



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

AMANDA DA FONSECA ELIAS

**O EMPREGO DO GENE *XIST* PARA SILENCIAMENTO DO
CROMOSSOMO 21 TRISSÔMICO NA SÍNDROME DE DOWN**

Trabalho de conclusão de curso em formato de artigo elaborado como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Fernanda Costa Vinhaes de Lima.

BRASÍLIA
2020

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família. Obrigada por permitir que eu cursasse Biomedicina e encontrasse uma profissão tão parecida comigo. Obrigada por me apoiar em todos os momentos, ouvir os meus desabafos em horas difíceis e comemorar as minhas vitórias e conquistas. Por me inspirar todos os dias a ser uma pessoa melhor e ir atrás dos meus sonhos. Por me mostrar que nada é impossível.

Agradeço, em segundo lugar, à minha orientadora Fernanda Costa Vinhaes de Lima, que esteve sempre ao meu lado, me acompanhando e incentivando nessa jornada. Obrigada por me apresentar algo tão incrível como a Genética Humana, e me mostrar todas as belezas que ela possui. Obrigada por reservar tanto do seu tempo para ler o que eu escrevia, para me responder, tirar minhas dúvidas e me acalmar durante um período tão delicado quanto a pandemia do COVID-19.

Agradeço às amigadas que fiz logo no primeiro semestre do curso (Alê, Luiza e Fer). Obrigada por terem compartilhado comigo todos os altos e baixos que apareceram nesses quatro anos. Obrigada pelas melhores risadas, até nas horas de desespero para provas e trabalhos. Pelas tardes que passamos na faculdade, que acabaram se tornando memórias incríveis. Por toda a ajuda, companheirismo, lealdade e cumplicidade. Por uma amizade tão verdadeira.

Agradeço aos professores do curso de Biomedicina. Obrigada pela paciência, pela dedicação e por todo o aprendizado durante a minha formação. Obrigada por me mostrar o quão maravilhosa é a nossa profissão.

O emprego do gene *XIST* para silenciamento do cromossomo 21 trissômico na Síndrome de Down

Amanda da Fonseca Elias¹
Fernanda Costa Vinhaes de Lima²

Resumo

A Síndrome de Down é uma aneuploidia causada pela terceira cópia do cromossomo 21. Com três etiologias, é caracterizada por prega simiesca, obesidade, prega epicântica, entre outros. Não existe cura, embora a qualidade e expectativa de vida dos sindrômicos aumentem com intervenções específicas. Entretanto, estudos vêm avaliando a possibilidade do emprego do gene *XIST* para silenciar o cromossomo extra em linhagens celulares. O objetivo desse trabalho foi descrever tal emprego a partir de uma revisão bibliográfica do tipo narrativa, realizada entre o período de 2000 e 2020. O gene é encontrado no cromossomo X e é responsável, junto a outros genes e modificações epigenéticas, pela inativação de um cromossomo X feminino e balanceamento genético com machos. A técnica mostrou-se eficiente em fibroblastos e na hematopoese, e permitiu melhor compreensão sobre a fisiopatologia da doença, logo, poderá contribuir para o desenvolvimento de terapias mais eficientes, embora não represente uma cura.

Palavras-chave: Síndrome de Down, gene *XIST*, inativação do X, fisiopatologia, engenharia genômica, terapia gênica.

Use of *XIST* gene to silence trisomic chromosome 21 in Down's Syndrome

Abstract

Down's Syndrome is an aneuploidy caused by the third copy of chromosome 21. With three etiologies, it's characterized by simian crease, obesity, epicanthic eyefold, among others. There is no cure, although patients life quality and expectancy increase with specific interventions. However, studies have been evaluating the possibility of using *XIST* gene to silence the extra chromosome in cell lines. The aim of this work was to describe such use, through a narrative bibliographic review, carried out between 2000 to 2020. The gene is naturally found on the X chromosome and is responsible, along with other genes and epigenetic modifications, for the inactivation of one female X chromosome and genetic balance with males. The technique was efficient in fibroblasts and in hematopoiesis, and allowed better understanding about the diseases pathophysiology, so, it can contribute to the development of more efficient therapies, although it doesn't represent a cure.

Key words: Down's Syndrome, *XIST* gene, X inactivation, pathophysiology, genomic engineering, gene therapy.

¹Graduanda do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

²Doutora em Patologia Molecular. Professora do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Down (SD), ou Trissomia do 21, é uma anormalidade genética provocada pela presença de uma terceira cópia do cromossomo 21 (PATTERSON, 2009). Foi descrita inicialmente, em 1866, por John Langdon Down, e pode acometer qualquer indivíduo, não sendo impactada pela sua raça (PAIVA; MELO; FRANK, 2018). Estima-se que a sua incidência mundial seja de 1 a cada 1.000 - 1.100 nascidos vivos, sendo que cerca de 3.000 a 5.000 crianças nascem com a doença por ano (ONU, 2019).

Existem basicamente três causas para a doença. A primeira delas (trissomia simples), que representa 95% dos casos, é uma não-disjunção meiótica, que consiste na não separação dos cromossomos 21 homólogos ou cromátides irmãs durante a meiose parental. A segunda é a translocação cromossômica (Robertsoniana), que representa de 3% a 4% dos casos e é baseada em rearranjos cromossômicos que provocam o ganho de informação genética. Já a terceira diz respeito ao mosaicismos, e corresponde a apenas de 1% a 2% dos casos. Nela, o erro de não-disjunção ocorre em uma das primeiras mitoses após a fecundação (KOZMA, 2007).

