

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**ESTUDO DA ORIGEM DO CROMOSSOMO 21 EXTRA EM  
PORTADORES DE SÍNDROME DE DOWN**

**Wellington dos Santos Silva**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução

**SÃO CARLOS**

1996

S586eo

Silva, Wellington dos Santos.

Estudo da origem do cromossomo 21 extra em portadores de Síndrome de Down / Wellington dos Santos Silva. - São Carlos : UFSCar, 1996.

60p.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, 1996.

1. Síndrome de Down. 2. Cromossomos. 3. Não disjunção. 4. DNA. 5. Polimorfismo. 6. Reação em cadeia de polimerase. I. Autor. II. Título.

---

orientador

Prof. Dr. Calógeras A. A. Barbosa

Dedico esta dissertação a Deus, O criador  
dos Céus, da Terra e tudo o que neles há.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus em primeiro lugar, que me deu saúde, inteligência e colocou-me em contato com as pessoas para ajudar-me neste trabalho.

Ao prof. Dr. Calógeras Barbosa, pela amizade solidificada ao longo desses anos e pela orientação dispensada na confecção deste trabalho.

Ao prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, pelo apoio indispensável na utilização das técnicas empregadas neste trabalho.

Aos meus pais Sônia e Winston (já falecido) de quem herdei o genoma e recebi (e continuo recebendo) muito amor.

À minha esposa, Liliane, que me deu o apoio na hora certa e às minhas filhas Isabelle e Danielle cuja companhia nem sempre era bem vinda.

Às diretorias das APAEs da São Carlos, Bebedouro e Araras.

À Dra. Marlene, que permitiu o acesso às famílias matriculadas na APAE de Bebedouro.

À Rose, que permitiu o acesso às famílias matriculadas na APAE de Araras.

Aos amigos do laboratório “Scaff”, Jairo e companhia, que me ajudaram em muitos momentos.

À prof. Mary Torres, e ao meu sogro, Jussaro Andrade pela revisão ortográfica.

À Universidade Federal de São Carlos, Instituição que possibilitou a realização deste mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo.

Aos demais familiares e amigos e a todos que colaboraram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

## **RESUMO**

A trissomia do cromossomo 21, mais conhecida como síndrome de Down, geralmente resulta da falta de disjunção cromossômica durante a meiose. A origem da não disjunção vem sendo estudada através do uso de heteromorfismos citogenéticos e pelo estudo dos polimorfismos de DNA. Pequenas seqüências repetitivas foram descritas como uma classe abundante de polimorfismos de DNA no genoma humano as quais podem ser tipadas através da técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR). A análise destes polimorfismos provê um conhecimento maior sobre a origem e o estágio meiótico da não disjunção. Neste trabalho foram utilizados os marcadores D21S13E, D21S16 e D21S120, localizados na região pericentromérica do cromossomo 21, além do HMG14-GT2, localizado na região 21q22.3, para estudar a origem e o estágio meiótico da não disjunção do cromossomo 21 extra em 32 famílias com um filho portador de síndrome de Down. Entre estas, 7 famílias (22%) foram informativas, mostrando que a não disjunção ocorreu na meiose I, e 3 casos foram de origem materna, comprovados através do estudo do sistema HMG14-GT2. Para os outros sistemas moleculares estudados no presente trabalho, nenhuma família se mostrou informativa.

## **ABSTRACT**

Down syndrome is usually due to meiotic nondisjunction leading to trisomy 21. The origin of nondisjunction in trisomy 21 has so far been studied using cytogenetic heteromorphisms and DNA polymorphisms. Short sequence repeats have recently been described as an abundant class of DNA polymorphisms in the human genome, which can be typed using the Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification. Analysis of these polymorphisms may provide a more accurate understanding of the meiotic stage of nondisjunction in trisomy 21 than that previously provided by chromosomal heteromorphisms. The following DNA polymorphisms located in pericentromeric region of human chromosome 21. Were typed D21S13E, D21S16 and D21S120. The other polymorphism studied was HMG14-GT2 which map to the terminal band 21q22.3. In the present stud such markers were used in order to the determine the parental origin and the meiotic stage of the additional chromosome 21 in 32 cases of Down syndromy. Seven families were informative showing that nondisjunction occurred in meiosis I and three were from maternal origin using HMG14-GT2 polymorphism. In the other molecular systems the families are not informatives.

## SUMÁRIO

Resumo .....	i
Abstract.....	ii
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1-OBJETIVOS.....	21
2-MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1-Reagentes.....	22
2.2-Amostra .....	22
2.3-Técnicas Moleculares .....	22
2.3.1-Extração de DNA.....	22
2.3.2-Oligonucleotídeos.....	24
2.3.3-Amplificação das regiões D21S13E, D21S120, D21S16 e HMG14- GT2 do cromossomo 21 humano .....	26
2.3.4-Eletroforese.....	28
2.3.4.1-Em gel de agarose.....	28
2.3.4.2-Em gel de poliacrilamida .....	28
2.3.5-Coloração por Nitrato de Prata .....	28
2.3.6-Conservação do gel.....	29
3-RESULTADOS .....	30
4-DISCUSSÃO .....	37
5-CONCLUSÕES .....	43
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44
7-APÊNDICE .....	59

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1 - Comparação de estudos citogenéticos e moleculares da não disjunção envolvendo o cromossomo 21 .....	10
Figura 1 - Produção de gametas durante a meiose normal e anormal .....	11
Figura 2 - Mapa de ligação do cromossomo 21 .....	25
Figura 3 - Gel de poliacrilamida desnaturante mostrando a tipagem de duas famílias para o sistema D21S13E .....	30
Figura 4 - Gel de poliacrilamida desnaturante mostrando a tipagem de algumas famílias para o sistema D21S120.....	31
Figura 5 - Gel de poliacrilamida desnaturante mostrando a tipagem de algumas famílias para o sistema HMG14-GT2.....	32
Figura 6 - Fotografia de gel de poliacrilamida mostrando os resultados da amplificação de cinco famílias para o sistema HMG14-GT2 .....	33
Figura 7 - Fotografia de gel de poliacrilamida mostrando os resultados da amplificação de seis famílias para o sistema HMG14-GT2.....	34
Tabela 2 - Resultado da tipagem de 30 indivíduos com síndrome de Down para a enzima conversora da angiotensina (ACE) .....	35
Figura 8 - Fotografia de gel de poliacrilamida mostrando o resultado da amplificação de doze pacientes com síndrome de Down para a enzima conversora da angiotensina (ACE).....	36

## INTRODUÇÃO

A trissomia é o tipo mais freqüente de anormalidade cromossômica encontrada na espécie humana, sendo descrita pela primeira vez por Lejeune, Gautier e Turpin (1959) em um grupo de pacientes com síndrome de Down, caracterizada em 1866 por John Langdon Down. Desde então, essa anomalia cromossômica tem sido reconhecida como uma das principais causas de deficiência mental severa, anomalias congênitas, mortalidade infantil e perinatal e abortos espontâneos nos países desenvolvidos.

Hassold e Jacobs (1984) encontraram uma freqüência de 0,5% de indivíduos trissômicos em um grupo de recém-nascidos e 24% em abortos espontâneos. Este mesmo estudo também revelou que na população geral, pelo menos 4% das gestações reconhecidas clinicamente apresentam algum tipo de trissomia. Jamieson et al (1992) encontraram uma freqüência ainda maior (9,6%) de embriões preimplantados em pacientes estéreis que foram submetidas a tratamento de fertilização in vitro.

As demais espécies de mamíferos em que a trissomia foi estudada apresentaram uma incidência muito menor do que aquela observada na espécie humana. Embriões preimplantados em diferentes espécies mostraram uma freqüência menor que 1%, por exemplo, em rato (Vickers, 1969 ; Donahue, 1972 ; Kaufman, 1973), Hamster chinês (Mikamo e kamiguchi, 1983) e carneiro (Murray *et al*, 1986 ). Dentre os invertebrados, estudos feitos em algumas espécies de *Drosophila* e cigarras selvagens não revelaram indivíduos virtualmente trissômicos.

Parker encontrou em *Drosophila* a frequência de zigotos com trissomia menor que 0,005% (Parker *et al.*, 1974).

A trissomia geralmente resulta da não disjunção cromossômica durante a meiose e esta pode ser tanto de origem paterna quanto materna.

O termo não disjunção foi aplicado pela primeira vez por Bridges (1913) ao observar em *Drosophila* erro na primeira divisão meiótica envolvendo uma segregação anormal do cromossomo X. Ele notou que uma fêmea de olhos brancos quando cruzada com macho de olhos vermelhos excepcionalmente produzia descendentes fenotipicamente iguais aos seus pais (cerca de 1 para 2000 moscas) ao invés de fêmeas com olhos vermelhos e machos com olhos brancos normalmente esperados de tal cruzamento.

Cerca de 95% dos casos em que ocorre a trissomia do cromossomo 21 na espécie humana é devido à não disjunção por trissomia livre, 3 % por mosaïcismo e 2 % por translocação (De Grouchy, 1970; Juberg e Jones, 1970).

De Grouchy (1970) e Juberg e Jones (1970) foram os primeiros a utilizar a análise de heteromorfismos cromossômicos no estudo da origem parental do cromossomo extra em portadores da trissomia do 21. Desde então, mais de 1000 famílias já foram estudadas através desta técnica a fim de compreender o mecanismo de segregação do cromossomo 21 (Juberg e Mowrey, 1983; Hassold e Jacobs, 1984; Bricarelli *et al.*, 1989).

Hassold e Jacobs (1984) estudaram um total de 647 famílias e determinaram a origem parental do cromossomo 21 extra em 391

casos, dos quais 315 (80,6%) foram de origem materna e 76 (19,4%) foram de origem paterna.

Através do estudo de heteromorfismos citogenéticos também pode se determinar o estágio meiótico da não disjunção. Os dados sumarizados por Hassold e Jacobs (1984) e Dagna Bricarelli e colaboradores (1989) mostraram que, de 433 casos em que houve erros meióticos maternos, 373 (86,1%) foram na meiose I e 60 (13,9%) foram na meiose II e, dos 127 casos em que houve erros meióticos paternos, 92 (72,4%) foram na meiose I e 35 (27,6%) foram na meiose II.

Podemos concluir destes estudos citogenéticos que a maioria dos casos de trissomia do 21 resultam da não disjunção na meiose I materna, mas que erros na meiose II materna e meiose I e II paterna podem ocorrer e juntos correspondem aproximadamente a um terço do total de casos (Stewart *et al*, 1988).

Entretanto, estes estudos não foram suficientes para responder algumas questões concernentes à origem da trissomia do 21. Uma delas é o enigma da idade materna. A associação entre o aumento da idade materna e ocorrência da trissomia do 21 tem sido reconhecida por mais de 60 anos (Penrose, 1933).

A hipótese formulada para explicar o efeito da idade materna é conhecida como o “modelo do envelhecimento do óvulo”. Segundo esta hipótese, oócitos com número irregular de cromossomos 21 tendem a aumentar com a idade materna. Entretanto, os resultados citogenéticos indicam que aproximadamente entre 70 e 80% dos eventos não disjuncionais envolvendo o cromossomo 21 ocorrem na meiose I independente da idade materna. Ao contrário disto, o

“modelo do envelhecimento do óvulo” prediz que os erros na meiose I materna deveriam aumentar proporcionalmente com a idade materna (Stewart *et al*, 1988).

