Renata Moscolini Romão

**Investigação dos polimorfismos do gene
PLAC4 na população brasileira**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Mário Henrique
Burlacchini de Carvalho

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Romão, Renata Moscolini

Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 na população brasileira /
Renata Moscolini Romão. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.

Orientador: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho.

Descritores: 1.Diagnóstico pré-natal 2.Trissomia do 21 3.Plasma
4.RNA/sangue 5.Polimorfismo de um único nucleotídeo 6.Brasil

USP/FM/DBD-373/11

***“Wisdom is to have dreams that are big
enough not to lose sight when we pursue them”***

Oscar Wilde

AGRADECIMENTOS

Ao **Departamento de Obstetrícia**, em especial ao **Prof. Dr. Marcelo Zugaib**, por permitir a realização deste trabalho em seu departamento.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Mario Henrique Burlacchini de Carvalho**, pela confiança, incentivo, apoio, paciência e ensinamentos.

Ao **Dr. José Eduardo Levi**, por me aceitar quando fui bater na porta do laboratório de Virologia do IMT-USP, por acreditar no projeto e não desistir após as recusas iniciais, e, sem o qual, este trabalho não teria sido realizado. Obrigada por todo apoio, dedicação, incentivo e ensinamentos.

Ao **Dr. Cláudio Sérgio Pannuti**, diretor do Instituto de Medicina Tropical, por abrir todas as portas para que esse trabalho pudesse ser realizado no Laboratório de Virologia do IMT-USP. Agradeço a confiança e a oportunidade de colaborar em projetos desse laboratório.

Aos membros da minha banca de qualificação – **Prof. Dr. Adolfo Wenjaw Liao**, **Prof^a. Dra. Rossana Pulcineli Vieira Francisco** e **Dr. Silvio Martinelli** – pela valiosa contribuição e pela disponibilidade.

Ao **Dr. Antônio Gomes de Amorim Filho**, pela colaboração neste trabalho, pela ajuda na finalização da dissertação, e pelos comentários feitos na qualificação.

À **Adriana Tateto** pelos ensinamentos da técnica de sequenciamento no nosso “velho companheiro” 377, e por todo convívio do dia a dia.

À **Ana Carolina Mamana**, pela ajuda com a coleta das amostras, pelos macetes do sequenciamento e pela amizade, sem dúvida, você contribuiu demais para a finalização deste trabalho

À **Cristina Oliveira**, pela amizade, pela contribuição, por compartilharmos das mesmas dificuldades e pelas incansáveis horas dedicadas às fitinhas.

À **Célia Luiza**, por ser minha primeira “professora” das técnicas de biologia molecular dentro do laboratório de Virologia, pelo convívio e por todos os momentos de descontração.

A todo pessoal do laboratório de Virologia – **Paulinho, Luiz, Mari, Cris Funiko, Jaila, Chris Troter, Renato, Rodrigo, Vic, Marcelo, Michele, Renata Wendel, Dani, Felipe, Thiaguinho, Letícia, Priscila, Tati, Vanessa, Cris Fink, Laurinha, Cynthia, Tânia, Lília, Luci, Marli, Silvia Helena, Adrianinha** – pela contribuição, por dividirem momentos do cotidiano e pelas incansáveis risadas.

À **Luciana Nardinelle**, pelo sequenciamento das primeiras placas no ABI 3130 do Hemocentro do HC-FMUSP.

À **Carla e Dani**, pelo sequenciamento do restante das placas no ABI 3100 do Laboratório de Virologia do Professor Zanotto do ICB-USP. À **Camila Romano** por fazer esta ponte entre nós – se não fosse esta colaboração, o trabalho não teria sido finalizado a tempo; e por toda a ajuda na padronização de protocolos “alternativos”.

A todo pessoal da **enfermagem da Clínica Obstétrica**, em especial a **Josefa**, pela ajuda com a coleta das amostras das gestantes.

À **Kelma**, pelos dias que passamos coletando amostras das mulheres nos lugares mais inusitados.

Ao **Amadeu**, pelas inúmeras ligações me avisando da realização de procedimentos.

Aos funcionários do laboratório de Virologia - **Luciano, Débora, Sônia e Maria**, por sempre estarem prontos pra ajudar quando precisei.

A todos os **médicos assistentes e residentes** da Clínica Obstétrica pela colaboração com a coleta das amostras de líquido amniótico do projeto.

A todos os funcionários da Secretaria e da Informática do Departamento de Obstetrícia (**Willian, Allan, Inez, Miriam, Cláudia e Adriana**).

À **FAPESP**, pelo auxílio pesquisa e pela bolsa de mestrado concedidos.

A todos os **voluntários**, que, literalmente, deram seu sangue para este projeto, e, sem o qual, não poderia ser realizado.

Às pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, e com meu desenvolvimento científico e intelectual, minha sincera gratidão.

Ao meu namorado **Lucas**, uma pessoa que admiro imensamente, e que, por também ser um pesquisador, compartilha comigo e compreende todas as dificuldades dessa jornada. Sou muito feliz por crescermos e amadurecermos juntos durante esses últimos cinco anos. Sua importância em minha vida não pode ser medida.

E finalmente, à minha **família**, toda ela! Sobretudo à minha querida irmãzinha **Patrícia**, pela amizade e companheirismo. Um agradecimento em especial aos meus pais, que tanto admiro e que são a base da minha vida. À minha mãe **Celí**, pelo apoio, carinho e amor incondicional. Ao meu pai **João**, por sempre incentivar a pesquisa, por se interessar por cada detalhe de meu trabalho, e por todo seu amor. Sei que vocês torceram, vibraram e se orgulharam a cada conquista.

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	7
2.1 Ácidos nucléicos livres na circulação sanguínea.....	7
2.1.1 Biologia.....	11
2.2 Detecção de aneuploidias cromossômicas.....	16
2.2.1 Abordagem SNP/mRNA.....	18
2.2.2 SNPs.....	21
3 OBJETIVOS.....	24
4 MÉTODOS.....	26
4.1 Casuística.....	26
4.1.1 Cálculo do tamanho amostral.....	28
4.2 Métodos.....	28
4.2.1 Coleta e processamento das amostras de sangue.....	29
4.2.2 Extração de DNA genômico.....	29
4.2.3 Determinação da concentração e pureza do DNA extraído.....	30

4.2.4 Desenho dos iniciadores	30
4.2.5 Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39
4.2.6 Identificação dos produtos de PCR por eletroforese em gel de agarose.....	39
4.2.7 Purificação do produto amplificado.....	40
4.2.8 Semi-quantificação do produto de PCR purificado.....	40
4.2.9 Reação de sequenciamento	41
4.2.10 Precipitação do produto do sequenciamento com isopropanol.....	42
4.2.11 Leitura no sequenciador	43
4.2.12 Análise das sequências	43
4.2.13 Análise Estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	47
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES.....	68
8 Anexos	70
8.1 Termo de Consentimento Livre e esclarecido.....	70
8.2 Aprovação CapPesq.....	73
8.3 Aprovação CEP IMT-USP	74
8.4 Tabela com resultados dos SNPs	75
9 Referências	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ilustração esquemática da abordagem SNP/mRNA, adaptada de Lo *et al.*, 2007..... 19
- Figura 2.** Representação gráfica da distribuição das raças ou cor dos voluntários do estudo “Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 na população brasileira”, realizado na cidade de São Paulo no período de agosto de 2009 a novembro de 2010..... 27
- Figura 3.** Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 1 de (banda 568 pares de bases),que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases..... 33
- Figura 4.** Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 2 (banda de 452 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases..... 33
- Figura 5.** Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 3 (banda de 651 pares de bases),que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases..... 33
- Figura 6.** Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 4 (banda de 352 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases..... 34
- Figura 7.** Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 5 de 476 pares de bases, que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases..... 34
- Figura 8.** Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 6 (banda de 462 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases..... 34
- Figura 9.** Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 7 (banda de 475 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases..... 35

Figura 10. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 8 (banda de 643 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases.....	35
Figura 11. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 9 (banda de 735 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases.....	36
Figura 12. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 10 (banda de 515 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases.....	36
Figura 13. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 11 (banda de 750 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases.....	36
Figura 14. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor concentração de DNA para o fragmento 4 (banda de 352 pares de bases) testada a 100 ng e 25 ng. 100 pb , padrão de peso molecular de 100 pares de bases.....	37
Figura 15. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a amplificação do fragmento 8 de (banda de 643 pares de bases), a uma temperatura de anelamento de 63,3 °C, de produtos de PCR de 4 indivíduos de raças diferentes (B = Branca, O = Oriental, P = Parda e I = Indígena) . 100 pb , padrão de peso molecular de 100 pares de bases.....	38
Figura 16. Relatório geral de qualidade mostrando as amostras sequenciadas e atribuição da qualidade conferida a cada uma de acordo com os parâmetros definidos pelo programa (coluna trace score). A atribuição de uma cor vermelha a uma amostra representa baixa qualidade de sequência, a cor amarela média qualidade e a cor azul, alta qualidade de sequência. Na coluna com a sigla CRL estão expressos os tamanhos dos fragmentos sequenciados de cada amostra	44
Figura 17. Cromatograma (representação gráfica de uma sequência) obtido de uma das amostras sequenciadas. O nucleotídeo A está representado em verde, T em vermelho, C em azul e G em preto.....	44
Figura 18. Visualização de toda a sequência obtida de uma das amostras sequenciadas. As cores atribuídas a cada nucleotídeo representam a confiabilidade da leitura de cada um deles (azul = confiabilidade alta, amarelo = confiabilidade média, vermelho = baixa confiabilidade)	45
Figura 19. Gene PLAC4 e os fragmentos selecionados para serem sequenciados no estudo (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), com seus respectivos tamanhos em pares de bases (pb) e localização no gene	48

- Figura 20.** Exemplo de cromatogramas de homozigoto selvagem (CC), homozigoto mutante (TT) e heterozigoto (CT) do SNP rs61736857 (C = citosina, T = Timina). A seta preta indica o sítio do SNP..... 50
- Figura 21.** Gráfico representativo da porcentagem dos genótipos de cada SNP, cuja frequência do genótipo heterozigoto foi superior a 25%..... 56
- Figura 22.** Representação gráfica da Comparação da distribuição percentual da população segundo a cor ou raça, entre os voluntários deste estudo e os indivíduos de todo o Brasil inclusos no último censo do IBGE (2010) 61
- Figura 23.** Representação gráfica da Comparação da distribuição percentual da população segundo a cor ou raça, entre os voluntários deste estudo e indivíduos da Região Metropolitana do Estado de São Paulo inclusos no último censo do IBGE (2010) 62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista dos fragmentos de interesse do gene PLAC4 definidos pelos iniciadores desenhados com o auxílio do programa Primer 3	31
Tabela 2. Lista de iniciadores selecionados para o sequenciamento, com seus tamanhos em pares de bases (pb) e suas temperaturas de anelamento	47
Tabela 3. SNPs que já foram descritos no “GenBank” que estão localizados nos fragmentos selecionados para o sequenciamento	49
Tabela 4. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 1	52
Tabela 5. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 2	52
Tabela 6. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 3	53
Tabela 7. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 4	53
Tabela 8. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 5	54
Tabela 9. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 6	54
Tabela 10. Frequência dos genótipos do SNP localizado no fragmento 7	55
Tabela 11. Resultados do sequenciamento de todos os voluntários do estudo para cada um dos SNPs analisados (A = adenina, C = citosina, G = guanina, T = timina, M = A ou C, Y = T ou C, R = A ou G, S = C ou G, W = A ou T). Em amarelo estão destacados os indivíduos que não são heterozigotos para nenhum SNP analisado	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%: percentagem

°C: Graus Celsius

µg: micrograma

µL: microlitro

a: amperes

A: nucleotídeo adenina

AFP: alfa feto proteína

C: nucleotídeo citosina

C21orf105: nome do gene em inglês *Chromosome21 Open ReadinG Frame 105*

CAPPesq: Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

ddNTP: dideoxynucleotídeo trifosfato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: deoxynucleotídeo trifosfato

DSCR4: região crítica da síndrome de Down 4 (*Down Syndrome Critical Region 4*)

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

G: nucleotídeo guanina

HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

hPL: lactogênio placentário humano

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IMT: Instituto de Medicina Tropical

MALDI-TOF: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight*

mL: mililitro

mM: milimolar

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro

nm: nanômetro

PAPP-A: proteína plasmática A associada à gestação

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

PLAC4: nome do gene em inglês *Placenta-Specific 4*

Pmol: picomol

q.s.p: quantidade suficiente para

Qext: *Quencher Extension*

Rh: antígeno Rhesus

RNA: ácido ribonucleico

RNase: ribonuclease

SERPINB2: nome do gene em inglês *serpin peptidase inhibitor, clade B (ovoalbumin), member 2*

SNP: polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

T: nucleotídeo timina

TA: temperatura ambiente

TAE: tris acetato EDTA

Tm: temperatura de anelamento (*melting*)

U: unidade

USP: Universidade de São Paulo

V: volts

x g: força centrífuga gerada em unidades de gravidade

β-hCG: subunidade β da gonadotrofina coriônica humana

Resumo

RESUMO

Renata MR. *Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 na população brasileira* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Duzentas amostras de DNA obtidas de voluntários brasileiros não aparentados foram triadas para SNPs em uma região de 4079 pares de bases do gene PLAC4 através de reação em cadeia da polimerase (PCR) - utilizando o kit Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen, USA) ciclada em termociclador Eppendorf Mastercycle Gradient (Eppendorf, Germany); e posterior sequenciamento - utilizando o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Applied Biosystems, USA) corrida em sequenciador ABI 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA). Sete fragmentos foram amplificados utilizando pares de iniciadores desenhados com o auxílio do programa Primer 3 baseado em uma sequência do gene PLAC4 obtida do "GenBank". Dez SNPs com taxa de heterozigotidade superior a 25% foram identificados, localizados em seis dos sete fragmentos estudados, que fazem a cobertura de 93% da população brasileira. Um painel combinando estes 10 SNPs apresenta potencial utilidade clínica em um teste pré-natal não invasivo da síndrome de Down fetal baseado na abordagem SNP/mRNA.

Descritores: Diagnóstico pré-natal; Trissomia do 21; Plasma; RNA/sangue; Polimorfismo de um único nucleotídeo; Brasil.

Summary

SUMMARY

Renata MR. *Investigation of PLAC4 gene polymorphisms in the Brazilian population* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011

Two hundred DNA samples obtained from unrelated Brazilian individuals were screened for SNPs in a region of 4079 bp of the exon of PLAC4 gene by polymerase chain reaction (PCR) - using Taq Platinum DNA polymerase kit (Invitrogen, USA) cycled on Eppendorf Mastercycle Gradient thermocycle (Eppendorf, Germany); and subsequent sequencing – using Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 kit (Applied Biosystems, USA) on ABI 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems, USA). Seven fragments were amplified using primer pairs designed by primer 3 software based on PLAC4 sequence obtained from “GenBank”. Ten SNPs with heterozygosity rate above 25% were identified, located in six of the seven fragments studied, that covers up to 93% of Brazilian population. A panel combining this 10 SNPs show potential utility in clinical setting for a noninvasive prenatal diagnostic test for Down syndrome based in the SNP/mRNA approach.

Descriptors: Prenatal diagnosis; Trisomy 21; Plasma; RNA/blood; Single Nucleotide Polymorphism; Brazil.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A investigação de doenças genéticas fetais pode ser oferecida no pré-natal. A triagem dessas doenças consiste na realização de exames ultrassonográficos e na análise de proteínas fetais no sangue materno durante a gestação. Porém esses exames não confirmam o diagnóstico, eles fornecem apenas uma estimativa dos riscos do feto possuir uma determinada doença genética. Isso acontece porque estes exames avaliam os fenômenos associados a cada doença genética, como aumento da translucência nucal ou outras malformações à ultrassonografia, e alterações nas concentrações de gonadotrofina coriônica humana (β -hCG), alfa-feto proteína (AFP), estriol e proteína plasmática A associada à gestação (PAPP-A) no sangue materno. Somente quando os riscos estão aumentados para uma determinada doença, é oferecido o diagnóstico definitivo, que é feito através da análise de células fetais obtidas através de procedimentos invasivos, como amniocentese e biópsia de vilo corial. Embora esses procedimentos sejam o padrão ouro para o diagnóstico pré-natal, eles estão associados a risco de aborto ou dano ao feto, o que leva algumas gestantes a recusarem sua realização.

