserções ou deleções dentro das duplicações segmentares;
- Desenho e validação de marcadores provenientes de duplicações segmentares;
- Genotipagem e diferenciação de amostras de indivíduos trissômicos e dissômicos pelo uso dos marcadores de duplicações segmentares;

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1 Material biológico**

O material biológico para os estudos foi proveniente do banco de DNA no Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular (NUDIM), uma coorte de 40 controles dissômicos e 30 pacientes trissômicos em triplicatas. Também, foram testadas amostras provenientes do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, como parte de colaboração.

O presente estudo foi aprovado sob a folha de rosto nº 347482, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Campos – FMC, devidamente constituído nos termos das resoluções nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

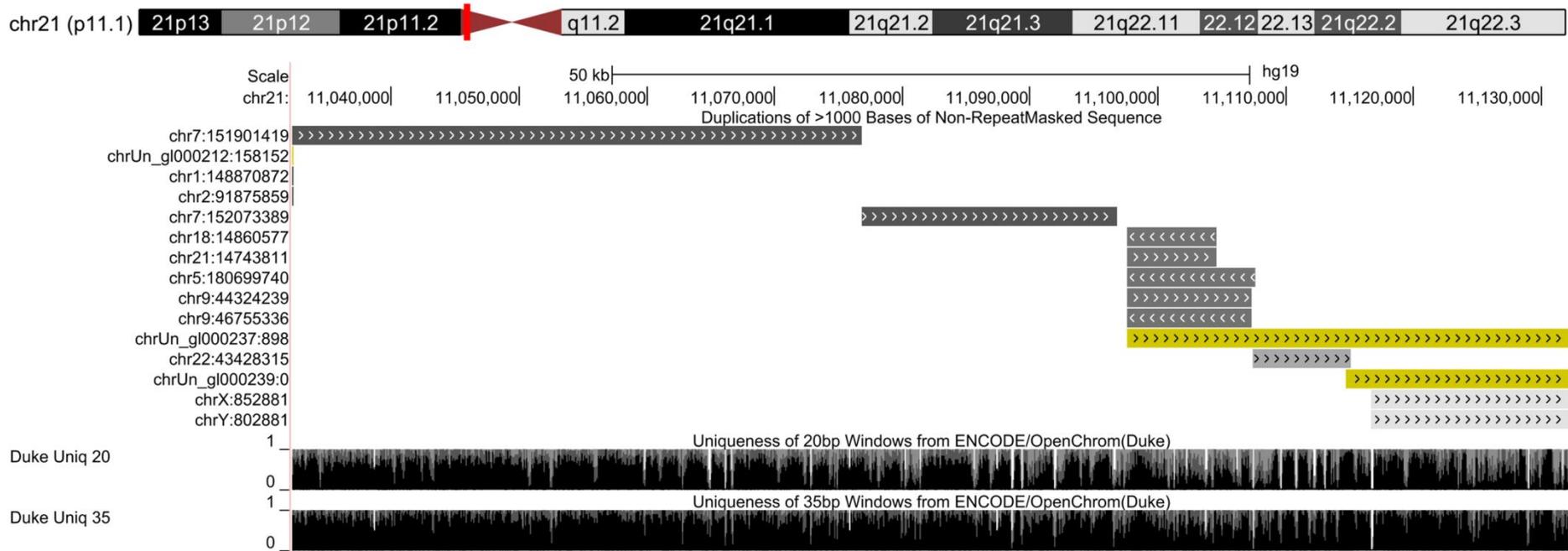
#### **4.2. Varredura do braço curto do cromossomo 21 por sequências únicas.**

A sequência do braço curto do cromossomo 21 no genoma de referência disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, no endereço: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC\\_000021#](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_000021#)) foi submetida à análise em BLAT. As 11 megabases do 21p foram lidas em intervalos de 25kb e comparadas ao resto das sequências do genoma humano. Quando estas sequências apresentavam identidade acima de 95%, foram consideradas duplicações.

### **4.3. Mapeamento das duplicações segmentares presentes no 21p**

A varredura de toda a extensão do braço curto do cromossomo 21 foi realizada utilizando o navegador da Universidade da Califórnia Santa Cruz (*Genome Browser*, no endereço: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), mapeando as duplicações segmentares pelas linhas de pista de duplicações e também pela linha de unicidade da sequência disponibilizada pela Universidade Duke.

Essas duas linhas de pista complementam uma a outra na busca: enquanto uma mostra a presença da duplicação segmentar, a outra comprova que a repetição desta sequência é limitada aos dois cromossomos. A varredura dividiu o 21p em intervalos de 50 Mb. A figura 19 exemplifica o processo desta varredura no navegador, com a região de 10 MB a 10,5 MB em evidência.



**Figura 19. Linhas de pista da varredura das duplicações segmentares.** Pista customizada na plataforma UCSC Genome Browser. O intervalo entre 11,03Mb e 11,13 Mb está destacado no ideograma pela linha vermelha. As informações das duas linhas de pista são comparadas: cada retângulo em cinza ou amarelo representa uma duplicação segmentar. O cromossomo compartilhado está indicado pelo nome à esquerda na figura. Quando uma duplicação se apresenta como uma potencial de se encontrar um marcador, ou seja, está presente em somente um cromossomo além do 21, suas sequências são analisadas pelas linhas de unicidade da Universidade de Duke. Ela deve apresentar um valor de 0,5 para que realmente e comprove a repetição dessa sequência em apenas dois lugares do genoma.

#### **4.4. Busca de inserções e deleções (indels) para o uso dentro das duplicações segmentares**

Após o mapeamento, as duplicações segmentares alvo foram submetidas a uma busca de indels, pela ferramenta BLAT. A presença de deleções ou inserções, num mínimo de quatro pares de base de extensão, dentro de uma mesma sequência diferencia os alelos em cada cromossomo pelo tamanho de seus amplicons.

#### **4.5. Identificação da presença da aneuploidia por SD-QF-PCR**

A identificação da aneuploidia por marcadores designados de duplicações segmentares foram tipados por SD-QF-PCR (*Segmental Duplication Quantitative Fluorescence Polymerase Chain Reaction*) em multiplex. A técnica foi baseada na metodologia de Kong, Li *et al.*, (2014), onde ocorre a amplificação de duas regiões em dois cromossomos diferentes utilizando o mesmo par de iniciadores marcados com fluorescência. Os produtos da SD-QF-PCR foram analisados por eletroforese capilar (utilizando o sequenciador 310 *Genetic Analyzer*, da *Applied Biosystem*), com a adição de formamida e também com o GeneScan LIZ 500 como o padrão de peso molecular. A aneuploidia será determinada pela diferença da dosagem dos picos, de tamanhos diferentes para identificar cada cromossomo. A interpretação do eletroferograma para esta metodologia se encontra na figura 20.



Os iniciadores foram sintetizados pela DNA Express com as fluorescências NED, VIC, FAM e PET.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Varredura do conteúdo do 21p**

O braço curto dos cromossomos acrocêntricos são regiões de mapeabilidade complexa, devido ao grande número de repetições ali presentes. Apesar disso, a montagem do genoma mais atual realizada pelo Consórcio Internacional de Sequenciamento do Genoma Humano foi capaz de mapear parcialmente o conteúdo do braço curto do 21p. A tabela a seguir mostra onde sequências de nucleotídeos já foram encontradas no braço curto e também as regiões ainda não mapeadas.

**Tabela 4.** Sequências do braço curto do cromossomo 21

<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>	<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>	<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>
1-5010000	não sequenciado	5585001-5610000	mapeado	6185001-6210000	não sequenciado
5010001-5035000	mapeado	5610001-5635000	parcialmente mapeado	6210001-6235000	parcialmente mapeado
5035001-5060000	mapeado	5635001-5660000	não sequenciado	6235001-6260000	mapeado
5060001-5085000	mapeado	5660001-5685000	parcialmente mapeado	6260001-6285000	mapeado
5085001-5110000	mapeado	5685001-5710000	mapeado	6285001-6310000	mapeado
5110001-5135000	mapeado	5710001-5735000	mapeado	6310001-6335000	mapeado
5135001-5160000	mapeado	5735001-5760000	mapeado	6335001-6360000	mapeado
5160001-5185000	parcialmente mapeado	5760001-5785000	mapeado	6360001-6385000	parcialmente mapeado
5185001-5210000	não sequenciado	5785001-5810000	parcialmente mapeado	6385001-6410000	não sequenciado
5210001-5235000	parcialmente mapeado	5810001-5835000	não sequenciado	6410001-6435000	parcialmente mapeado
5235001-5260000	mapeado	5835001-5860000	parcialmente mapeado	6435001-6460000	mapeado
5260001-5285000	mapeado	5860001-5885000	mapeado	6460001-6485000	mapeado
5285001-5310000	mapeado	5885001-5910000	mapeado	6485001-6510000	mapeado
5310001-5335000	mapeado	5910001-5935000	parcialmente mapeado	6510001-6535000	mapeado
5335001-5360000	mapeado	5935001-5960000	não sequenciado	6535001-6560000	mapeado
5360001-5385000	mapeado	5960001-5985000	parcialmente mapeado	6560001-6585000	parcialmente mapeado
5385001-5410000	parcialmente mapeado	5985001-6010000	mapeado	6585001-6610000	não sequenciado
5410001-5435000	não sequenciado	6010001-6035000	mapeado	6610001-6635000	parcialmente mapeado
5435001-5460000	parcialmente mapeado	6035001-6060000	mapeado	6635001-6660000	mapeado
5460001-5485000	não sequenciado	6060001-6085000	mapeado	6660001-6685000	mapeado
5485001-5510000	parcialmente mapeado	6085001-6110000	mapeado	6685001-6710000	mapeado
5510001-5535000	mapeado	6110001-6135000	mapeado	6710001-6735000	mapeado
5535001-5560000	mapeado	6135001-6160000	mapeado	6735001-6760000	parcialmente mapeado
5560001-5585000	mapeado	6160001-6185000	parcialmente mapeado	6760001-6785000	não sequenciado

A primeira coluna abrange as regiões do braço curto, em intervalos de 25kb. Até 5MB não há sequenciamento do braço curto. Parcialmente sequenciado significa que mais da metade dos 25kb não está sequenciado. Regiões mapeadas apresentam todas as bases enquanto não sequenciadas apresentam somente Ns.