Crianças que apresentam a SD manifestam características e sintomas variados. Todavia, alguns traços são representativos da doença, como obesidade, prega epicântica, pescoço largo e curto, mãos largas com dedos curtos e prega simiesca, baixa implantação das orelhas, entre outros. É importante ressaltar que não existem graus da doença e que as variações fenotípicas derivam de fatores genéticos e externos (COSTA; DUARTE; GORLA, 2017).

Não existe uma cura conhecida para a SD, contudo, existem intervenções que podem contribuir para melhorias nas condições de vida de sindrômicos, se realizadas precocemente, e aumentar sua expectativa de vida. Dentre elas, têm-se as terapias da fala, assistência na educação, drogas específicas, entre outros (DOOLEY, 2016).

Nas últimas décadas, estudos *in vitro* e *in vivo* realizados para corrigir defeitos monogênicos têm sido muito desenvolvidos, diferente das correções de defeitos que envolvem excesso de informação genética, pois são consideradas improváveis. Trabalhos recentes têm avaliado a possibilidade da inserção de um gene capaz de promover o silenciamento da terceira cópia do cromossomo 21: o gene *XIST*. Com esse marco, seria possível compreender mais acerca da patologia celular da SD e, conseqüentemente, se aproximar cada vez mais da terapia para a doença (JIANG *et al.*, 2013).

Dentro do grupo Eutheria, as fêmeas recebem duas cópias do cromossomo X, enquanto os machos herdam da mãe apenas uma cópia deste cromossomo. Para que as fêmeas não expressem o dobro das características adquiridas no cromossomo X, é necessário que um deles

seja inativado, a partir de mecanismos de compensação de dose que evoluíram ao longo das gerações (OHNO, 1967).

Sabe-se que o mecanismo de inativação do cromossomo X (ICX) ocorre no início do desenvolvimento embrionário feminino e que é um processo estável e aleatório. Isso garante às fêmeas um organismo mosaico haploide no que se refere ao cromossomo X, que pode ser facilmente observado em situações como a cor da pelagem de camundongos ou de gatos cálicos (LYON, 1961).

O ICX ocorre devido à presença do Centro de Inativação do X (XIC), do qual faz parte o gene *XIST*. Este codifica o transcrito *Xist* (X-inactive specific transcript), responsável pelo início da inativação em um dos alelos. Em associação ao XIC, um conjunto de modificações epigenéticas e outros genes também dispõe de importância para o processo (WUTZ, 2011).

O alelo inativado é extremamente condensado, e pode ser observado como um pequeno corpo de heterocromatina, chamado de Cromatina Sexual ou Corpúsculo de Barr. Ele é encontrado em 30-40% das células femininas, já que as fêmeas apresentam o ICX de forma bem desenvolvida (BARR; BERTRAM, 1949). Contudo, não é o cromossomo X inteiro que sofre inativação: cerca de 15% dos genes conseguem escapar desse mecanismo sendo expressos em ambos os X (CARREL; WILLARD, 2005).

A partir disso, pensou-se no uso do gene *XIST* como forma de silenciar a cópia extra do cromossomo X, que é realizado a partir de enzimas específicas (nucleases dedo de zinco) capazes de reconhecer e quebrar a molécula de DNA do cromossomo em um local determinado e, então, inserir o gene. Essa técnica foi aplicada em grupos de células pluripotentes induzidas portadoras de SD e gerou resultados promissores, permitindo entender melhor quais vias celulares são afetadas na síndrome (URNOV *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2013).

Logo, ressalta-se a importância dos estudos a respeito dessa técnica, visto que este gene é capaz de normalizar a fisiologia celular responsável pela patologia, e permite realizar uma avaliação mais profunda sobre os efeitos diretos que a síndrome exerce nas funções celulares, podendo ser útil para desenvolvimento de medicamentos e terapias. Além disso, nota-se a escassez de literatura no que se refere a esses experimentos, o que justifica a atenção ao tema (CHIANG *et al.*, 2018).

Justifica-se, então, a realização do presente trabalho, cujo objetivo é descrever a possibilidade do emprego do gene *XIST* como forma de silenciamento do cromossomo 21 trissômico, característico da SD.

2 METODOLOGIA

O presente trabalho consistiu-se em uma revisão bibliográfica do tipo narrativa, que diz respeito a um estudo crítico da literatura que não usa critérios bem definidos e organizados para a busca e interpretação da informação. Para tal, o autor da revisão pode ser influenciado pelas ideias dos autores da literatura coletada, ou seja, está sujeito a viés de seleção. Nesse tipo de estudo, não há a obrigatoriedade de analisar a totalidade do conteúdo disponível nas fontes de busca, visto que, normalmente, possui uma temática menos específica que outros trabalhos. Ele é ideal para embasar teoricamente artigos, teses, dissertações, trabalhos de conclusão de curso, entre outros (UNESP, 2015).

Para a sua realização foram coletadas informações das bases de dados Scielo (Scientific Electronic Library Online), PubMed (Public Medline), BVS (Biblioteca Virtual em Saúde), Google Acadêmico, sites institucionais e livros. Para a busca foram utilizadas as palavras-chave: “Síndrome de Down”, “gene *XIST*”, “inativação do X”, “fisiopatologia”, “engenharia genômica” e “terapia gênica”, todas em inglês e português, utilizadas separadamente e aos pares com o auxílio do conector “AND/E”.