Há várias décadas, cientistas em todo o mundo dedicam-se ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos de diagnóstico pré-natal não invasivo. Desde o final do século XIX sabe-se que células fetais circulam no sangue materno ¹. Como essas células contêm todo o genoma fetal (todos os cromossomos), elas são um importante alvo para o diagnóstico não invasivo, pois, em teoria, poderiam ser isoladas de uma amostra de sangue materno sem a necessidade de invasão da cavidade uterina, e com apenas uma célula é possível investigar tanto doenças monogênicas como doenças cromossômicas.

Porém, dois grandes motivos impedem sua implantação na prática clínica. O primeiro é que é muito difícil fazer o isolamento dessas células, uma vez que elas estão presentes em quantidades ínfimas. Bianchi *et al.* demonstraram que a média da concentração das células fetais no segundo trimestre de gestação é de 1,2 células por mililitro de sangue materno. Para fazer seu enriquecimento, é necessário um volume muito grande de sangue materno e procedimentos extremamente trabalhosos, pois ainda não foi encontrado um marcador específico para elas ². O segundo motivo é que essas células permanecem na circulação materna após o parto. Bianchi *et al.* isolaram células fetais da circulação materna 27 anos após o parto ³. Isso pode levar a resultados falso-positivos nas gestações subsequentes, pois não é possível saber se a célula isolada é proveniente do feto em questão, do feto anterior ou abortamento anterior.

Em 1997, Lo *et al.*, descobriram que sequências de ácidos desoxirribonucleicos (DNA) livres provenientes do feto eram liberadas para a circulação sanguínea materna como consequência normal da fisiologia placentária, e seu grupo conseguiu isolar e amplificar essas sequências utilizando técnicas de biologia molecular (PCR convencional) ⁴. Posteriormente, eles verificaram que essas sequências estavam presentes em quantidades consideráveis no plasma materno (cerca de 6% do DNA livre circulante total no primeiro trimestre de gestação) quando comparadas às quantidades de células fetais, e verificaram também que essas sequências eram completamente eliminadas da circulação materna após o parto ⁵. Isso ampliou as possibilidades de desenvolvimento de técnicas de diagnóstico pré-natal não invasivo, fornecendo uma nova ferramenta alvo de pesquisa, uma vez que este tipo de material genético proveniente do feto pode ser isolado e analisado facilmente, é obtido de uma forma que não oferece riscos de aborto (através da simples coleta de uma amostra de sangue periférico materno), e não permanece na circulação materna após o parto.

Em todos os indivíduos, 99,9% das sequências de DNA humano são idênticas ⁶. Por causa disso, um problema com a utilização de sequências de DNA livre fetal é que as mesmas sequências de DNA livre da mãe e do feto circulam no plasma materno, impossibilitando afirmar se o DNA livre isolado do plasma materno é de origem materna ou fetal. Só é possível distinguir entre material genético fetal e materno quando o feto possui alguma sequência de DNA que está ausente no genoma materno. Alguns exemplos disso são: sequências do cromossomo Y provenientes de fetos do sexo masculino; sequências do gene Rhesus D provenientes de fetos Rh positivos, quando sabe-se que a mãe é Rh negativo; sequências que possuem mutações causadoras de doenças monogênicas de origem paterna, quando há conhecimento prévio dos genótipos de ambos os progenitores.

A análise de DNA livre fetal para determinação do sexo fetal ⁷, do Rh fetal ⁸, e do genótipo fetal para algumas doenças monogênicas - como doença de Huntington ⁹, acondroplasia ¹⁰ e distrofia miotônica ¹¹; já está consolidada na prática clínica. Surgem a cada dia novas ferramentas que aumentam a segurança desses testes, como a utilização de controles internos para evitar resultados falso-negativos quando o diagnóstico é concluído pela exclusão da detecção de determinada sequência de DNA livre fetal, como acontece no diagnóstico de fetos do sexo feminino ou fetos Rh negativo ¹².

Contrariando os conhecimentos a respeito da fragilidade da molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), o mesmo grupo de cientistas conseguiu isolar também RNA livre do plasma materno ¹³. Esta surpreendente estabilidade das moléculas de RNA livre foi posteriormente explicada por sua ligação às proteínas nucleares (os nucleossomos), que as protegem da degradação pelas inúmeras enzimas (RNases) presentes na circulação sanguínea ^{14,15}. A análise de RNA livre fetal representa uma vantagem sobre a análise do DNA livre fetal, pois permite a investigação da expressão

gênica do feto. Cada tecido do nosso corpo expressa um perfil individual de RNAs mensageiros (mRNAs). A placenta é um tecido derivado do feto, portanto os mRNAs expressos por ela não são expressos por mais nenhum outro tecido do organismo, sendo completamente específicos do feto.

A síndrome de Down é a aneuploidia compatível com a vida mais comum. Sua incidência é de um a cada 600 nascimentos, e aumenta com o avanço da idade materna. Por ser a síndrome mais incidente, sua investigação é o principal motivo pelo qual as gestantes procuram os serviços de diagnóstico pré-natal. Porém, ainda não existe um teste de diagnóstico não invasivo para esta, ou qualquer outra aneuploidia cromossômica.

Esta síndrome é causada pela presença de uma cópia extra do cromossomo 21. Em teoria, as quantidades de sequências de mRNAs codificadas por genes localizados no cromossomo 21 expressas por tecidos placentários estariam aumentadas no plasma de gestantes de fetos com a doença, refletindo a presença da cópia extra deste cromossomo no feto. Para testar esta hipótese, alguns grupos selecionaram mRNAs que são codificados por genes localizados no cromossomo 21 e expressos pela placenta (como o C21orf105, o PLAC4, o β -hCG e o PAPP-A), e compararam suas quantidades no plasma de gestantes de fetos normais e de fetos com a síndrome. Todos eles encontraram resultados semelhantes, uma grande sobreposição nos valores entre os dois grupos estudados, o que impossibilita a utilização de sua quantificação direta para o diagnóstico da síndrome de Down ¹⁶⁻¹⁸.

A abordagem da razão entre os alelos de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) localizados em mRNAs expressos por tecido placentário (SNP/mRNA) descrita por Lo *et al.*, trouxe nova perspectiva a este assunto, já que a partir dela foi possível prever o número de cromossomos que o feto possui, sem depender da quantificação

direta de mRNAs expressos pela placenta. Esta abordagem é baseada em um feto heterozigoto para um dado SNP localizado no cromossomo de interesse e expresso por tecidos placentários, que possui dois alelos passíveis de serem distintos. Se o feto for euplóide e heterozigoto (contendo duas cópias do cromossomo de interesse), a razão entre a quantidade dos dois alelos deste SNP será 1:1. Se um feto possuir trissomia do cromossomo 21, por exemplo, e for heterozigoto para o SNP localizado no mRNA transcrito do cromossomo 21, a razão entre a quantidade dos alelos deste SNP será 1:2 ou 2:1. O grupo alcançou sensibilidade de 90% e especificidade de 96,5% utilizando apenas um SNP ¹⁸.

Como este método de diagnóstico requer que o feto seja heterozigoto para o SNP investigado, é necessário que se conheçam quais os polimorfismos mais comuns na população em que se deseja implantar o teste, uma vez que a taxa de heterozigotidade dos SNPs varia entre diferentes populações étnicas. Um determinado polimorfismo pode não ser informativo para todos os indivíduos, portanto o teste não pode estar focado em um único marcador polimórfico, é necessário que se crie um painel de marcadores para garantir que pelo menos um deles será informativo para um determinado indivíduo da população.

Nosso grupo pretende implantar um teste de diagnóstico da trissomia do cromossomo 21 baseado na abordagem SNP/mRNA no futuro. Sendo um pré-requisito para este teste, o principal objetivo deste trabalho foi descrever os polimorfismos localizados no gene PLAC4 que possuem as maiores taxas de heterozigotidade na população brasileira.

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta linha de pesquisa é relativamente recente, para introduzi-los no assunto, a seguir faremos uma revisão dos artigos que foram publicados até o presente momento, que englobará a biologia desses novos marcadores (mecanismos de liberação, a origem e o metabolismo), e as diferentes metodologias baseadas na abordagem SNP/mRNA.

2.1 ÁCIDOS NUCLÉICOS LIVRES NA CIRCULAÇÃO SANGUÍNEA

Embora a maior parte do DNA humano esteja localizada dentro das células, a presença de pequenas quantidades de DNA extracelular na circulação de indivíduos saudáveis e doentes foi primeiramente descrita em 1948 ¹⁹. Apesar de ter sido uma descoberta inovadora, não foi dada muita atenção a ela até 1966, quando Tan *et al.* demonstraram a presença de DNA extracelular no soro e plasma de pacientes afetados por lúpus eritematoso sistêmico ²⁰. Como o DNA extracelular pôde ser detectado também em outras doenças associadas à destruição de tecidos (hepatites, carcinoma metastático e tuberculose miliar), os autores propuseram que o DNA extracelular é originado pela destruição de tecidos endógenos.

Devido ao crescimento agressivo dos tumores, o câncer também é uma doença associada à destruição de tecidos. Em 1977, Leon *et al.* descreveram a presença de grandes quantidades de DNA extracelular de tumor no soro de pacientes com câncer de pâncreas ²¹. O achado mais interessante e curioso deste trabalho foi que os níveis de DNA extracelular diminuíram após a quimioterapia.

Somente nos anos 90, após a detecção de mutações em genes relacionados a tipos específicos de câncer (chamados de oncogenes), como a mutação K-*ras* do câncer de pâncreas ²², a mutação N-*ras* da leucemia mielóide aguda e síndrome mielodisplásica ²³, entre outras, os ácidos nucléicos livres foram reconhecidos como potenciais marcadores precoces de alguns tipos de câncer. E, graças ao avanço da tecnologia na biologia molecular, foram desenvolvidas técnicas sensíveis para a detecção de quantidades mínimas de ácidos nucléicos em plasma ou soro.

Trabalhando em um centro de câncer e a par das similaridades entre o crescimento agressivo da unidade feto-placentária e tumores (ambos são imunologicamente “estranhos” e estão em contato direto com o sistema vascular de seus hospedeiros), Lo *et al.* inicialmente questionaram se DNA fetal também estaria presente no soro e plasma de gestantes. Utilizando amplificação por PCR convencional de sequências de DNA específicas do cromossomo Y e eletroforese em gel de agarose, sua equipe foi capaz de detectar DNA fetal em amostras de soro e plasma de mulheres grávidas de fetos do sexo masculino. ⁴

Com o desenvolvimento subsequente da técnica de PCR em tempo real, o mesmo grupo conseguiu medir a concentração do DNA fetal livre no plasma materno. Eles utilizaram sequências do gene da β -globina no soro e plasma materno para medir a quantidade total de DNA extraído, tanto materno como fetal, e verificaram que a fração da quantidade de DNA fetal no início da gestação é de 0,014–0,54% (média de 0,13%) em soro e 0,39–11,9 % (média de 3,4 %) em plasma, e no final da gestação é de 0,032–3,91 (média de 1%) em soro e 2,33–11,4% (média de 6,2%) em plasma. A concentração absoluta de DNA fetal foi a mesma tanto no soro como no plasma. A grande diferença foi a presença de altas quantidades de *background* de DNA materno no soro (liberado pelo processo de coagulação) comparado ao plasma. As altas concentrações de DNA

fetal permitiram a detecção dos genes SRY do feto em plasma ou soro materno de todas as gestações de fetos do sexo masculino.⁵

Como a mãe e o feto compartilham a maior parte das sequências de DNA livre que circulam no plasma materno, só é possível afirmar que o material genético isolado do plasma materno é de origem fetal quando ele possuir alguma sequência que estiver ausente no genoma materno.

Cada célula nucleada do organismo humano contém cerca de 25.000 genes²⁴. Entretanto, nem todos os genes estão ativos em uma célula em particular. Nos genes ativos, o DNA é transcrito em RNA mensageiro para depois ser traduzido em proteínas²⁵. Cada um dos tecidos do nosso organismo possui um conjunto característico de genes ativos, que serão responsáveis pela produção das proteínas específicas que os compõem, portanto, cada tecido possui a sua “marca”, ou seja, transcritos (mRNAs) que são expressos exclusivamente por eles.

Ribonucleases (RNases) estão presentes no plasma e soro, tanto de indivíduos saudáveis como doentes, estando presente em maiores quantidades em indivíduos com alguns tipos de cânceres. O fato de que RNA fetal livre foi isolado do plasma de gestantes foi extremamente surpreendente, dada a sua grande propensão à degradação por essas enzimas¹³. Foi demonstrado que o RNA livre está associado a partículas subcelulares de diferentes tamanhos¹⁵. Sugere-se que essa associação do RNA a partículas é feita durante o processo de apoptose, principalmente à proteínas nucleares (nucleossomos). Tais partículas conferem uma proteção contra o ataque das RNases e contribuem para a estabilidade do RNA fetal livre¹⁴.

Ng *et al.* identificaram e quantificaram os níveis de transcritos de dois genes que são expressos pela placenta, o lactogênio placentário humano (hPL) e a subunidade β

da gonadotrofina coriônica humana (β -hCG). Eles verificaram que existe correlação entre variações nos níveis plasmáticos individuais desses mRNAs e variações nos níveis de suas proteínas correspondentes no decorrer da gestação. Portanto, a análise desses transcritos fornece informações precisas sobre a expressão de genes fetais pela placenta. ²⁶

Trabalhos subsequentes destacaram alguns transcritos expressos pela placenta que estão localizados em cromossomos de interesse para o diagnóstico de aneuploidias cromossômicas, como o C21orf105 ²⁷, PLAC4 ¹⁸, *placenta-derived hypomethylated* DSCR4 ²⁸ do cromossomo 21, o SERPINB2 do cromossomo 18 ²⁹, entre outros.

Além de ser uma potencial ferramenta de diagnóstico, o RNA mensageiro fetal no sangue materno pode fornecer informações importantes sobre o desenvolvimento funcional do feto em tempo real. A análise da expressão gênica representa uma oportunidade não só para estudar a regulação gênica, mas também todas as vias envolvidas na fisiopatologia de certas condições fetais ³⁰. Maron *et al.* identificaram alguns transcritos fetais em sangue materno no terceiro trimestre de gestação, e a maioria dos transcritos dessa idade gestacional sugerem que o feto está passando por um processo que o prepara para deixar o ambiente uterino, devido ao desenvolvimento de suas vias visuais, vias olfativas, sistema imune e sistema nervoso ³¹. Uma vez que os transcritos mais importantes de cada fase da gravidez forem identificados, eles poderão ser incorporados em um painel de investigação do bem estar fetal em cada fase da gestação ³⁰.

Mais recentemente, vem sendo especulado que os ácidos nucléicos livres, principalmente os microRNAs, sejam um veículo de comunicação entre a mãe e o feto, pois eles foram encontrados dentro de exossomos, que são os mediadores da comunicação intercelular ³². Como a principal função dos microRNAs é a regulação da

expressão gênica, sendo essas moléculas transportadas pelos exossomos através da circulação sanguínea para outros tecidos, elas podem alterar a expressão gênica e influenciar o fenótipo desses tecidos. O estudo desse tipo de ácido nucléico pode ajudar a compreender melhor a fisiologia da gestação.