**Tabela 4. Sequências do braço curto do cromossomo 21 (continuação)**

<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>	<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>	<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>
6785001-6810000	parcialmente mapeado	7385001-7410000	mapeado	8035001-8060000	parcialmente mapeado
6810001-6835000	mapeado	7410001-7435000	mapeado	8060001-8085000	não sequenciado
6835001-6860000	mapeado	7435001-7460000	mapeado	8085001-8110000	parcialmente mapeado
6860001-6885000	mapeado	7460001-7485000	mapeado	8110001-8135000	mapeado
6885001-6910000	mapeado	7485001-7510000	parcialmente mapeado	8135001-8160000	mapeado
6910001-6935000	parcialmente mapeado	7510001-7535000	não sequenciado	8160001-8185000	mapeado
6935001-6960000	não sequenciado	7535001-7560000	parcialmente mapeado	8185001-8210000	mapeado
6960001-6985000	parcialmente mapeado	7560001-7585000	mapeado	8210001-8235000	mapeado
6985001-7010000	mapeado	7585001-7610000	mapeado	8235001-8260000	mapeado
7010001-7035000	mapeado	7635001-7660000	mapeado	8260001-8285000	parcialmente mapeado
7035001-7060000	mapeado	7660001-7685000	mapeado	8285001-8310000	não sequenciado
7060001-7085000	mapeado	7685001-7710000	parcialmente mapeado	8310001-8335000	parcialmente mapeado
7085001-7110000	mapeado	7710001-7735000	não sequenciado	8335001-8360000	mapeado
7110001-7135000	mapeado	7735001-7760000	parcialmente mapeado	8360001-8385000	mapeado
7135001-7160000	parcialmente mapeado	7760001-7785000	mapeado	8385001-8410000	mapeado
7160001-7185000	não sequenciado	7810001-7835000	mapeado	8410001-8435000	mapeado
7185001-7210000	parcialmente mapeado	7835001-7860000	mapeado	8435001-8460000	mapeado
7210001-7235000	mapeado	7860001-7885000	parcialmente mapeado	8460001-8485000	parcialmente mapeado
7235001-7260000	mapeado	7885001-7910000	não sequenciado	8485001-8510000	não sequenciado
7260001-7285000	mapeado	7910001-7935000	parcialmente mapeado	8510001-8535000	parcialmente mapeado
7285001-7310000	mapeado	7935001-7960000	mapeado	8535001-8560000	mapeado
7310001-7335000	parcialmente mapeado	7960001-7985000	mapeado	8560001-8585000	mapeado
7335001-7360000	não sequenciado	7985001-8010000	mapeado	8585001-8610000	mapeado
7360001-7385000	parcialmente mapeado	8010001-8035000	mapeado	8610001-8635000	mapeado

A primeira coluna abrange as regiões do braço curto, em intervalos de 25kb. Até 5MB não há sequenciamento do braço curto. Parcialmente sequenciado significa que mais da metade dos 25kb não está sequenciado. Regiões mapeadas apresentam todas as bases enquanto não sequenciadas apresentam somente Ns.

**Tabela 4. Sequências do braço curto do cromossomo 21 (continuação)**

<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>	<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>	<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>
8635001-8660000	mapeado	9110001-9135000	mapeado	9585001-9610000	mapeado
8660001-8685000	mapeado	9135001-9160000	mapeado	9610001-9635000	mapeado
8685001-8710000	parcialmente mapeado	9160001-9185000	mapeado	9635001-9660000	mapeado
8710001-8735000	não sequenciado	9185001-9210000	parcialmente mapeado	9660001-9685000	mapeado
8735001-8760000	parcialmente mapeado	9210001-9235000	não sequenciado	9685001-9710000	mapeado
8760001-8785000	mapeado	92350010-9260000	parcialmente mapeado	9710001-9735000	mapeado
8785001-8810000	mapeado	9260001-9285000	mapeado	9735001-9760000	mapeado
8810001-8835000	mapeado	9285001-9310000	mapeado	9760001-9785000	mapeado
8835001-8860000	mapeado	9310001-9335000	mapeado	9785001-9810000	mapeado
8860001-8885000	mapeado	9335001-9360000	mapeado	9810001-9835000	mapeado
8885001-8910000	parcialmente mapeado	9360001-9385000	parcialmente mapeado	9835001-9860000	mapeado
8910001-8935000	não sequenciado	9385001-9410000	não sequenciado	9860001-9885000	mapeado
8935001-8960000	não sequenciado	9410001-9435000	não sequenciado	9885001-9910000	mapeado
8960001-8985000	não sequenciado	9435001-9460000	não sequenciado	9910001-9935000	mapeado
8985001-9010000	parcialmente mapeado	9460001-9485000	não sequenciado	9935001-9960000	mapeado
9010001-9035000	mapeado	9485001-9510000	não sequenciado	9960001-9985000	mapeado
9035001-9060000	mapeado	9510001-9535000	parcialmente mapeado	9985001-10010000	mapeado
9060001-9085000	mapeado	9535001-9560000	mapeado	10010001-10035000	mapeado
9085001-9110000	mapeado	9560001-9585000	mapeado	10035001 -10060000	mapeado

A primeira coluna abrange as regiões do braço curto, em intervalos de 25kb. Até 5MB não há sequenciamento do braço curto. Parcialmente sequenciado significa que mais da metade dos 25kb não está sequenciado. Regiões mapeadas apresentam todas as bases enquanto não sequenciadas apresentam somente Ns.

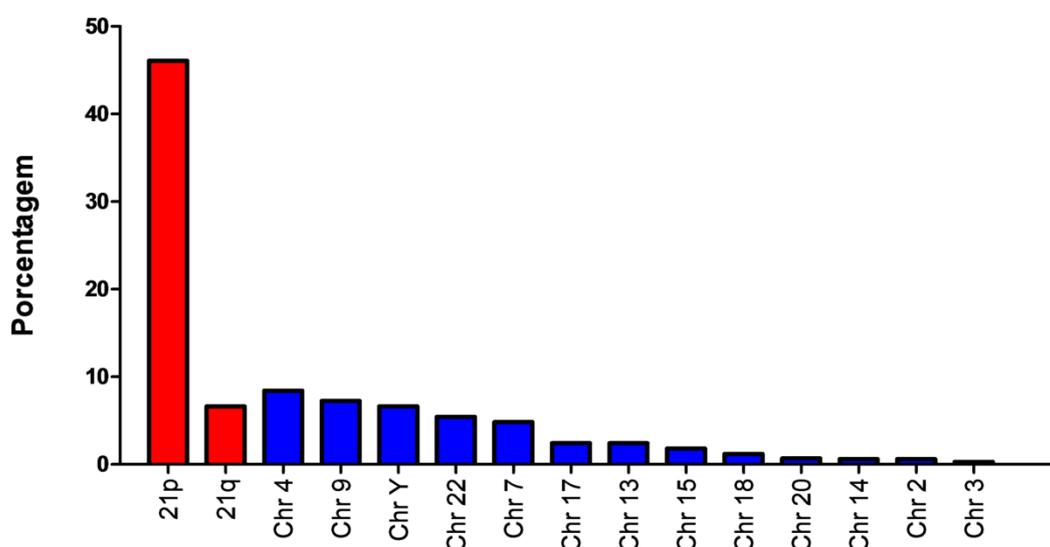
**Tabela 4. Sequências do braço curto do cromossomo 21 (continuação)**

<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>	<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>	<b>Região 21p</b>	<b>Situação</b>
10060001-10085000	Mapeado	10410001-10435000	mapeado	10735001-10760000	mapeado
10085001-10110000	Mapeado	10435001-10460000	mapeado	10760001-10785000	mapeado
10110001-10135000	Mapeado	10460001-10485000	mapeado	10785001-10810000	mapeado
10135001-10160000	Mapeado	10485001-10510000	mapeado	10810001-10835000	Parcialmente mapeado
10160001-10185000	parcialmente mapeado	10510001-10535000	mapeado	10835001-10860000	não sequenciado
10185001-10210000	não sequenciado	10535001-10560000	mapeado	10860001-10885000	parcialmente mapeado
10210001-10235000	não sequenciado	10560001-10585000	mapeado	10885001-10910000	mapeado
10260001-10285000	parcialmente mapeado	10585001-10610000	mapeado	10910001-10935000	mapeado
10285001-10310000	não sequenciado	10610001-10635000	mapeado	10935001-10960000	mapeado
10310001-10335000	parcialmente mapeado	10635001-10660000	mapeado	10960001-10985000	mapeado
10335001-10360000	Mapeado	10660001-10685000	mapeado	10985001-11010000	mapeado
10360001-10385000	Mapeado	10685001-10710000	mapeado		
10385001-10410000	Mapeado	10710001-10735000	mapeado		

A primeira coluna abrange as regiões do braço curto, em intervalos de 25kb. Até 5MB não há sequenciamento do braço curto. Parcialmente sequenciado significa que mais da metade dos 25kb não está sequenciado. Regiões mapeadas apresentam todas as bases enquanto não sequenciadas apresentam somente Ns.

## 5.2. Unicidade do 21p

Cerca de 50% do conteúdo do braço curto foi mapeado. Dessas sequências, apenas 6% é exclusivo do 21p. O resto do conteúdo apresenta duplicações entre outros cromossomos e até mesmos intracromossomais. Das sequências mapeadas até então, cerca de metade apresenta duplicações dentro da própria região do braço curto.



**Gráfico 8 – Percentagem identidade as sequências do 21p.** No eixo x são identificados os cromossomos que apresentam duplicações compartilhadas com o cromossomo 21. As regiões do próprio cromossomo estão evidenciadas nas barras vermelhas. O eixo y representa a porcentagem dessas duplicações.

Existem sequências que são compartilhadas por mais de um cromossomo, e até mesmo sequências ainda não organizadas em cromossomos estão duplicadas no cromossomo 21. O gráfico 10 evidencia apenas as duplicações com mais de 95% de identidade com as sequências do cromossomo 21.

## 5.3. Busca de duplicações segmentares

A busca por duplicações segmentares foi feita usando a ferramenta de busca da UCSC (no endereço: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=ch>

r21%3A400000011000000&hgsid=483270047\_VPgkxgQVjTAT9o5mBNuiXiUxvhwD)

O parâmetro de busca foi a presença da mesma duplicação em diversos cromossomos. Aquela que fosse compartilhada somente entre o cromossomo 21 e mais um, seria escolhida. A partir destas duplicações encontradas foi selecionada uma região que apresentasse uma inserção ou deleção (indel) de bases na sequência, que pudesse diferenciar um cromossomo do outro. Este indel deve estar entre os pares de primers.

Quatro duplicações segmentares foram encontradas na região pericentromérica do braço curto do cromossomo 21, e são compartilhadas entre o cromossomo 7, 15 e 20.