Foram selecionados 4 sites institucionais, 130 artigos científicos e 12 livros publicados entre 2000 e 2020 nos idiomas inglês e português, disponíveis com texto completo na íntegra. Alguns artigos científicos com data de publicação que antecedem esse período também foram incluídos no trabalho por serem considerados clássicos e relevantes para o tema.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 A Síndrome de Down

A Síndrome de Down (SD), também chamada de Trissomia do 21, consiste em uma síndrome provocada pela presença de uma terceira cópia total ou parcial do cromossomo 21 humano na constituição genética do indivíduo. No Brasil, estima-se que a incidência da SD seja de 1 a cada 700 nascimentos, não sofrendo influências étnicas, de gênero ou de classes sociais (BRASIL, 2012).

As chances de uma criança nascer com SD, entretanto, aumentam de acordo com a idade materna (> 34 anos), a qual é o principal fator de risco para a síndrome. Isso se dá devido à quantidade reduzida das proteínas coesina e securina, que são importantes participantes do ciclo celular, mantendo as cromátides irmãs unidas pelo centrômero. À medida que os gametas maternos envelhecem, os níveis dessas proteínas decrescem, logo, ocorrem instabilidades no pareamento cromossômico e este torna-se mais suscetível a erros (UTSWMED, 2017).

Além da idade materna avançada, fatores ambientais também podem ser fatores de risco para o desenvolvimento da síndrome, aumentando o risco de erros de disjunção cromossômica. Entre eles, tem-se o tabaco, a falta da suplementação com ácido fólico, uso de contraceptivo oral, entre outros. Porém, são de difícil identificação, visto que variam de acordo com os níveis e tempo de exposição e com a dosagem (COPPEDÈ, 2016).

A síndrome foi inicialmente descrita em 1866, por John Langdon Down, do qual derivou o seu nome. O pediatra inglês foi responsável por diferenciar os indivíduos com SD de outros com algum tipo de retardo mental, os quais eram comumente denominados “idiotas” e “imbecis” e raramente categorizados com base em diagnósticos diferenciais (STARBUCK, 2011). Ele percebeu semelhanças entre as feições faciais dos sindrômicos e indivíduos de descendência mongol, além de observar que essas características fenotípicas eram compartilhadas entre pessoas não relacionadas. Dessa forma, subclassificou tais indivíduos com comprometimento cognitivo como “idiotas mongóis” ou “mongoloides” (DOWN, 1866).

Até então, o diagnóstico da SD era realizado a partir das manifestações físicas da doença, já que as técnicas de cariotipagem ainda não estavam disponíveis. Entretanto, em 1959, Jérôme LeJeune descobriu a existência da terceira cópia do cromossomo 21 nas células dos portadores da síndrome e estabeleceu a sua causa (LEJEUNE; GAUTIER; TURPIN, 1959).