2.1.1 BIOLOGIA

2.1.1.1 MECANISMO DE LIBERAÇÃO

A apoptose é a forma mais comum de morte celular que acontece durante toda a vida, desde os estágios iniciais da embriogênese até a morte. Como 10^{11} a 10^{12} células dividem-se diariamente no corpo humano, a mesma quantidade de células deve ser perdida para garantir a homeostase dos tecidos. Então, é esperado que cerca de 1 a 10g de DNA sejam degradados por dia nos seres humanos. Devido a essa grande renovação, parte do DNA que escapa à clivagem/degradação final a mono ou oligonucleotídeos, é liberado para a circulação sanguínea na forma de DNA livre.³³

Durante a apoptose, após a clivagem do DNA e a condensação da cromatina, o núcleo e as células são fragmentados em pedaços menores de tamanhos variáveis e envolvidos por membrana, formando os corpos apoptóticos. Células em apoptose e corpos apoptóticos são reconhecidos por macrófagos ou células vizinhas, fagocitados e digeridos. As chances desses pequenos corpos apoptóticos escaparem à fagocitose e aparecerem na corrente sanguínea são muito maiores do que as de células inteiras escaparem à fagocitose, por isso há muito mais ácidos nucléicos fetais livres do que células fetais intactas na circulação de gestantes.³⁴

Utilizando acridina laranja para marcar ácidos nucleicos, Orozco *et al.* isolaram material positivo para ácidos nucleicos da fração acelular do plasma colhido de

gestantes de fetos do sexo masculino, entre 12 e 16 semanas de gestação, através de citometria de fluxo. Eles demonstraram que corpos apoptóticos estão presentes no plasma materno e, além disso, conseguiram amplificar sequências de genes localizados no cromossomo Y desses corpos apoptóticos.³⁵

Os corpos apoptóticos são caracterizados por conter em seu interior os nucleossomos, que são compostos por um octâmero de histonas central (proteínas nucleares) envolto por DNA de 180-200 pares de bases³⁶. Corpos apoptóticos, geralmente, contêm tanto DNA quanto RNA, mas nunca os dois simultaneamente³⁷.

2.1.1.2 ORIGEM

Nem todos os tecidos do organismo têm contato íntimo com a circulação sanguínea ou renovam-se com a mesma frequência e intensidade. Células epiteliais geralmente possuem índices maiores de mitose e apoptose do que as células que compõem os órgãos sólidos. Entretanto, isto não significa que o DNA epitelial seja mais bem representado no sangue. Em muitos órgãos tubulares, como intestino delgado, cólon ou pulmão, as células diferenciadas em processo de morte são liberadas diretamente no lúmen, conforme as vilosidades da mucosa vão sendo continuamente regeneradas. Queratinócitos mortos são continuamente perdidos na superfície da pele. Similarmente, células em processo de morte são eliminadas nas mucosas bucal e nasal, entre outras. Esses processos diminuem a probabilidade de que o DNA de tais células apareça na corrente sanguínea.³⁸

O tipo de tecido que possui maior contato com a circulação sanguínea é o tecido sanguíneo propriamente dito. Quando as células do sangue são destruídas, elas entram em apoptose na própria circulação, o que facilita a liberação do DNA e do RNA fragmentado de seus núcleos.

Cientistas realizaram um trabalho com pacientes femininas que receberam transplante de medula óssea de doadores do sexo oposto. Os autores encontraram sequências do cromossomo Y no plasma e soro dessas pacientes, o que confirma que a origem do DNA circulante é predominantemente do doador da medula, ou seja, o DNA livre tem origem hematopoiética em indivíduos saudáveis ³⁹.

Durante a gestação, o tecido fetal que fica em contato direto com a circulação sanguínea materna é a placenta, que é o órgão que conecta o feto em desenvolvimento ao organismo materno para permitir a entrada de nutrientes, eliminação de excretas e as trocas gasosas. Ela é composta por uma parte materna - a decídua (nome que o endométrio recebe durante a gravidez); e por uma parte fetal - a placa coriônica (que contém as vilosidades coriônicas). Entre essas duas partes é formada uma lacuna, chamada de espaço intervilo, que é preenchida por sangue materno. A camada mais externa da placa coriônica é revestida por células chamadas de trofoblastos, que ficam em contato direto com o sangue materno.

Os trofoblastos são a maior fonte de ácidos nucleicos fetais na circulação materna, os quais são liberados através da apoptose durante o crescimento e remodelamento placentário. A seguir estão listados alguns estudos que comprovam este fato:

- Sekizawa *et al.* detectaram concentrações elevadas de DNA fetal livre no plasma materno em mulheres com placenta prévia, particularmente naquelas com placenta invasiva ⁴⁰. Nesses casos, os trofoblastos que invadem o miométrio são atacados pelo sistema imune materno, resultando em níveis aumentados do DNA fetal livre no plasma.
- Jimbo *et al.* publicaram um estudo de caso de placenta increta, onde uma pequena parte da placenta permanece aderida ao útero após o parto. O

monitoramento pós-parto do plasma materno demonstrou que o DNA fetal livre foi detectado nas 10 semanas subsequentes, tempo em que a placenta permaneceu aderida ao útero. Após a expulsão da placenta, os níveis de DNA fetal livre tornaram-se indetectáveis. Esse resultado indica que o DNA fetal livre no plasma de pacientes com retenção de tecidos placentários após o parto reflete a destruição dos trofoblastos ⁴¹.

- Flori *et al.* publicaram um estudo de caso a respeito do mosaicismismo confinado ao feto. Em uma gestante carregando feto do sexo masculino, sequências do gene SRY não foram detectadas em seu plasma, apesar da visualização da genitália masculina por ultrassonografia. Foi feita a cultura de trofoblastos com posterior realização do cariótipo dessas células, indicando 45, X0. Foi feita também cultura de todos os tecidos fetais estudados, e o cariótipo indicou 45, X0 / 46, Xidic (Yp) nesses tecidos. A presença de sequências do cromossomo Y em todos os tecidos fetais, e sua ausência nos trofoblastos e na circulação materna indica que o DNA fetal livre origina-se dos trofoblastos ⁴².
- A taxa de apoptose dos trofoblastos das vilosidades coriônicas varia de acordo com o avanço da idade gestacional, e encontra-se aumentada em doenças que causam sofrimento placentário ⁴³. A maior detecção de ácidos nucleicos livres na pré-eclampsia corrobora com a hipótese de essas células serem as maiores responsáveis pela liberação dos ácidos nucleicos fetais, uma vez que a pré-eclampsia está associada ao sofrimento placentário ⁴⁴.
- Guibert *et al.* realizaram um estudo com 22 mulheres que conceberam utilizando tecnologias de reprodução artificial, onde sequências do gene SRY fetais foram detectadas em amostras de soro de todas as gestantes que carregavam pelo menos um feto do sexo masculino. Este estudo demonstrou que o DNA fetal livre é detectado na circulação materna a partir do 18º dia após

a concepção em gestações gemelares e a partir do 22º dia em gestações únicas. A circulação feto-placentária completa só é estabelecida entre o 28º e o 30º dia após a concepção. Esse resultado implica que o DNA fetal livre pode ser encontrado na circulação materna mesmo antes que a circulação materno-fetal seja estabelecida, o que fornece mais evidências de que o DNA fetal livre é liberado pelo trofoblasto ⁴⁵.

- Alberry *et al.* detectaram DNA livre fetal no plasma de mulheres com gestação anembrionada (presença do saco gestacional e trofoblasto, sem o feto) em níveis que não diferem daqueles encontrados em gestações normais no primeiro trimestre. ⁴⁶

2.1.1.3 METABOLISMO

O DNA fetal livre pode ser detectado a partir da sétima semana de gestação na circulação sanguínea materna e possui níveis indetectáveis 2 horas após o parto ⁴⁷. Lo *et al.* estudaram o *clearance* do DNA fetal circulante após o parto e verificaram que a meia-vida foi de 16,3 minutos ⁴⁷. O mRNA placentário pode ser detectado na plasma materno a partir da quarta semana de gestação e possui uma meia-vida média de 14,1 minutos ⁴⁸.

Pesquisadores especulam que, partindo do princípio que o parto não induz mudanças bruscas no *clearance* do DNA fetal, para a manutenção de um estado estável, o DNA fetal livre deve ser continuamente liberado para a circulação materna, a uma taxa de $2,24 \times 10^4$ cópias/minuto ⁵.

Diversos estudos confirmaram que os níveis de DNA fetal livre elevam-se no decorrer da gestação ⁴⁹⁻⁵². Mais precisamente, há um aumento de 21% por semana no primeiro trimestre ⁵³, um aumento menos severo no segundo trimestre, e um aumento

considerável nas oito últimas semanas de gestação, estando relacionado à destruição gradual da interface placentária materno/fetal que antecede o parto, onde a fração de DNA fetal é de 6,2%⁵. Além disso, os níveis de DNA fetal livre alteram-se após a realização de procedimentos invasivos. A punção, necessária para a obtenção de material fetal nestes procedimentos, rompe a barreira entre as circulações materna e fetal e aumenta artificialmente a quantidade de DNA fetal livre na circulação materna^{46, 54, 55}.

Diferentemente do DNA fetal livre, os níveis totais de mRNAs fetais livres não se alteram no decorrer da gestação. Nem mesmo os procedimentos invasivos afetam os níveis de mRNAs fetais⁵⁴.

2.2 DETECÇÃO DE ANEUPLOIDIAS CROMOSSÔMICAS

A maior dificuldade em criar um teste de diagnóstico não invasivo para a detecção de aneuploidias cromossômicas deve-se ao fato que as mesmas sequências de DNA do cromossomo em questão do feto e da mãe coexistem no plasma materno. Para fazer o diagnóstico é necessário diferenciar sequências fetais das sequências maternas, para sua posterior quantificação. Na tentativa de resolver estes problemas alguns cientistas sugerem algumas abordagens para isolar/enriquecer o DNA fetal:

- A utilização de modificações epigenéticas que resultam em diferenças de padrões de metilação de DNA entre a mãe e o feto.⁵⁶⁻⁵⁸
- A constatação que os fragmentos de DNA fetal livre são, geralmente, menores que os maternos pode ser utilizada como uma maneira de enriquecer o DNA fetal livre, através utilização de técnicas que isolem os fragmentos de acordo com seu tamanho.⁵⁹⁻⁶²

- Tratamento das amostras de sangue com formaldeído (composto químico que estabiliza a membrana das células impedindo sua lise), que diminui a liberação de DNA livre materno ⁶³⁻⁶⁷

Porém, cada um dos métodos propostos possui detalhes técnicos que ainda precisam ser aperfeiçoados.

Como dito anteriormente, é sabido que cada tecido no organismo possui um perfil característico de mRNAs. Em teoria, não haveria necessidade de enriquecimento se os ácidos nucleicos fetais alvo fossem apenas expressos pelo feto. Isso permitiria o isolamento seletivo, e, portanto, a análise seletiva de ácidos nucleicos fetais. A utilização de mRNAs expressos exclusivamente por tecidos de origem fetal (principalmente pela placenta), presentes na circulação materna e ausente no plasma de indivíduos não gestantes, os qualifica como marcadores específicos do feto e resolve o problema da contribuição do material genético de origem materna.

Oudejans *et al.* investigaram a presença de mRNAs em tecidos placentários, mais especificamente em sinciciotroblastos (que são as principais células que liberam ácidos nucleicos para a circulação). Eles verificaram que o LOC90625 (atualmente conhecido como C21orf105) foi o candidato mais promissor para ser utilizado no desenvolvimento de um teste de diagnóstico da trissomia do cromossomo 21 fetal. Isso porque o gene que codifica esse mRNA está localizado na região crítica da síndrome de Down do cromossomo 21, é transcrito de éxons localizados em diferentes blocos haplotípicos (separados por íntrons), e é detectado no plasma de mulheres grávidas ²⁷.

Este mesmo grupo quantificou o mRNA C21orf105 no plasma materno em gestações normais e em gestações afetadas pela trissomia do 21, verificando uma grande sobreposição nos valores das concentrações desse transcrito nos dois grupos, o

que limita a sensibilidade e especificidade do uso de sua quantificação direta na discriminação entre os casos euplóides e aneuplóides ¹⁷. Outros grupos encontraram resultados semelhantes na quantificação de diferentes transcritos placentários com características similares, em gestações normais e afetadas pela trissomia do cromossomo 21, como o mRNA PLAC4, o mRNA β -hCG e o mRNA PAPP-A ^{16,18}. Alguns cientistas sugerem que isto ocorre em consequência das variações individuais nas concentrações do DNA fetal livre, o que pode ser resultado do tipo étnico, do peso materno, entre outras ^{68,69}.

A descrição, por Lo *et al.* da abordagem da razão entre os alelos de polimorfismos de nucleotídeos únicos localizados em mRNAs expressos por tecido placentário (abordagem SNP/mRNA), trouxe nova perspectiva a esse assunto, já que a partir dela foi possível prever o número de cromossomos que o feto possui, sem depender da quantificação direta de mRNAs expressos pela placenta ¹⁸.

2.2.1 ABORDAGEM SNP/MRNA

A abordagem SNP/mRNA é baseada em um feto heterozigoto para um dado SNP localizado no cromossomo de interesse e expresso por tecidos placentários, que possui dois alelos diferentes e passíveis de serem distintos. Se o feto for euplóide (contendo duas cópias do cromossomo de interesse), a razão entre os dois alelos deste SNP será 1:1. Quando a placenta libera este mRNA para a circulação materna, a razão entre o mRNA placentário no plasma materno que é transcrito de cada um dos dois alelos também será 1:1. Se um feto possuir trissomia do cromossomo 21, por exemplo, e for heterozigoto para o SNP localizado no mRNA transcrito do cromossomo 21, a razão entre os alelos deste SNP será 1:2 ou 2:1 ¹⁸.

Neste estudo foi hipotetizado que a diferença na razão entre os alelos presentes no feto poderia ser medida no plasma de gestantes através de um mRNA transcrito do cromossomo 21 expresso pela placenta (PLAC4), utilizando-se a técnica de *primer extension* seguida da detecção dos produtos estendidos por espectrometria de massas (MALDI-TOF). Essa abordagem foi testada em tecidos placentários e amostras de plasma materno de grávidas de fetos euplóides e de fetos com trissomia do cromossomo 21 (figura 3). A sensibilidade na discriminação entre os casos e os controles foi de 90% e a especificidade foi de 96,5%, nas amostras de plasma materno, utilizando um único SNP. A abordagem SNP/mRNA possui, portanto, grande potencial, dada sua grande precisão.

Figura 1. Ilustração esquemática da abordagem SNP/mRNA, adaptada de Lo *et al.*, 2007 ¹⁸

Posteriormente, outros grupos também conseguiram alcançar o diagnóstico não invasivo da trissomia do cromossomo 21 a partir da abordagem SNP/mRNA, porém utilizando outras metodologias de detecção dos alelos do SNP, uma vez que a espectrometria de massas é uma metodologia que requer equipamentos altamente especializados e altos custos, o que pode ser um fator limitante da implementação em larga escala da abordagem SNP/mRNA.

A metodologia descrita para fazer esta abordagem foi inicialmente testada em amostras de tecido placentário, e somente aplicada ao plasma materno após a validação no tecido placentário. Alguns pesquisadores acreditam que, talvez métodos mais simples que já foram testados com sucesso em amostras de tecido placentário, possam se mostrar eficientes na análise do plasma materno. Esse é o caso do sistema *Transgenomic WAVE* e da técnica *Quencher Extension (Qext)*, utilizado por Go *et al.* para diagnosticar a trissomia do 21 em amostras de tecido placentário ⁷⁰. Posteriormente, este grupo aplicou a técnica em amostras de plasma materno (duas de fetos com trissomia do cromossomo 21 e três de fetos normais), onde todas as amostras com trissomia do cromossomo 21 puderam ser distinguidas das amostras normais, o que mostra a viabilidade da aplicação deste método no diagnóstico pré-natal não invasivo da trissomia do cromossomo 21 ⁷¹.

Uma maneira alternativa utilizada para a detecção dos alelos do SNP é a “Digital SNP-RNA”, um método que utiliza PCR digital para contar diretamente o número de cada um dos alelos presentes na amostra de plasma materno. Este método demonstrou-se preciso na classificação de fetos euplóides e fetos com trissomia do cromossomo 21 não invasivamente com amostra de plasma materno. ⁷²

Outro método de detecção dos alelos de SNPs é a RT-MLPA (*reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification*), seguida de eletroforese

capilar. O método mostrou-se eficiente na detecção da trissomia do cromossomo 21 fetal quando aplicado a amostras de mRNA fetal extraído de plasma materno, com sensibilidade de 92% e especificidade de 100%. Os autores concluíram que, devido a sua eficiência, o método é aplicável para o diagnóstico não invasivo da trissomia do cromossomo 21 na prática clínica.⁷³

Embora não seja dependente do sexo fetal, a abordagem SNP/mRNA é dependente de polimorfismos genéticos. A taxa de heterozigotidade varia bastante entre SNPs, e entre diferentes populações étnicas. O SNP rs8130833 do gene PLAC4 utilizado por Lo *et al.*¹⁸, possui uma taxa de heterozigotidade de 45% na população estudada (Chinesa). A cobertura de todos os indivíduos de uma população pode ser alcançada pela combinação de vários SNPs transcritos de diferentes genes do cromossomo em questão.