**Quadro 4. Duplicações segmentares alvo**

Duplicação segmentar	Tamanho (bp)	Posição física	
		cromossomo 21	cromossomo 7
<b>SD10435</b>	10.014	21:10435619-1445633	7:152260381-152270394
<b>SD10510</b>	6.597	21:10510550-10517147	7:152204334-152210931
		cromossomo 21	cromossomo 20
<b>SD10517</b>	3.885	21:10517150-10521034	20:53601734-53605586
		cromossomo 21	cromossomo 15
<b>SD10632</b>	16.860	21:10632544-10649404	15:19954743-19964670

Das quatro duplicações segmentares, três apresentavam tais características, rendendo um total de quatro marcadores moleculares.

**Quadro 5. Marcadores alvo**

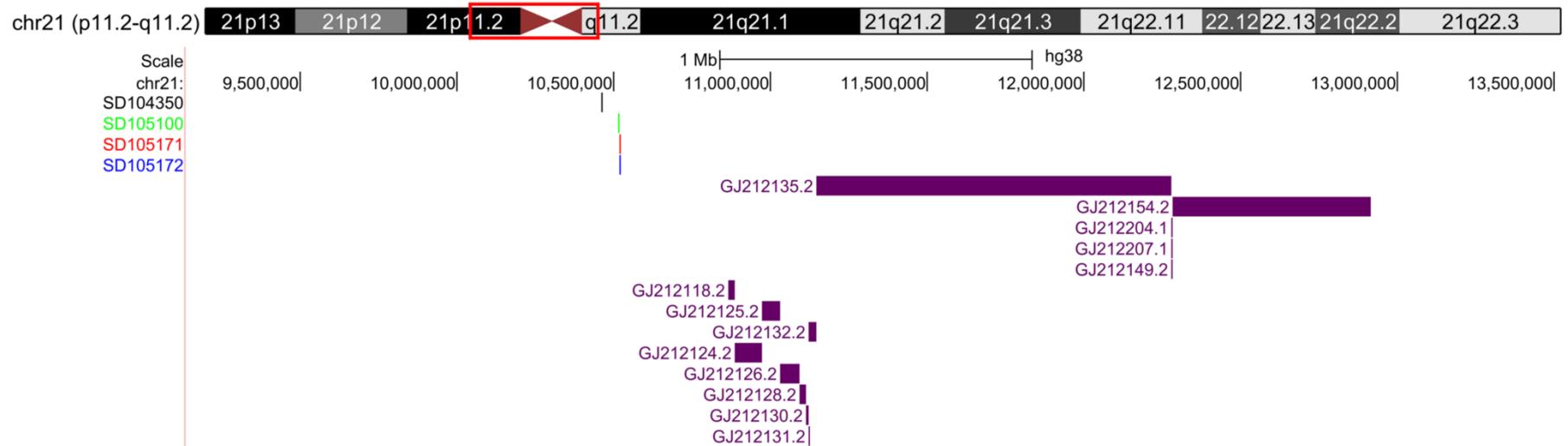
Marcador	Localização do amplicon	Tamanho do amplicon (bp)	Sequência do primer.
SD10517 1	chr21:10518606-10518760	158	F:TATGCCTAGCCCTGGGTATGT
	chr20:53603999-53604148	150	R:CCAAGGAGCACAGAACAGC
SD10517 2	chr21:10520166-10520365	200	F:TACTTTTTCCATGGAGCTG
	chr20:53602403-53602598	196	R:AACAAAGAAACATGGGTGGTGA GA
SD10435	chr21:10459190-10459435	246	F:AGAAAGGACATAACTGGGATGT T
	chr7:152268613- 152268837	225	R:AAGTGTCAGGGGAGCAAAC
SD10510	chr21:10515060-10515276	217	F:ACTTCCATGTGAGGCAGAGG
	chr7:152206266- 152296488	223	R:TTCATTCGTATTCCATGAGACC

Para diferenciar a amplificação de cada marcador em seus respectivos cromossomos, os amplicons devem ter diferentes tamanhos, com indels que criem

uma diferença de quatro nucleotídeos, pelo menos. Em cada duplicação segmentar, então, feita uma varredura buscando tais características, que também fossem flanqueadas por regiões de potenciais desenhos de iniciadores.

A unicidade dos iniciadores também foi avaliada através da mapabilidade do Duke 35. A pontuação da sequência mostra que ela se repete duas vezes no genoma, indicando sua presença nos cromossomos 21 e 20 para os marcadores SD105171, SD105172 e SD10435, e nos cromossomos 21 e 7 para o marcador SD10510.

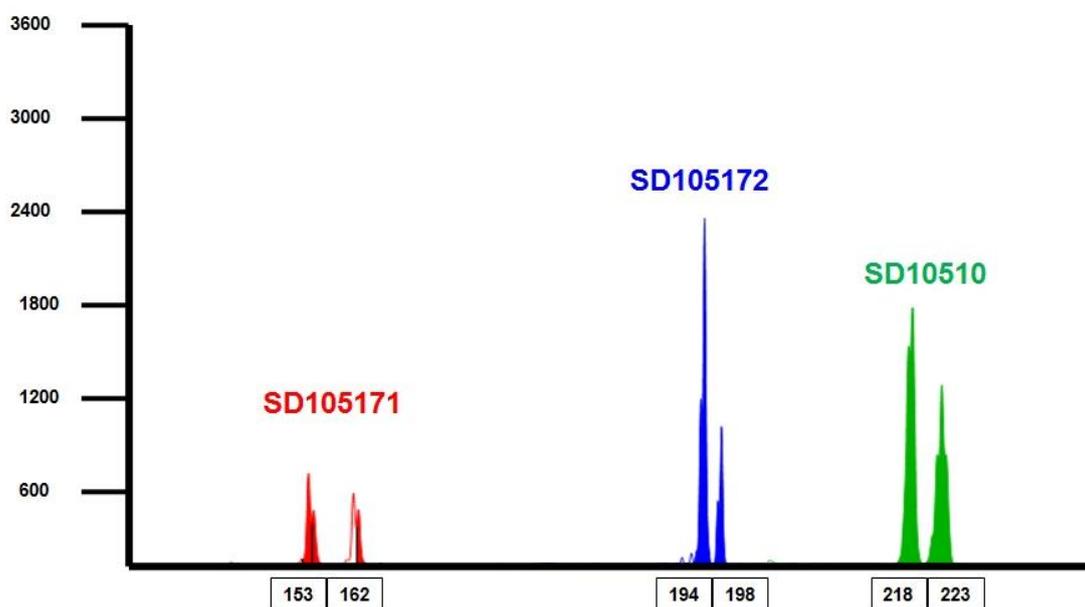
Para certificar a localização dos marcadores no braço curto do cromossomo, uma linha de pista foi criada para comparar sua localização com o centrômero do chr21 (figura 21). Foi utilizado, como base da localização no cromossomo, a linha de pista *Centromere Location* (posição do centrômero, tradução livre). Esta linha de pista é a mais atualizada sobre informações das sequências do centrômero e incorporam os modelos de sequência deste segmento, derivadas de leituras de bibliotecas de alfa-satélites provenientes de sequenciamento *shotgun*.



**Figura 21. Localização dos marcadores em relação ao centrômero.** Pista customizada na plataforma UCSC Genome Browser. O ideograma representa o cromossomo 21, com a região pericentromérica estudada evidenciada pelo retângulo vermelho. A primeira linha de pista retrata os marcadores moleculares, indicados por seu nome e cor de suas respectivas fluorescências. A segunda linha de pista engloba as 13 sequências de referências centroméricas, em roxo. Podemos inferir, pela distância entre o marcador molecular mais proximal (SD105172) e a primeira sequência de referência (GJ212118.2), que os marcadores provenientes de duplicações segmentares não estão localizados no centrômero, e sim no braço curto.

#### 5.4. Resultados das genotipagem de controles

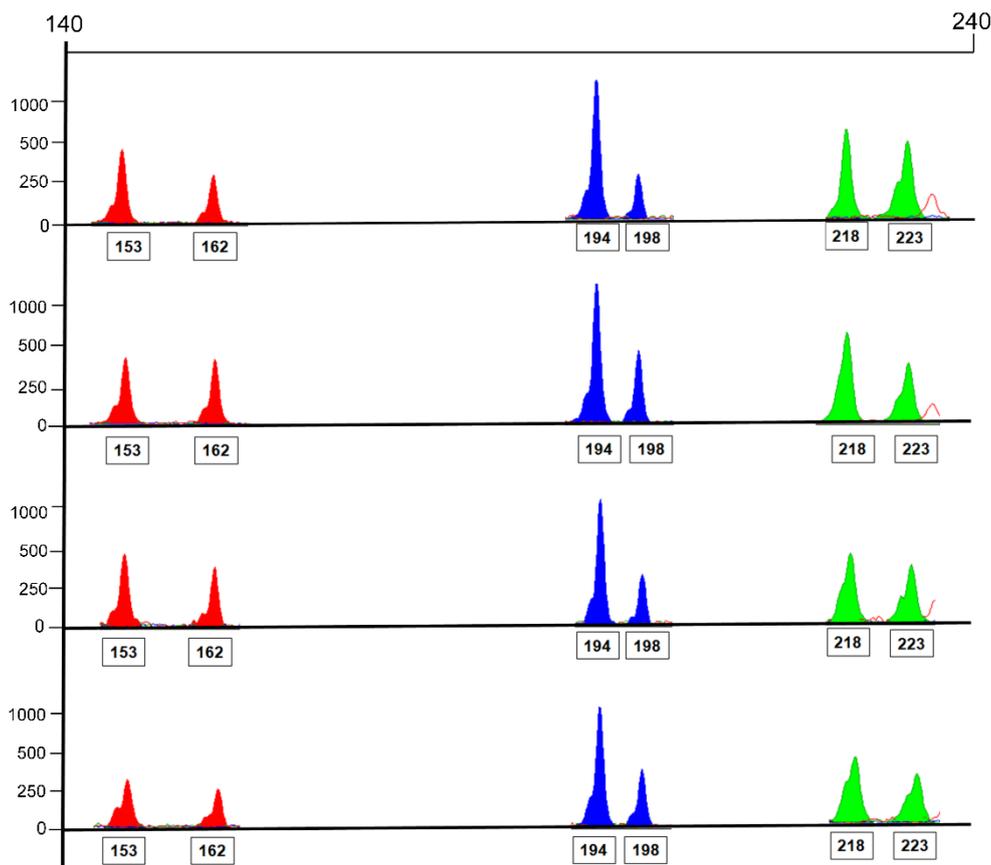
Todas as duplicações segmentares selecionadas para estudo estão localizadas no braço curto do cromossomo 21. Para avaliar a dosagem, se são de fato limitados aos cromossomos de seus amplicons, os quatro pares de primers foram testados previamente com amostras dissômicas, para então serem testados em pacientes trissômicos. Um tetraplex foi montado para a avaliação dos marcadores. O resultado se encontra na figura 21.