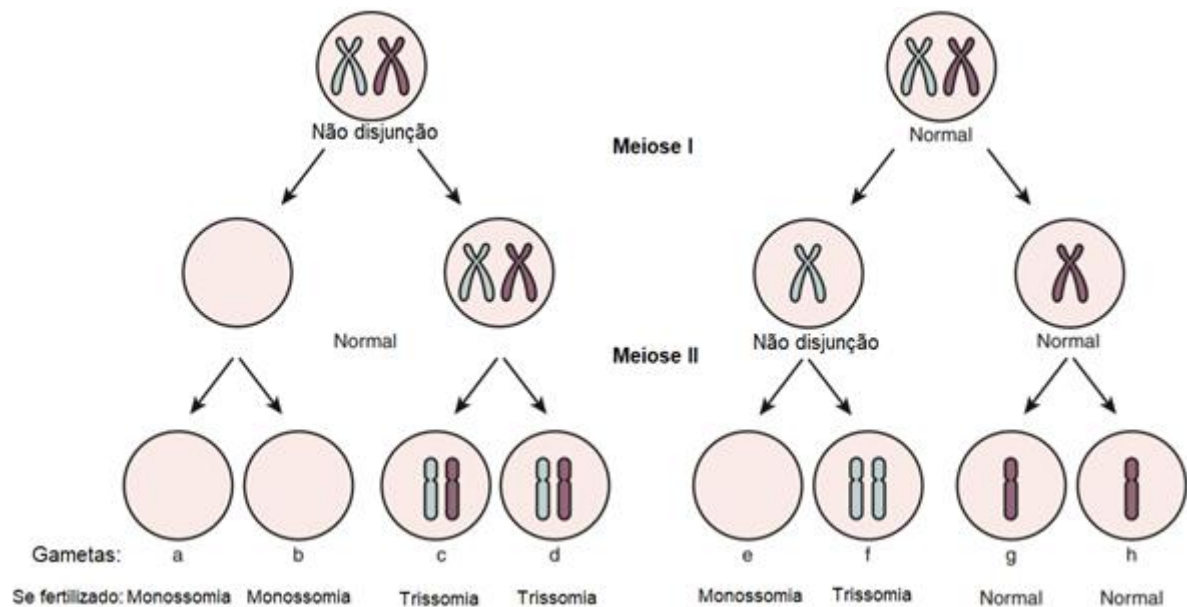
3.1.1 Etiologia da síndrome

Existem três causas principais para a SD. A primeira delas, mais frequente, representando 95% dos casos, é a não-disjunção cromossômica, geralmente meiótica, que provoca a Trissomia Simples. A maioria dos casos deriva de um erro durante a gametogênese materna (88%), dos quais 75% ocorrem durante a meiose I (HASSOLD; HUNT, 2001; ANTONARAKIS *et al.*, 2004). Isso é explicado pelo longo período em que os ovócitos imaturos permanecem suspensos em meiose I, desde sua produção durante o período fetal, até uma ovulação e posterior fertilização, quando a mulher atinge sua maturidade sexual. O grande intervalo de tempo, que pode levar de 10 a 50 anos, torna o ovócito predisposto ao acúmulo de efeitos danosos, os quais resultam em erros de separação cromossômica, seja em meiose I ou II (HUNT, 2006; SHERMAN *et al.*, 2007).

Na meiose I normal, ocorre a separação dos cromossomos homólogos. Já na meiose II, há a separação das cromátides irmãs de cada cromossomo, o que a torna bastante semelhante a uma mitose. Enquanto na espermatogênese são produzidos 4 gametas haploides a partir de uma célula diploide, na ovogênese, uma célula diploide dá origem a apenas um óvulo haploide e

três corpúsculos polares. Quando há um erro na dissolução dos quiasmas formados durante a fase de crossing over da anáfase I, ambos os cromossomos homólogos podem permanecer juntos, ou seja, ocorre um erro de não-disjunção. Nesse caso, 50% dos gametas produzidos terão duas cópias do cromossomo em questão, enquanto a outra metade não terá nenhuma (não será viável). Se ocorrer um erro durante a separação das cromátides irmãs, na meiose II, 25% dos gametas terão as duas cópias, 25% não terá nenhuma (inviável) e 50% será normal (Figura 1) (HASSOLD; HUNT, 2001).

Figura 1: Comparação do erro de não-disjunção meiótica durante meiose I e meiose II, e representação dos respectivos gametas formados. Se cada um dos gametas for fertilizado por um gameta normal, o indivíduo formado será portador de (a) monossomia; (b) monossomia; (c) trissomia – SD; (d) trissomia – SD; (e) monossomia; (f) trissomia – SD; (g) normal; (h) normal.



Fonte: Adaptado de MORTON; LEE, 2009.

Se o cromossomo em questão for o 21, e um dos gametas com duas cópias dele for fecundado por outro gameta normal, uma célula trissômica será gerada, a qual, após passar por uma série de mitoses, dará origem a um indivíduo com SD. Todas as suas células terão o mesmo cariótipo: 47, XX + 21 (quando feminino) ou 47, XY + 21 (quando masculino) (KOZMA, 2007).

A segunda causa da SD é a Translocação Robertsoniana, correspondente a 3 a 4% dos casos (HUNTER, 2010). Acontece quando, após quebras nas regiões centroméricas, o braço longo do cromossomo 21 liga-se ao braço longo de outro cromossomo acrocêntrico, e os braços

curtos de ambos são perdidos. Embora seja mais comum entre os cromossomos 21 e 14, também pode ocorrer entre o 21 e o 13, 15, 22 ou até o próprio 21 (ZHAO *et al.*, 2015).

A translocação pode derivar de uma mutação *de novo*, entretanto, a maior parte dos casos é herdada de um dos progenitores, o qual apresenta a translocação em seu cariótipo, porém não expressa as características da síndrome, visto que há um balanceamento de material genético (MACLENNAN, 2019).