2.2.2 SNPS

Cada indivíduo, com exceção de gêmeos idênticos, possui um genoma único. Mesmo que 99,9% do genoma seja igual para todos os indivíduos, ainda restam 0,1 % de diferença nos 3,2 bilhões de pares de bases que compõe nosso genoma. Esse 0.1% é responsável por todas as variações entre os indivíduos, como cor dos olhos, formato do rosto, susceptibilidade a doenças, etc. Cerca de 90% dessas variações acontecem devido a substituições no DNA, onde somente uma base é alterada, conhecidas como polimorfismos de nucleotídeo único (SNP)⁶. A frequência em que cada um dos alelos do SNP aparece no genoma dos indivíduos varia em diferentes populações étnicas.

A investigação da taxa de heterozigotidade de SNPs do cromossomo 21 já foi realizada nas seguintes populações:

- Chinesa, onde foram encontrados sete SNPs em três diferentes genes do cromossomo 21 que cobrem até 90% da população estudada ¹⁸.
- Norte-americana, onde foram encontrados dez SNPs em diferentes genes do cromossomo 21, que cobrem até 95% da população estudada ⁷⁴.
- Holandesa, onde foram encontrados três SNPs em três diferentes genes do cromossomo 21, que cobrem até 85,1% da população estudada ⁷⁵.

A população brasileira é uma das mais heterogêneas de todo o mundo. Dada essa grande miscigenação, a investigação da frequência de SNPs a partir de nossa população, de forma a produzir um painel de SNPs, torna-se imprescindível para o desenvolvimento de um teste não invasivo para a trissomia do cromossomo 21.

Objetivos

3 OBJETIVOS

O principal objetivo do presente trabalho foi descrever a frequência dos alelos de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) de uma região de cerca de 4000 pares de bases do gene PLAC4, localizado no cromossomo 21, em indivíduos da população brasileira.

Objetivou-se também avaliar a porcentagem de cobertura da população brasileira utilizando-se os SNPs descritos para simulação de um teste de diagnóstico não invasivo da trissomia do cromossomo 21 durante a gestação.

Métodos

4 MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Este estudo prospectivo foi realizado com 200 voluntários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), no período de agosto de 2009 a novembro de 2010, que se encaixaram nos critérios descritos abaixo:

Critérios de Inclusão:

- Idade mínima 18 anos
- Nacionalidade brasileira
- Não possuir parentes já incluídos no estudo

Após esclarecimentos sobre a pesquisa, os indivíduos interessados em participar assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 8.1), o qual foi submetido e aprovado pela CAPPesq (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo 0789/08, anexo 8.2).

Juntamente com a aplicação do termo de consentimento, solicitou-se que cada voluntário fizesse uma autoclassificação em relação à sua raça ou cor da pele. A classificação da população brasileira por cor ou raça utilizada neste estudo seguiu os padrões do último Censo Demográfico, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e

Estatística (IBGE) em 2010 ⁷⁶, onde foi utilizado o seguinte conjunto de categorias: branca, preta, parda, oriental, e indígena.

Foram incluídos no estudo 111 indivíduos da raça branca (55,5%), 56 indivíduos da raça parda (28%), 24 indivíduos da raça preta (12%), sete indivíduos da raça oriental (4%) e um indivíduo da raça indígena (0,5%), descrito no gráfico da figura 2.

Figura 2. Representação gráfica da distribuição das raças ou cor dos voluntários do estudo "Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 na população brasileira", realizado na cidade de São Paulo no período de agosto de 2009 a novembro de 2010

4.1.1 CÁLCULO DO TAMANHO AMOSTRAL

A determinação do tamanho amostral foi realizada com base na estimativa da proporção populacional (p) de heterozigotidade de SNPs de 25%, com margem de erro (E) de 6%.

$$n = \frac{Z_{\alpha/2}^2 \cdot p \cdot q}{E^2}$$

Onde:

n = número de indivíduos da amostra

$Z_{\alpha/2}$ = valor crítico que corresponde ao grau de confiança desejado

p = proporção populacional de indivíduos que pertencem a categoria que estamos interessados em estudar (taxa de heterozigotidade de SNPs de 25%)

q = proporção populacional de indivíduos que não pertencem a categoria que estamos interessados em estudar ($q = 1 - p$)

E = Margem de erro ou erro máximo de estimativa – identifica a diferença máxima entre a proporção amostral e a verdadeira proporção populacional (p)

4.2 MÉTODOS

Todos os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMT-SP) sob

a supervisão do Dr. José Eduardo Levi e com a aprovação do comitê de ética em pesquisa do IMT-SP (nº 033/08, anexo 8.3).

4.2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Foram coletados cerca de 10mL de sangue periférico em tubo contendo anticoagulante EDTA, por punção da veia do braço. Logo após a coleta os tubos foram levados ao laboratório onde ficaram refrigerados até o momento da extração, que não ultrapassou sete dias do momento da coleta.

4.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

A extração do DNA foi realizada utilizando-se 500 µL de sangue total e o kit FlexiGene DNA (QIAGEN).

Para lisar as células, adicionou-se tampão de lise à amostra com posterior incubação. Os núcleos das células e mitocôndrias foram precipitados por centrifugação. Para liberar o DNA do núcleo e remover eficientemente contaminantes como proteínas, o precipitado foi ressuspensionado e incubado em tampão de desnaturação (que contém sais caotrópicos e Protease QIAGEN). O DNA foi precipitado pela adição de isopropanol, recuperado por centrifugação, lavado em solução de etanol 70%, seco e ressuspensionado em tampão de hidratação (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Seguiu-se protocolo recomendado pelo fabricante do kit.

4.2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO E PUREZA DO DNA EXTRAÍDO

Após a extração, verificou-se a concentração de DNA de cada uma das amostras através de medida espectrofotométrica no aparelho Eppendorf Biophotometer (Eppendorf). Foi feita uma diluição de 1:10 utilizando tampão de hidratação fornecido no kit de extração (5 µL de amostra e 45 µL de tampão). O tampão de hidratação foi utilizado para calibrar o espectrofotômetro. O aparelho forneceu a concentração do DNA em µg/mL e medidas das absorbâncias nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A pureza do DNA foi determinada calculando-se a razão entre a absorbância a 260 nm e a absorbância a 280 nm (A_{260}/A_{280}). Amostras puras de DNA devem ter uma razão A_{260}/A_{280} entre 1,7 e 1,9. Após determinada a concentração de DNA de cada amostra, elas foram diluídas a 50 ng/µL utilizando água deionizada e armazenadas a -20 °C até o preparo da reação.

Para as amostras em que a concentração do DNA foi inferior a 50 µg/mL e/ou a razão A_{260}/A_{280} desviou do intervalo 1,7 a 1,9, foi feita uma nova extração.

4.2.4 DESENHO DOS INICIADORES

Os iniciadores para a amplificação dos fragmentos de interesse foram desenhados com base nas sequências do gene PLAC4 disponíveis no “GenBank”, banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com a utilização do programa Primer3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>).

Foram utilizados os seguintes parâmetros para o desenho dos iniciadores:

- Porcentagem de CG: de 40% a 60%
- Temperatura de *melting* (T_m): de 50 °C a 65 °C
- Tamanho: de 18 a 25 pares de bases
- Não pareamento dos iniciadores senso e anti-senso entre si (*dimers*), e não emparelhamento dos iniciadores com eles mesmos (*self-dimers*)

A qualidade dos iniciadores foi verificada com o auxílio do programa Net Primer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/netprlaunch.html>).

A tabela 1 mostra o tamanho em pares de bases, a posição no gene PLAC4 e as sequências senso e anti-senso dos iniciadores desenhados para o estudo.

Tabela 1. Lista dos fragmentos de interesse do gene PLAC4 definidos pelos iniciadores desenhados com o auxílio do programa Primer 3

Fragmento	Tamanho (pb)	Posição no gene PLAC4	Sequência dos Iniciadores (5' → 3')
1	568	964 a 1531	Senso: TCTGCTTCAGCTTTGTGTGG Anti-senso: CAGCACCAAGATTTTCAGCA
2	452	1059 a 1961	Senso: TGCTGCTGAAAATCTTGGTG Anti-senso: TGGAAACAAGCCTCCATTTTC
3	651	2822 a 3472	Senso: GGAGACTGGAAGTGCTGCTC Anti-senso: TGCAGTGGCACAATCGTAAT
4	352	4235 a 4586	Senso: GGTGCAGAGTGAGGTGTCC Anti-senso: AGCCCAGGACACTGTTGAAT
5	476	7427 a 7902	Senso: AAAGGAGTTCAAGGGCCAA Anti-senso: TGGGATATGCTTAATGTGTGG
6	462	8142 a 8603	Senso: CAGTTTGACAGCACGCTAGA Anti-senso: TGCCTAACTGCTCTGGTGAGA
7	475	9461 a 9935	Senso: CATTAGGGAATTGGCGAGAA Anti-senso: GGAAGAGTAACTAGGCTTTTGC
8	643	1111 a 1735	Senso: GATGGTTCCTGGAAAGAGCA Anti-senso: TTGCAGTTACTTGGGCAACA
9	735	3784 a 4581	Senso: TCAGAAGTTAGGGAAAGCGTGT Anti-senso: GCACCCTCAGCTTGATTCTC
10	515	8867 a 9381	Senso: ACTTGAAGGTCCCATTGCTG Anti-senso: ATGAGCCCAACCAGTACACC
11	750	9122 a 9871	Senso: ACAGCAAGCGGATGACAATA Anti-senso: ATAGGCATGGGGACAACAAG

4.2.4.1 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DEFINIDOS PELOS INICIADORES

Para definir as condições ideais de ciclagem para cada fragmento desenhado anteriormente, realizou-se um experimento piloto utilizando como molde amostras de voluntários de quatro raças diferentes (branca, parda, oriental e indígena). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf).

Para cada fragmento, foi feita uma PCR com gradiente de temperatura de anelamento (T_m) que variou de 45 °C a 63,6 °C (figuras 3 a 13). Como controle da reação, foi utilizado um fragmento de 268 pb do gene da Beta-Globina (PCO4/GH20), que funcionou em todas as reações (amplificação deste gene não é mostrada nas figuras). Foram utilizados inicialmente os volumes dos reagentes, concentrações dos reagentes e condições de ciclagem sugeridas pelo fabricante do kit Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies).

Utilizando essas condições de ciclagem, foi possível definir as concentrações e volumes dos reagentes a serem utilizados na preparação do mix da reação, e a temperatura de anelamento ideal para a ciclagem os fragmentos 1, 2, 3, 5, 6 e 7, que é de 62,5 °C.

Figura 3. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 1 de (banda 568 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 4. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 2 (banda de 452 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 5. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 3 (banda de 651 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 6. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 4 (banda de 352 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 7. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 5 de 476 pares de bases, que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 8. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 6 (banda de 462 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 9. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 7 (banda de 475 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 10. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 8 (banda de 643 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 11. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 9 (banda de 735 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 12. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 10 (banda de 515 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,6 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Figura 13. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor temperatura de anelamento para o fragmento 11 (banda de 750 pares de bases), que variou de 45 °C a 63,3 °C. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Os demais fragmentos não funcionaram sob estas condições, e foram submetidos a novas reações, variando-se as concentrações de DNA, Tampão, dNTPs e Magnésio, e o tempo de cada fase da ciclagem.

Com as condições inicialmente testadas, o fragmento 4 apresentou duas bandas no gel de agarose, uma de cerca de 350 pares de bases (que corresponde ao fragmento desenhado), e outra de cerca de 1000 pares de bases (figura 6). Na tentativa de eliminar esta banda maior, foram testadas reações contendo menor quantidade de DNA. Isso foi alcançado quando utilizou-se uma concentração de DNA de 100 ng, sob as demais condições dos fragmentos anteriores (figura 14).

Figura 14. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a melhor concentração de DNA para o fragmento 4 (banda de 352 pares de bases) testada a 100 ng e 25 ng. 100 pb, padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Com as condições inicialmente testadas, o fragmento 8 apresentou uma banda bem fraca na temperatura de anelamento de 63,6 °C. Posteriormente, para este fragmento, foram testadas temperaturas de anelamento um pouco mais altas e reações realizadas com amostras de DNA de indivíduos de raças diferentes, e verificou-se que a reação deste fragmento funcionou apenas para amostras de DNA das raças branca e parda, e não funcionou para as amostras de DNA das raças oriental e indígena, na temperatura de anelamento de 63,3 °C (figura 15). Suspeitamos que exista um

polimorfismo de nucleotídeo único localizado na região que compreende o iniciador, e por causa disso, a reação não funciona nas amostras de DNA dos indivíduos que possuem o alelo mutante. Esse fragmento foi descartado do estudo, pois não seria possível analisá-lo nos indivíduos que possuem a variação.

Figura 15. Gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio para verificar a amplificação do fragmento 8 de (banda de 643 pares de bases), a uma temperatura de anelamento de 63,3 °C, de produtos de PCR de 4 indivíduos de raças diferentes (B = Branca, O = Oriental, P = Parda e I = Indígena) . 100 pb , padrão de peso molecular de 100 pares de bases

Os fragmentos 9, 10 e 11 não funcionaram sob nenhuma das condições testadas, portanto também foram descartados do estudo.

Demos preferência aos fragmentos gerados sob condições similares e temperatura de anelamento idênticas para facilitar a montagem da reação. O número de fragmentos desenhados no estudo que atendem a essas condições é suficiente para caracterizar diversos SNPs e está de acordo com nosso planejamento inicial de sequenciar cerca de 4000 pares de bases do gene *PLAC4*, portanto, a perda causada pelos fragmentos definidos pelos iniciadores que não funcionaram adequadamente sob as condições testadas não prejudicou o andamento do estudo.

4.2.5 AMPLIFICAÇÃO DO DNA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O DNA foi amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se a enzima Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™ Life Technologies) e o termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf)

As reações foram realizadas com volume final de 25 µL, nas seguintes condições: Tampão de PCR (Tris HCl 20 mM, pH = 8,3, KCl 50 mM), 2,5 mM de MgCl₂, 2,5 mM de dNTPs, 0,25 pmol/µL de cada iniciador senso e anti-senso, 1,5 unidades da enzima Platinum Taq DNA polimerase e 250 ng de DNA, exceto para o fragmento 4, onde foi utilizado 100 ng de DNA.

Os ciclos de variação de temperatura utilizados foram os seguintes: 94 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 62,5 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto.

4.2.6 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para confirmar a amplificação dos fragmentos definidos pelos sete pares de iniciadores foram utilizados 5 µL do produto de PCR misturados a tampão de amostra (azul de bromofenol 6X) e corridos em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) em tampão TAE (1X). A eletroforese foi realizada em cuba para sistema horizontal de eletroforese alimentada por fonte de eletroforese, nas seguintes condições: 100 V / 60 a por 25 minutos.

Foram considerados amplificados os produtos que, quando o gel foi exposto à luz ultravioleta, apresentaram bandas correspondentes a seus tamanhos (pares de bases) pela comparação a um peso molecular.

Nas amostras que não houve constatação de banda foi repetida a reação de amplificação.

4.2.7 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Após a amplificação das amostras foi feito um procedimento para a purificação dos produtos da PCR com o objetivo de remover iniciadores, nucleotídeos e outras impurezas das amostras. Utilizou-se o kit comercial QIAquick® Spin 100 (QIAGEN), que contém uma membrana de sílica que retém produtos de PCR com tamanhos maiores que 100 pb e remove eficientemente as impurezas. O procedimento foi feito em etapas de centrifugação, e o produto final eluído em água. Seguiu-se protocolo recomendado pelo fabricante do kit.