**Figura 22. Resultados do tetraplex.** O eixo X indica o tamanho do marcador, enquanto o eixo Y mostra a intensidade da amplificação. Dos quatro pares de iniciadores, três estavam adequados para o ensaio.

Dos quatro marcadores, três amplificaram de forma eficaz. O SD10510 apresenta duplicações no cromossomo 21 e 7, nos tamanhos de 217 e 223, respectivamente. O marcador SD105172 apresentou um desbalanço entre os picos do cromossomo 20 (153 pb) e 21 (162 pb). O marcador SD105171 apresenta duplicações nos cromossomos 20 (152 bp) e cromossomo 21 (163 bp).

A diferença de amplificação entre os alelos de cada marcador foi mantida entre as amostras controle. O marcador mais próximo a uma proporção de 1:1 é o marcador SD105171, como mostrado na figura 23.



**Figura 23. Eletroferograma da genotipagem do triplex em controles dissômicos.** A figura apresenta quatro perfis de diferentes controles dissômicos, mostrando que as diferenças de altura e áreas entre os picos é mantida. As informações no eixo X se referem ao tamanho do marcador, enquanto o eixo Y mostra a intensidade da fluorescência deste. O comportamento do pico não variou entre as amostras dissômicas.

Triplicatas de 20 amostras controles foram feitas. A razão entre a altura dos picos e área dos picos segue abaixo nas tabelas 12 e 13 respectivamente.

**Tabela 5 – Resultados das médias das alturas das triplicatas dos controles dissômicas**

	SD105171			SD105172			SD10510		
	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03
<b>Controle 01</b>	1,10	1,13	1,06	0,58	0,66	0,59	2,03	2,01	1,98
<b>Controle 02</b>	0,94	0,89	0,98	0,43	0,38	0,45	1,66	1,64	1,65
<b>Controle 03</b>	0,89	0,90	0,90	0,44	0,05	0,46	1,33	1,30	1,31
<b>Controle 04</b>	0,83	0,89	0,91	0,42	0,47	0,46	1,28	1,35	1,30
<b>Controle 05</b>	0,72	0,76	0,76	0,43	0,43	0,43	1,15	1,06	0,95
<b>Controle 06</b>	0,85	0,96	0,97	0,43	0,49	0,41	1,23	1,02	1,24
<b>Controle 07</b>	0,84	0,75	0,86	0,44	0,45	0,51	1,37	1,44	1,50
<b>Controle 08</b>	1,04	0,98	0,97	0,61	0,63	0,61	1,72	1,61	1,92
<b>Controle 09</b>	0,90	0,86	0,90	0,53	0,48	0,40	1,85	1,76	1,68
<b>Controle 10</b>	0,83	0,75	0,75	0,40	0,41	0,39	1,58	1,24	1,39
<b>Controle 11</b>	0,97	0,92	0,92	0,51	0,52	0,59	1,51	1,71	1,72
<b>Controle 12</b>	0,86	0,74	0,81	0,43	0,42	0,45	1,45	1,52	1,46
<b>Controle 13</b>	0,88	0,60	0,72	0,43	0,43	0,41	1,53	1,60	1,63
<b>Controle 14</b>	0,81	0,76	0,89	0,48	0,49	0,49	1,87	1,89	1,78
<b>Controle 15</b>	0,86	0,76	0,76	0,47	0,49	0,45	1,52	1,32	1,45
<b>Controle 16</b>	0,95	0,85	1,01	0,54	0,61	0,60	2,12	2,06	2,20
<b>Controle 17</b>	0,84	0,93	0,97	0,44	0,45	0,51	1,51	1,71	1,72
<b>Controle 18</b>	0,90	0,90	0,97	0,47	0,49	0,49	1,33	1,30	1,31
<b>Controle 19</b>	0,84	0,75	0,86	0,47	0,66	0,45	1,51	1,71	1,72
<b>Controle 20</b>	0,94	0,89	0,98	0,61	0,63	0,61	1,28	1,35	1,30

Tabela 6 – Resultados das médias das áreas dos controles dissômicos

	SD105171			SD105172			SD10510		
	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03
<b>Controle 01</b>	1,05	1,08	1,07	0,53	0,60	0,55	0,68	0,69	0,69
<b>Controle 02</b>	0,88	0,63	0,93	0,40	0,35	0,41	0,83	0,82	0,80
<b>Controle 03</b>	0,82	0,84	0,82	0,42	0,38	0,44	0,97	0,88	0,82
<b>Controle 04</b>	0,89	0,96	0,96	0,40	0,44	0,43	0,82	0,78	0,80
<b>Controle 05</b>	0,87	0,74	0,78	0,30	0,31	0,31	1,01	1,11	1,07
<b>Controle 06</b>	0,89	0,94	0,90	0,59	0,47	0,48	1,13	0,92	1,09
<b>Controle 07</b>	0,91	0,91	0,94	0,37	0,43	0,49	0,75	0,69	0,70
<b>Controle 08</b>	1,13	1,04	1,08	0,56	0,55	0,56	0,64	0,69	0,67
<b>Controle 09</b>	0,99	0,93	0,84	0,46	0,45	0,38	0,77	0,81	0,77
<b>Controle 10</b>	0,81	0,81	0,80	0,34	0,39	0,33	0,77	0,91	0,76
<b>Controle 11</b>	0,94	1,00	1,04	0,47	0,50	0,58	0,68	0,60	0,65
<b>Controle 12</b>	0,85	0,83	0,91	0,40	0,39	1,00	0,76	0,77	0,76
<b>Controle 13</b>	0,88	0,80	0,89	0,39	0,41	0,39	0,84	0,89	0,87
<b>Controle 14</b>	0,99	0,80	0,87	0,44	0,47	0,45	0,75	0,68	0,73
<b>Controle 15</b>	0,88	0,82	0,87	0,45	0,45	0,42	0,72	0,81	0,73
<b>Controle 16</b>	1,19	0,97	1,12	0,50	0,55	0,56	0,65	0,62	0,46
<b>Controle 17</b>	0,78	0,79	0,92	0,53	0,45	0,41	0,73	0,63	0,67
<b>Controle 18</b>	0,75	0,83	0,80	0,55	0,49	0,58	1,05	0,92	0,90
<b>Controle 19</b>	0,80	0,86	0,99	0,48	0,40	0,51	0,79	0,85	0,82
<b>Controle 20</b>	1,06	1,11	0,84	0,47	0,64	0,45	0,78	0,92	0,79

Pelas diferenças na amplificação para cada alelo em cada marcador, os desvios médios de altura e área foram identificados. A média da altura para os marcadores é respectivamente 0,87; 0,48 e 1,5.

A razão das áreas também foi avaliada, com a média de 0,9: 0,46 e 0,79 para os marcadores SD105171, SD105172 e SD10510.

A média das razões entre as triplicatas das 20 amostras dissômicas, o desvio padrão e o coeficiente de variação se encontram na tabela 11.

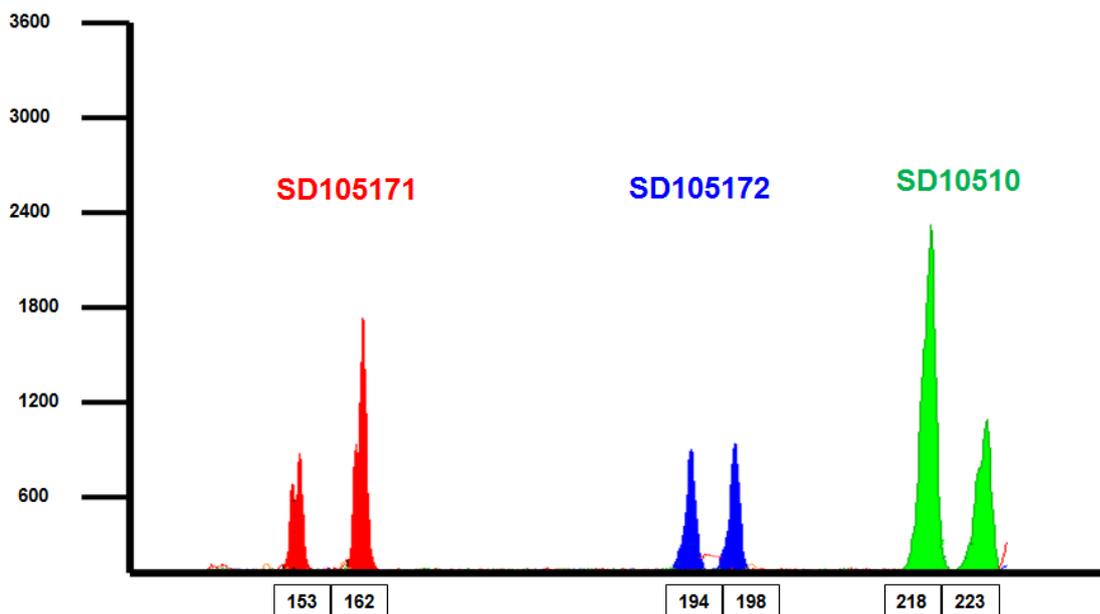
**Quadro 6. Médias das Altura e áreas dos dissômicos**

<b>ALTURA</b>	<b>SD105171</b>	<b>SD105172</b>	<b>SD10510</b>
<b>Média</b>	0,8781	0,4831	1,543
<b>Desvio padrão</b>	0,09042	0,07857	0,2745
<b>coeficiente de variação</b>	10%	16%	18%
<b>ÁREA</b>			
<b>Média</b>	0,9065	0,4649	0,7951
<b>Desvio padrão</b>	0,02142	0,01697	0,02824
<b>coeficiente de variação</b>	11%	16%	16%

A partir dos resultados com os controles dissômicos, amostras de pacientes trissômicos foram submetidas ao teste.

### **5.5. Resultado das genotipagens em amostras trissômicas**

O perfil encontrado foi diferente do apresentado nos controles (figura 24). Os marcadores que antes apresentavam certo equilíbrio nas amostras dissômicas estão desbalanceados nos trissômicos, ao passo que o que antes era desbalanceado, aparentemente se mostrava na mesma proporção nos trissômicos.