Esta contradição, pelo menos em parte, favoreceu a formulação de uma segunda hipótese que passou a ser conhecida como “hipótese do relaxamento da seleção”, a qual sugere que a relação entre o aumento da idade materna e a frequência da síndrome de Down talvez resulte de uma incapacidade que as mães mais velhas apresentam para rejeitar embriões trissômicos (Ayme e Lippman-Hand, 1982; Stein *et al*, 1986).

Para apoiar experimentalmente esta hipótese, Vekemans e Trasler (1985) realizaram o cruzamento entre linhagens distintas de ratos que produziam fetos com trissomia do cromossomo 19. Através de técnicas citogenéticas foram estabelecidos os complementos cromossômicos dos fetos. Os fetos foram obtidos do cruzamento entre machos híbridos (W/+ H/+) das linhagens T (5:19) 1WH e T (9:19) 163 H com fêmeas das linhagens C57BL / 6J, SWV, DBA / 2J e C3H / Hej. A diferença na frequência de embriões trissômicos para cada genótipo materno (7,3%, 8,8%, 20% e 28% respectivamente) foi altamente significativa ( $X^2=16,94$ , g. l.=3,  $p=0,0007$ ).

Considerando que a incidência na concepção é constante, estes dados sugerem que a extensão da seleção *in útero* contra embriões trissômicos é determinada geneticamente. Para saber se houve participação do genótipo materno ou fetal foram realizados cruzamentos recíprocos (fêmeas W/+ H/+ com machos C57BL / 6J, SWV, DBA / 2J e C3H / Hej). Os resultados não revelaram

diferença significativa ( $X^2=0,87$ , g.l.=3,  $p=0,83$ ) na frequência de embriões trissômicos. Neste caso, a incidência na concepção e o genótipo materno permaneceram constantes.

Estes dados sugerem, portanto, que a taxa de sobrevivência de embriões trissômicos é controlada pelo genótipo materno. Biddle e colaboradores (1986) também observaram em murinos que o genótipo materno pode afetar a sobrevivência de embriões trissômicos no útero.

Entretanto, estas observações a favor de um relaxamento da seleção em humanos não são muito convincentes. Hook não encontrou uma correlação entre translocações não balanceadas e idade materna como previa o modelo do relaxamento da seleção (Hook, 1983). Além do mais, este modelo está inteiramente ligado às técnicas de análise citogenética. Stewart (1988) apresenta três grandes limitações para esta técnica: os heteromorfismos da região cromossômica 21p estão somente sobre um lado do centrômero de modo que possíveis recombinações entre o centrômero e os marcadores da região 21p não podem ser detectadas e por isso fica frustrada a tentativa de determinar o estágio meiótico em que ocorreu a não disjunção; os heteromorfismos citogenéticos não são informativos na maioria dos casos, e, finalmente, a análise é baseada numa avaliação subjetiva do tamanho e coloração das bandas cromossômicas levando a uma tendenciosidade por parte de quem observa ou a um erro experimental.

Carothers (1987) demonstrou que as determinações de origem parental por métodos citogenéticos apresentam uma taxa de erro em

torno de 8% e que este número já é suficiente para reconciliar estas observações com o modelo do envelhecimento do óvulo.

Portanto, o apelo intuitivo da hipótese que diz que o aumento da idade materna está associado com o aumento da não disjunção e não com o decréscimo da seleção permanece viável. Um estudo definitivo para resolver esta questão requer uma metodologia que verifique de forma confiável a origem parental da trissomia em um número maior de famílias com portadores da síndrome de Down

A outra questão bastante discutida é se existe correlação entre a frequência de recombinação e a não disjunção do cromossomo 21. Partindo-se da premissa de que os bivalentes permanecem unidos durante a meiose I em pontos denominados quiasmas, uma redução neste número de quiasmas predispõe à formação de univalentes e, conseqüentemente, a não disjunção. Em ratos, esta tem sido considerada a base para relacionar o aumento da idade com a não disjunção. Hendersen e Edwards (1968) observaram o declínio da frequência de quiasmas e o aumento da incidência de univalentes em oócitos envelhecidos e sugeriram que a trissomia dependente da idade resulta da segregação aleatória de univalentes.

Considerando que a formação de quiasmas ocorre em fêmeas quando estas ainda estão se desenvolvendo no útero materno, estes investigadores elaboraram um modelo que denominaram “modelo de produção em linha”, no qual a frequência de quiasmas decresce em oócitos formados tardiamente em seu desenvolvimento, sendo liberados do ovário na mesma ordem com que entraram em meiose.

Posteriormente, muitos estudos confirmaram a relação entre o aumento da idade em ratas com a diminuição de quiasmas e

aumento de univalentes. Jagiello e Fang (1979) relataram uma frequência menor de quiasmas em oócitos de rato no 18º dia gestacional do que em oócitos que estavam no 16º dia.

Em seres humanos, com base em dados de abortos espontâneos, Hassold sugeriu que o efeito entre idade materna e trissomias autossômicas pode refletir a variação na frequência de quiasmas entre cromossomos. Se a não disjunção relacionada à idade materna resulta da perda de quiasmas com o aumento da idade, o efeito deve ser ainda mais pronunciado entre cromossomos pequenos, ou seja, aqueles que apresentam um número menor de quiasmas (Hassold *et al*, 1980). Laurie e Hulten (1985) observaram que existe uma correlação inversa entre o número estimado de quiasmas para um cromossomo particular, e a média da idade materna em casos de trissomia que envolva tal cromossomo.

Entretanto, Baker (1972) questionou a validade do modelo “produção em linha” aplicado ao rato devido ao curto tempo que é requerido para a prófase meiótica nesta espécie (Crone *et al*, 1965) e também devido à sincronia que existe no desenvolvimento de oócitos fetais (Borum, 1961; Bakken e McLanahan, 1978; Speed, 1982).

Speed e Chandley (1983) estudaram preparações metafásicas de oócitos em duas linhagens de fetos de ratas durante o período que variou do 15º ao 19º dias da gestação através da técnica de espalhamento de superfície (Speed, 1982). Eles não foram capazes de confirmar as observações feitas por Jagiello e Fang (1979) a favor do modelo “produção em linha”. Os resultados mostraram a formação de univalentes entre o 16º e 18º dias do período

gestacional cujas frequências não diferiam significativamente uma da outra e nenhum univalente foi observado nas duas linhagens no 19 dia.

O princípio básico postulado pelo modelo “produção em linha” é que os pares de univalentes na meiose I em oócitos de fêmeas mais velhas sofram não disjunção e levem à formação de células aneuplóides. Trabalhando com ratos, nem Polani e Jagielo (1976) nem Speed (1977) foram capazes de achar uma correlação entre a presença de univalentes na meiose I e aneuploidia na meiose II. Esta falta de correlação foi encontrada por Sugawara e Mikamo (1983) em experiências com Hamster chinês. Nesta espécie em que os 11 cromossomos podem ser divididos em quatro subgrupos morfológicamente distinguíveis, é possível determinar precisamente se os mesmos pares cromossômicos, vistos como univalentes na meiose I que sofreram não disjunção, apareceram entre os complementos aneuplóides na meiose II. Assim como em ratos, oócitos em meiose I com pares de univalentes ocorrem com grande frequência em oócitos de Hamster envelhecidos e há também aumento da relação entre idade materna e não disjunção na meiose II. Entretanto, enquanto univalentes ocorrem quase que exclusivamente em cromossomos pequenos, os eventos de não disjunção que levam à aneuploidia na meiose II têm lugar igualmente em quase todos os subgrupos. Portanto, não existe correlação entre o tamanho das univalentes e o tamanho dos cromossomos que sofreram não disjunção.

Estes achados contraditórios podem refletir a ambigüidade da técnica de heteromorfismos citogenéticos e a sua limitação em

demonstrar com clareza a origem da não disjunção do cromossomo 21 extra.

Os conhecimentos sobre a origem da trissomia do 21 aumentaram não só quantitativamente mas também qualitativamente através da análise de seqüências polimórficas de DNA presentes no cromossomo 21 (Davies *et al*, 1984; Antonarakis *et al*, 1985; Stewart *et al*, 1985, 1988; Bricarelli *et al*, 1988; Rudd *et al*, 1988; Galt *et al*, 1989).

Os cálculos teóricos desenvolvidos por Chakravarti (1989) mostraram a necessidade de múltiplos marcadores genéticos para identificar a origem parental, e Nakamura (1987) mostrou que os polimorfismos multialélicos de VNTR (variable number of tandem repeat), número variável de seqüências altamente repetitivas são os mais informativos.

Mais recentemente duas novas classes de polimorfismos de DNA altamente informativos foram identificadas. Compreendem estas classes os VNDR (variable number dinucleotide repeat), número variável de seqüências dinucleotídicas repetitivas (Litt e Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber e May, 1989) e polimorfismos AluVpA (variable poly(A) tract of alu sequences), região de uma seqüência Alu com cauda poli (A) encontrada por todo o genoma humano (Economou *et al*. 1990).

Estas regiões podem ser tipadas através da técnica denominada PCR (polymerase chain reaction), reação de polimerase em cadeia. Esta técnica foi utilizada pela primeira vez por Saiki ao amplificar um segmento do gene da  $\beta$ -globina em pacientes com anemia falciforme (Saiki *et al*, 1985).

A maioria dos estudos citogenéticos feitos tem sustentado uma alta frequência de erros na meiose I materna e isto é assumido como certo que a não disjunção neste estágio é a origem mais comum da trissomia do 21. Entretanto, uma proporção substancial dos casos de idade materna e incidência da trissomia do 21 tem sido atribuída à não disjunção paterna, algo em torno de 24% (Bricarelli *et al*, 1989). Esta frequência elevada é considerada surpreendente, haja vista uma forte associação entre aumento da idade materna e não disjunção (Hook, 1983).

Norma Takaesu resumizou os dados obtidos de vários estudos realizados desde 1984 até 1990 e comparou com os resultados citogenéticos como mostra a tabela 1.

ESTUDO CITOGÉNÉTICO	ORIGEM PATERNA	ORIGEM MATERNA
Juberg e Mowrey(1983)	55	190
Ayme et al(1986)	84	364
TOTAL	139	554
PORCENTAGEM	20.1%	79.9%

POLIMORFISMOS de DNA	ORIGEM PATERNA	ORIGEM MATERNA
Davies <i>et al</i> (1984)	0	1
Stwart <i>et al</i> (1985)	1	2
Bricarelli <i>et al</i> (1989)	11	17
Rudd <i>et al</i> (1988)	2	7
Galt <i>et al</i> (1989)	3	9
Chakravarti <i>et al</i> (1989)	6	55
Takaesu <i>et al</i> (1990)	4	34
TOTAL	27	125
PORCENTAGEM	17.8%	82.2%

TABELA 1- Comparação de estudos citogenéticos e moleculares da não disjunção envolvendo o cromossomo 21

De um total de 152 famílias estudadas pelos polimorfismos de DNA, 125 (82,2%) apresentaram não disjunção materna e 27 (17,8%) apresentaram não disjunção paterna. Mais recentemente,

em dois estudos realizados por Antonarakis et al (1992) e Sherman et al (1991) de um total de 304 famílias analisadas, a origem parental foi determinada em 293 casos. A origem paterna foi encontrada em apenas 15 casos (5,1%) e em 278 casos (94,9%), a origem foi materna. Esta discrepância significativa é atribuída à superioridade dos métodos moleculares e à subjetividade dos heteromorfismos citogenéticos.