4.2.8 SEMI-QUANTIFICAÇÃO DO PRODUTO DE PCR PURIFICADO

Após a purificação foi feita uma nova corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio (0,5 µg/mL) em tampão TAE (1X), utilizando-se o padrão de massa Low DNA Mass Ladder (Gibco) que permitiu avaliar a quantidade de produto obtido em cada reação de PCR. A concentração de cada produto formado na reação de PCR foi calculada comparando sua intensidade com a intensidade do marcador Low Mass Ladder.

A semi-quantificação é importante para que seja possível adicionar a quantidade ideal de DNA na reação de sequenciamento (100 ng).

4.2.9 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Foi utilizada a técnica de sequenciamento derivada da metodologia de Sanger *et al.*, 1977 ⁷⁷. A reação de sequenciamento é baseada nos mesmos princípios da PCR. As diferenças são: as reações das fitas senso e anti-senso são realizadas em tubos separados; e, juntamente aos dNTPs comuns, são adicionados dideoxynucleotídeos (ddNTPs), que são nucleotídeos de terminação, pois tem as mesmas características que os dNTPs, mas nos quais foi removido o grupo hidroxila 3' terminal. Quando há a ligação de uma fita molde de DNA aos ddNTPs, acontece o término da extensão da mesma, pois sem o grupo hidroxila terminal não é possível ocorrer a adição do nucleotídeo seguinte, determinando a paralisação da fase de extensão. Como a adição de ddNTPs ocorre aleatoriamente durante a reação de sequenciamento, no produto final encontram-se fragmentos de tamanhos distintos, representando todas as extensões possíveis entre as duas extremidades a serem analisadas. Cada um dos ddNTPs é marcado com sinal de fluorescência diferente, capaz de emitir fluorescência quando excitado por uma fonte de luz, e esta fluorescência é lida pelo sequenciador.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) com volume final de 20 µL nas seguintes condições: 2 µL do reagente Ready Reaction Premix (Kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing), 4,4 µL do tampão 5X (20 Tris 1M (pH=9,0), 50 mM MgCl₂), 3,2 pmol de cada iniciador, 100 ng de DNA e água q.s.p. 20 µL.

As placas de 96 poços contendo as reações foram cicladas no termociclador Eppendorf Mastercycler® Gradient (Eppendorf). Os ciclos de variação de temperatura utilizados foram os seguintes: 25 ciclos a 96 °C por 30 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos.

As duas fitas de DNA dos produtos de PCR foram sequenciadas para garantir uma melhor qualidade na caracterização dos nucleotídeos.

4.2.10 PRECIPITAÇÃO DO PRODUTO DO SEQUENCIAMENTO COM ISOPROPANOL

Após a reação de sequenciamento foi realizada uma nova purificação para remover resíduos de ddNTPs que não foram incorporados ao DNA durante a reação de sequenciamento. Foram adicionados 80 µL de isopropanol 75% (Merck S.A.) ao produto da reação, com posterior incubação por 15 minutos, protegida da luz, a temperatura ambiente (TA) e centrifugação a 2.000 x g por 45 minutos (TA). Após esta etapa, o isopropanol foi removido com cuidado para não aspirar ao precipitado. Em seguida foi realizada centrifugação com a placa invertida, durante 1 minuto a 200 x g (TA). Após esta etapa as amostras foram colocadas em termobloco por 2 minutos a 95 °C, e imediatamente em seguida colocadas em bloco de gelo e armazenadas no freezer.

O produto purificado foi ressuspendido em 10 µL formamida deionizada (Hidi). Posteriormente, foram incubados a 95 °C por 5 minutos para desnaturação das fitas de DNA, e imediatamente após a incubação as amostras foram colocadas em banho de gelo até a aplicação no sequenciador.

4.2.11 LEITURA NO SEQUENCIADOR

O produto purificado foi submetido à leitura no sequenciador modelo ABI 3100 – Genetic Analyser (Applied Biosystems), que utiliza um sistema de eletroforese capilar para a separação dos fragmentos de DNA. Nesse sequenciador, cada um dos capilares é revestido por um eletrodo em uma das extremidades e durante a eletroforese capilar, as moléculas (fragmentos a serem sequenciados) tendem a ser eletro-injetadas no capilar entrando em contato com o polímero (malha da corrida), ou seja, elas migram para o interior do capilar. Quando submetidos à alta voltagem, esses fragmentos no pólo negativo tendem a se mover no interior do capilar preenchido com o polímero em direção ao pólo positivo. A ordenação para a leitura dos fragmentos nessa migração vai depender do peso molecular de cada um deles. Assim, todos os fragmentos marcados em diferentes lugares com ddNTPs fluorescentes migrarão progressivamente, de acordo com o tamanho, tendo sua fluorescência detectada por um laser de detecção.

Acoplado ao sequenciador existe um programa de computador (Data Collection, Applied Biosystems), que gera os resultados referentes à corrida (cromatograma).

4.2.12 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Sequence Scanner (Applied Biosystems, Foster City, USA), que permitiu a visualização do relatório geral das amostras sequenciadas (figura 16), classificando-as de acordo com a intensidade do sinal e número de bases sequenciadas. A partir da avaliação criteriosa dos parâmetros citados acima, foi possível definir quais amostras puderam ser analisadas e quais necessitaram de repetição.

Figura 16. Relatório geral de qualidade mostrando as amostras sequenciadas e atribuição da qualidade conferida a cada uma de acordo com os parâmetros definidos pelo programa (coluna trace score). A atribuição de uma cor vermelha a uma amostra representa baixa qualidade de sequência, a cor amarela média qualidade e a cor azul, alta qualidade de sequência. Na coluna com a sigla CRL estão expressos os tamanhos dos fragmentos sequenciados de cada amostra

Posteriormente as sequências foram editadas com o programa DNA Baser Sequence Assembler v2.80, programa que possibilitou a visualização e edição do cromatograma (figura 17). Os cromatogramas foram inspecionados visualmente e individualmente. Quanto ao parâmetro da sequência (figura 18) a verificação da mesma permitiu avaliar a confiabilidade de cada nucleotídeo e sua ordenação no fragmento.

Figura 17. Cromatograma (representação gráfica de uma sequência) obtido de uma das amostras sequenciadas. O nucleotídeo A está representado em verde, T em vermelho, C em azul e G em preto.

Figura 18. Visualização de toda a sequência obtida de uma das amostras sequenciadas. As cores atribuídas a cada nucleotídeo representam a confiabilidade da leitura de cada um deles (azul = confiabilidade alta, amarelo = confiabilidade média, vermelho = baixa confiabilidade)

As alterações encontradas nos fragmentos definidos pelo iniciador senso foram confirmadas por meio da análise dos fragmentos definidos pelo iniciador anti-senso, e gerou-se uma sequência consenso, que é uma forma de representar o alinhamento entre essas duas sequências.

A partir dessa sequência consenso de cada amostra foi possível alinhá-la e compará-la à sequência referência do gene PLAC4 obtida do “GenBank” (Gene ID: 191585), com o objetivo de identificar os polimorfismos.

As informações resultantes do sequenciamento, referentes ao nucleotídeo presente no sítio de cada SNP do gene PLAC4 analisado no estudo, para cada indivíduo, foram exportadas para uma tabela do Microsoft Excel (Microsoft Inc., Redmond, WA). A partir desta tabela foi possível fazer o cálculo da frequência em que o alelo selvagem, o alelo mutante e o heterozigoto de cada SNP apareceram na população de estudo.

4.2.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as concentrações de DNA foi calculada a média $\pm$ desvio padrão.

Para os dados do sequenciamento foi utilizada análise descritiva, com tabelas de frequência e porcentagem dos alelos dos polimorfismos na população.

Resultados

5 RESULTADOS

Todas as amostras extraídas tiveram concentração de DNA acima de 50 µg/mL, que variou de 51,7 a 1297,1 µg/mL (média de 224,2 µg/mL e desvio padrão de 181 µg/mL), e todas as amostras apresentaram razão A_{260}/A_{280} entre 1,7 e 1,9, o que garantiu a pureza do DNA extraído, excluindo a contaminação com proteínas e outras substâncias.

Foi possível fazer a amplificação, para os 200 voluntários do estudo, de sete regiões do gene PLAC4, definidas pelos iniciadores selecionados após a padronização da reação de amplificação, que juntos somam 4079 pares de bases (tabela 2 e figura 19), totalizando 1400 reações de amplificação. Nessas sete regiões estão localizados 33 SNPs que já foram descritos no “GenBank” (tabela 3), sendo possível verificar a frequência de cada alelo destes SNPs em nossa população de estudo.

Tabela 2. Lista de iniciadores selecionados para o sequenciamento, com seus tamanhos em pares de bases (pb) e suas temperaturas de anelamento

Iniciador	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
1	568	62,5
2	452	62,5
3	651	62,5
4	352	62,5
5	476	62,5
6	462	62,5
7	475	62,5

Figura 19. Gene PLAC4 e os fragmentos selecionados para serem sequenciados no estudo (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7), com seus respectivos tamanhos em pares de bases (pb) e localização no gene

Tabela 3. SNPs que já foram descritos no “GenBank” que estão localizados nos fragmentos selecionados para o sequenciamento

Fragmento	Nome do SNP ("GenBank")	Alelo Selvagem	Alelo Mutante	Posição no gene PLAC4
1	rs59066201	A	C	1068
	rs61738364	G	A	1264
	rs61736857	C	T	1297
	rs61735054	C	T	1325
2	rs9977003	G	A	1565
	rs7844	C	G	1673
	rs10109	C	A	1740
	rs9015	A	T	1851
3	rs73902942	G	A	2948
	rs57618285	G	A	3237
	rs9305729	C	G	3246
	rs9305730	A	T	3251
	rs34567150	A	DEL	3306
	rs61040647	A	G	3340
	rs62217944	A	T	3358
4	rs5019195	C	G	4269
	rs5019194	T	A	4276
	rs5844069	G	DEL	4281
	rs1049904	G	A	4366
	rs16998089	G	A	4470
5	rs73902944	T	C	7478
	rs73902945	G	A	7479
	rs60050016	A	G	7601
	rs59895715	A	G	7670
	rs79509580	A	G	7831
	rs55874010	A	G	7841
	rs7278659	G	A	7849
6	rs12106409	T	C	8247
	rs12106395	A	G	8314
	rs76935499	G	A	8320
	rs12106401	C	A	8399
	rs12106434	A	C	8460
7	rs8130833	A	G	9729

Foi possível fazer o sequenciamento das fitas senso e anti-senso de todos os sete fragmentos para cada um dos voluntários incluídos no estudo, portanto, foram realizadas 14 reações de sequenciamento por indivíduo, totalizando 2800 reações de sequenciamento para todos os 200 voluntários. O anexo 8.4 contém todos os resultados dos SNPs, para cada voluntário do estudo. Na figura 20 estão ilustrados exemplos de cromatogramas (resultado do sequenciamento) dos alelos do SNP rs61736857 de uma amostra do estudo.

Figura 20. Exemplo de cromatogramas de homozigoto selvagem (CC), homozigoto mutante (TT) e heterozigoto (CT) do SNP rs61736857 (C = citosina, T = Timina). A seta preta indica o sítio do SNP

Para o fragmento 1 foram verificadas as frequências de 4 SNPs descritos no “GeneBank”(rs59066201, rs61738364, rs61736857 e rs61735054). Foi observado que três SNPs desse fragmento possuem frequência de heterozigoto superior a 26,5% em nossa população de estudo (tabela 4).

Para o fragmento 2 foram verificadas as frequências de 4 SNPs descritos no “GeneBank” (rs9977003, rs7844, rs10109 e rs9015). Foi observado que dois SNPs desse fragmento possuem frequência de heterozigoto igual ou superior a 43,5% em nossa população de estudo. (tabela 5).

Para o fragmento 3 foram verificadas as frequências de 7 SNPs descritos no “GeneBank” (rs73902942, rs57618285, rs9305729, rs9305730, rs34567150, rs61040647 e rs62217944). Foi observado que um SNP neste fragmento possui frequência de heterozigoto de 50% em nossa população de estudo. (tabela 6).

Para o fragmento 4 foram verificadas as frequências de 5 SNPs descritos no “GeneBank” (rs5019195, rs5019194, rs5844069, rs1049904 e rs16998089). Foi observado que um SNP deste fragmento possui frequência de heterozigoto de 28,5% em nossa população de estudo. (tabela 7).

Para o fragmento 5 foram verificadas as frequências de 7 SNPs descritos no “GeneBank” (rs73902944, rs73902945, rs60050016, rs59895715, rs79509580, rs55874010 e rs7278659). Foi observado que dois SNPs deste fragmento possuem frequência de heterozigoto igual ou superior a 29% em nossa população de estudo. (tabela 8).

Para o fragmento 6 foram verificadas as frequências de 5 SNPs descritos no “GeneBank” (rs12106409, rs12106395, rs76935499, rs12106401 e rs12106434). Neste fragmento, nenhum dos SNPs analisados apresentou frequência de heterozigoto superior a 2% em nossa população de estudo (tabela 9).

Para o fragmento 7 foi verificado a frequência de 1 SNP descritos no “GeneBank” (rs8130833). Foi observado que este SNP possui frequência de heterozigoto de 26,5% em nossa população de estudo. (tabela 8).

Tabela 4. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 1

SNP	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	nº total de indivíduos (%)
rs59066201	AA/ 98 (49%)	CC/ 17 (8,5%)	AC/ 85 (42,5%)	200 (100%)
rs61738364	GG/ 198 (99%)	AA/ -	AG/ 2 (1%)	200 (100%)
rs61736857	CC/ 142 (71%)	TT/ 5 (2,5%)	CT/ 53 (26,5%)	200 (100%)
rs61735054	CC/ 134 (67%)	TT/ 8 (4 %)	CT/ 58 (29%)	200 (100%)

Tabela 5. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 2

SNP	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	nº total de indivíduos (%)
rs9977003	GG/ 90 (45%)	AA/ 23 (11,5%)	AG/ 87 (43,5%)	200 (100%)
rs7844	CC/ 69 (34,5%)	GG/ 37 (18,5%)	CG/ 94 (47%)	200 (100%)
rs10109	CC/ 200 (100%)	AA/ -	AC/ -	200 (100%)
rs9015	AA/ 183 (91,5%)	TT/ -	AT/ 17 (8,5%)	200 (100%)

Tabela 6. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 3

SNP	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	nº total de indivíduos (%)
rs73902942	GG/ 175 (87,5%)	AA/ -	AG/ 25 (12,5%)	200 (100%)
rs57618285	GG/ 175 (87,5%)	AA/ 1 (0,5%)	AG/ 24 (12%)	200 (100%)
rs9305729	CC/ 55 (27,5%)	GG/ 45 (22,5%)	AG/ 100 (50%)	200 (100%)
rs9305730	AA/ 200 (100%)	TT/ -	AT/ -	200 (100%)
rs34567150	AA/ 200 (100%)	DEL/ -		200 (100%)
rs61040647	AA/ 198 (99%)	GG/ -	AG/ 2 (1%)	200 (100%)
rs62217944	AA/ 200 (100%)	TT/ -	AT/ -	200 (100%)

Tabela 7. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 4

SNP	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	nº total de indivíduos (%)
rs5019195	GG/ 195 (97,5%)	CC/ 5 (2,5%)	CG/ -	200 (100%)
rs5019194	AA/ 195 (97,5%)	TT/ 5 (2,5%)	AT/ -	200 (100%)
rs5844069	GG/ 195 (97,5%)	DEL/ 5 (2,5%)		200 (100%)
rs1049904	GG/ 200 (100%)	AA/ -	AG/ -	200 (100%)
rs16998089	GG/ 136 (68%)	AA/ 7 (3,5%)	AG/ 57 (28,5)	200 (100%)

Tabela 8. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 5

SNP	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	nº total de indivíduos (%)
rs73902944	TT/ 134 (67%)	CC/ 3 (1,5%)	CT/ 63 (31,5%)	200 (100%)
rs73902945	GG/ 200 (100%)	AA/ -	AG/ -	200 (100%)
rs60050016	AA/ 194 (97%)	GG/ 2 (1%)	AG/ 4 (2%)	200 (100%)
rs59895715	AA/ 194 (97%)	GG/ 1 (0,5%)	AG/ 5 (2,5%)	200 (100%)
rs79509580	AA/ 194 (97%)	GG/ -	AG/ 6 (3%)	200 (100%)
rs55874010	AA/ 139 (69,5%)	GG/ 3 (1,5%)	AG/ 58 (29%)	200 (100%)
rs7278659	GG/ 199 (99,5%)	AA/ 1 (0,5%)	AG/ -	200 (100%)

Tabela 9. Frequência dos genótipos de cada SNP localizado no fragmento 6

SNP	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	nº total de indivíduos (%)
rs12106409	TT/ 197 (98,5%)	CC/ -	CT/ 3 (1,5%)	200 (100%)
rs12106395	AA/ 196 (98%)	GG/ -	AG/ 4 (2%)	200 (100%)
rs76935499	GG/ 198 (99%)	AA/ -	AG/ 2 (1%)	200 (100%)
rs12106401	CC/ 196 (98%)	AA/ -	AC/ 4 (2%)	200 (100%)
rs12106434	AA/ 197 (98,5%)	CC/ -	AC/ 3 (1,5%)	200 (100%)

Tabela 10. Frequência dos genótipos do SNP localizado no fragmento 7

SNP	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	Genótipo/nº de indivíduos (%)	nº total de indivíduos (%)
rs8130833	AA/	GG/	AG/	
	114 (57%)	33 (16,5%)	53 (26,5%)	200 (100%)

Para criar um painel de SNPs informativos é necessário que a taxa de heterozigozidade (frequência em que o genótipo heterozigoto aparece na população estudada), seja alta, no mínimo de 25%. No estudo foi possível encontrar 10 SNPs que possuem taxa de heterozigozidade acima de 25% (figura 21), que estão distribuídos em 6 dos sete fragmentos estudados.