**Figura 24. Eletroferograma da genotipagem do triplex dos marcadores moleculares de duplicações segmentares em trissômicos.** As informações no eixo X se referem ao tamanho do marcador, enquanto o eixo Y mostra a intensidade da fluorescência deste. Há um desbalanço entre os marcadores SD105171 e SD10510, que em dissômicos estão na mesma dosagem. Os picos do marcador SD105172 na amostra trissômica estão balanceados, devido a presença da cópia extra.

O comportamento dos picos na amostra trissômica foi esperado para um perfil que apresenta uma cópia extra do cromossomo 21. A área abaixo dos picos se encontra na tabela 12.

Trinta amostras trissômicas foram testadas em triplicata. Destas, 24 apresentaram o perfil esperado para um perfil com a presença de mais uma cópia do cromossomo 21. A razão das alturas e áreas dos picos dessas amostras se encontram nas tabelas 13 e 14 respectivamente.

Tabela 7 – Resultados das médias das alturas das triplicatas trissômicas

	SD105171			SD105172			SD10510		
	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03
<b>Amostra 01</b>	1,50	1,51	1,38	0,77	0,75	0,78	2,65	2,76	2,79
<b>Amostra 02</b>	1,81	1,84	1,86	1,08	1,14	1,06	2,55	2,17	2,40
<b>Amostra 03</b>	1,32	1,31	1,30	0,80	0,83	1,10	1,71	2,85	1,55
<b>Amostra 04</b>	1,50	1,56	1,67	1,15	1,16	1,23	2,33	2,58	2,56
<b>Amostra 05</b>	1,78	1,53	1,61	1,46	1,30	1,40	2,93	3,13	3,49
<b>Amostra 06</b>	1,36	1,32	1,78	0,92	0,96	1,41	2,22	2,36	2,51
<b>Amostra 07</b>	1,77	2,58	2,08	0,92	1,22	0,87	3,32	2,28	2,46
<b>Amostra 08</b>	1,70	1,78	1,84	1,46	1,04	0,98	3,43	3,48	4,55
<b>Amostra 09</b>	1,22	1,78	1,82	0,89	0,99	1,20	2,62	3,07	2,73
<b>Amostra 10</b>	1,48	1,64	1,59	0,92	1,06	1,14	3,19	2,48	2,99
<b>Amostra 11</b>	1,63	1,45	2,57	0,96	0,77	1,34	3,05	2,85	3,74
<b>Amostra 12</b>	2,05	2,06	1,96	2,34	2,15	2,25	4,64	4,20	4,42
<b>Amostra 13</b>	1,99	1,87	1,93	1,21	1,03	1,12	2,52	3,22	2,87
<b>Amostra 14</b>	1,77	1,68	1,72	0,64	0,65	0,64	1,60	1,35	1,48
<b>Amostra 15</b>	1,72	1,81	1,83	1,14	1,40	1,14	1,87	1,74	2,96
<b>Amostra 16</b>	1,89	2,24	2,48	2,26	2,34	2,07	3,37	4,66	4,26
<b>Amostra 17</b>	2,06	2,03	2,00	0,99	0,99	1,02	3,15	3,04	3,17
<b>Amostra 18</b>	1,82	1,29	1,56	1,19	1,00	1,09	2,14	2,42	2,28
<b>Amostra 19</b>	1,12	1,25	1,28	0,62	0,93	0,69	2,98	2,66	2,95
<b>Amostra 20</b>	2,08	1,63	2,03	1,10	1,23	1,09	2,98	2,86	2,87
<b>Amostra 21</b>	1,85	1,78	1,95	1,21	1,13	1,04	2,15	2,29	2,58
<b>Amostra 22</b>	1,86	2,05	1,73	1,04	0,98	1,01	2,78	2,56	2,43
<b>Amostra 23</b>	1,60	1,78	1,58	1,16	0,93	1,09	2,27	3,11	2,80
<b>Amostra 24</b>	1,44	1,66	1,58	0,72	1,13	0,84	2,91	3,07	2,76

Tabela 8 – Resultados da média das áreas das triplicatas dos trissômicos

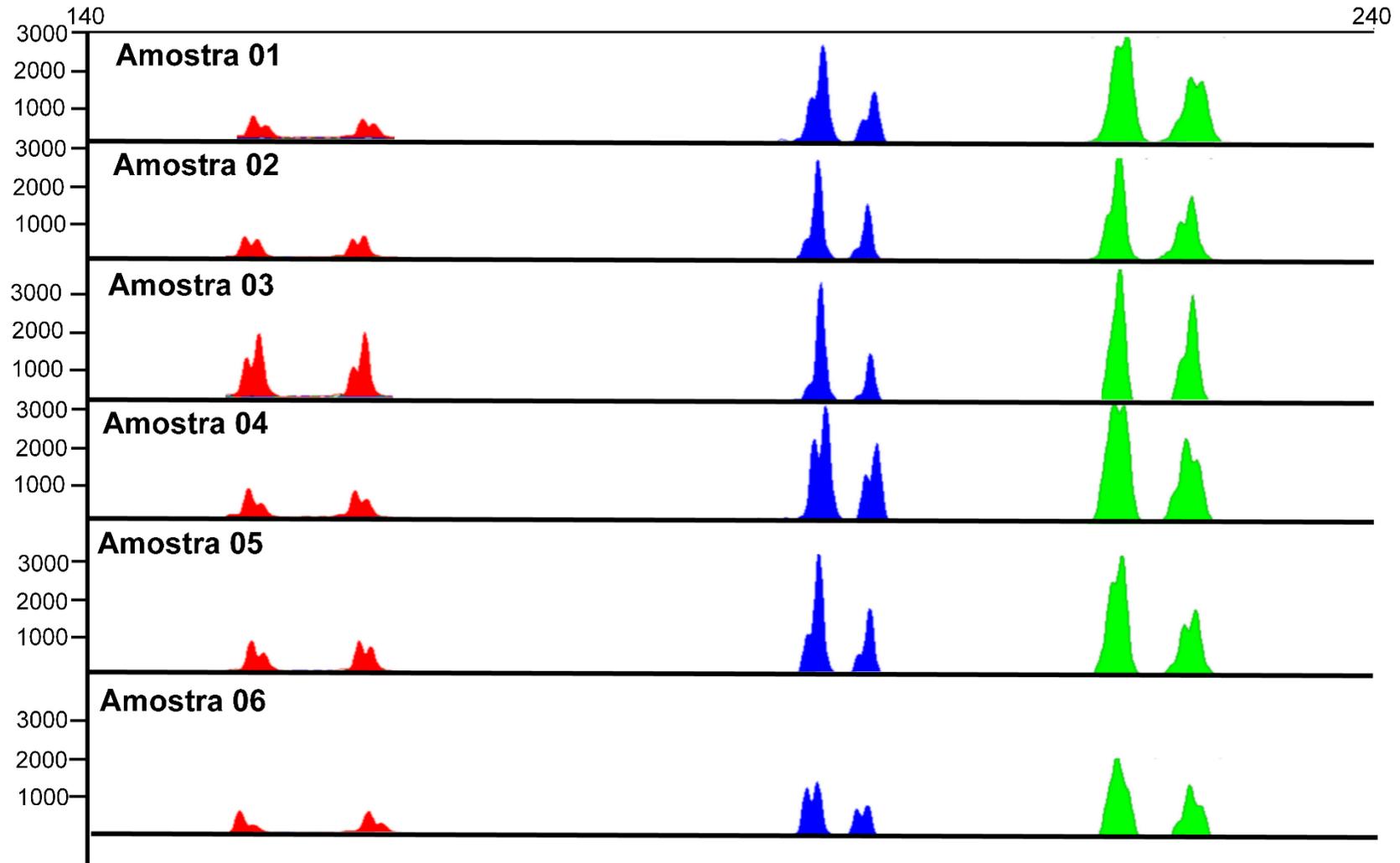
	SD105171			SD105172			SD10510		
	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03	triplicata 01	triplicata 02	triplicata 03
<b>Amostra 01</b>	1,39	1,37	1,28	0,72	0,70	0,73	2,19	2,11	2,05
<b>Amostra 02</b>	1,61	1,69	1,71	1,02	1,08	1,01	2,14	2,38	2,19
<b>Amostra 03</b>	1,45	1,39	1,56	0,76	0,79	0,85	2,03	2,60	1,78
<b>Amostra 04</b>	1,66	1,81	1,71	1,13	1,14	1,20	2,48	2,68	2,59
<b>Amostra 05</b>	2,08	1,51	1,99	1,40	1,27	1,35	2,80	2,88	2,79
<b>Amostra 06</b>	1,48	1,10	2,00	0,92	0,99	1,41	2,22	2,36	2,51
<b>Amostra 07</b>	1,68	2,37	1,98	0,87	1,19	0,84	3,13	2,17	2,27
<b>Amostra 08</b>	1,68	1,68	1,64	1,41	0,98	0,94	2,84	2,90	3,99
<b>Amostra 09</b>	1,41	1,55	1,67	0,99	0,93	1,02	2,44	2,41	2,10
<b>Amostra 10</b>	1,42	1,62	1,58	0,88	1,02	1,06	2,44	1,94	2,26
<b>Amostra 11</b>	1,63	1,41	2,49	0,91	0,68	1,35	2,34	2,32	2,75
<b>Amostra 12</b>	2,43	2,58	2,50	2,21	2,00	2,10	1,76	1,58	1,67
<b>Amostra 13</b>	2,16	2,06	2,11	2,05	1,76	1,91	2,56	3,35	2,95
<b>Amostra 14</b>	1,75	1,50	1,63	0,55	0,52	0,54	1,85	1,70	1,78
<b>Amostra 15</b>	1,72	1,80	1,77	1,07	1,33	1,10	1,97	1,68	3,02
<b>Amostra 16</b>	2,39	2,58	2,24	2,18	2,26	3,02	2,76	4,11	3,48
<b>Amostra 17</b>	2,27	2,25	1,93	1,09	1,08	1,12	2,73	2,49	2,57
<b>Amostra 18</b>	1,08	1,46	0,90	0,78	0,67	0,73	1,95	2,29	2,12
<b>Amostra 19</b>	1,23	1,38	1,44	0,60	0,71	0,67	2,58	2,29	2,84
<b>Amostra 20</b>	2,91	2,35	2,15	1,06	1,10	1,91	3,32	2,57	2,12
<b>Amostra 21</b>	1,65	1,60	1,70	1,05	0,79	1,25	2,41	2,21	2,17
<b>Amostra 22</b>	1,87	1,80	1,78	1,55	1,46	2,33	2,01	2,05	1,98
<b>Amostra 23</b>	1,25	1,03	1,24	1,60	1,28	1,99	2,34	2,49	2,12
<b>Amostra 24</b>	1,70	1,80	1,60	0,80	2,19	1,45	2,92	3,02	2,54

A média da razão de alturas e áreas para trissômicos se encontra na tabela 15.