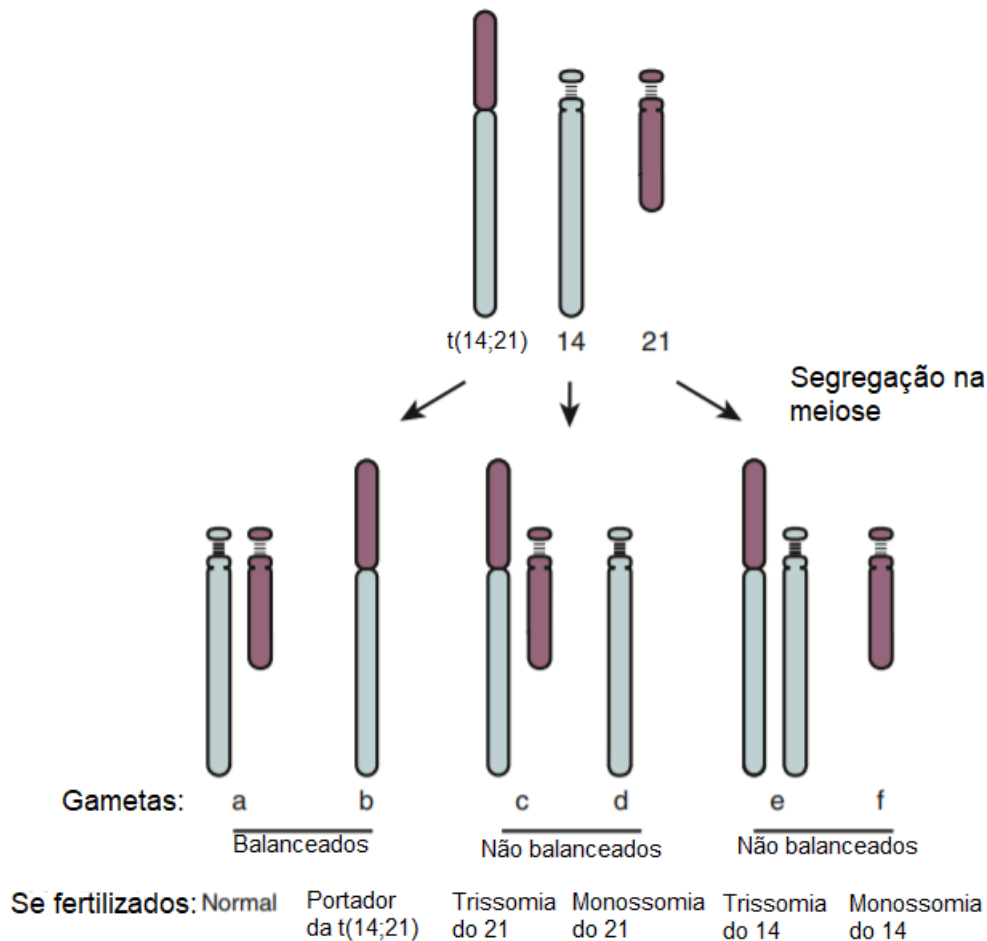
No caso da herança da translocação entre os cromossomos 14 e 21, o progenitor portador irá realizar meioses para produzir seus gametas. Nesse processo, os cromossomos irão sofrer duplicação e posterior emparelhamento, porém, devido à conformação translocada de um deles, o emparelhamento será feito de forma trivalente. Após isso, a segregação entre eles ocorrerá de maneira alternada ou adjacente. A primeira resultará em gametas normais e gametas aneuplóides portadores da translocação, balanceados. Já a segunda, em gametas não-balanceados, os quais podem ter: (1) uma cromátide do cromossomo 14 translocada com uma cromátide do cromossomo 21 e uma cromátide do cromossomo 14 normal; (2) uma cromátide do cromossomo 21 normal; (3) uma cromátide do cromossomo 14 translocada com uma cromátide do cromossomo 21 e uma cromátide do cromossomo 21 normal; (4) uma cromátide do cromossomo 14 normal (MOREL *et al.*, 2004).

Se houver fecundação entre um gameta normal e: gameta normal, a prole será normal; gameta balanceado, a prole será portadora da translocação, mas não expressará a SD devido à equivalência de material genético; (1), a prole terá uma trissomia do cromossomo 14; (2) a prole terá uma monossomia do cromossomo 14, logo, será inviável; (3) a prole terá uma trissomia do cromossomo 21, ou seja, SD; (4) a prole terá uma monossomia do cromossomo 21, logo, será inviável. As monossomias são sempre incompatíveis com a vida, enquanto as trissomias, embora resultarem frequentemente em aborto espontâneo, podem ser viáveis (Figura 2) (GARRIDO-GIMENEZ; ALIJOTAS-REIG, 2015).

A terceira e última causa da SD é o mosaïcismo, que diz respeito a 1 a 2% dos diagnósticos (HULTÉN *et al.*, 2013). Ele ocorre devido a erros de não-disjunção mitótica, ou seja, pós fecundação e formação do zigoto (HULTÉN *et al.*, 2010). A célula que recebeu as três cópias do cromossomo 21 em razão do erro irá dar origem a uma linhagem celular, e todas as células derivadas de tal linhagem irão ser portadoras do mesmo erro, ou seja, terão SD. Dessa forma, duas populações de células geneticamente distintas serão formadas: uma portadora da síndrome e outra normal (KOUZAK; MENDES; COSTA, 2013).

O momento em que o erro acontece é crucial para determinar a porcentagem de células afetadas pelo mosaicismo, ou seja, quanto mais cedo no desenvolvimento embrionário ele ocorrer, uma maior quantidade de células será afetada. Dessa forma, os sintomas da SD serão expressos de maneira mais intensa, enquanto em condições em que o erro ocorreu mais tarde, menos células expressarão o fenótipo da síndrome (DELHANTY; SENGUPTA; GHEVARIA, 2019).

Figura 2: Esquema representativo dos gametas formados por um progenitor portador da translocação Robertsoniana entre o cromossomo 21 e o 14, assim como os possíveis indivíduos formados após fertilização. Quando fertilizados por um gameta normal, o resultado será um indivíduo: (a) normal; (b) normal portador da translocação; (c) portador da trissomia do 21; (d) portador de monossomia do 21 – inviável; (e) portador da trissomia do 14; (f) portador de monossomia do 14 – inviável.



Fonte: Modificado de MORTON; LEE, 2009.

Quando o erro afeta a linhagem germinativa de células, é possível passá-lo para a prole, a qual também irá ser portadora da SD, entretanto, em sua forma não mosaica. Nesse caso, se o mosaicismo for gonadal, ou seja, afetar as células germinativas mais primordiais, dando

origem à maioria dos gametas trissômicos, é de se esperar que a SD ocorra em repetidas gestações. Se apenas um ou alguns gametas forem afetados (erro ocorre mais tarde), a SD pode ser uma ocorrência individual (COZZI *et al.*, 1999; DELHANTY, 2011; GHEVARIA *et al.*, 2015).