Figura 21. Gráfico representativo da porcentagem dos genótipos de cada SNP, cuja frequência do genótipo heterozigoto foi superior a 25%

A partir dos resultados obtidos, dos 200 indivíduos incluídos no estudo, 186 são heterozigotos para pelo menos um polimorfismo encontrado, portanto, utilizando um painel com a combinação dos seis fragmentos que contém os 10 polimorfismos informativos é possível alcançar a cobertura de 93% da população brasileira.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Dentre as diversas metodologias descritas recentemente para o teste de diagnóstico não invasivo da síndrome de Down, nós optamos pela abordagem SNP/mRNA, por ser a mais viável para nossa realidade, devido sua aplicabilidade a plataformas mais simples e custos de equipamentos e insumos razoáveis.

Uma vantagem da abordagem SNP/mRNA é que ela não demanda a investigação dos genótipos paternos antes da realização do teste, o que traria muita complexidade logística. O mRNA PLAC4 livre fetal é mais abundante do que o DNA livre fetal no plasma materno ⁷⁸, e a sua especificidade ao feto já foi confirmada através da genotipagem ¹⁸. Consequentemente, quando analisamos o mRNA livre fetal só investigamos material genético de origem fetal, eliminando a interferência dos ácidos nucleicos de origem materna.

Nos testes que fazem a análise do DNA fetal livre, tanto o DNA fetal como o materno são analisados em conjunto, pois não existe uma maneira de distingui-los. Por causa disso, a grande quantidade de DNA livre materno acaba diluindo a informação genética que poderia ser obtida através da análise do DNA livre fetal no plasma materno, o que demanda o uso de tecnologias extremamente sofisticadas para sua análise, como o sequenciamento em massa ⁷⁸.

Alguns grupos estão apostando nessas plataformas de sequenciamento em massa, porém, elas ainda são extremamente custosas e laboriosas, o que impede sua aplicabilidade na prática clínica. Tais grupos apóiam-se na promessa futura da queda dos custos de reagentes e equipamentos, e dependem da diminuição da complexidade do teste para permitir sua implantação em laboratórios clínicos menos especializados ⁷⁹.

Outro trabalho recente fez a inclusão de outras aneuploidias cromossômicas no teste com sequenciamento em massa (trissomia do 13 e do 18), porém, para o diagnóstico dessas aneuploidias há a necessidade de ferramentas de bioinformática que fazem e cálculos de correção estatística para que o resultado do teste seja obtido, as quais ainda não estão bem estabelecidas ⁸⁰. Similarmente, a abordagem SNP/mRNA também poderia ser aplicada ao diagnóstico dessas outras aneuploidias cromossômicas, sendo necessário apenas investigar a taxa de heterozigosidade dos polimorfismos nestes cromossomos.

O teste não invasivo de diagnóstico da trissomia do cromossomo 21 fetal em plasma de gestantes baseado na abordagem SNP/mRNA parte do princípio que o feto seja heterozigoto para o SNP analisado, para que a razão entre a quantidade de cada alelo possa ser obtida. Os alelos de um polimorfismo ocorrem em diferentes frequências nas diferentes populações étnicas. A utilização de SNPs específicos para cada população étnica é necessária, visto que a taxa de heterozigosidade varia de acordo com a etnia.

A combinação de mais de um SNP em um painel possibilita a cobertura dos indivíduos de uma dada população étnica, uma vez que cada amostra de plasma materno será testada para todos os SNPs que compõem o painel. Para aqueles SNPs para os quais apenas um alelo for detectado no plasma materno (indicando que o feto é homozigoto) a razão entre os alelos não será informativa. A razão entre os alelos só será informativa quando os dois diferentes alelos de um SNP forem detectados no plasma materno, indicando que o feto é heterozigoto para aquele determinado SNP.

Com o objetivo de encontrar o painel de SNPs apropriado para a população brasileira, procuramos obter uma amostra de indivíduos que fosse representativa desta população. Incluímos 200 voluntários, que é o número de indivíduos necessários para fornecer um erro máximo de estimativa de 6%, ou seja, este erro é a diferença máxima entre a proporção amostral descrita no estudo e verdadeira proporção na população brasileira.

Vale ressaltar que os voluntários do estudo foram selecionados no Complexo do Hospital das Clínicas, incluindo indivíduos de diferentes níveis socioeconômicos (população atendida no hospital, funcionários da limpeza, funcionários do laboratório, médicos residentes e assistentes do hospital), com o intuito de obter uma amostra heterogênea, e assim, representativa da população brasileira.

Para verificar se, de fato, nossa amostra representa a população brasileira, fizemos uma comparação entre os resultados da distribuição percentual da cor ou raça da população deste estudo e dos dados do último censo do IBGE (2010) ⁷⁶, ambos baseados na autoclassificação dos voluntários (Gráfico 1).

Fonte: Censos Demográficos - IBGE

Figura 22. Representação gráfica da comparação da distribuição percentual da população segundo a cor ou raça, entre os voluntários deste estudo e os indivíduos de todo o Brasil inclusos no último censo do IBGE (2010)

Podemos perceber que na população deste estudo há mais brancos, pretos e orientais, e menos pardos, quando comparada ao descrito no último censo. Isso provavelmente se deve ao fato que a distribuição do IBGE faz a média dos dados encontrados nas cinco diferentes regiões do Brasil, sendo que, devido às proporções

continentais do nosso país e a diferente colonização de cada região, cada uma delas possui uma distribuição característica de raça ou cor ⁸¹.

Quando comparamos nossos dados à distribuição percentual de raça ou cor de voluntários da Região Metropolitana de São Paulo, notamos que a distribuição percentual do estudo assemelha-se mais à descrita pelo IBGE, no que diz respeito às porcentagens de brancos e pardos (Gráfico 2). Notamos também que houve um aumento considerável (maior que 2,8 vezes) no percentual de amarelos e indígenas descrito pelo Censo na Região Metropolitana de São Paulo em relação aos dados do Brasil, refletindo a grande comunidade nipônica presente na cidade de São Paulo.

Fonte: Censos Demográficos - IBGE

Figura 23. Representação gráfica da comparação da distribuição percentual da população segundo a cor ou raça, entre os voluntários deste estudo e indivíduos da Região Metropolitana do Estado de São Paulo inclusos no último censo do IBGE (2010)

A determinação de raça ou cor feita por autoclassificação está atrelada ao fato que, no Brasil, a categorização social de raça ou cor depende da aparência física do indivíduo, e não da sua ancestralidade ⁸¹. Talvez fosse necessário investigar a ancestralidade de cada voluntário (através de uma entrevista ou até mesmo estudos genéticos mais aprofundados, como painéis de polimorfismos conhecidos), o que demandaria um tempo

maior dedicado a cada voluntário e mais recursos financeiros, incompatíveis com os disponíveis para o estudo. Alguns cientistas discutem a existência ou não de raças ⁸². Neste sentido, como incluímos indivíduos de cada uma das raças ou cor de pele presentes no Brasil, podemos inferir que nossa amostra é representativa da população brasileira, mesmo que as proporções das raças não sejam exatamente iguais aos dados do Censo.

Como resultado do sequenciamento, encontramos um painel de 10 SNPs, que permitem a cobertura de 93% dos indivíduos da população brasileira. Assim como é feito para os testes de paternidade, nós podemos também propor a utilização de dois diferentes painéis. O primeiro painel a ser testado incluiria os cinco SNPs com as maiores taxas de heterozigotidade (rs59066201, rs9977003, rs7844, rs9305729, rs73902944), que fariam a cobertura de 84,5% da população brasileira. Para aqueles indivíduos para os quais este primeiro painel de SNPs não fosse informativo (os 15,5% restantes da população), eles seriam subsequentemente testados para o segundo painel (rs61736857, rs61735054, rs16998089, rs55874010, rs8130833). Isso poderia contribuir para uma redução no preço do teste, porque para a maioria da população (84,5%), apenas o primeiro painel de SNPs seria suficiente.

O painel de SNPs encontrado neste estudo deixa de fora 7% dos indivíduos da população brasileira. Isto significa que, para 7% das gestantes que fizerem o teste de diagnóstico da trissomia do cromossomo 21 fetal através do plasma materno, o resultado será inconclusivo. Assim sendo, para estas gestantes, ainda seria necessário oferecer o procedimento invasivo para confirmar o genótipo fetal.

O resultado inconclusivo não inviabiliza o grande potencial e os benefícios que o teste não invasivo que estamos propondo oferece, visto que, para o próprio procedimento invasivo (que é o padrão ouro atual), existe a possibilidade de o teste ser inconclusivo devido à falha de cultura das células fetais. A falha de cultura de células fetais acontece em uma taxa que varia de laboratório para laboratório. No Hospital das Clínicas, a taxa de

falha de cultura de células fetais é de 6,74%, segundo estimativa feita pelo Dr. Mario Kohatsu (dados não publicados), baseada nos resultados de 713 procedimentos (340 amniocenteses, 116 biópsias de vilo corial e 260 cordocenteses).

Além disso, é possível utilizar a abordagem SNP/mRNA com o painel de SNPs encontrado neste estudo para a análise do material coletado através do procedimento invasivo (vilo corial, líquido amniótico ou sangue do cordão umbilical). Isso seria muito útil para diminuir as taxas de resultados inconclusivos devido à falha de cultura de células fetais, pois esta abordagem não depende da cultura dessas células, já que utiliza técnicas de biologia molecular que fazem a amplificação dos ácidos nucleicos fetais extraídos diretamente do material coletado. E poderia ser utilizada para análise tanto do mRNA fetal quanto do DNA fetal, uma vez que o material coletado é sabidamente de origem fetal, sem contribuição de material genético materno. Outra vantagem da utilização desta abordagem nas amostras resultantes do procedimento invasivo é o tempo para a liberação do resultado, que seria bem menor em comparação ao cariótipo, pois a análise pode ser feita diretamente no material coletado, sem necessidade da espera para que as células fetais se proliferem em cultura.

Visando aumentar a cobertura dos 7% de indivíduos que o painel de SNPs descrito neste estudo deixa de fora, estamos atualmente investigando a taxa de heterozigotidade de SNPs em outro gene do cromossomo 21 (C21orf105), com características similares ao do PLAC4. Esperamos encontrar SNPs adicionais neste gene, que quando combinados aos SNPs do PLAC4, cheguem à cobertura próxima a 100% da população brasileira.

No que diz respeito às taxas de heterozigotidade dos SNPs, não encontramos dados na literatura que permitissem fazer a comparação entre as frequências dos SNPs descrita em nossos resultados, em relação à de outros grupos étnicos, uma vez que os grupos não publicam em seus estudos quais são os SNPs que compõem o painel que faz cobertura de suas populações, talvez como uma tentativa de proteger seus resultados.

O único dado encontrado foi o descrito por Lo *et al.* ¹⁸, onde a taxa de heterozigotidade do SNP rs8130833 na população chinesa foi de 45%. Na população brasileira, a frequência deste SNP foi bem menor (26,5%), o que ressalta a importância deste estudo, uma vez que as taxas de heterozigotidade dos SNPs se comportam de forma diferente nas duas populações, indicando que o teste para a população brasileira não pode estar baseado nas frequências encontradas em populações étnicas diferentes.

Os resultados da cobertura alcançada pelo painel de SNPs encontrados neste estudo são similares aos descritos em outras populações étnicas: população norte americana, onde foi feito um estudo com 250 voluntários resultando em um painel de 10 SNPs com cobertura de 95% desta população ⁷⁴; população holandesa, onde foi realizado um estudo com 121 voluntários resultando em um painel de 3 SNPs que fazem a cobertura de 85% desta população ⁷⁵; e chinesa, onde foi feito um estudo com 10 voluntários resultando em um painel de 7 SNPs que fazem a cobertura de 90% desta população ¹⁸.

A plataforma que pretendemos utilizar para a detecção da quantidade dos alelos dos SNPs encontrados neste trabalho é o sequenciamento em massa, através do equipamento Ion Torrent (Life Technologies) ⁸³, com protocolos robustos, rápidos, econômicos, passos que requerem mínima manipulação e permitem um fluxo de trabalho ideal para laboratórios individuais e pequenos. Uma das vantagens dessa plataforma é que ela permite o sequenciamento de DNA, utilizando fragmentos de até 200 pares de bases, o que nos permite fazer a análise de mais de um SNP por fragmento. Isso é muito útil, pois em nosso trabalho encontramos cinco fragmentos que possuem mais de um SNP em sua extensão.

O próximo passo do trabalho é a padronização do processo de extração do mRNA placentário do plasma materno, padronização da PCR transcriptase reversa (RT-PCR) englobando os fragmentos que contém os SNPs de interesse, a definição de condições

ideais da reação de sequenciamento e, finalmente, a análise bioinformática dos dados de sequência, traduzidos em relação alélica.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Na região sequenciada de 4079 pares de bases do gene PLAC4, foram encontrados 10 SNPs com taxa de heterozigotidade acima de 25%. Combinando esses 10 SNPs em um painel, é possível fazer a cobertura de 93% dos indivíduos da população brasileira em um teste de diagnóstico não invasivo da síndrome de Down, utilizando a abordagem SNP/mRNA.

Anexos

8 ANEXOS

8.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

¹ HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)
 RAÇA (COR DA PELE):

2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA "Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 para avaliação de potencial teste diagnóstico da Trissomia do 21 fetal em plasma de gestantes"

PESQUISADOR: Mário Henrique Burlacchini de Carvalho

CARGO/FUNÇÃO: Professor Colaborador da Disciplina de Obstetrícia FMUSP

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CRM 80872

UNIDADE DO HCFMUSP: Clínica Obstétrica

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	X	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – DESENHO E OBJETIVOS DO ESTUDO:

O objetivo deste estudo é fazer o sequenciamento do gene PLAC4 localizado no cromossomo 21, na população brasileira, com a finalidade de identificar variações na sequência de nucleotídeos deste gene. Tendo conhecimento dessas variações em nossa população, espera-se desenvolver um teste não invasivo para a detecção da Síndrome de Down fetal, utilizando amostra de sangue materno. A principal causa da Síndrome de Down é a presença de uma cópia extra do cromossomo 21. O número de cópias do cromossomo 21 poderá ser identificado através do número de cópias do gene PLAC4 encontradas no sangue materno. Se forem encontradas duas cópias do gene significa que o bebê é normal, se forem encontradas três cópias do gene significa que o bebê tem a doença.