**Quadro 7. Média, desvio padrão e coeficiente de variação de cada marcador na população trissômica**

<b>ALTURA</b>	<b>SD105171</b>	<b>SD105172</b>	<b>SD10510</b>
Média	1,735	1,134	2,808
Desvio padrão	0,2492	0,3741	0,6439
coeficiente de variação	14%	33%	23%
<b>ÁREA</b>			
Média	1,752	1,214	2,436
Desvio padrão	0,3714	0,477	0,4208
coeficiente de variação	21%	39%	17%

Inesperadamente, seis amostras das trinta testadas apresentaram um perfil mais próximo ao perfil esperado de uma amostra dissômica. Seus eletroferogramas estão na figura 25.



**Figura 25. Eletroferograma das seis amostras trissômicas com perfis diferenciados.** As seis amostras se apresentam no eletroferograma. No eixo X temos o tamanho dos alelos, sendo eles respectivamente 153pb e 162pb para o marcador SD105171, 194 e 198 para o marcador SD105172 e 217 e 223 para o marcador SD10510. A intensidade da fluorescência é medida pelo eixo Y, que vai até 3000 enquanto no eixo X temos o intervalo de tamanho que vai de 140 a 240 pb.

A razão dos picos de altura e área das seis amostras se encontra na tabela 16.

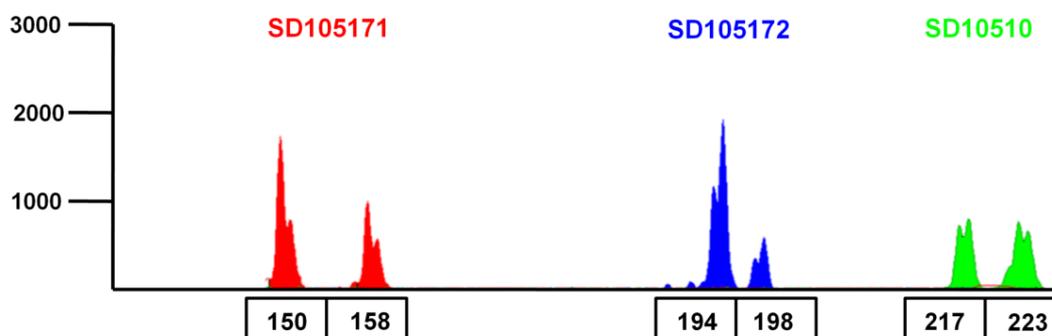
**Quadro 8. Média, desvio padrão e coeficiente de variação nas amostras trissômicas com perfil dissômicos**

<b>ALTURA</b>	<b>SD105171</b>	<b>SD105172</b>	<b>SD10510</b>
Média	0,9578	0,5339	1,634
Desvio padrão	0,09743	0,07521	0,2871
coeficiente de variação	10%	14%	18%
<b>ÁREA</b>			
Média	1,095	0,5049	1,574
Desvio padrão	0,1369	0,08144	0,1224
coeficiente de variação	13%	16%	19%

Os valores das razões de área e altura de cada marcador nestas seis amostras são comparáveis aos valores dos controles dissômicos. A possível explicação para esse fenômeno seja a deleção parcial da região do cromossomo onde se encontram esses marcadores ou possivelmente de todo o braço curto.

### 5.6. Busca de mais amostras com a possível deleção

A presença do fenômeno acima motivou o teste de mais 20 amostras de tanto as populações dissômica e trissômica, a fim de determinar a frequência e presença deste evento. Uma das 20 amostras dissômicas testadas apresentou a suposta deleção (figura 26), enquanto não foram encontradas mais dentro da população trissômica.



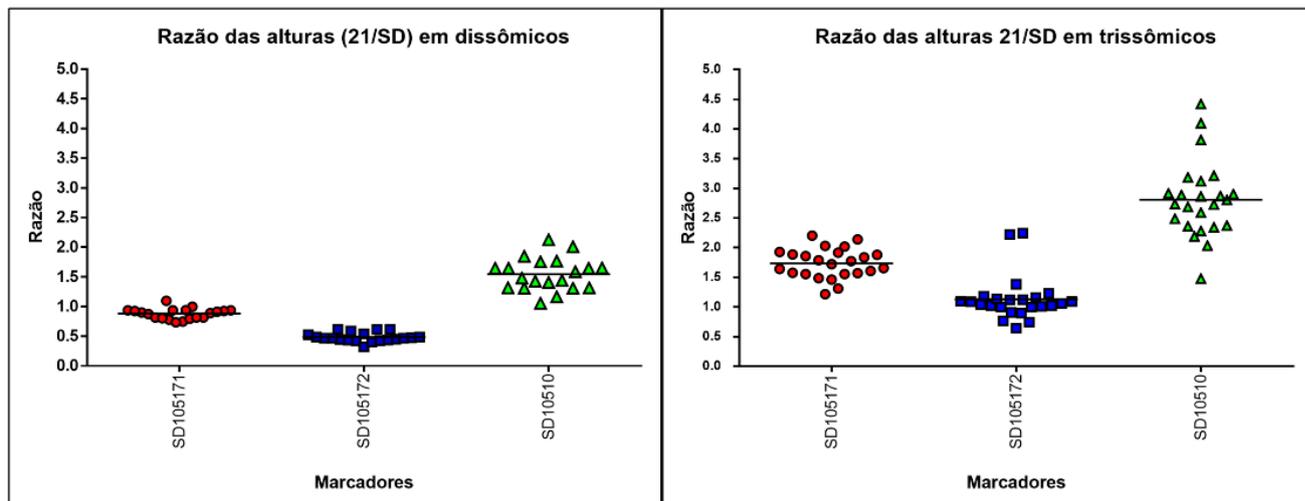
**Figura 26 – Possível deleção num elefroferograma dissômico.** As alturas e áreas dos picos sugerem uma deleção, e assim, um perfil monossômico para esta amostra.

A perda do braço curto exibida em dois fenótipos indica uma fragilidade desta região, ainda não explorada devido a falta de interesse nos estudos dos braços curtos de cromossomos acrocêntricos. Também, levanta questionamentos sobre as funções desta região dentro do genoma.

Ainda, pode-se suspeitar de uma correlação entre a perda do 21p com a presença da cópia extra do cromossomo, levando a trissomia.

### 5.7. Comparação dos resultados das amostras dos controles dissômicos e amostras trissômicas

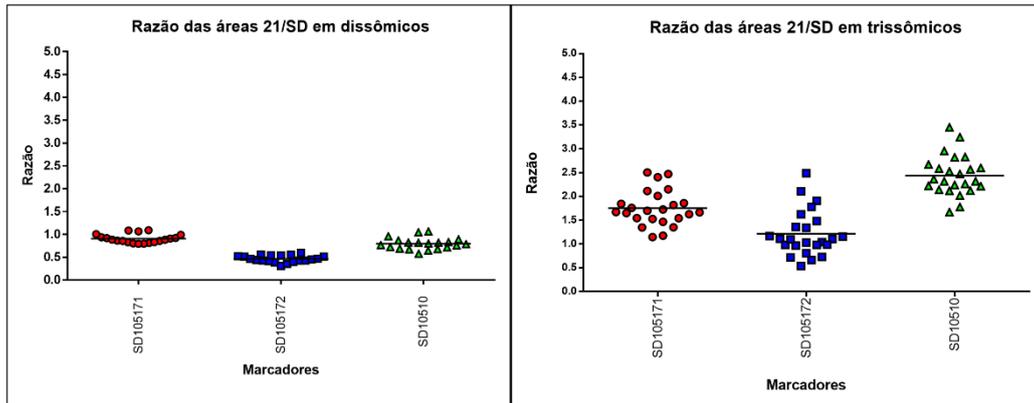
As amostras médias dos resultados encontrados nas alturas se encontram na figura 27.



**Figura 27. Comparação das razões de altura do sinal dos alelos entre indivíduos dissômicos e trissômicos.** No eixo Y se encontram os valores das razões, enquanto no eixo X os valores de cada marcador. Pode-se perceber que os valores para dissômicos estão mais próximos enquanto os valores para as amostras trissômicas são mais flutuantes.

Os valores no marcador se SD105171 se manteve mais concordante entre as amostras dissômicas, enquanto esses fatores foram flutuantes para os outros marcadores.

O mesmo padrão se repetiu quando as áreas foram comparadas.



**Figura 28. Comparativo da razão das áreas entre trissômicos e dissômicos.** No eixo Y se encontram os valores das razões, enquanto no eixo X os valores de cada marcador. Pode-se perceber que os valores para dissômicos estão mais próximos enquanto os valores para as amostras trissômicas são mais flutuantes.

## 6. DISCUSSÃO

Apesar do cromossomo 21 ter sido o primeiro cromossomo humano a ser mapeado, o grande número de repetições que nele se encontram gera uma complexidade na montagem das suas sequências, levando a lacunas desconhecidas dentro do genoma. Quando exploramos o braço curto deste cromossomo, esse desafio se torna mais evidente. Mesmo a versão mais atualizada do genoma humano não apresenta toda a extensão do 21p completa (Bailey, Yavor *et al.*, 2001; Bailey, Gu *et al.*, 2002; Bailey e Eichler, 2003; ).

Como demonstrado na tabela 7, pouco ainda se sabe sobre o 21p, já que mais de sua metade ainda está parcialmente mapeada ou ainda não foi sequenciada. É possível que as regiões já conhecidas deste cromossomo não pertençam realmente a ele, já que pouquíssimo de suas sequências são únicas.

O gráfico 10 mostra que a maioria das duplicações encontradas no 21p são intracromossomais, presentes tanto no braço curto quanto no braço longo, questionando também a veracidade destas sequências pertencerem ao 21p, e não ao 21q (Kent, Sugnet *et al.*, 2002).

Porém, a partir das 9 Mb de extensão, o braço curto mostra regiões com um maior nível de identidade e um mapeamento mais conciso. Possivelmente, os dados a partir dessa megabase sejam mais fidedignos e passíveis de uma análise mais verdadeira do que se encontra no 21p.

Ao invés de encararmos as duplicações tão presentes no 21p como um fator de dificuldade, exploramos a aplicabilidade desta característica do braço curto (Kong, Li *et al.*, 2014). Buscando regiões correspondentes entre o 21p e o outros cromossomos, foram encontradas regiões passivas de co-amplificação nos cromossomos 20, 15 e 7.

Ainda em fase de testes com controles dissômicos, nenhum dos marcadores do triplex mostrou exatidão nas alturas e áreas entre os alelos dos cromossomos diferentes. O mais próximo a uma proporção exata foi o marcador SD105171.