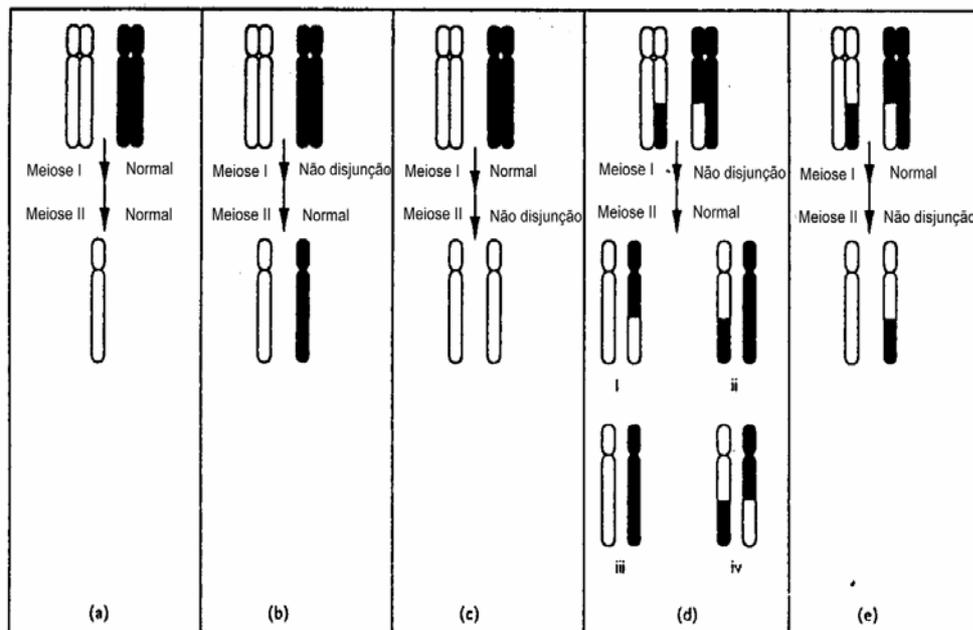


Figura 1. A Produção de gametas durante meiose normal e anormal. Um par de cromossomos homólogos de cada progenitor está representado no topo da figura, cada um com duas cromátides: a) meiose normal: os pares de cromossomos se separam na meiose I e as cromátides se separam na meiose II para produzir gametas que contém apenas uma cópia do cromossomo; b) não disjunção na meiose I; c) não disjunção na meiose II; d) não disjunção na meiose I envolvendo cromossomos que sofreram recombinação. Ocorre a produção de 4 tipos diferentes de gametas. Em i e ii os gametas recebem a cromátide de apenas um cromossomo recombinante. As células produzidas serão heterozigotas para um sítio de recombinação localizado no centrômero e homozigotas para um sítio de recombinação mais próximo ao telômero. Em iii as células não recebem cromossomos que sofreram recombinação e em iv os gametas recebem as duas cromátides que sofreram recombinação. Neste caso todos os alelos mantêm a mesma heterozigosidade do genótipo parental; e) não disjunção na meiose II envolvendo um cromossomo recombinante produzindo uma célula que é homozigota para um sítio de recombinação localizado no centrômero e heterozigota para um sítio de recombinação próximo ao telômero.

Para determinar o estágio meiótico da não disjunção, assume-se que a redução para a homoziguidade de um certo marcador pericentromérico é interpretada como um erro na meiose II (figura 1c) e a retenção para a heteroziguidade é interpretada como resultante de um erro na meiose I (figura 1b).

Os resultados de um estudo feito por Antonarakis et al (1991) sobre o estágio meiótico da não disjunção revelaram que, de 166 casos maternos, 128 (77,1%) ocorreram na meiose I e 38 (22,9%) ocorreram na meiose II e, dos 9 casos paternos, 2 (22,2%) ocorreram na meiose I e 7 (77,8%) ocorreram na meiose II. Este estudo também revelou que não houve diferenças quanto à distribuição da idade materna entre os grupos com erros na meiose I e II materna, ou seja, não houve indícios de que um erro em determinado estágio meiótico fosse responsável pelo aumento da incidência da trissomia do 21 associada ao aumento da idade materna. Estes resultados são compatíveis com a hipótese do “relaxamento da seleção” na qual existe um decréscimo na taxa de perda espontânea de conceptos trissômicos antes do nascimento (Ayme e Lippman-Hand, 1982) ou então indicam que o avanço da idade materna pode levar à ocorrência de erros tanto na meiose I quanto na meiose II (Warburton, 1989).

Quanto aos estudos de heteromorfismos citogenéticos dentre os erros meióticos maternos, 86,1% ocorreram na meiose I e 13,9% ocorreram na meiose II. Esta diferença é estatisticamente significativa quando comparada com os resultados de polimorfismos de DNA ( $X^2=7.158$ , g.l.=1,  $p=0.0075$ ). Entre os erros meióticos paternos, os estudos de heteromorfismos citogenéticos revelaram

72,4% de erros na meiose I e 27,6% na meiose II. Entretanto, estudos de polimorfismos de DNA revelaram que a maioria (77,8%) das não disjunções paternas ocorre na meiose II. Esta diferença é também estatisticamente significativa ( $X^2=9.93$ , g.l.=1,  $p=0.0016$ ), apesar do tamanho da amostra estudada para os polimorfismos de DNA ter sido pequena.

Os polimorfismos de DNA localizados na região centromérica não permitem distinguir entre os erros na meiose II e os erros mitóticos nos primeiros estágios do desenvolvimento embriológico. O uso de outros marcadores localizados no braço longo do cromossomo 21, entretanto, eliminam a possibilidade de erros mitóticos por causa da ocorrência de recombinação entre os marcadores centroméricos e pericentroméricos. Os casos em que os marcadores foram reduzidos para homoziguidade ao longo de todo o cromossomo são considerados como erros mitóticos.

Yoon et al (1996) em recente estudo populacional investigaram a origem da não disjunção do cromossomo 21, através de polimorfismos de DNA, em 155 indivíduos trissômicos. 86% dos casos foram de origem materna (75% na meiose I e 25% na meiose II), 9% de origem paterna (50% na meiose I e 50% na meiose II) e 5% devido a erros mitóticos. Os resultados desse trabalho suportam uma associação entre o aumento da idade materna e a não disjunção. Essa associação é maior com erros ocorridos na meiose II. Isso implica que existe pelo menos um mecanismo relacionado à idade materna atuando por volta do tempo de concepção.

Para determinar o efeito diferencial que a idade materna exerce sobre erros na meiose I e II são necessários mais dados sobre a

freqüência da não disjunção ocorrida entre mulheres com mais de 35 anos e mecanismos biológicos que resultam em não disjunção.

Erros na determinação da origem meiótica da não disjunção podem ocorrer tanto na utilização dos heteromorfismos citogenéticos quanto dos polimorfismos de DNA. No caso dos polimorfismos de DNA, Antonarakis (1992) estimou uma taxa de erros na determinação da não disjunção inferior à taxa de 6-10%.

Para se determinar a freqüência de recombinação dos cromossomos 21 que sofreram não disjunção, é necessário que os cromossomos paternos onde ela teve origem sejam heterozigotos para dois ou mais marcadores. Se a recombinação ocorrer na primeira divisão meiótica, isto se refletirá como redução para homozigosidade e se houver recombinação na segunda divisão meiótica, isto se refletirá como retenção para heterozigosidade.

Apenas 50% das recombinações que ocorreram em cromossomos que sofreram não disjunção na meiose I puderam ser detectados, enquanto todos os “ crossing-overs ” que ocorreram em cromossomos que sofreram não disjunção na meiose II puderam ser detectados (figura 1d e 1e).

Sherman et al (1991) utilizaram 19 sítios polimórficos do cromossomo 21 para estudar a associação entre freqüência reduzida de recombinação e não disjunção do cromossomo 21. Eles elaboraram um mapa genético do braço longo do cromossomo 21 e concluíram que o mapa de ligação das mulheres normais é significativamente maior que aquele encontrado em casos de trissomia originados da mãe. Neste estudo em que houve cinco casos de trissomia derivados do pai, foi observado recombinação

em três casos e nos outros dois casos houve uma redução para homoziguidade em todos os *loci* informativos. Portanto, falhas no pareamento e ou recombinação na meiose I não podem ser o mecanismo responsável pelo aparecimento de trissomia decorrente da origem paterna.

Para os 77 casos de trissomia derivados da mãe, foi detectado recombinação em 25 casos e em quatro outros casos todos os *loci* foram reduzidos para homoziguidade. Nos 48 casos restantes, a heteroziguidade foi mantida para todos os *loci*, implicando numa associação entre redução na frequência de recombinação e não disjunção na meiose I materna.

Tanzi et al (1992) observaram que a taxa de recombinação nas regiões telomérica e pericentromérica do cromossomo 21 diminui com o avanço da idade materna. Em mulheres com menos de 20 anos, 47% do total de recombinações do cromossomo 21 ocorrem na porção distal junto ao telômero. Em mulheres com idade que varia dos 31-61, anos esta frequência cai para 6%. Na região subcentromérica, a frequência de recombinação decai de 22% em mulheres com aproximadamente 20 anos para 0% em mulheres com mais de 31 anos de idade. Portanto, estes resultados são consistentes com a sugestão de Warren e colaboradores (1987) de que falhas na recombinação são um importante fator na gênese da trissomia do 21. Entretanto, Howard et al (1993) estudaram um grupo de 27 famílias, cada uma com uma criança com síndrome de Down, não puderam excluir a possibilidade de que a frequência de quiasmas deve ocorrer a uma frequência normal em cromossomos que sofreram não disjunção. Os achados desta amostra sugerem que os

cromossomos 21 que sofreram não disjunção estão envolvidos em pelo menos um evento recombinacional.

Apesar desta controvérsia, mais dados estão sendo publicados a favor da redução da frequência de recombinação (Sherman *et al*, 1994; Zittergruen *et al*, 1995). Se isto for verdade, podemos inferir que o mecanismo do qual resultam células aneuplóides deve ocorrer no início da meiose. Portanto, falhas no pareamento cromossômico predispõem o surgimento de univalentes e, conseqüentemente, uma separação precoce das bivalentes durante a primeira anáfase meiótica como observou Angell (1994), ao analisar 100 oócitos humanos em metáfase II da meiose. Sturtevant e Beadle (1962) foram os primeiros a propor o termo “não-conjunção” para esta falha do pareamento cromossômico e subseqüente distribuição irregular, como foi observado em *Drosófila*, mas o termo “não-disjunção” é tão amplamente utilizado na literatura que muitos autores continuam a usá-lo.

O estudo do mecanismo da não disjunção meiótica através dos polimorfismos de DNA provê várias possibilidades de investigação da variabilidade clínica dos pacientes com síndrome de Down. Aproximadamente 40% desses pacientes apresentam algum tipo de cardiopatia, sendo a presença de defeito do septo atrioventricular o mais comum. Zittergruen *et al* (1995) recentemente estudaram 94 famílias com um filho portador de síndrome de Down divididas em dois grupos: 43 famílias cujo probando apresentava defeito do septo atrioventricular e 51 famílias cujo probando não apresentou nenhum tipo de cardiopatia. Através do uso de 29 marcadores da região pericentromérica do cromossomo 21, eles determinaram a origem e

o estágio meiótico da não disjunção. 86,2% do total dos casos foram de origem materna e 13,8% foram de origem paterna. Dos casos de origem materna, 76,5% ocorreram na meiose I e 23,5% na meiose II e dos casos derivados do pai, 23,1% ocorreram na meiose I e 76,9% na meiose II. Não foi encontrada associação entre a presença de defeito do septo atrioventricular e a origem e ou estágio meiótico da não disjunção. Uma associação significativa foi encontrada entre defeito do septo atrioventricular e a frequência reduzida de recombinação nos cromossomos que sofreram não disjunção.