2 – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS, COM SEUS PROPÓSITOS E IDENTIFICAÇÃO DOS QUE FOREM EXPERIMENTAIS E NÃO ROTINEIROS:

Se você concordar em participar deste estudo, isolaremos células do seu sangue e destas isolaremos DNA, que será utilizado para avaliar o gene PLAC4, que é apenas um trecho deste DNA, de cerca de 3000 pares de bases, lembrando que o DNA completo (genoma) tem 3 bilhões de pares de bases.

3 – RELAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS ROTINEIROS E COMO SÃO REALIZADOS:

Em sua participação você doará cerca de 10mL de sangue por punção periférica da veia do antebraço. O seu sangue será analisado no laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da USP (IMT-USP), através de exames de biologia molecular.

4 – DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS NOS PROCEDIMENTOS DOS ITENS 2 E 3:

Os desconfortos e riscos são os decorrentes de uma coleta de sangue com agulha da veia do braço. A coleta do sangue pode causar um pouco de desconforto na punção e às vezes pode causar hematoma ou inchaço temporário.

5 – BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE:

Ao participar desta pesquisa você não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico pré-natal não-invasivo, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa diminuir a necessidade de utilização de procedimentos invasivos.

6 – RELAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS, PELOS QUAIS O PACIENTE PODE OPTAR:

Não se aplica.

7 – GARANTIA DE ACESSO: EM QUALQUER ETAPA DO ESTUDO:

Caso você tenha alguma dúvida em relação a esta pesquisa, ou se tiver alguma lesão ou doença relacionada à pesquisa, você poderá entrar em contato com Dr. Mário Henrique Burlacchini de Carvalho (tel: 3069 6380) ou com a pesquisadora Renata Moscolini Romão (tel: 8023 6926). Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: capessa@hcnet.usp.br

8 – É GARANTIDA A LIBERDADE DA RETIRADA DE CONSENTIMENTO A QUALQUER MOMENTO E DEIXAR DE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEM QUALQUER PREJUÍZO À CONTINUIDADE DE SEU TRATAMENTO NA INSTITUIÇÃO.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento do estudo, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico na Clínica Obstétrica.

09 – DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE:

3

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados obtidos serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

10 – DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO SOBRE OS RESULTADOS PARCIAIS DAS PESQUISAS, QUANDO EM ESTUDOS ABERTOS, OU DE RESULTADOS QUE SEJAM DO CONHECIMENTO DOS PESQUISADORES:

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

11 – DESPESAS E COMPENSAÇÕES:

Você não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, bem como não terá ressarcimento, indenização, ou recebimento de valores por ter participado dela. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Você estará consciente de que sua participação é voluntária. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), você terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

12 - COMPROMISSO DO PESQUISADOR DE UTILIZAR OS DADOS E O MATERIAL COLETADO SOMENTE PARA ESTA PESQUISA.

Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e materiais coletados somente para a realização deste estudo. Seus dados e/ou amostras só poderão ser utilizados novamente mediante a elaboração de novo protocolo de pesquisa com autorização prévia da Comissão de Ética, e você será contatado(a) novamente para conceder ou não autorização para o uso do material em futuros projetos.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Investigação dos polimorfismos do gene PLAC4 para avaliação de potencial teste diagnóstico da Trissomia do 21 fetal em plasma de gestantes".

Eu discuti com o Dr. Mário Henrique e/ou a pesquisadora Renata sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____/____

Assinatura da testemunha Data ____/____/____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

8.2 APROVAÇÃO CAPPESQ

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0789/08**, intitulado: **"INVESTIGAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE PLAC4 NA POPULAÇÃO BRASILEIRA."** apresentado pelo Departamento de **OBSTETRÍCIA E GINECOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Mário Henrique Burlacchini de Carvalho**

Pesquisador (a) Executante: **Renata Moscolini Romão**

CAPPesq, 26 de Março de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

8.3 APROVAÇÃO CEP IMT-USP

8.4 TABELA COM RESULTADOS DOS SNPS

Tabela 11. Resultados do sequenciamento de todos os voluntários do estudo para cada um dos SNPs analisados (A = adenina, C = citosina, G = guanina, T = timina, M = A ou C, Y = T ou C, R = A ou S, S = C ou G, W = A ou T). Em amarelo estão destacados os indivíduos que não são heterozigotos para nenhum SNP analisado

Gene		PLAC4														7																		
Fragmento		1				2				2				4				5				6				7								
Variação	A/C	C/T	C/T	Q/T	A/G	C/G	A/C	A/T	A/G	C/G	A/G	-/A	A/G	A/T	C/G	A/T	-/G	A/C	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/C	A/C	A/C	A/G					
SNP	r59066201	r61738364	r61736857	r61735054	r5977003	r57844	r510109	r59015	r573902942	r5618285	r59305729	r59305730	r534567150	r561040647	r562217944	r5019195	r5019194	r584069	r51049904	r51698089	r73902944	r73902945	r60050016	r59895715	r579509580	r55874010	r7278659	r12106409	r12106395	r76935499	r512106401	r512106434	r8130833	
	Posição Fragmento																																	
	104	300	333	361	56	164	231	342	126	415	424	429	484	518	536	34	41	46	131	235	51	52	174	243	404	414	422	105	172	178	257	318	268	
	Nucleotídeos																																	
	Amostra	Raça																																
	1	Branco	M	G	T	T	A	G	C	G	G	C	A	A	A	A	G	-	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
	2	Anarelo	M	G	C	C	G	C	A	G	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
	3	Branco	M	G	C	Y	G	C	A	G	G	G	A	A	A	A	G	A	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
	4	Branco	M	G	T	Y	R	S	C	A	G	C	A	A	A	A	G	-	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R
	5	Branco	M	G	Y	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R
6	Pardo	M	G	C	A	G	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	G	
7	Branco	M	G	C	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
8	Branco	M	G	C	C	G	S	C	A	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	G	
9	Branco	M	G	C	Y	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
10	Anarelo	M	G	C	C	C	A	G	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
11	Indio	M	G	C	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
12	Pardo	M	G	C	C	R	G	C	W	R	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
13	Branco	M	G	C	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
14	Pardo	M	G	C	R	G	C	A	G	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	G	
15	Branco	M	G	Y	Y	R	S	C	A	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
16	Pardo	M	G	C	C	R	S	C	A	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A	
17	Branco	M	G	C	Y	R	S	C	A	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	R
18	Branco	M	G	C	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
19	Pardo	M	G	C	C	G	C	A	R	R	S	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R	
20	Preto	M	G	C	C	R	S	C	A	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
21	Preto	M	G	Y	C	R	C	W	R	R	S	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
22	Preto	M	G	Y	C	R	S	C	A	R	C	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R	
23	Preto	M	G	C	C	A	G	C	A	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	R	Y	G	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	R	
24	Preto	M	G	C	C	G	S	C	W	R	S	A	A	A	A	C	T	G	G	R	Y	G	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	G
25	Branco	M	G	Y	Y	A	G	C	A	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
26	Anarelo	M	G	C	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
27	Branco	M	G	Y	Y	A	G	C	A	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A	
28	Preto	M	G	C	C	R	S	C	A	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R	
29	Pardo	M	G	C	C	G	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
30	Pardo	M	G	C	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	R
31	Pardo	M	G	C	C	R	S	C	A	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
32	Preto	M	G	Y	Y	R	S	C	A	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
33	Branco	M	G	C	C	R	S	C	A	R	S	A	A	A	A	C	T	G	G	R	Y	G	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A
34	Branco	M	G	C	C	C	W	G	A	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A
35	Pardo	M	G	C	C	R	G	C	A	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	A	Y	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	G
36	Branco	M	G	Y	C	R	S	C	A	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
37	Pardo	M	G	Y	C	A	G	C	A	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A
38	Preto	M	G	C	C	A	G	C	A	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	G	G
39	Pardo	M	G	C	Y	G	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	R
40	Branco	M	G	C	C	C	A	G	C	C	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	R

continua

Tabela 11. Resultados do sequenciamento de todos os voluntários do estudo para cada um dos SNPs analisados (A = adenina, C = citosina, G = guanina, T = timina, M = A ou C, Y = T ou C, R = A ou G, S = C ou G, W = A ou T). Em amarelo estão destacados os indivíduos que não são heterozigotos para nenhum SNP analisado (continuação)

Gene	PLAC4														7
	Fragmento	1		2		2		4		5		6		A/C	A/G
SNP	Variação	A/C	C/T	C/T	A/C	A/G	C/G	A/T	A/C	A/G	C/T	A/G	A/G	A/C	A/G
		rs5966201	rs61738364	rs61736857	rs61735054	rs9977003	rs844	rs10109	rs9015	rs73902942	rs57618285	rs9305729	rs9305730	rs34567150	rs61040647
Posição	Fragmento	104	300	333	361	56	164	231	342	126	415	424	429	484	518
Nucleotídeos															
Amostra	Raça														
41	Pardo	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	S	A	A	R
42	Preto	A	G	C	C	G	S	C	W	R	R	C	A	A	A
43	Branco	A	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	A	A	A
44	Preto	A	G	T	T	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A
45	Branco	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A
46	Branco	M	G	C	C	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A
47	Branco	M	G	Y	Y	A	G	C	A	G	G	C	A	A	A
48	Branco	M	G	Y	Y	A	G	C	A	G	G	C	A	A	A
49	Pardo	A	G	C	C	G	S	C	A	G	G	G	A	A	A
50	Branco	A	G	C	C	R	S	C	W	R	R	S	A	A	A
51	Branco	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A
52	Pardo	M	G	Y	C	G	S	C	W	R	R	C	A	A	A
53	Branco	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A
54	Pardo	A	G	C	Y	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A
55	Pardo	A	G	C	C	G	S	C	A	G	G	G	A	A	A
56	Branco	C	G	T	T	G	S	C	A	G	G	S	A	A	A
57	Pardo	M	G	C	C	R	S	C	A	G	G	C	A	A	A
58	Pardo	M	G	C	C	C	C	C	A	G	G	S	A	A	A
59	Branco	C	G	C	C	C	C	C	A	G	G	S	A	A	A
60	Pardo	A	G	C	C	G	G	C	A	G	G	C	A	A	A
61	Pardo	A	G	C	C	G	C	C	W	R	R	C	A	A	A
62	Branco	A	G	C	Y	C	C	C	A	G	G	S	A	A	A
63	Preto	A	G	C	C	C	S	C	A	R	A	C	A	A	A
64	Branco	A	G	C	C	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A
65	Branco	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A
66	Branco	M	G	C	C	C	R	C	A	G	G	S	A	A	A
67	Branco	M	G	C	C	G	S	C	A	G	G	G	A	A	A
68	Branco	M	G	C	C	G	C	C	A	G	G	S	A	A	A
69	Pardo	M	G	C	C	C	C	C	A	G	G	S	A	A	A
70	Branco	A	G	C	C	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A
71	Pardo	A	G	C	C	R	S	C	A	G	R	C	A	A	A
72	Preto	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A
73	Preto	M	G	Y	Y	C	S	C	A	G	G	C	A	A	A
74	Branco	A	G	C	C	G	S	C	A	G	G	C	A	A	A
75	Branco	M	G	Y	Y	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A
76	Pardo	A	G	C	C	C	S	C	A	G	G	S	A	A	A
77	Branco	A	G	C	C	A	S	C	W	R	R	C	A	A	A
78	Branco	M	G	Y	Y	A	S	C	A	G	G	C	A	A	A
79	Oriental	A	G	C	C	C	C	C	A	G	G	G	A	A	A
80	Branco	A	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	A	A	A

continua

Tabela 11. Resultados do sequenciamento de todos os voluntários do estudo para cada um dos SNPs analisados (A = adenina, C = citosina, G = guanina, T = timina, M = A ou C, Y = T ou C, R = A ou G, S = C ou G, W = A ou T). Em amarelo estão destacados os indivíduos que não são heterozigotos para nenhum SNP analisado (continuação)

[illegible]continua

Tabela 11. Resultados do sequenciamento de todos os voluntários do estudo para cada um dos SNPs analisados (A = adenina, G = guanina, T = timina, M = A ou C, Y = T ou C, R = A ou G, S = C ou G, W = A ou T). Em amarelo estão destacados os indivíduos que não são heterozigotos para nenhum SNP analisado (continuação)

Gene		PLAC4																																				
Fragmento		1					2					2					4					5					6					7						
Fragmento	Variação	A/C	C/T	C/T	A/G	C/G	A/C	A/T	A/G	C/G	A/T	-A	A/G	A/T	C/G	A/T	-G	A/C	A/G	C/T	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/C	A/C							
SNP		rs39066201	rs61738364	rs61736857	rs61735054	rs9977003	rs7844	rs10109	rs9015	rs73902942	rs57618285	rs9305729	rs9305730	rs34567150	rs61040647	rs62217944	rs5019195	rs5844069	rs1049904	rs16998089	rs73902944	rs73902945	rs60050016	rs5895715	rs79059580	rs55874010	rs7278659	rs12106409	rs12106395	rs76935499	rs12106401	rs12106434						
	Posição	Fragmento	104	300	333	361	56	164	231	342	126	415	424	429	484	518	536	34	41	46	131	235	51	52	174	243	404	414	422	105	172	178	257	318				
	Nucleotídeos																																					
	Amostra	Raça																																				
	121	Pardo	A	G	C	Y	R	S	C	W	R	R	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	R	Y	G	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	G	
	122	Pardo	A	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	G	A	A	A	C	T	G	G	G	G	T	G	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	R	
	123	Pardo	M	G	C	C	G	C	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	R	Y	G	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R		
	124	Pardo	A	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
	125	Branco	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
	126	Branco	G	C	C	C	R	S	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	G
127	Branco	M	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R		
128	Branco	A	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R	
129	Branco	A	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A	
130	Preto	M	G	Y	C	A	S	C	A	G	G	G	C	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A	
131	Branco	M	G	Y	Y	A	G	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	G	
132	Branco	M	G	Y	Y	G	C	A	G	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
133	Branco	M	G	Y	T	G	S	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R	
134	Pardo	M	G	C	C	A	C	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
135	Pardo	M	G	Y	Y	R	S	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	G	
136	Branco	C	G	C	C	G	C	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A	
137	Amarelo	A	G	C	C	C	C	C	A	G	G	G	G	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R	
138	Pardo	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A	
139	Branco	M	G	Y	Y	R	S	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	R	Y	G	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A	
140	Preto	A	G	C	Y	G	C	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	R	R	G	T	A	G	C	A	R
141	Branco	A	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	G	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
142	Preto	M	G	C	C	G	S	C	A	R	R	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
143	Branco	M	G	Y	Y	R	S	C	A	G	G	S	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
144	Pardo	M	G	C	C	G	C	C	A	R	R	S	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A	
145	Branco	A	G	C	C	A	G	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	R	Y	G	A	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	R
146	Pardo	C	G	Y	C	G	C	W	R	R	R	S	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	G
147	Pardo	A	G	C	C	R	G	C	W	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	R	
148	Pardo	A	G	Y	Y	R	G	C	W	R	R	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R
149	Branco	C	G	T	Y	A	G	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
150	Pardo	M	G	Y	Y	G	S	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	A	Y	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R
151	Pardo	M	G	C	C	R	G	C	A	G	G	G	C	A	A	A	C	T	G	G	R	Y	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R
152	Preto	M	R	Y	Y	R	S	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	R	Y	G	A	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A
153	Pardo	M	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	G	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
154	Branco	M	G	C	C	G	S	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	Y	G	A	A	A	A	A	A	A	R	G	T	A	G	C	A	A
155	Branco	M	G	Y	T	R	S	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R
156	Branco	A	G	Y	C	G	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
157	Branco	A	G	C	C	G	C	C	A	G	G	G	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
158	Pardo	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	G	S	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
159	Branco	A	G	C	C	R	S	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	A
160	Branco	A	G	C	C	R	G	C	A	G	G	C	A	A	A	A	C	T	G	G	R	T	G	A	A	A	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	G

continua

Tabela 12. Resultados do sequenciamento de todos os voluntários do estudo para cada um dos SNPs analisados (A = adenina, C = citosina, G = guanina, T = timina, M = A ou C, Y = T ou C, R = A ou G, S = C ou G, W = A ou T). Em amarelo estão destacados os indivíduos que não são heterozigotos para nenhum SNP analisado (conclusão)