Apesar disso, os resultados não são flutuantes dentro das populações. Os valores dos coeficientes de variação do SD105171 mostram que essas populações são homogêneas. Estes, abaixo de 15% na população sabidamente dissômica e

trissômica mostra que o triplex foi capaz de classificar as populações de acordo com seu fenótipo corretamente.

A diferença de área e altura entre os alelos dos marcadores SD105172 e SD10510 mostra que, apesar de toda a mineração e testes *in silico*, essas regiões se repetem em mais de dois lugares no genoma, possivelmente numa região ainda no cromossomo 21.

O perfil destes dois últimos marcadores se manteve dentro dos controles e obteve a diferença esperada quando testados nas amostras trissômicas. Apesar dos valores mais imprecisos em seus coeficientes de variação, eles ainda se mostraram eficazes na discriminação das duas populações.

Um fato inesperado foi identificado quando seis amostras trissômicas mostraram uma inadequação em seus perfis genotípicos e valores de média das razões de altura e áreas abaixo dos picos. Elas foram muito mais compatíveis com a população dissômica.

Apesar das amostras desses pacientes já terem sido confirmadas como trissômicas pelo uso de marcadores no 21q, seria interessante reavaliá-las utilizando um maior número de marcadores no braço longo concomitantemente ao triplex no 21p.

A deleção da região onde se encontram os marcadores pode ser explicado pela presença do cromossomo ChristChurch (Ch<sup>1</sup>) nesses pacientes. As únicas provas deste fenômeno são os poucos artigos publicados sobre o assunto (Gunz, Fitzgerald *et al.*, 1962; Neu, Leao *et al.*, 1966; Ballantyne, Parslow *et al.*, 1977).

Ainda assim, essa descoberta revive esse termo antes esquecido e não mais utilizado pela biologia. Um teste molecular que evidencie processos que ocorrem no 21p pode retomar a uma discussão sobre o cromossomo Christchurch e a sua influência no resultado para a trissomia 21.

Caso a deleção do 21p seja realmente comprovada, pode-se suspeitar da possibilidade da deleção do braço curto do cromossomo 21 ser um fator de risco para a trissomia 21, devido a sua maior frequência entre pacientes trissômicos.

A ausência do braço curto pode desestabilizar recombinações que poderiam acontecer nessa região, levando a não disjunção do cromossomo e assim à trissomia.

Não existe evidência ainda que ocorram eventos de recombinação no braço curto. Porém, levando em consideração que recombinações no braço longo

influenciam a disjunção das cromátides irmãs, é esperado que isso também ocorresse para o 21p.

Outra suspeita que incide sobre a deleção do 21p é sua hereditariedade. Testamos cinco trios de pai, mãe e filho trissômico para tentar avaliar este fenômeno (dado não mostrado), porém nenhum deles apresentou a deleção. Uma alternativa para este estudo seria buscar as famílias dos pacientes que apresentaram a possível deleção e testar os genitores em busca da origem da deleção.

O marcador SD10435 não foi promissor para o estudo. Novos testes com ele serão empregados para que ele seja incluído no multiplex.

Por uma ousadia, uma amostra trissômica por translocação roberstoniana rob(21;22) foi testada com o triplex das duplicações segmentares. Notavelmente, ele apresentou um perfil trissômico, demonstrando que a translocação apresentava o segmento do braço curto que apresenta o triplex. Esse teste demonstra então, que marcadores provenientes de duplicações segmentares são uma boa alternativa para estudos em translocações, principalmente em casos que envolvam cromossomos de visualização incerta, como os acrocêntricos.

## 7. CONCLUSÕES

- As sequências de DNA ainda preliminares no genoma de referência do 21p mostram que as duplicações segmentares compõem toda a extensão do braço curto.
- Pela primeira vez temos marcadores moleculares presentes e aplicáveis no braço curto do cromossomo 21, capazes de diferenciar dissômicos de perfis trissômicos. Ainda, o uso do triplex proveniente de duplicações segmentares foi capaz de identificar a presença do cromossomo Christchurch nos dois grupos estudados. A diferença na prevalência deste fenômeno entre trissômicos e dissômicos pode indicar o Ch<sup>1</sup> como um fator de risco para a não disjunção, levando à trissomia 21.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves da Silva, A. Recombinação pericentromérica e o estágio meiótico da não disjunção do cromossomo 21 na síndrome de Down. (Dissertação de mestrado). Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Campos dos Goytacazes, 2011. 85 p.

Antonarakis, S. E., Lyle, R., Dermitzakis, E. T., Reymond, A. e Deutsch, S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. Nat Rev Genet, v.5, n.10, Oct, p.725-38. 2004.

Bailey, J. A. e Eichler, E. E. Genome-wide detection and analysis of recent segmental duplications within mammalian organisms. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v.68, p.115-24. 2003.

Bailey, J. A., Gu, Z., Clark, R. A., Reinert, K., Samonte, R. V., Schwartz, S., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W. e Eichler, E. E. Recent segmental duplications in the human genome. Science, v.297, n.5583, Aug 9, p.1003-7. 2002.

Bailey, J. A., Yavor, A. M., Massa, H. F., Trask, B. J. e Eichler, E. E. Segmental duplications: organization and impact within the current human genome project assembly. Genome Res, v.11, n.6, Jun, p.1005-17. 2001.

Balduino Victorino, D., de Godoy, M. F., Goloni-Bertollo, E. M. e Pavarino, E. C. Genetic polymorphisms involved in folate metabolism and maternal risk for down syndrome: a meta-analysis. Dis Markers, v.2014, p.517504. 2014.

Ballantyne, G. H., Parslow, M. I., Veale, A. M. e Pullon, D. H. Down's syndrome and deletion of short arms of a G chromosome. J Med Genet, v.14, n.2, Apr, p.147-50. 1977.

Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res, v.27, n.2, Jan 15, p.573-80. 1999.

Berg, J. M. e Korossy, M. Down syndrome before Down: a retrospect. Am J Med Genet, v.102, n.2, Aug 1, p.205-11. 2001.

Boquett, J. A., Brandalize, A. P., Fraga, L. R. e Schuler-Faccini, L. Maternal SNPs in the p53 pathway: risk factors for trisomy 21? Dis Markers, v.34, n.1, p.41-9. 2013.

Borges-Osório, M. e Robinson, W. M. Genética Humana. Porto Alegre: Artmed. 2013. 784 p.

Brown, A. S., Feingold, E., Broman, K. W. e Sherman, S. L. Genome-wide variation in recombination in female meiosis: a risk factor for non-disjunction of chromosome 21. Hum Mol Genet, v.9, n.4, Mar 1, p.515-23. 2000.

Butler, J. M. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. In: Listewnik, M. (Ed.). Forensic DNA Typing. Oxford: Elsevier, 2005. Forensic DNA Typing, p.660

Consortium, I. H. G. S. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. Oct 21, 2004. 931-45 p.

Dutta, S., Nandagopal, K., Gangopadhyay, P. K. e Mukhopadhyay, K. Molecular aspects of Down syndrome. Indian Pediatr, v.42, n.4, Apr, p.339-44. 2005.

Ghosh, S., Hong, C. S., Feingold, E., Ghosh, P., Bhaumik, P. e Dey, S. K. Epidemiology of Down syndrome: new insight into the multidimensional interactions among genetic and environmental risk factors in the oocyte. Am J Epidemiol, v.174, n.9, Nov 1, p.1009-16. 2011.

Gravholt, C. H., Friedrich, U., Caprani, M. e Jorgensen, A. L. Breakpoints in Robertsonian translocations are localized to satellite III DNA by fluorescence in situ hybridization. Genomics, v.14, n.4, Dec, p.924-30. 1992.

Gunz, F. W., Fitzgerald, P. H. e Adams, A. An abnormal chromosome in chronic lymphocytic leukaemia. Br Med J, v.2, n.5312, Oct 27, p.1097-9. 1962.

Hassold, T. e Hunt, P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Nat Rev Genet, v.2, n.4, Apr, p.280-91. 2001.

Hassold, T. e Sherman, S. Down syndrome: genetic recombination and the origin of the extra chromosome 21. Clin Genet, v.57, n.2, Feb, p.95-100. 2000.

Hecht, C. A. e Hook, E. B. Rates of Down syndrome at livebirth by one-year maternal age intervals in studies with apparent close to complete ascertainment in populations of European origin: a proposed revised rate schedule for use in genetic and prenatal screening. Am J Med Genet, v.62, n.4, Apr 24, p.376-85. 1996.

Hobbs, C. A., Sherman, S. L., Yi, P., Hopkins, S. E., Torfs, C. P., Hine, R. J., Pogribna, M., Rozen, R. e James, S. J. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. Am J Hum Genet, v.67, n.3, Sep, p.623-30. 2000.

Hou, Y., Fan, W., Yan, L., Li, R., Lian, Y., Huang, J., Li, J., Xu, L., Tang, F., Xie, X. S. e Qiao, J. Genome analyses of single human oocytes. Cell, v.155, n.7, Dec 19, p.1492-506. 2013.

Hulten, M. A., Jonasson, J., Iwarsson, E., Uppal, P., Vorsanova, S. G., Yurov, Y. B. e Iourov, I. Y. Trisomy 21 mosaicism: we may all have a touch of Down syndrome. Cytogenet Genome Res, v.139, n.3, p.189-92. 2013.

Hulten, M. A., Patel, S. D., Tankimanova, M., Westgren, M., Papadogiannakis, N., Jonsson, A. M. e Iwarsson, E. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. Mol Cytogenet, v.1, p.21. 2008.

Iourov, I. Y., Vorsanova, S. G. e Yurov, Y. B. Chromosomal variation in mammalian neuronal cells: known facts and attractive hypotheses. Int Rev Cytol, v.249, p.143-91. 2006.

James, S. J., Pogribna, M., Pogribny, I. P., Melnyk, S., Hine, R. J., Gibson, J. B., Yi, P., Tafoya, D. L., Swenson, D. H., Wilson, V. L. e Gaylor, D. W. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. Am J Clin Nutr, v.70, n.4, Oct, p.495-501. 1999.

Jarmuz-Szymczak, M., Janiszewska, J., Szyfter, K. e Shaffer, L. G. Narrowing the localization of the region breakpoint in most frequent Robertsonian translocations. Chromosome Res, v.22, n.4, Dec, p.517-32. 2014.