3.1.2 Fenótipo da síndrome

Os pacientes portadores de SD podem apresentar sintomas e características variadas, os quais podem existir em alguns indivíduos e não necessariamente em outros (ROUBERTOUX; KERDELHUÉ, 2006). Geralmente, o fenótipo inclui a presença de prega simiesca (prega palmar transversal única), hipotonia, atraso no desenvolvimento, mãos e dedos mais curtos, afastamento do hálux, baixa estatura, deslocamento dos joelhos, atraso na aprendizagem, prega epicântica, língua protusa, baixa implantação das orelhas, braquicefalia, pescoço curto, rosto redondo e plano, ponte nasal plana, porção occipital da cabeça plana, entre outros (MACLENNAN, 2019).

Cerca de metade dos pacientes nascem com doenças cardíacas congênitas, dos quais os mais comuns são defeito do septo atrioventricular (45%), defeito do septo ventricular (35%), defeitos isolados do septo atrial tipo secundum (8%), persistência isolada do canal arterial (7%) e tetralogia de Fallot (4%) (FREEMAN *et al.*, 2008; BULL; COMMITTEE ON GENETICS, 2011; MORRIS *et al.*, 2014; STOLL *et al.*, 2015). Durante a adolescência e a idade adulta, o paciente ainda pode desenvolver prolapso da valva mitral (46%) e regurgitação da aorta (17%) (MORRISON; MCMAHON, 2018).

Entre 38 e 75% dos síndrômicos costumam desenvolver perda de audição em diferentes níveis e formas, o que requer o correto acompanhamento e as devidas intervenções (ROIZEN; PATTERSON, 2003; NIGHTENGALE, 2018). À medida que o indivíduo vai envelhecendo, suas chances de apresentar problemas oftalmológicos crescem, tais como catarata, glaucoma, estrabismo, defeitos de refração, problemas na retina, na íris e nistagmo (KRINSKY-MCHALE *et al.*, 2012).

São mais propensos à obesidade do que a população em geral, devido ao metabolismo mais lento, além de frequentemente enfrentarem problemas ortodônticos (AKSAKALLI; ILERI, 2012; BERTAPELLI *et al.*, 2016). Ademais, doença celíaca e hipotireoidismo também costumam ocorrer, em frequências de 4,6 a 7,1% e 15%, respectivamente (CARNICER *et al.*, 2001; BULL; COMMITTEE ON GENETICS, 2011).

Apresentam também, mais regularmente que o resto da população, doenças como artrite, diabetes mellitus, leucemia, depressão, apneia do sono obstrutiva, distúrbios gastrointestinais, convulsões, subluxação atlantoaxial, doenças dermatológicas e doença de Alzheimer (ROIZEN; PATTERSON, 2003; ASIM *et al.*, 2015).

3.1.3 *Diagnóstico*

Durante a gestação, no pré-natal, técnicas de screening são realizadas para o diagnóstico de algumas síndromes, entre elas, a SD. Tais técnicas são baseadas na dosagem de marcadores bioquímicos presentes no soro materno, associada à medição do tamanho da translucência nugal fetal (TN) durante o primeiro trimestre (CUCKLE; MAYMON, 2016).

Dentre os compostos, tem-se a α -fetoproteína, presente tanto no soro materno quanto no líquido amniótico, β -gonadotrofina coriônica humana, estriol não-conjugado, inibina A e proteína A plasmática associada à gravidez. Esses marcadores sofrem variações em seus níveis dependendo da idade gestacional, e alguns podem diferenciar a SD de outras aneuploidias. A partir dos níveis obtidos na dosagem, é usado um algoritmo de computador que os associa com idade materna e idade gestacional e fornece o risco que o feto possui de ter SD. Dependendo do resultado, é recomendada a realização de aconselhamento genético e testes confirmatórios como amniocentese e biópsia de vilosidades coriônicas, seguida de análise do cariótipo (ANTONARAKIS *et al.*, 2020).

Com a incorporação da ultrassonografia fetal ao pré-natal no final da década de 80, algumas anormalidades associadas à SD passaram a ser observadas. Uma das principais é o aumento do tamanho da TN durante o primeiro trimestre, e pode vir acompanhada da ausência do osso nasal, ângulo frontomaxilar aumentado, regurgitação da valva tricúspide e fluxo reduzido nos ductos venosos. No segundo trimestre, outras observações a serem feitas incluem a medição reduzida do comprimento do úmero e do fêmur, espessamento da pele da nuca, língua proeminente, cistos no plexo coroide, defeitos cardiovasculares, afastamento do hálux, entre outras (BIANCHI *et al.*, 2010).

Além dessas técnicas, desenvolveu-se ainda o screening pré-natal não-invasivo (NIPS), visto que a amniocentese e a biópsia de vilosidades coriônicas são procedimentos invasivos e que colocam o feto em risco. O NIPS, então, usa o DNA fetal livre isolado no sangue materno e avalia a presença excessiva de material do cromossomo 21, em comparação com cromossomos de referência (GREGG *et al.*, 2013). Entretanto, ele é um teste suscetível a falsos-positivos e falsos-negativos, já que o DNA obtido é proveniente da placenta e pode não

representar o cariótipo fetal real. Dessa forma, no caso de um NIPS positivo, ainda é recomendada a realização dos testes confirmatórios invasivos (TAYLOR-PHILLIPS *et al.*, 2016; WILSON; POON; GHIDINI, 2016).

A partir do diagnóstico pré-natal da SD, os pais têm a oportunidade de se educar a respeito da síndrome e de se adequar para que seja possível fornecer as melhores condições de vida à criança, como procurar os profissionais mais capacitados para o acompanhamento e intervenções a serem estabelecidas (RALSTON *et al.*, 2001).