A análise molecular e fenotípica de indivíduos com trissomia parcial do cromossomo 21 levou à definição de algumas regiões do cromossomo que resultam no aparecimento de algumas características da síndrome de Down quando estão triplicadas (Sinet *et al*, 1991; Rahmani *et al*, 1990; Korenberg *et al*, 1990; McCormick *et al*, 1989). 23 características diferentes da síndrome de Down foram assinaladas em 7 regiões do cromossomo 21. Entretanto, o resultado mais notável é que 18 das 23 características resultam da trissomia de um pequeno segmento do cromossomo nas proximidades da região D21S55 (DCR) (Sinet *et al*, 1991).

Num estudo realizado com 6 pacientes com monossomia parcial do cromossomo 21, foi encontrada associação entre a deleção dos segmentos 21q11 e 21q21 com hipertonia. Também foi encontrada associação entre a deleção da região 21q21-q22 com artrogriposi e retardo mental (Chettouh *et al*, 1991), apesar de uma paciente com deleção de uma região similar a esta ter sido encontrada, mas sem a presença de retardo mental (Korenberg *et al*, 1991). Estes casos foram extremamente importantes para o estudo da síndrome de

Down, pois possibilitaram relacionar a região terminal do cromossomo 21 como a principal responsável pelo fenótipo da síndrome de Down. A região mínima responsável pelo maior número de características da síndrome de Down, foi denominada de Região Crítica da Síndrome de Down (DSCR).

A princípio toda a região 21q22 era considerada como região crítica e o gene SOD-1 que codifica a enzima superoxidodesmutase era um dos genes conhecidos nesta região e devido a isto pode se diagnosticar que alguns pacientes possuíam um acréscimo na concentração desta enzima, sugerindo um efeito aditivo deste gene. Alterações degenerativas do sistema nervoso e envelhecimento precoce podem ser resultantes de alterações no metabolismo oxidativo causado pelo acréscimo da SOD-1, porém estudos posteriores demonstraram que o gene da SOD-1 não era o principal responsável pelas alterações fenotípicas uma vez que foram encontrados portadores da síndrome que não possuíam o gene em triplicata. Estes estudos permitiram delimitar uma nova região crítica, 3 Mb ao redor de D21S55 reduzindo ainda mais esta região.

Apesar de existirem controvérsias a respeito da delimitação da região crítica, existe um consenso que o gene SOD-1 está localizado fora desta região e que a região D21S55 está muito próxima dos genes responsáveis pela determinação das características mais frequentes da síndrome de Down. Outros estudos sugerem que genes fora da região D21S55 contribuam para o estabelecimento das principais características da síndrome de Down (Korenberg *et al*, 1994).

Fuentes et al (1995) utilizaram uma técnica denominada “Alu-splice PCR” para identificar éxons próximos de seqüências Alu que ficam nas proximidades de um determinado gene. Através deste método, eles isolaram um novo gene, o DSCR1, localizado na região 21q22.1-22.2 entre os genes KCNEI e AMLI (aproximadamente 100 Kb do gene KCNEI e 400 Kb do gene AMLI) cerca de 2 Mb do locus D21S55.

Em embriões de ratos, a proteína codificada pelo gene DSCR1 é expressa em níveis elevados no cérebro e no coração sugerindo que a superexpressão deste gene pode contribuir para a patogênese da síndrome de Down, em particular o retardo mental e ou defeitos cardíacos (Fuentes *et al*, 1995).

Uma das características clínicas mais estudadas na síndrome de Down é a cardiopatia, presente em cerca de 40% dos pacientes (Jones, 1988). Isto sugere que a variabilidade genética do cromossomo 21 pode contribuir para algum tipo de cardiopatia em síndrome de Down. Entretanto, o processo de formação do músculo cardíaco é bastante complexo, envolvendo muitos genes que interagem entre si. Alguns desses genes estão localizados no cromossomo 21 (Davies *et al*, 1995), mas não se sabe se existe alguma relação entre cardiopatia em síndrome de Down e algum outro gene fora do cromossomo 21 associado à cardiopatia na população normal. O gene que codifica a enzima conversora da angiotensina (ACE), por exemplo, está associado a pessoas que apresentam predisposição a infarto do miocárdio (Badenhop *et al*, 1995) e está localizado na região q23 do cromossomo 17 (Mattei *et al*, 1989). Não se sabe se existe alguma associação entre o

polimorfismo desta região cromossômica e cardiopatia em síndrome de Down.

Podemos concluir, portanto, que os métodos moleculares constituem uma metodologia importante para o esclarecimento das causas da não disjunção cromossômica e para estabelecer possíveis associações com a variabilidade clínica dos pacientes.

## **OBJETIVOS**

Os objetivos estabelecidos para a realização deste estudo são os seguintes :

1. determinar a origem do cromossomo 21 extra por métodos moleculares numa amostra de 32 pacientes portadores da síndrome de Down por trissomia livre,
2. investigar a associação da fase meiótica da não disjunção com a idade materna,
3. investigar possíveis associações da isodissomia com o quadro clínico dos pacientes,
4. investigar possível associação do polimorfismo ACE com cardiopatia em síndrome de Down.

## **MATERIAIS E METODOS**

### **1 - REAGENTES**

Os materiais para PCR utilizados (Taq DNA polimerase, dNTPs, tampões) foram de procedência da GIBCO-BRL. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela NBI (National Biosciences, Inc.) e adquiridos da Worklab. A acrilamida e Bis-Acrilamida foram procedentes da SIGMA, os sais foram procedentes da Merck e os reagentes (PA) foram procedentes da Merck, Synth e da Reagen.

### **2 - AMOSTRA**

Uma amostra de 32 famílias, cada uma com um probando com trissomia livre do 21 diagnosticada cromossomicamente, foi analisada neste estudo. Para isso foi necessário que a coleta de sangue se estendesse às APAEs dos municípios de São Carlos, Bebedouro e Araras. Foram coletadas amostras de 3 ml de sangue venoso com EDTA (0,2%) como anticoagulante.

### **3 - TÉCNICAS MOLECULARES**

*3.1) Extração de DNA* -A técnica de extração utilizada foi uma modificação do método de Debomoy e Nurenberg (1991 ). Na metodologia modificada partimos de 1 ml de sangue total, colhido com EDTA (2%), o qual pode ser totalmente processado utilizando como equipamentos uma microcentrífuga com velocidade controlada entre 1.000 e 13.000 r.p.m. da DENVER Instrument e um Banho-

Maria modelo 100 da FANEM. O método não enzimático produz cerca de 100 µg de DNA de alto peso molecular. As fórmulas dos tampões utilizados encontram-se no apêndice. Os passos são os seguintes:

- a) transferir 1,0 ml de sangue para um tubo eppendorf de 1,8 ml e centrifugar 5 minutos a 5.000 r.p.m.;
- b) descartar o soro e adicionar 1.0 ml de solução TTKM1;
- c) agitar suavemente até a lise das hemácias e centrifugar 5 minutos a 5.000 r.p.m.;
- d) descartar o sobrenadante, adicionar 1,0 ml de TKM1 e agitar suavemente para lavar o precipitado nuclear. Centrifugar 5 minutos a 5.000 r.p.m..Repetir a lavagem até a obtenção de um precipitado nuclear livre de hemoglobina;
- e) ressuspender cuidadosamente o precipitado nuclear em 200 µl de TKM2 e adicionar 20 µl de uma solução de S.D.S. a 10%;
- f) incubar 65° por 15 minutos;
- g) adicionar 60 µl de uma solução 5M de NaCl;
- h) agitar até a lise dos núcleos leucocitários e centrifugar a 12.000 r.p.m. por 10 minutos;
- i) recuperar o sobrenadante, passando-o para novo tubo, e adicionar 2 volumes de etanol absoluto, inverter até precipitar o DNA;
- j) centrifugar a 13.000 r.p.m. por 10 minutos, descartar o sobrenadante e lavar o DNA precipitado com 500 µl de etanol 70%;
- k) descartar o sobrenadante e deixar o precipitado secar sobre papel absorvente;
- l) ressuspender o DNA em 150 µl de T. E.(Tris 10 mM, EDTA 1mM).

3.2) *Oligonucleotídeos* - para determinar o estágio meiótico da não disjunção foram utilizados, oligonucleotídeos adjacentes aos loci dos microsátélites D21S120, D21S16, D21S13E e HMG14.

O locus D21S120, localizado na região 21q11, fica cerca de 200 kb do locus D21S16, foi descrito por Burmelster *et al* (1990) e os “primers” para PCR apresentam a seguinte seqüência:

“Primer” 1: 5’GTGTGTCTGCCATTTCTGGGTGTAG 3’

“Primer” 2: 5’GATCCTGGGACAAAGTAGTCTCTAA 3’

O locus D21S16, localizado na região 21q11, foi descrito por Chumakov *et al* (1992). As seqüências nucleotídicas dos “primers” são as seguintes:

“Primer” 1: 5’TTCCATGCCCAGACTGAAGTTCTGGACTGA 3’

“Primer” 2: 5’CCTATCACCAATGGAGAAAGCCCATAAGGA.3’

O locus D21S13, localizado na região 21q11, foi descrito por Guo *et al* (1990). Os “primers” apresentam a seguinte seqüência nucleotídica:

“Primer” 50: 5’ATCTGATGCCTTTGAATCT 3’

“Primer” 51: 5’TATGCCATTCACCTGTGATA 3’

O locus HMG14-GT2, está localizado na região 21q22.3, foi descrito por Petersen *et al.* (1990) e apresenta a seguinte seqüência nucleotídica:

“Primer” 3: 5’GGCACATTACTIONTGTCTGACA 3’

“Primer” 4: 5’CTACTGTTTCAGAGTCAAAGC 3’

Estes marcadores estão bem posicionados no mapa genético de ligação do cromossomo 21 humano como mostra a figura 2.