Jiang, X., Liu, C., Yu, T., Zhang, L., Meng, K., Xing, Z., Belichenko, P. V., Kleschevnikov, A. M., Pao, A., Peresie, J., Wie, S., Mobley, W. C. e Yu, Y. E. Genetic dissection of the Down syndrome critical region. Hum Mol Genet, v.24, n.22, Nov 15, p.6540-51. 2015.

Jones, G. H. e Franklin, F. C. Meiotic crossing-over: obligation and interference. Cell, v.126, n.2, Jul 28, p.246-8. 2006.

Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M. e Haussler, D. The human genome browser at UCSC. Genome Res, v.12, n.6, Jun, p.996-1006. 2002.

Kong, X., Li, L., Sun, L., Fu, K., Long, J., Weng, X., Ye, X., Liu, X., Wang, B., Yan, S., Ye, H. e Fan, Z. Rapid diagnosis of aneuploidy using segmental duplication quantitative fluorescent PCR. PLoS One, v.9, n.3, p.e88932. 2014.

Kurahashi, H., Tsutsumi, M., Nishiyama, S., Kogo, H., Inagaki, H. e Ohye, T. Molecular basis of maternal age-related increase in oocyte aneuploidy. Congenit Anom (Kyoto), v.52, n.1, Mar, p.8-15. 2012.

Lamb, N. E., Feingold, E., Savage, A., Avramopoulos, D., Freeman, S., Gu, Y., Hallberg, A., Hersey, J., Karadima, G., Pettay, D., Saker, D., Shen, J., Taft, L., Mikkelsen, M., Petersen, M. B., Hassold, T. e Sherman, S. L. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. Hum Mol Genet, v.6, n.9, Sep, p.1391-9. 1997.

Lamb, N. E., Yu, K., Shaffer, J., Feingold, E. e Sherman, S. L. Association between maternal age and meiotic recombination for trisomy 21. Am J Hum Genet, v.76, n.1, Jan, p.91-9. 2005.

Langlois, S. e Duncan, A. Use of a DNA method, QF-PCR, in the prenatal diagnosis of fetal aneuploidies. J Obstet Gynaecol Can, v.33, n.9, Sep, p.955-60. 2011.

Liao, J. M., Zhou, X., Zhang, Y. e Lu, H. MiR-1246: a new link of the p53 family with cancer and Down syndrome. Cell Cycle, v.11, n.14, Jul 15, p.2624-30. 2012.

Lima, D. S. Avaliação dos genes MLL, RB e TP53 em pacientes com síndrome mielodisplásica. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011. 94 p.

Lyle, R., Prandini, P., Osoegawa, K., ten Hallers, B., Humphray, S., Zhu, B., Eyraes, E., Castelo, R., Bird, C. P., Gagos, S., Scott, C., Cox, A., Deutsch, S., Ucla, C., Cruts, M., Dahoun, S., She, X., Bena, F., Wang, S. Y., Van Broeckhoven, C., Eichler, E. E., Guigo, R., Rogers, J., de Jong, P. J., Reymond, A. e Antonarakis, S. E. Islands of euchromatin-like sequence and expressed polymorphic sequences within the short arm of human chromosome 21. Genome Res, v.17, n.11, Nov, p.1690-6. 2007.

Lynn, A., Kashuk, C., Petersen, M. B., Bailey, J. A., Cox, D. R., Antonarakis, S. E. e Chakravarti, A. Patterns of meiotic recombination on the long arm of human chromosome 21. Genome Res, v.10, n.9, Sep, p.1319-32. 2000.

Martinez-Frias, M. L. The real earliest historical evidence of Down syndrome. Am J Med Genet A, v.132A, n.2, Jan 15, p.231. 2005.

Martinez-Frias, M. L. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. Am J Med Genet A, v.146A, n.11, Jun 1, p.1477-82. 2008.

Matise, T. C., Chen, F., Chen, W., De La Vega, F. M., Hansen, M., He, C., Hyland, F. C., Kennedy, G. C., Kong, X., Murray, S. S., Ziegler, J. S., Stewart, W. C. e Buyske, S. A second-generation combined linkage physical map of the human genome. Genome Res, v.17, n.12, Dec, p.1783-6. 2007.

Megarbane, A., Ravel, A., Mircher, C., Sturtz, F., Grattau, Y., Rethore, M. O., Delabar, J. M. e Mobley, W. C. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: the past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. Genet Med, v.11, n.9, Sep, p.611-6. 2009.

Michel, J.-B., Shen, Y. K., Aiden, A. P., Veres, A., Gray, M. K., Pickett, J. P., Hoiberg, D., Clancy, D., Norvig, P., Orwant, J., Pinker, S., Nowak, M. A. e Aiden, E. L. Quantitative Analysis of Culture Using Millions of Digitized Books. Science, v.331, n.6014, p.176-182. 2011.

Middlebrooks, C. D., Mukhopadhyay, N., Tinker, S. W., Allen, E. G., Bean, L. J., Begum, F., Chowdhury, R., Cheung, V., Doheny, K., Adams, M., Feingold, E. e Sherman, S. L. Evidence for dysregulation of genome-wide recombination in oocytes with nondisjoined chromosomes 21. Hum Mol Genet, v.23, n.2, Jan 15, p.408-17. 2013.

Neu, R. L., Leao, J. C. e Gardner, L. I. Short arm deletions in G-group chromosomes. Lancet, v.2, p.390-391. 1966.

Ohkura, H. Meiosis: An Overview of Key Differences from Mitosis. Cold Spring Harb Perspect Biol, Jan 20. 2015.

Oliver, T. R., Feingold, E., Yu, K., Cheung, V., Tinker, S., Yadav-Shah, M., Masse, N. e Sherman, S. L. New insights into human nondisjunction of chromosome 21 in oocytes. PLoS Genet, v.4, n.3, Mar, p.e1000033. 2008.

Oliver, T. R., Middlebrooks, C. D., Tinker, S. W., Allen, E. G., Bean, L. J., Begum, F., Feingold, E., Chowdhury, R., Cheung, V. e Sherman, S. L. An examination of the relationship between hotspots and recombination associated with chromosome 21 nondisjunction. PLoS One, v.9, n.6, p.e99560. 2013.

Papavassiliou, P. Karyotype-Phenotype correlations for mosaic Down Syndrome. (Thesis). School of Medicine, Virginia Commonwealth University, Richmond, 2007. 170 p.

Papavassiliou, P., Charalsawadi, C., Rafferty, K. e Jackson-Cook, C. Mosaicism for trisomy 21: a review. Am J Med Genet A, v.167A, n.1, Jan, p.26-39. 2014.

Papavassiliou, P., York, T. P., Gursoy, N., Hill, G., Nicely, L. V., Sundaram, U., McClain, A., Aggen, S. H., Eaves, L., Riley, B. e Jackson-Cook, C. The phenotype of persons having mosaicism for trisomy 21/Down syndrome reflects the percentage of trisomic cells present in different tissues. Am J Med Genet A, v.149A, n.4, Feb 15, p.573-83. 2009.

Pelleri, M. C., Cicchini, E., Locatelli, C., Vitale, L., Caracausi, M., Piovesan, A., Rocca, A., Poletti, G., Seri, M., Strippoli, P. e Cocchi, G. Systematic reanalysis of partial trisomy 21 cases with or without Down syndrome suggests a small region on 21q22.13 as critical to the phenotype. Hum Mol Genet, Apr 22. 2016.

Plohl, M., Luchetti, A., Mestrovic, N. e Mantovani, B. Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. Gene, v.409, n.1-2, Feb 15, p.72-82. 2008.

Roizen, N. J. e Patterson, D. Down's syndrome. Lancet, v.361, n.9365, Apr 12, p.1281-9. 2003.

Santos-Reboucas, C. B., Correa, J. C., Bonomo, A., Fintelman-Rodrigues, N., Moura, K. C., Rodrigues, C. S., Santos, J. M. e Pimentel, M. M. The impact of folate pathway polymorphisms combined to nutritional deficiency as a maternal predisposition factor for Down syndrome. Dis Markers, v.25, n.3, p.149-57. 2008.

Shaffer, L. G. e Bui, T. H. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. Am J Med Genet C Semin Med Genet, v.145C, n.1, Feb 15, p.87-98. 2007.

Shaw, M. W. Familial mongolism. Cytogenetics, v.1, p.141-79. 1962.

Shaw, S. W., Chen, C. P., Cheng, P. J., Wang, T. H., Hou, J. W., Lin, C. T., Chang, S. D., Hwa, H. L., Lin, J. L., Chao, A. S., Soong, Y. K. e Hsieh, F. J. Gene dosage change of TPTE and BAGE2 and breakpoint analysis in Robertsonian Down syndrome. J Hum Genet, v.53, n.2, p.136-43. 2008.

Sherman, S. L., Lamb, N. E. e Feingold, E. Relationship of recombination patterns and maternal age among non-disjoined chromosomes 21. Biochem Soc Trans, v.34, n.Pt 4, Aug, p.578-80. 2006.

Sherman, S. L., Petersen, M. B., Freeman, S. B., Hersey, J., Pettay, D., Taft, L., Frantzen, M., Mikkelsen, M. e Hassold, T. J. Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. Hum Mol Genet, v.3, n.9, Sep, p.1529-35. 1994.

Sherman, S. L., Takaesu, N., Freeman, S. B., Grantham, M., Phillips, C., Blackston, R. D., Jacobs, P. A., Cockwell, A. E., Freeman, V., Uchida, I. e et al. Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. Am J Hum Genet, v.49, n.3, Sep, p.608-20. 1991.

Warren, A. C., Chakravarti, A., Wong, C., Slaugenhaupt, S. A., Halloran, S. L., Watkins, P. C., Metaxotou, C. e Antonarakis, S. E. Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down syndrome. Science, v.237, n.4815, Aug 7, p.652-4. 1987.

Warren, W. D. e Goringe, K. L. A molecular model for sporadic human aneuploidy. Trends Genet, v.22, n.4, Apr, p.218-24. 2006.

Wolff, D. J. e Schwartz, S. Characterization of Robertsonian translocations by using fluorescence in situ hybridization. Am J Hum Genet, v.50, n.1, Jan, p.174-81. 1992.

Yang, Q., Sherman, S. L., Hassold, T. J., Allran, K., Taft, L., Pettay, D., Khoury, M. J., Erickson, J. D. e Freeman, S. B. Risk factors for trisomy 21: maternal cigarette smoking and oral contraceptive use in a population-based case-control study. Genet Med, v.1, n.3, Mar-Apr, p.80-8. 1999.

Zheng, C. J. e Byers, B. Oocyte selection: a new model for the maternal-age dependence of Down syndrome. Hum Genet, v.90, n.1-2, Sep-Oct, p.1-6. 1992.