3.1.4 Intervenções e tratamentos para a síndrome

Não existe cura para a SD, entretanto, o indivíduo sindrômico, se submetido a suporte médico, acompanhamento e intervenções de desenvolvimento ainda durante a infância, apresentará benefícios (PRESSON *et al.*, 2013).

Se a criança apresentar dificuldades de crescimento e/ou de alimentação, o ideal é manter sempre o acompanhamento profissional para auxiliar na amamentação, tratar má formações gastrointestinais da maneira mais adequada, avaliar e tratar condições como hipotireoidismo, que podem interferir no crescimento, fazer reposição hormonal com hormônio do crescimento, se necessário e possível, e monitorar e controlar o peso a partir do balanceamento da dieta e de exercícios (HUNTER, 2010).

No caso de problemas de audição, o tratamento pode incluir o manejo de otites médias, que podem ser frequentes, e associado à amigdalectomia, adenoidectomia, cirurgias nas tubas de Eustáquio, terapias de fala, comunicação por linguagem de sinais, implantes cocleares, entre outros (ROIZEN; PATTERSON, 2003). Já os problemas de visão devem ser corretamente avaliados por exames oftalmológicos frequentes e eventuais cirurgias para correção de cataratas, por exemplo (KRINSKY-MCHALE *et al.*, 2014).

Para controle de defeitos cardíacos congênitos, exames como ecocardiograma devem ser realizados regularmente, e reparos cirúrgicos e até mesmo transplante de coração podem ser usados (MORALES-DEMORI, 2017). A realização de polissonografia é recomendada para pacientes com SD até os 4 anos de idade, independente dos sintomas, para avaliar a condição de apneia do sono. Alternativas para controle dessa situação incluem oximetria em casa, uso de aparelho de pressão positiva (CPAP), equipamentos de avanço mandibular, perda de peso, amigdalectomia e adenoidectomia (SMITH, 2001; ESBENSEN *et al.*, 2018; HILL *et al.*, 2018).

A reposição de hormônios tireoidianos, como TSH e T4, é recomendada em situações de hipotireoidismo, associada ao acompanhamento regular dos seus níveis séricos (BULL;

COMMITTEE ON GENETICS, 2011). Também é importante avaliar a existência de fenótipos indicadores de declínio cognitivo, que podem estar relacionados com a maior chance de desenvolvimento de Alzheimer. Quando o indivíduo apresenta um declínio cognitivo, como o Alzheimer ou demência, é importante que ele tenha acesso ao suporte adequado (LOTT; HEAD, 2019).

O uso de medicamentos anticonvulsivantes é feito se o paciente apresentar quadros epiléticos, entretanto, o tratamento varia de acordo com a etiologia das convulsões (GHOLIPOUR *et al.*, 2017). Em casos de subluxação atlantoaxial, ou seja, desalinhamento entre a primeira e a segunda vértebra cervical, o paciente deve ser alertado para evitar praticar esportes, o qual pode agravar o problema (BULL; COMMITTEE ON GENETICS, 2011).

O tratamento de problemas mentais, como depressão e transtorno de ansiedade, deve ser realizado da maneira convencional, com acompanhamento psicológico (NEVILL; BENSON, 2018). O mesmo deve ser feito para problemas de desenvolvimento neurológico e funções cognitivas, como autismo ou transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH), variando de acordo com as apresentações clínicas de cada indivíduo (AMAN; BUICAN; ARNOLD, 2003).

Infecções, principalmente no trato respiratório, devem ser tratadas rapidamente e de maneira convencional, lembrando que é importante que o esquema vacinal do indivíduo síndrômico seja completo, sem nenhuma contraindicação. Outros problemas imunológicos, como doença celíaca, devem ser avaliados por meio de dosagem dos níveis de IgA (BULL; COMMITTEE ON GENETICS, 2011).

Outras condições e patologias apresentadas devem ser tratadas de acordo com as necessidades individuais e físicas de cada paciente. Normalmente, há o envolvimento de diversos profissionais da saúde e da educação, tais como fisioterapeutas, terapeutas ocupacionais, terapeutas de fala, entre outros. Juntos, ajudam o paciente a atingir metas de desenvolvimento e a participar de atividades do dia a dia. As intervenções devem ser realizadas o mais cedo possível, tanto com o paciente quanto com a sua família, e serem continuadas ao longo de toda a vida do síndrômico, de forma a proporcioná-lo a melhor qualidade de vida possível (NICHD, 2017).

3.2 Mecanismo de inativação do cromossomo X

Após a fertilização do oócito primário, há o alinhamento do material genético presente no pronúcleo masculino, proveniente do espermatozoide, com o presente no oócito, garantindo

então os 46 cromossomos ao óvulo fertilizado. Dentre os 23 cromossomos presentes no espermatozoide, um deles é o cromossomo sexual, o qual pode ser tanto o X quanto o Y (uma metade dos gametas masculinos carrega o X e a outra, o Y). Se um espermatozoide que carrega o Y fecunda o oócito, será gerado um indivíduo do sexo cromossômico masculino (XY). Já se o que carrega o X fecundar, o embrião será do sexo cromossômico feminino (XX) (GUYTON; HALL, 2011).