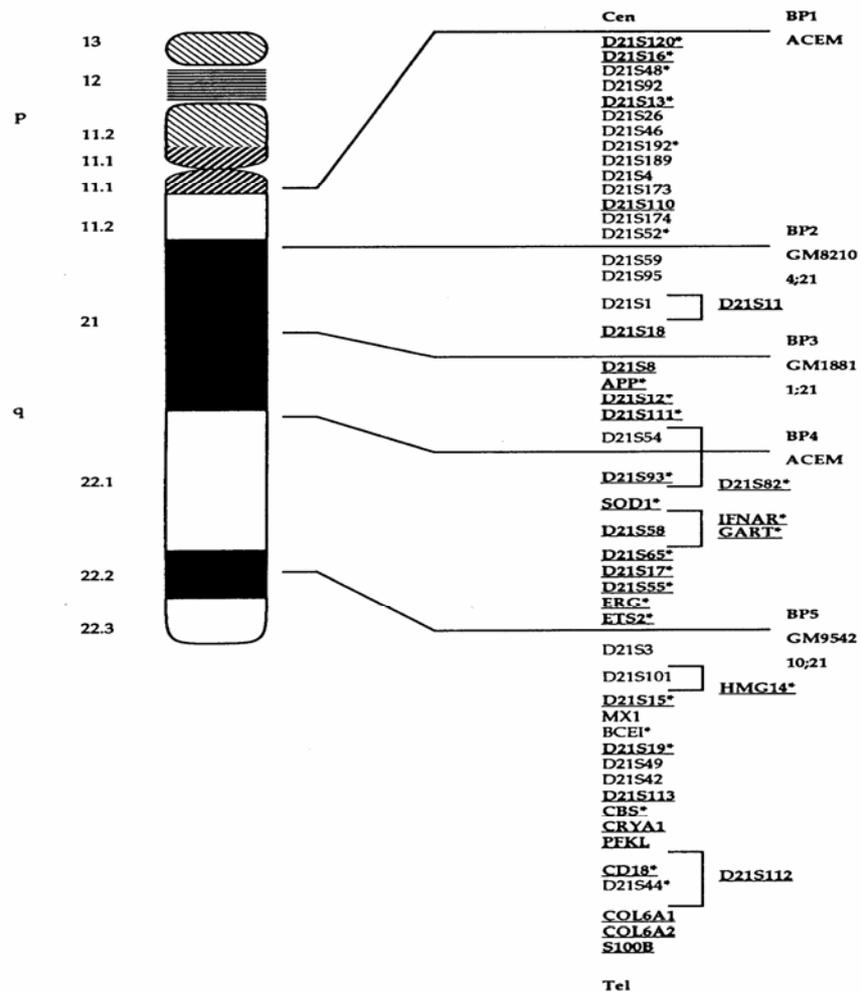


FIGURA 2. Mapa de ligação do cromossomo 21. Os marcadores que estão sublinhados representam os *loci* descobertos através de STS e os marcadores indicados por \* representam os *loci* que foram isolados a partir de YACs (extraído de Cox e Shimizu, 1991).

A utilização de oligonucleotídeos que flanqueiam a região correspondente à inserção de uma seqüência Alu repetitiva de 287 pares de bases do gene que codifica a enzima conversora da angiotensina no cromossomo humano 17 também faz parte deste trabalho. O polimorfismo inserção/deleção da enzima conversora da angiotensina (ACE) foi detectado por Rigat e colaboradores (1990) e a seqüência nucleotídica dos “primers”, determinada por Hubert e colaboradores (1991) é a seguinte:

SC1407: 5’CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT 3’

BR2352: 5’GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT 3’

*3.3) Amplificação das regiões D21S13E, D21S120, D21S16, HMG14-GT2 e ACE* A reação de amplificação da região D21S13E foi feita de acordo com o protocolo descrito por Guo *et al* (1990) em um volume total de 25 µl contendo 25ng do DNA genômico, 5pmoles de cada oligonucleotídeo, 200 µM de dNTPs, 0,6 unidade de taq DNA polimerase (GIBCO-BRL), KCl 50 mM, Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM e MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM. As condições de amplificação foram as seguintes: 30 ciclos com denaturação a 94°C por 1 min, pareamento a 54°C por 1 min e extensão a 72°C por 30 seg.

A reação de amplificação da região D21S120 foi feita de acordo com o protocolo descrito por Burmelster *et al* (1990) em um volume total de 50 µl contendo 100 a 200 ng de DNA genômico, 200 pmoles de cada oligonucleotídeo, 250 µM de dNTPs, 1 unidade de taq DNA polimerase (GIBCO BRL), KCl 50 mM, Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM e MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM. As condições de amplificação foram as seguintes: 94° C por 5

min e 45 ciclos com denaturação a 93°C por 1 min, pareamento a 65°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min.

As reações de amplificação, tanto para a região D21S16 quanto para a região HMG14-GT2 foram feitas em um volume total de 50 µl contendo 100 a 200 ng de DNA genômico, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo, 250 µM de dNTPs, 1 unidade de taq DNA polimerase (GIBCO BRL), KCl 50 mM, Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM e MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM. As condições de amplificação para a região D21S16 foram desenvolvidas em nosso laboratório e são as seguintes: 94°C por 5 min e 30 ciclos com denaturação a 94°C por 1 min, pareamento a 65°C por 1 min e extensão a 72°C por 45 seg. As condições de amplificação para a região HMG14-GT2 foram as seguintes: 94°C por 10 min e 30 ciclos com denaturação a 94°C por 30 seg, pareamento a 58°C por 30 seg e extensão a 72°C por 1 min.

A reação de amplificação para detectar o polimorfismo inserção/deleção do ACE foi feita em um volume final de 20 µl contendo 100 ng de DNA genômico 25 pmoles de cada oligonucleotídeo, 250 µM de dNTPs, 0,6 unidade de taq DNA polimerase (GIBCO BRL), KCl 50 mM, Tris-Cl<sup>-</sup> 10 mM e MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM. As condições de amplificação foram as seguintes: 94°C por 4 min e 30 ciclos com denaturação a 94°C por 1 min, pareamento a 58°C por 1 min e extensão a 72°C por 2 min. As reações de amplificações foram realizadas utilizando-se um termociclador da Perkin Elmer modelo 2400.

### 3. 4 ) Eletroforese

3.4.1) *Em gel de agarose* - após a extração, o DNA foi analisado através da eletroforese em gel de agarose (0,8% em T.B.E.) e visualizado em U.V. por coloração com brometo de etídio (0,4 µg/ml de água). A eletroforese foi realizada a uma voltagem constante de 8 V/cm por 1 hora.

3 4.2.) *Em gel de poliacrilamida* - Foram separadas alíquotas de 6 µl das amostras amplificadas, as quais foram adicionados 12 µl de formamida e 3,5 µl do tampão de corrida (L. B. 6 X). Estas alíquotas foram aquecidas a 90°C por 10 min para desnaturação do DNA. Em seguida foram aplicados 10 µl em gel desnaturante de poliacrilamida de 15 cm de comprimento por 10 cm de altura e concentração 12% com uréia 7M segundo Sambrook e cols. (1989). A eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 180 V por 2 horas.

3.5.) *Coloração por Nitrato de prata* - Para corar o gel de poliacrilamida utilizamos o método descrito por Santos e cols. (1993) cujos passos são os seguintes:

- a) fixar o gel em 300 ml de Etanol, 10% / Ácido acético, 0,5% por 20min.
- b) Corar com agitação em 300 ml de Nitrato de Prata, 0,17% por 25min.
- c) Lavar em 300 ml de água deionizada por 3 min.
- d) Revelar em NaOH, 3% Formaldeído, 0,1% (5-10 min) até as bandas surgirem.
- e) Parar a reação com Etanol, 10% e Ácido Acético, 0,5%

3.6.) *Conservação do Gel* - Os géis foram colocados entre duas folhas de papel Celofane embebido em água e deixados secar à temperatura ambiente fixados por fita adesiva numa placa de vidro. Depois de secos (1 dia), os géis foram fotografados para documentação.

## RESULTADOS

Foram realizadas ampliações de DNA por PCR dos membros das 32 famílias coletadas envolvendo os sistemas D21S13E, D21S16, D21S120 e HMG14-GT2 sendo este último o único que apresentou resultados positivos para a determinação da origem e estágio meiótico da não disjunção. Dois alelos muito frequentes foram encontrados para os sistemas D21S13E e D21S16 nas famílias estudadas. A figura 3 mostra o resultado da amplificação de duas famílias para o sistema D21S13E. Devido à pequena variabilidade apresentada por estes sistemas, eles não foram informativos para as famílias analisadas.

A análise dos alelos para o sistema D21S120 foi bastante dificultada pela presença de bandas espúrias em quase todos os géis (figura 4).

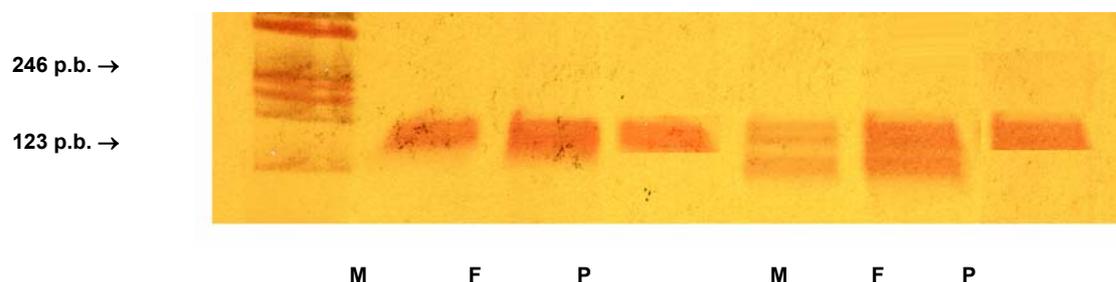


FIGURA 3. gel de poliacrilamida desnaturalante corado com nitrato de prata mostrando a tipagem de duas famílias para o sistema D21S13E

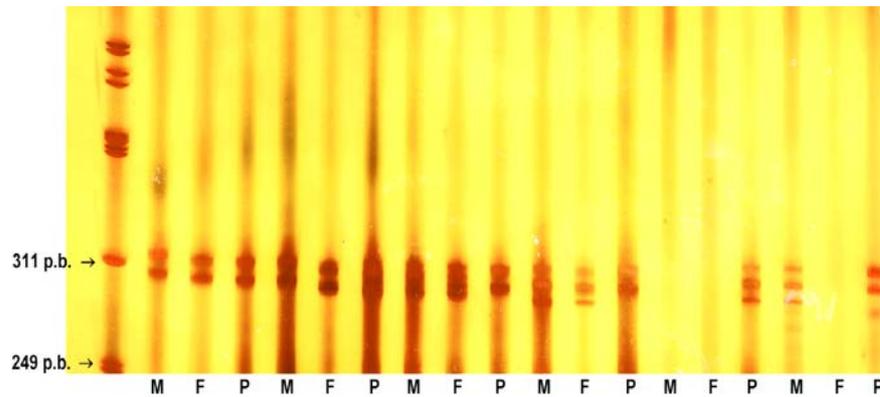


FIGURA 4. gel de poliacrilamida desnaturante corado com nitrato de prata mostrando a tipagem de algumas famílias para o sistema D21S120. O marcador de peso molecular utilizado é o Hinf-174. Observe a presença de bandas espúrias.

Para o sistema HMG14-GT2 foram detectados na presente amostra pelo menos 7 alelos diferentes, embora a caracterização precisa destes alelos seja dificultada pela pequena diferença no número de pares de bases entre eles. Neste trabalho os alelos são designados A, B, C, D, E, F e G, cujos tamanhos variam de 276 a 300 pares de bases. As frequências para os alelos do sistema HMG14-GT2 detectados nesta amostra são as seguintes:  $f(A)=0.434$ ;  $f(B)=0.144$ ;  $f(C)=0.131$ ;  $f(D)=0.065$ ;  $f(E)=0.144$ ;  $f(F)=0.065$ ;  $f(G)=0.013$ . O que se estima é que os alelos mais frequentes (A e B) são os que apresentam menor tamanho. As figuras 5, 6 e 7 mostram os resultados da amplificação do *locus* HMG14-GT2 de algumas famílias analisadas.