Gene	PLAC4																																	
	1				2				4				5				6				7													
Fragmento	Variação	A/C	C/T	C/T	A/G	C/G	A/C	A/T	A/G	A/T	C/G	A/T	-/G	A/C	C/T	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	C/T	A/G	A/G	A/G	A/G	A/G	A/C	A/C	A/G			
SNP	rs59066201	rs61738364	rs61736857	rs61735054	rs9977003	rs7844	rs10109	rs9015	rs73902942	rs57618285	rs9305729	rs9305730	rs34567150	rs61040647	rs62217944	rs5019195	rs5019194	rs5844069	rs1049904	rs16998089	rs73902944	rs73902945	rs60050016	rs9895715	rs79509580	rs55874010	rs7278659	rs12106409	rs12106395	rs76935499	rs12106401	rs12106434	rs130833	
	M	G	Y	T	R	S	C	A	G	S	A	A	A	A	A	C	T	G	G	G	T	G	A	A	A	A	A	G	T	A	G	C	A	R
	161	Pardo																																
	162	Branco																																
	163	Branco																																
	164	Pardo																																
	165	Pardo																																
	166	Preto																																
	167	Branco																																
	168	Preto																																
	169	Pardo																																
	170	Preto																																
	171	Branco																																
	172	Preto																																
	173	Branco																																
	174	Pardo																																
	175	Branco																																
	176	Pardo																																
	177	Branco																																
	178	Pardo																																
179	Pardo																																	
180	Branco																																	
181	Branco																																	
182	Amarelo																																	
183	Branco																																	
184	Branco																																	
185	Pardo																																	
186	Branco																																	
187	Branco																																	
188	Branco																																	
189	Branco																																	
190	Branco																																	
191	Branco																																	
192	Branco																																	
193	Preto																																	
194	Branco																																	
195	Branco																																	
196	Branco																																	
197	Pardo																																	
198	Pardo																																	
199	Branco																																	
200	Branco																																	

Referências

9 REFERÊNCIAS¹

1. Lapaire O, Holzgreve W, Oosterwijk JC, Brinkhaus R, Bianchi DW. Georg Schmorl on trophoblasts in the maternal circulation. *Placenta* 2007, 28:1-5.
2. Bianchi DW. Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis. *Br J Haematol* 1999, 105:574-583.
3. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, 93:705-708.
4. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 1997, 350:485-487.
5. Lo YM, Tein MS, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PM, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet* 1998, 62:768-775.
6. Hartl DL, Jones EW: *Genetics: analysis of genes and genomes*. 7th ed. Massachusetts, Cambridge: Jones & Bartlett Publishers; 2009,
7. Hill M, Finning K, Martin P, Hogg J, Meaney C, Norbury G, Daniels G, Chitty L. Non-invasive prenatal determination of fetal sex: translating research into clinical practice. *Clin Genet* 2010, 80:68-75.
8. Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium. *Transfusion* 2008, 48:373-381.

¹De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

9. Bustamante-Aragones A, Trujillo-Tiebas MJ, Gallego-Merlo J, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Cantalapiedra D, Ayuso C, Ramos C. Prenatal diagnosis of Huntington disease in maternal plasma: direct and indirect study. *Eur J Neurol* 2008, 15:1338-1344.
10. Lim JH, Kim MJ, Kim SY, Kim HO, Song MJ, Kim MH, Park SY, Yang JH, Ryu HM. Non-invasive prenatal detection of achondroplasia using circulating fetal DNA in maternal plasma. *J Assist Reprod Genet* 2011, 28:167-172.
11. Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma. *Clin Chem* 2000, 46:301-302.
12. Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011, 16:88-93.
13. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Presence of fetal RNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2000, 46:1832-1834.
14. Ziegler A, Zangemeister-Wittke U, Stahel RA: Circulating DNA. a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev* 2002, 28:255-271.
15. Tsui NB, Dennis Lo YM. Placental RNA in maternal plasma: toward noninvasive fetal gene expression profiling. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1075:96-102.
16. Banzola I, Rusterholz C, Zannoni L, Rizzo N, Zhong XY, Caramelli E, Holzgreve W, Farina A, Hahn S. PLAC4 and beta-HCG mRNA levels are not altered in the maternal circulation of pregnancies with trisomy 21. *Prenat Diagn* 2008, 28:1262-1267.
17. Go AT, Visser A, Mulders MA, Twisk JW, Blankenstein MA, van Vugt JM, Oudejans CB. C21ORF105, A chromosome 21-encoded mRNA, is not a discriminative marker gene for prediction of Down syndrome in maternal plasma. *Prenat Diagn* 2007, 27:146-149.
18. Lo YM, Tsui NB, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Heung MM, Gero-vassili A, Jin Y, Nicolaides KH, Cantor CR, Ding C. Plasma placental RNA allelic ratio permits noninvasive prenatal chromosomal aneuploidy detection. *Nat Med* 2007, 13:218-223.
19. Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil* 1948, 142:241-243.

20. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1966, 45:1732-1740.
21. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977, 37:646-650.
22. Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994, 3:67-71.
23. Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1994, 86:774-779.
24. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004, 431:931-945.
25. Lo YM:. Noninvasive prenatal detection of fetal chromosomal aneuploidies by maternal plasma nucleic acid analysis: a review of the current state of the art. *BJOG* 2009, 116:152-157.
26. Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YM. mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:4748-4753.
27. Oudejans CB, Go AT, Visser A, Mulders MA, Westerman BA, Blankenstein MA, van Vugt JM. Detection of chromosome 21-encoded mRNA of placental origin in maternal plasma. *Clin Chem* 2003, 49:1445-1449.
28. Du Y, Zhang J, Wang H, Yan X, Yang Y, Yang L, Luo X, Chen Y, Duan T, Ma D. Hypomethylated DSCR4 is a placenta-derived epigenetic marker for trisomy 21. *Prenat Diagn* 2011, 31:207-214.

29. Tsui NB, Wong BC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Non-invasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by RNA-SNP allelic ratio analysis using maternal plasma SERPINB2 mRNA: a feasibility study. *Prenat Diagn* 2009, 29:1031-1037.
30. Bianchi DW, Maron JL, Johnson KL. Insights into fetal and neonatal development through analysis of cell-free RNA in body fluids. *Early Hum Dev* 2010, 86:747-752.
31. Maron JL, Johnson KL, Slonim D, Lai CQ, Ramoni M, Alterovitz G, Jarrah Z, Yang Z, Bianchi DW. Gene expression analysis in pregnant women and their infants identifies unique fetal biomarkers that circulate in maternal blood. *J Clin Invest* 2007, 117:3007-3019.
32. Chiu RW, Lo YM. Pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma: a channel for fetal-maternal communication? *Clin Chem* 2010, 56:1656-1657.
33. Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure. *Hum Reprod Update* 2005, 11:59-67.
34. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980, 68:251-306.
35. Orozco AF, Bischoff FZ, Horne C, Popek E, Simpson JL, Lewis DE. Hypoxia-induced membrane-bound apoptotic DNA particles: potential mechanism of fetal DNA in maternal plasma. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1075:57-62.
36. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993, 14:131-136.
37. Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z. Segregation of RNA and separate packaging of DNA and RNA in apoptotic bodies during apoptosis. *Exp Cell Res* 2000, 260:248-256.
38. Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2001, 945:239-249.

39. Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem* 2002, 48:421-427.
40. Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, Otsuka J, Okai T. Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta. *Clin Chem* 2002, 48:353-354.
41. Jimbo M, Sekizawa A, Sugito Y, Matsuoka R, Ichizuka K, Saito H, Okai T. Placenta increta: Postpartum monitoring of plasma cell-free fetal DNA. *Clin Chem* 2003, 49:1540-1541.
42. Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J, Costa JM. Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytiotrophoblastic cells. Case report. *Hum Reprod* 2004, 19:723-724.
43. Smith SC, Baker PN. Placental apoptosis is increased in post-term pregnancies. *Br J Obstet Gynaecol* 1999, 106:861-862.
44. Ishihara N, Matsuo H, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Samoto T, Maruo T. Increased apoptosis in the syncytiotrophoblast in human term placentas complicated by either preeclampsia or intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 2002, 186:158-166.
45. Guibert J, Benachi A, Grebille AG, Ernault P, Zorn JR, Costa JM. Kinetics of SRY gene appearance in maternal serum: detection by real time PCR in early pregnancy after assisted reproductive technique. *Hum Reprod* 2003, 18:1733-1736.
46. Alberry M, Maddocks D, Jones M, Abdel Hadi M, Abdel-Fattah S, Avent N, Soothill PW. Free fetal DNA in maternal plasma in anembryonic pregnancies: confirmation that the origin is the trophoblast. *Prenat Diagn* 2007, 27:415-418.
47. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet* 1999, 64:218-224.

48. Chiu RW, Lui WB, Cheung MC, Kumta N, Farina A, Banzola I, Grotti S, Rizzo N, Haines CJ, Lo YM. Time profile of appearance and disappearance of circulating placenta-derived mRNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2006, 52:313-316.
49. Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, Lee TH. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion* 2001, 41:1524-1530.
50. Birch L, English CA, O'Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation. *Clin Chem* 2005, 51:312-320.
51. Chan LY, Leung TN, Chan KC, Tai HL, Lau TK, Wong EM, Lo YM. Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. *Clin Chem* 2003, 49:678-680.
52. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Samura O, Kinutani M, Hara T, Ohama K. Fetal gender determination in early pregnancy through qualitative and quantitative analysis of fetal DNA in maternal serum. *Hum Genet* 2002, 110:75-79.
53. Wataganara T, Chen AY, LeShane ES, Sullivan LM, Borgatta L, Bianchi DW, Johnson KL. Cell-free fetal DNA levels in maternal plasma after elective first-trimester termination of pregnancy. *Fertil Steril* 2004, 81:638-644.
54. Miura K, Yoshiura K, Miura S, Yamasaki K, Nakayama D, Ishimaru T, Wagstaff J, Niikawa N, Masuzaki H. Cell-free DNA is more sensitive than cell-free mRNA as a marker for evaluation of fetal-maternal hemorrhage. *Clin Chem* 2006, 52:2121-2123.
55. Samura O, Miharu N, Hyodo M, Honda H, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K. Cell-free fetal DNA in maternal circulation after amniocentesis. *Clin Chem* 2003, 49:1193-1195.
56. Chim SS, Jin S, Lee TY, Lun FM, Lee WS, Chan LY, Jin Y, Yang N, Tong YK, Leung TY, Lau TK, Ding C, Chiu RW, Lo YM. Systematic search for placental DNA-methylation markers on chromosome 21: toward a maternal plasma-based epigenetic test for fetal trisomy 21. *Clin Chem* 2008, 54:500-511.

57. Old RW, Crea F, Puszyk W, Hulten MA. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome. *Reprod Biomed Online* 2007, 15:227-235.
58. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Chow KC, Lo YM. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002, 48:35-41.
59. Chan KC, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM. Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2004, 50:88-92.
60. Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Analysis of the size distributions of fetal and maternal cell-free DNA by paired-end sequencing. *Clin Chem* 2010, 56:1279-1286.
61. Hahn T, Drese KS, O'Sullivan CK. Microsystem for isolation of fetal DNA from maternal plasma by preparative size separation. *Clin Chem* 2009, 55:2144-2152.
62. Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W, Hahn S. Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms. *Clin Chem* 2004, 50:1002-1011.
63. Benachi A, Yamgnane A, Olivi M, Dumez Y, Gautier E, Costa JM. Impact of formaldehyde on the in vitro proportion of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Clin Chem* 2005, 51:242-244.
64. Chinnapapagari SK, Holzgreve W, Lapaire O, Zimmermann B, Hahn S. Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma. *Clin Chem* 2005, 51:652-655.
65. Chung GT, Chiu RW, Chan KC, Lau TK, Leung TN, Lo YM. Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment. *Clin Chem* 2005, 51:655-658.

66. Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, Cronin M, Chou V, Mohr M. Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation. *JAMA* 2004, 291:1114-1119.
67. Zhang Y, Li Q, Hui N, Fei M, Hu Z, Sun S. Effect of formaldehyde treatment on the recovery of cell-free fetal DNA from maternal plasma at different processing times. *Clin Chim Acta* 2008, 397:60-64.
68. Urato AC, Peter I, Canick J, Lambert-Messerlian G, Pulkkinen A, Knight G, Jeong YJ, Johnson KL, Bianchi DW. Smoking in pregnancy is associated with increased total maternal serum cell-free DNA levels. *Prenat Diagn* 2008, 28:186-190.
69. Wataganara T, Peter I, Messerlian GM, Borgatta L, Bianchi DW. Inverse correlation between maternal weight and second trimester circulating cell-free fetal DNA levels. *Obstet Gynecol* 2004, 104:545-550.
70. Go AT, Visser A, Betsalel OT, van Vugt JM, Blankenstein MA, Oudejans CB. Measurement of allelic-expression ratios in trisomy 21 placentas by quencher extension of heterozygous samples identified by partially denaturing HPLC. *Clin Chem* 2008, 54:437-440.
71. Go ATJl: *Fetal mrna in maternal plasma - Development of a non-invasive prenatal test for trisomy 21, A quest of a Holy Grail*. [dissertation]. Edited by Amsterdam, Vrije Universiteit Amsterdam; 2009.
72. Lo YM, Lun FM, Chan KC, Tsui NB, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BC, Cantor CR, Chiu RW. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:13116-13121.
73. Deng YH, Yin AH, He Q, Chen JC, He YS, Wang HQ, Li M, Chen HY. Non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21 by reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification [abstract]. *Clin Chem Lab Med* 2011, 49:641-646.

74. Yang Y, Ding JH, Lee MS, Loria O, Mohsenian F, Tang MH, Dragon B. Identification of mRNA-SNP markers for a noninvasive prenatal trisomy 21 (T21) test. Edited by InterScience W. Vancouver, Canada, *Prenat Diag*, 2008, p. S12.
75. Go AT, Visser A, Betsalel O, Blankenstein MA, Van Vugt JM, Oudejans CB. Determination of population coverage using three selected SNPs in placentally expressed chromosome 21-coded genes. Edited by InterScience W. Vancouver, Canada, *Prenat Diag*, 2008, p. S67.
76. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Síntese de Indicadores Sociais*. Rio de Janeiro: IBGE; 2010,
77. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, 74:5463-5467.
78. Chiu RW, Cantor CR, Lo YM. Non-invasive prenatal diagnosis by single molecule counting technologies. *Trends Genet* 2009, 25:324-331.
79. Ehrich M, Deciu C, Zwiefelhofer T, Tynan JA, Cagasan L, Tim R, Lu V, McCullough R, McCarthy E, Nygren AO, Dean J, Tang L, Hutchison D, Lu T, Wang H, Angkachatchai V, Oeth P, Cantor CR, Bombard A, van den Boom D: Noninvasive detection of fetal trisomy 21 by sequencing of DNA in maternal blood: a study in a clinical setting. *Am J Obstet Gynecol* 2011, 204:205.e201-211.
80. Chen EZ, Chiu RW, Sun H, Akolekar R, Chan KC, Leung TY, Jiang P, Zheng YW, Lun FM, Chan LY, Jin Y, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM: Noninvasive prenatal diagnosis of fetal trisomy 18 and trisomy 13 by maternal plasma DNA sequencing. *PLoS One* 2011, 6:e21791.
81. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, Kohlrausch F, Magno LA, Montenegro RC, Moraes MO, de Moraes ME, de Moraes MR, Ojopi EB, Perini JA, Racciopi C, Ribeiro-Dos-Santos AK, Rios-Santos F, Romano-Silva MA, Sortica

VA, Suarez-Kurtz G. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011, 16;6:e17063.

82. Long JC, Kittles RA. Human genetic diversity and the nonexistence of biological races, *Hum Biol* 2003, 75:449-471.

83. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, *et al.* An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 2011, 475:348-352.