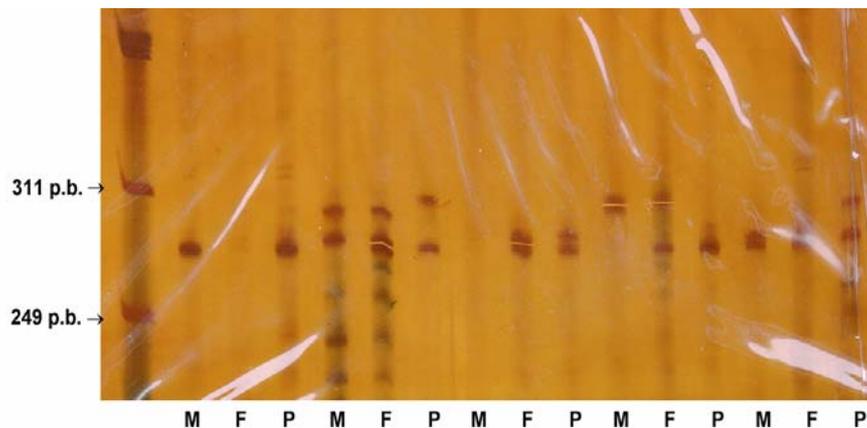


FIGURA 5. gel de poliacrilamida desnaturante (12%) corado com nitrato de prata mostrando a tipagem de algumas famílias para o sistema HMG14-GT2. Para explicação ver o texto.

Nas figuras 5 e 6 estão representadas as mesmas famílias. O primeiro trio mostra o filho sem amplificação, mas podemos inferir o seu genótipo uma vez que seus pais são homocigotos para o mesmo alelo. O mesmo acontece com o terceiro trio onde a mãe não amplificou, mas o pai e o filho apresentam o mesmo genótipo. O segundo e quarto trios mostram duas famílias segregantes com o probando ao meio apresentando 3 alelos. As duas revelaram que a não disjunção foi de origem materna ocorrendo na meiose I. No quinto trio não podemos determinar nem a origem nem o estágio meiótico da não disjunção pois os pais compartilham um alelo muito freqüente na população.

O gel revelou presença de algumas bandas espúrias, mas isso não interfere no resultado, pois foi utilizado um padrão de peso molecular conhecido que localiza as bandas que apresentam o fragmento amplificado de aproximadamente 300 pares de bases.

FIGURA 6. Gel desnaturante de poliacrilamida (12%) mostrando os resultados da amplificação de 5 famílias para o sistema HMG14-GT2. A seqüência da esquerda para a direita mostra o padrão de peso molecular conhecido,  $\phi$  174- clivado com Hinf 1 da GIBCO-BRL e os respectivos trios (mãe-filho-pai). O segundo e quarto trios revelaram origem materna para a não disjunção que ocorreu na meiose I

Na figura 7 sabemos que o estágio meiótico no qual ocorreu a não disjunção do primeiro trio foi a meiose I pois o filho apresenta três alelos distintos, mas como ele divide um alelo com a mãe e outro com o pai não é possível saber qual a origem da não disjunção. No terceiro trio a não disjunção ocorreu na meiose I materna. Nos demais trios não foi possível determinar a origem e nem o estágio meiótico da não disjunção.

A origem da não disjunção foi detectada em 3 famílias sendo todas de origem materna e o estágio meiótico em que ocorreu a não disjunção foi determinado em 7 famílias para a meiose I. Nos 7 casos que se mostraram positivos para o estágio meiótico da não disjunção a idade materna variou dos 30 aos 37 anos e em três casos constatou-se a presença de algum tipo de cardiopatia.

FIGURA 7. Gel de poliacrilamida desnaturante (12%) mostrando o resultado da amplificação de 6 famílias para o sistema HMG14-GT2. A seqüência da esquerda para a direita mostra o padrão de peso molecular conhecido, “leader”<sup>123</sup> da GIBCO-BRL e os respectivos trios (mãe-filho-pai). O primeiro trio mostra o filho com três alelos (não disjunção na meiose I), mas como os pais compartilham um mesmo alelo não dá para determinar a origem; o terceiro trio revelou origem materna para a não disjunção que ocorreu na meiose I; os demais trios não apresentaram resultados positivos para determinar a origem e o estágio meiótico da não disjunção.

#### 4 - ACE e Associação com Cardiopatia

Durante este período foi realizada a tipagem das crianças com síndrome de Down para o gene que codifica a enzima conversora da angiotensina ( ACE ) e possível associação com defeito cardíaco congênito que é uma característica presente em 40% dos pacientes portadores de síndrome de Down. Os resultados são apresentados na tabela 2.

GENÓTIPO	CRIANÇAS NORMAIS	CRIANÇAS COM CARDIOPATIA
DD	8	2
DI	12	4
II	1	3

TABELA 2- Resultado da tipagem de 30 indivíduos portadores da síndrome de Down normais e com cardiopatia para a enzima conversora da angiotensina (ACE).

De 30 crianças estudadas, 10 apresentaram o genótipo DD, 16 apresentaram o genótipo DI e 4 apresentaram o genótipo II. Não foi encontrado associação significativa entre o genótipo D/D e defeito cardíaco congênito ( $X^2 = 0,631$ ; g. l. = 1;  $0,50 > p > 0,30$ ). A figura 8 mostra o resultado da amplificação de 12 indivíduos para a tipagem do ACE.

FIGURA 8. Gel de poliacrilamida não desnaturante (6%) mostrando o resultado da amplificação de 12 pacientes com síndrome de Down para a enzima conversora da angiotensina (ACE). A seqüência da esquerda para a direita mostra os indivíduos 1,3,7 e 12 com deleção da seqüência Alu repetitiva nos dois cromossomos 17(genótipo D/D); os indivíduos 8 e 10 apresentam a inserção da seqüência Alu repetitiva no íntron 16 dos dois cromossomos 17 (genótipo I/I); os indivíduos 2,4,5,6,9 e 11 apresentam esta inserção em apenas um cromossomo (genótipo D/I).

## DISCUSSÃO

Para determinar o estágio meiótico da não disjunção assume-se que a redução para a homoziguidade de um certo marcador pericentromérico é interpretada como um erro na meiose II. A retenção para a heteroziguidade de um certo marcador pericentromérico é interpretada como resultante de um erro na meiose I.

Quando a origem meiótica da não disjunção é determinada por mais de um marcador polimórfico não existe discrepância entre os resultados de diferentes marcadores. Por exemplo, se a mãe de um probando de trissomia livre do 21 possui dois alelos AB e o pai dois alelos CC, e esse probando tem alelos AAC para um dado marcador, então o erro ocorreu na meiose II materna. Alternativamente, se o filho possui os alelos ABC para o mesmo marcador, então o erro ocorreu na meiose I materna.

A condição necessária para se determinar a origem parental através destes sistemas, utilizando-se PCR, é que o filho apresente três alelos e que os pais sejam heterozigotos para alelos diferentes. Se os pais forem homozigotos para alelos diferentes, não se poderá determinar nem a origem, nem o estágio meiótico da não disjunção no probando. Se os pais são heterozigotos e compartilham um alelo e o filho apresenta os três alelos distintos, provavelmente trata-se de um erro na meiose I, mas não é possível saber a origem em que ocorreu a não disjunção. Se os pais são heterozigotos e compartilham um alelo e o filho apresenta dois alelos distintos não é possível saber a origem em que ocorreu a não disjunção e quanto ao estágio meiótico, a não

disjunção pode ocorrer tanto na meiose I quanto na meiose II se um dos alelos envolvidos for o mais frequente. A única possibilidade de se detectar erro na meiose II é quando os pais são heterozigotos para alelos diferentes e o filho apresenta apenas duas bandas distintas. Neste caso não é possível determinar a origem da não disjunção. Portanto, esses sistemas só são informativos para os casos de não disjunção que ocorrem na meiose I

A hibridização é uma técnica que permite determinar facilmente a origem parental da não disjunção através da comparação da banda mais intensa entre o filho e apenas um dos progenitores. Acreditamos que através desta técnica iremos encontrar mais famílias que nos permitam detectar a origem da não disjunção. A desvantagem deste método é a grande quantidade de DNA utilizada e este deve ser de boa qualidade, não apresentando degradação.

Na população estudada foram encontrados 7 alelos e heterozigosidade de 74% para o sistema HMG14-GT2. Não houve discrepância quanto à heterozigosidade descrita na literatura. Petersen (1991) descreveu 10 alelos para este sistema. O número de alelos observado para os demais sistemas também foi inferior ao registrado na literatura. Guo (1990) relata um número de 5 alelos para o sistema D21S13E enquanto nós encontramos apenas dois alelos muito frequentes na população estudada. Burmelster (1990) relatou um número de 7 alelos para o sistema D21S120. Convém ressaltar a dificuldade encontrada na caracterização alélica para estes sistemas bem como a determinação da origem e o estágio meiótico da não disjunção. Isto ocorre devido à uma diferença muito pequena de

tamanho entre os alelos (repetição de suqüências dinucleotídicas GT) além da presença de bandas espúrias.

Portanto, é necessário utilizar um número maior de marcadores do que o utilizado neste estudo ou encontrar outros marcadores que sejam mais polimórficos para esta população a fim de obter um maior número de famílias que sejam positivas para esses marcadores. Recentemente, Zittergruen (1995) e Yoon (1996) ao estudarem a origem da não disjunção em pacientes com síndrome de Down utilizaram, respectivamente, 20 e 29 sistemas do cromossomo 21.

O polimorfismo da inserção/deleção do gene que codifica para a Enzima conversora da angiotensina (ACE) tem sido considerado um fator de risco independente para doenças artério-coronárias. Indivíduos com genótipo D/D apresentam níveis mais elevados da enzima conversora da angiotensina que os indivíduos com genótipos I/D ou I/I. Badenhop (1995) encontrou num grupo de indivíduos enfartados e também indivíduos com história familiar de infarto do miocárdio uma freqüência maior do genótipo D/D. Apesar da amostra de pacientes com síndrome de Down apresentar-se pequena para este estudo, não foi encontrado uma associação significativa entre o genótipo D/D e cardiopatia em síndrome de Down. Portanto, a cardiopatia em síndrome de Down deve estar associada à própria trissomia do cromossomo 21 e não a outro fator.

Davies e colaboradores (1994) demonstraram que a cardiopatia está associada a genótipos não usuais encontrados nos pais de crianças com síndrome de Down que apresentavam cardiopatia. Esses genótipos refletem a variação encontrada no gene COL6A1 através da técnica RFLP. O colágeno tipo VI é um componente da

matriz extracelular formado por 3 cadeias polipeptídicas:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  codificados por 3 diferentes genes. Os genes que codificam as cadeias  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  (COL6A1 e COL6A2) estão fortemente ligados na porção mais distal do cromossomo 21 humano (21q22.3). Recentemente Comeglio e colaboradores (1996) identificaram pela primeira vez um polimorfismo de 14 repetições CA no gene COL6A2. Este é o primeiro microsatélite polimórfico descrito na literatura e deverá ser útil para estudos de análise de ligação através de PCR em doenças nas quais o colágeno tipo VI possa estar envolvido.

Recentemente, o nosso laboratório recebeu da Unidade Acadêmica de Genética Médica e Comunitária do Imperial College of Science Technology and Medicine de Londres, através da Doutora Anna M. Kessling, as sondas COL6A1 e COL6A2 para investigarmos, através da técnica de hibridização, a associação entre a trissomia do cromossomo 21 e cardiopatia, além de podermos determinar a origem da não disjunção.

Descobertas recentes sobre o mecanismo responsável pela manutenção do pareamento cromossômico em *Drosophila*, tornam este organismo um modelo animal útil para compreendermos melhor as causas da não disjunção na espécie humana.

Citologicamente tem sido observado que durante a prófase I as cromátides irmãs estão associadas ao longo de todo seu comprimento, mas na transição da metáfase para a anáfase da primeira divisão meiótica a coesão nos braços das cromátides é desfeita (Miyazaki e Orr-Weaver, 1994). Do final da anáfase I até a

transição da metáfase II para a anáfase II, as cromátides irmãs estão ligadas apenas na região do centrômero.

O gene que controla diretamente a coesão entre as cromátides irmãs durante a meiose em *Drosophila* foi denominado *mei-S332* (Davis, 1971; Goldstein, 1980; Kerrebrock *et al*, 1992). Em mutantes para o gene *mei-S332* no início da meiose I a coesão entre as cromátides irmãs é normal. No final da anáfase I as cromátides irmãs separam-se precocemente em mais de 90% dos espermatócitos mutantes levando à não disjunção e perda cromossômica na segunda divisão meiótica.

O gene *mei-S332* está localizado na região 58-B do braço direito do cromossomo 2 de *Drosophila* (Kerrebrock *et al*, 1995); apresenta uma sequência de 1206 nucleotídeos que codificam um polipeptídeo com 401 aminoácidos e peso molecular de 44,4 kDa. Recentemente Kerrebrock e colaboradores (1995) através da fusão entre o gene *mei-S332* e o gene GFP (green fluorescent protein) localizaram a região cromossômica onde o produto gênico se liga. O fenótipo das mutações no gene *mei-S332* sugeriu que o produto deste gene pode atuar durante a meiose mantendo as cromátides irmãs juntas através da região centromérica. Quando as cromátides irmãs separam-se na anáfase II, o composto *mei-S332-GFP* desaparece dos cromossomos sugerindo que a destruição ou liberação desta proteína é necessária -para a separação das cromátides irmãs. Este estudo também revelou que mutações no gene *mei-S332* afetam diferencialmente a função do produto gênico em ambos os sexos, o que permite distinguir diferentes domínios da proteína. Segundo Orr-Weaver (1995) os produtos dos genes *mei-*

*S332* na meiose e *ord* na mitose são essenciais para a coesão entre as cromátides irmãs.

Estas recentes descobertas provêm uma base molecular para a elucidação do mecanismo do pareamento meiótico e as falhas que levam à não disjunção cromossômica.

## CONCLUSÕES

- 1- As famílias analisadas não se mostraram positivas para os sistemas da região pericentromérica D21S13E, D21S16 e D21S120.
- 2- Dos sistemas analisados nesta população, o HMG14-GT2 foi o que apresentou maior variabilidade com pelo menos 7 alelos e heterozigosidade de 74%.
- 3- Das 32 famílias analisadas através do sistema HMG14-GT2, 7 se mostraram positivas para o estágio meiótico em que ocorreu a não disjunção (meiose I) e 3 famílias foram informativas para a origem da não disjunção (todas de origem materna).
- 4- Os resultados mostram que é necessário utilizar um número maior de sistemas do cromossomo 21 para encontrarmos mais famílias que se mostrem positivas para o estágio meiótico da não disjunção e também realizar hibridização em “southern” para determinar a origem da não disjunção.
- 5- Não foi encontrada associação significativa entre o polimorfismo inserção/deleção para o gene da enzima conversora da angiotensina (ACE) e cardiopatia nos pacientes portadores de síndrome de Down estudados neste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELL, R.R., XIAN, J., KEITH, J., LEDGER, W., BAIRD, D.T.  
First meiotic division abnormalities in human oocytes:  
mechanism of trisomy formation. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 65,  
p. 194-202, 1994.
- ANTONARAKIS, S.E. *et al.* The meiotic stage of nondisjunction in  
trisomy 21: determination by using DNA polymorphisms. **Am. J.  
Hum. Genet.**, v.50, p. 544-550, 1992.
- ANTONARAKIS, S.E., KITTUR, S.D., METAXOTOU, C.,  
WATKINS, P.C., PATEL, A.S. Analysis of DNA haplotypes  
suggests a genetic predisposition to trisomy 21 associated with  
DNA sequences on chromosome 21. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**,  
v. 82, p. 3360-3364, 1985.
- AYME, S., LIPPMAN-HAND, A. Maternal age effect in aneuploidy:  
does altered embryonic selection play a role? **Am. J. Hum.  
Genet.**, v. 39, p. 558-565, 1982.
- BADENHOP, R.F., WANG, X.L., WILCKEN, D.E.L. Angiotensin-  
converting enzyme genotype in children and coronary events in  
their grandparents. **Circulation.**, v. 91, p. 1655-1658, 1995.

- BAKER, T.G. Oogenesis and ovulation. In: AUSTIN, C.R., SHORT, R.V. (eds). **Reproduction in mammals**. I. Germ cells and fertilization. London : Cambridge University, 1972.
- BAKKEN, A.H., McCLANAHAN, M. Patterns of RNA syntesis in early meiotic prophase oocytes from fetal mouse ovaries. **Chromosoma**, v. 67, p. 21-40, 1978.
- BIDDEL, F., EATES, B., OLAND, L. Strain difference in survival of XO embryos in the mouse. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 39, p. A104, 1986.
- BORUM, K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. **Exp. Cell. Res.**, v. 24, p. 495-507, 1961.
- BRICARELLI, F.D., PIERLUIGI, M., LANDUCCI, M., ARSLANIAN, A., COVIELLO, D.A., FERRO, M.A., STRIGINI, P. Parental age and the origin of trisomy 21. **Hum. Genet.**, v. 82, p. 20-26, 1989.
- BRICARELLI, F.D., PIERLUIGI, M., PERRONI, L., GRASSO, M., ARSLANIAN, A. SACCHI, N. High efficiency in the attribution of paternal origin of nondisjunction in trisomy 21 by both cytogenetic and molecular and molecular polymorphisms. **Hum. Genet.**, v. 79, p. 124-127, 1988.

- BRIDGES, C.B. Nondisjunction of the sex chromosomes of *Drosophila*. **J. Exp. Zool.**, v.15, p.587-606, 1913.
- BURMELSTER, M. , COX, D.R., MYESS, R.M. Dinucleotide repeat polymorphism located at D21S120. **Nucleic Acids Res.**,v. 18, n. 16, p.4969,1990.
- CAROTHERS, A. Down syndrome and maternal age: the effect of erroneous assignment of parental origin. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 40, p. 147-150, 1987.
- CHAKRAVART, A. The probability of detecting the origin of nondisjunction of autosomal trisomies. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 44, p. 639-645, 1989.
- CHETTOUH, Z., SINET, P.M., GILGENKRANTZ, S., CROQUETTE, M.F., PRIEUR, M., MAUNOURY, C., DELABAR, J.M. Hypertonia, arthrogyrosis and mental retardation associated with a deletion of the centromere-D21S1 region on chromosome 21: study of 5 patients. **Cytogenet. Cell. Genet.** (A27310), 1991.
- CHUMAKOV, I. *et al.* Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q. **Nature**, v. 359, p. 380-387, 1992.

- COMEGLIO, P., SAITTA, B., PEPE, G., CHU, M.L. Identification of a polymorphic CA repeat in the COL6A2 gene on human chromosome 21q22.3. **Hum. Hered.**, v. 46, p. 239-240, 1996.
- COX, D.R., SHIMIZU, N. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 21. **Cytogenet. Cell. Genet.** v. 58, p. 800-826, 1991.
- CRONE, M., LEVY, E., PETERS, H. The duration of the premeiotic DNA synthesis in mouse oocytes. **Exp. Cell. Res.**, v. 39, p. 678-688, 1965.
- DAVIES, K. E., HARPER, K., BONTHRON, D., KRUMLAUF, R., POLKEY, A., PEMBREY, M. E., WILLIAMSON, R. Use of a chromosome 21 cloned DNA probe for the analysis of nondisjunction in Down syndrome. **Hum. Genet.**, v. 66, p. 54-56, 1984.
- DAVIS, B. Genetic analysis of a meiotic mutant resulting in precocious sister-centromere separation in *Drosophila melanogaster*. **Mol. Gen. Genet.** v. 113, p. 251-272, 1971.
- DAVIES, G.E. *et al.* Genetic variation in the COL6A1 region is associated with congenital heart defects in trisomy 21 (Down's syndrome). **Ann. Hum. Genet.**, v. 59, p. 253-269, 1995.

De GROUCHY, J. 21p-Maternal and double exemplaire chez un trissomique 21. **Annu. Rev. Genet.**, v. 13, p. 52-55, 1970.

DEBOMOY, K.L., NURENBERGER JR., JOHN I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, p. 5444, 1991.

DONAHUE, R.P. Cytogenetic analysis of the first cleavage in mouse embryos. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 69, p. 74-77, 1972.

ECONOMOU, E.P., BERGEN, A.W., WARREN, A.C., ANTONARAKIS, S.E. The polydeoxyadenylate tract of Alu repetitive elements is polymorphic in the human genome. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 2951-2954, 1990.

GALT, J., BOYD, E., CONNOR, J.M., FERGUSON-SMITH, M.A. Isolation of chromosome-21-specific DNA probes and their use in the analysis of nondisjunction in Down syndrome. **Hum. Genet.**, v. 81, p. 113-119, 1989.

GOLDSTEIN, L.S.B. Mechanisms of chromosome orientation revealed by two meiotic mutants in *Drosophila melanogaster*. **Chromosoma**, v. 78, p. 79-111, 1980.

GUO, Z., SHARMA, V., LITT, M. Dinucleotide repeat polymorphism at the D21S13E locus. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 24, p. 7470, 1990.

- HASSOLD, T., JACOBS, P.A., KLINE, J., STEIN, Z.,  
WARBURTON, D. Effect of maternal age on autosomal  
trisomies. **Ann. Hum. Genet.**, v. 44 p.19-36, 1980.
- HASSOLD, T.J. and JACOBS, P.A. Trisomy in man. **Annu. Rev.  
Genet.**, v.18, p. 69-97, 1984.
- HENDERSON, S.A., EDWARDS, R.G. Chiasma frequency and  
maternal age in mammals. **Nature**, v. 218, p. 22-28, 1968.
- HOOK, E.B. Down syndrome rates and relaxed selection at older  
maternal ages. **Am. J. Hum. genet.**, v. 35, p. 1307-1313, 1983.
- HOWARD, C.M., DAVIES, G.E., FARRER, M.J., CULLEN, L.M.,  
COLEMAN, M.M., WILLIAMSON, R., WYSE, R.K.H.,  
PALMER, R., KESSLING, A.M. Meiotic crossing-over in  
nondisjoined chromosomes of children with trisomy 21 and a  
congenital heart defect. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 53, p. 462-471,  
1993.
- HUBERT, C., HOUOT, A.M., CORVOL, P., SOUBRIER, F.  
Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene: two  
alternate promoters correspond to evolutionary steps of a  
duplicated gene. **J. Biol. Chem.**, v. 266, pg.15377-15383, 1991.

JAGIELLO, G., FANG, J.S. Analyses of diplotene chiasma and frequencies in mouse oocytes and spermatocytes in relation to aging and sexual dimorphism. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 23, p. 53-60, 1979.

JAMIESON, M.E., COUTTS, J.R.T., CONNOR, J.M. The frequency of aneuploidy in human preimplantation embryos. **J. Reprod. Fertil. Abs. Ser.** v. 9, p. 56, 1992.

JONES, K.L. **Smith's recognisable patterns of human malformation.** 4. ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1988. p. 12-15 B., ,

JUBERG, R.C., JONES, B. The Christchurch chromosome (Gp-). **New. Engl. J. Med.**, v. 282, p. 292-297, 1970.

JUBERG, R.C., MOWREY, P.N. Origin of nondisjunction in trisomy 21 syndrome: all studies compiled, parental age analysis, and external comparisons. **Am. J. Med. Genet.**, v. 16, p. 111-116, 1983.

KAUFMAN, M.H. Analysis of the first cleavage division to determine the sex-ratio and incidence of chromosome anomalies. **J. Reprod. Fertil.**, v. 35, p.351-354, 1973.

KERREBROCK, A.W., MIYAZAKI, W.Y., BIRNBY, D., ORR-WEAVER, T.L. *The Drosophila. me-S332 gene promotes sister-chromatid cohesion in meiosis following kinetocore differentiation. **Genetics**, v.130, p. 827-841, 1992.*

KERREBROCK, A.W., MOORE, D.P., WU, J.S., ORR-WEAVER, T.L. *Mei-s332, A Drosophila protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions **Cell**, v. 83, n. 2, p. 247-256, 1995.*

KORENBERG, J.R. *et al.* Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 47, p. 236-246, 1990.

KORENBERG, J.R., KALOUSEK, D.K., ANNEREN, G., PULST, S.M., HALL, J.G., EPSTEIN, C.J., COX, D.R. Deletion of chromosome 21 and normal intelligence: molecular definition of the lesion. **Hum. Genet.**, v. 87, p. 112-118, 1991.

LAURIE, D.A., HULTEN, M.A. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. **Ann. Hum. Genet.**, v.49, p. 189-201, 1985.

LEJEUNE, J., TURPIN, R., GAUTIER, M. Le Mongolisme, premier exemple d'aberration autosomique humaine. **Ann. Génét.**, v. 1, p. 41-49, 1959.

- LITT, M., LUTY, J.A.A. hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. hum. Genet.**, v. 44, p. 397-401, 1989.
- MATTEI, M.G., HUBERT, C., ALHENC-GELAS, F., ROECKEL, N., CORVOL, P., SOUBRIER, F. Angiotensin I converting enzyme gene is chromosome 17. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 51, p. 1041, 1989.
- McCORMICK, M.K. *et al.* Molecular genetic approach to the characterization of the Down syndrome region of chromosome 21. **Genomics**, v. 5, p. 325-331, 1989.
- MIKAMO, K., KAMIGUCHI, Y. Primary incidences of spontaneous chromosomal anomalies and their origins and causal mechanisms in the Chinese hamster. **Mutat. Res.**, v. 108, p. 265-278, 1983.
- MIYAZAKI, W.Y., ORR-WEAVER, T.L. Sister-chromatid cohesion in mitosis and meiosis. **Annu. Rev. Genet.** v.28, p. 167-187, 1994.
- MURRAY, J.D., MORAN, C., BOLAND, M.P., NANCARROW, C.D., SUTTON, R., HOSKINSON, R.M., SCARAMUZZI, R.J. Polyploid cells in blastocysts and early fetuses from Australian Merino Sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v. 78, p. 439-446, 1986.

NAKAMURA, Y., LEPPERT, M., O'CONNELL, P., WOLFF, R., HOLM, T., CULVER, M., MARTIN, C. Variable number of tandem repeat ( VNTR ) markers for human gene mapping. **Science**, v. 235, p. 1616-1622, 1987.

ORR-WEAVER, T.L. Meiosis in *Drosophila*: seeing is believing. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 10443-10449, 1995.

PARKER, D.R., WILLIAMSON J.H., GAVIN, J. The nature and time of occurrence of radiation-induced nondisjunction of the acrocentric X and fourth chromosomes in *Drosophila melanogaster* females. **Mutat. Res.**, v.24, p. 135-148, 1974.

PENROSE, L.S. The relative effect of paternal age and maternal age in mongolism. **J. Genet.**, v. 27, p. 219-224, 1933.

PETERSEN, M.B., SCHINZEL, A.A., BINKERT, F., TRANEBJAERG, L., MIKKELSEN, M., COLLINS, F.A., ECONOMOU, E.P. ANTONARAKIS, S.E. Use of short sequence repeat DNA polymorphisms after PCR amplification to detect the parental origin of the additional chromosome 21 in Down syndrome. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 48, p. 65-71, 1991.

PETERSEN, M.B.; ECONOMOU, E.P.; SLAUGENHAUPT, S.A.; CHAKAVARTI, A.; ANTONARAKIS, S.E. Linkage analysis of the human HMG14 gene on chromosome 21 using a GT

dinucleotide repeat as polymorphic marker. **Genomics**, v. 7, p. 136-138, 1990.

POLANI, P.E., JAGIELLO, G.M. Chiasmata, meiotic univalents and age in relation to aneuploid imbalance in mice. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 16, p.505-529, 1976.

RAHMANI, Z. *et al.* Down syndrome critical region around D21S55 on proximal 21q22.3. **Am. J. Med. Genet. Suppl.**, v. 2, p. 98-103, 1990.

RIGAT, B., HUBERT, C., ALHENC-GELAS, F., CAMBIEN, F., CORVOL, P., SOUBRIER, F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. **J. Clin. Invest.**, v. 86, p 1343-1346, 1990.

RUDD, N.L., DIMNIK, L.S., GREENTREE, C., MENDES-CRABB, K., HOAR, D.I. The use of DNA probs to establish parental origin in Down syndrome. **Hum. Genet.**, v. 78, p. 175-178, 1988.

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science.**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2. ed. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, F.R., PENA, S.D.J., EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non isotopic technique. **Hum. Genet.**, v. 90, p. 655-656, 1993.

SHERMAN, S.L., *et al.* Non-disjunction of chromosome 21 in maternal meiosis I: evidence for a maternal age-dependent mechanism involving reduced recombination. **Hum. Mol. Genet.**, v. 3, p. 1529-1535, 1994.

SHERMAN, S.L., *et al.* Trisomy 21: association between reduced recombination and nondisjunction. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 49, p.608-620, 1991.

SINET, P.M. *et al.* Molecular definition of 7 minimal regions on chromosome 21 involved in pathogenesis of 23 features of Down syndrome. **Cytogenet. Cell. Genet.** (A27305), 1991.

SPEED, R.M. Meiosis in the foetal mouse ovary. I. An analysis at the lightmicroscope level using surface spreading. **Chromosoma**, v. 85, p. 427-437, 1982.

SPEED, R.M. The effects of ageing on the meiotic chromosomes of male and female mice. **Chromosoma**, v. 64, p. 241-254, 1977.

SPEED, R.M., CHANDLEY, A.C. Meiosis in the foetal mouse ovary. II. Oocyte development and age-related aneuploidy. Does a production line exist? **Chromosoma**, v. 88, p. 184-189, 1983.

STEIN, Z., STEIN, W., SUSSER, M. Attrition of trisomies as a maternal screening device. **Lancet**, v. 1, p. 944-946, 1986.

STEWART, G.D., HARRIS, P., GALT, J., FERGUSON-SMITH, M.A. Cloned DNA probes regionally mapped to human chromosome 21 and their use in determining the origin of nondisjunction. **Nucleic Acids Res.**, v. 13, p. 4125-4132, 1985.

STEWART, G.D., HASSOLD, T.J., BERG, A., WATKINS, P., TANZI, R., KURNIT, D.M. Trisomy 21 ( Down Syndrome ): studying nondisjunction and meiotic recombination by using cytogenetic and molecular polymorphisms that span chromosome 21. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 42, p. 227-236, 1988.

STURTEVANT, A.H., BEADLE, G.W. **An introduction to genetics**. New York : Dover, 1962.

SUGAWARA, S., MIKAMO, K. Absence of correlation between univalent formation and meiotic nondisjunction in aged female Chinese hamsters. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 35, p. 34-40, 1983.

TAKAESU, N., JACOBS, P.A., COCKWELL, A., BLACKSTON, R.D., FREEMAN, S., NUCCIO, J., KURNIT, D.M., UCHIDA, I., FREEMAN, V., HASSOLD, T. Nondisjunction of chromosome 21. **Am. J. Med. Genet. Suppl.**, v. 7, p. 175-181, 1990.

TANZI, R.E., WATKINS, P.C., STEWART, G.D., WEXLER, N.S., GUSELLA, J.F., HAINES, J.L. A genetic linkage map of human chromosome 21: analysis of recombination as a function of sex and age. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 50, p. 551-558, 1992.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

VEKEMANS, M., TRASLER, D. Maternal genes control the extent of in utero selection against trisomic embryos in the mouse. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 37, p. A128, 1985.

VICKERS, A.D. Delayed fertilisation and chromosome anomalies. **J. Reprod. Fertil.**, v. 20, p.69-76, 1969.

WARBURTON, D., The effect of maternal age on the frequency of trisomy: change in meiosis or in utero selection ? In: HASSOLD, T.J., EPSTEIN, C.J. (Eds). **Molecular and cytogenetic studies of nondisjunction**. New York : Allan R. Liss, 1989. p. 165-181.

WARREN, A.C., CHAKRAVARTI, A., WONG, C., SLAUGENHAUPT, S.A, HALLORAN, S.L WATKINS, P.C, METAXOTOU, C., ANTONARAKIS, S.E. Evidence for reduced recombination on the nondisjoined chromosomes 21 in Down syndrome. **Science**, 237: 652-654, 1987.

WEBER, J.L., MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 44, p. 388-396, 1989.

YOON, P.W., FREEMAN, S.B., SHERMAN, S.L., TAFT, L.F., GU, Y., PETTAY, D., FLANDERS, W.D., KHOURY, M.J., HASSOLD, T.J. Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of the chromosomal error: a population-based study. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 58, p. 628-633, 1996.

ZITTERGRUEN, M.M., MURRAY, J.C., LAUER, R.M., BURNS, T.L., SHEFFIELD, V.C. Molecular analysis of nondisjunction in Down syndrome patients with and without atrioventricular septal defects. **Circulation** , v. 92, p. 2803-2810, 1995.

## APÊNDICE

### SOLUÇÕES:

SDS 10%

100 g de duodecil sulfato em 1l de H<sub>2</sub>O dest.

TBE 10 X

109 g de TRIS BASE.

9.31g de EDTA.

55.65g de Acido Bórico.

TKM1

10 mM Tris-HCl ,pH 7.6

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

2mM EDTA

TTKM 1

10 mM Tris-HCl ,pH 7.6

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

2mM EDTA

0.27% de Triton X-100

TKM 2

10 mM Tris-HCl ,pH 7.6

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

2mM EDTA

400 mM de NaCl

TE<sup>4</sup>

1.210 g TRIS base  
0.037 g Na<sub>2</sub>EDTA, pH=7.5

Solução de Acrilamida, 12% (p/ 100 ml)

12 g Acrilamida

0,3 g N-metil bisacrilamida

TBE 10X

completar p/ 100 ml com água deionizada

para preparar o gel em 7 ml da solução de acrilamida, acrescentar 6 µl de TMED e uma “pitada” de persulfato de amônio e esperar até polimerizar.