Enquanto o cromossomo Y possui menos de 100 genes e determina o desenvolvimento masculino, o X tem mais de 1100 genes, os quais são responsáveis por diversos fenótipos essenciais à célula. Para que as fêmeas não expressem duas vezes mais a quantidade de características ligadas ao X que os machos, existe um mecanismo que inativa um dos cromossomos X promovendo uma compensação de dose, chamado de mecanismo de inativação do X (ICX) (LYON, 1961; DENG *et al.*, 2014).

Esse mecanismo inicia-se nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário feminino e é aleatório, ou seja, tanto o cromossomo X materno (X_m) quanto o paterno (X_p) tem a mesma chance de serem inativados. Além disso, também é estável (fixado), logo, quando um dos cromossomos é inativado em uma célula, todas as células derivadas dessa linhagem receberão o mesmo padrão de inativação. Dessa forma, o indivíduo formado carregará dois tipos celulares: 50% inativando o X_m e 50%, o X_p. Como consequência, o organismo será mosaico no que diz respeito aos produtos e fenótipos derivados dos genes do cromossomo X (HEARD; DISTECHE, 2006; FERREIRA; FRANCO, 2011).

O mosaicismo pode ser observado quando analisamos a pelagem de gatos. Fêmeas são capazes de expressar a pelagem tortoiseshell (preta e laranja) e tricolor (preta, laranja e branca), que recebe o nome de cálica. Isso se dá, pois, o gene que codifica a cor laranja está localizado no cromossomo X, e pode apresentar alelos laranja (L) e não laranja (l). O alelo l permite a expressão da cor preta, cujo gene está localizado em um cromossomo autossômico, enquanto o L inibe essa expressão, resultando na pelagem laranja. Se fêmeas heterozigotas (L/l) inativam o cromossomo X que carrega L, o l será expresso, dessa forma, o pelo será preto. Porém, como elas apresentam mosaicismo, parte das suas células irão inativar o cromossomo X que carrega l, deixando L expresso e, conseqüentemente, apresentando partes da pelagem laranja. Nesse caso, a gata irá apresentar pelagem tortoiseshell. Em associação, outro gene, localizado também em um cromossomo autossômico, poderá ser responsável pela expressão da cor branca, garantindo à gata a coloração cálica (NICHOLAS, 2009; PAZZA; KAVALCO, 2015).

Normalmente, apenas as fêmeas podem apresentar esses tipos de coloração, visto que machos possuem apenas um cromossomo X e não o inativam. Entretanto, em casos de aneuploidias em que machos apresentam mais de um cromossomo X, essas pelagens também poderão ser vistas, mesmo que seja um fenômeno muito raro (COSTA *et al.*, 2017).

Para que apenas um dos dois cromossomos X seja inativado, o ICX é controlado por um *locus* chamado centro de inativação do X (XIC), localizado no braço longo do próprio cromossomo (Xq13), ou seja, que age em *cis* (RUSSEL, 1963). Dentro do XIC, vários genes atuarão em conjunto para realizar o correto ICX, entre eles, o gene *XIST* (X Inactive Specific Transcript), o qual possui maior influência nessa regulação. Os outros genes serão responsáveis, então, por regular a atividade do *XIST*, de forma positiva ou negativa (LEE; DAVIDOW; WARSHAWSKY, 1999; LODA; HEARD, 2019).

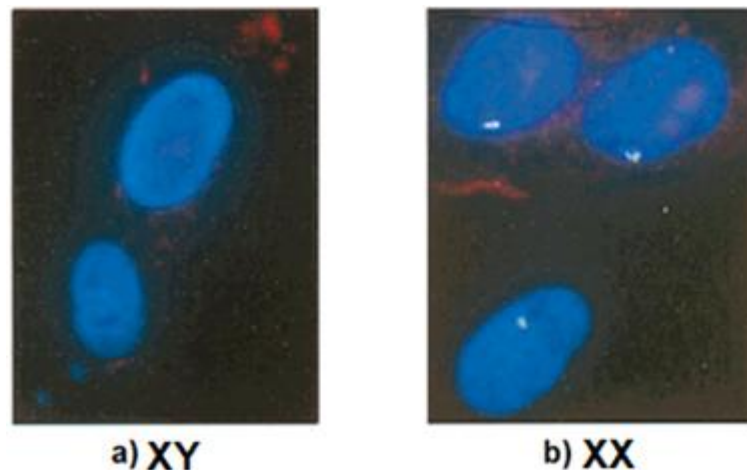
3.2.1 O gene *XIST*

O gene *XIST* localiza-se no braço longo do cromossomo X, na posição 13.2 (Xq13.2) e é responsável pela transcrição de um RNA de cerca de 19 Kb (HONG; ONTIVEROS; STRAUSS, 2000; NIH, 2020). No cromossomo X que é inativado, esse gene é expresso em grandes quantidades, sendo transcrito em um RNA não codificante que envolve o cromossomo (atuação em *cis*), devido à sua capacidade de se ligar a proteínas nucleares. Esse processo provoca uma série de alterações epigenéticas, as quais fazem com que cromatina se torne muito condensada (heterocromatina) e permaneça em um estado em que é impossível ocorrer a transcrição (MOINDROT; BROCKDORFF, 2016; PINTER, 2016; PRZANOWSKI; WASKO; BHATNAGAR, 2018).

Dentre as alterações epigenéticas, é importante destacar as modificações nas histonas e a metilação do DNA, devido à ativação do complexo repressivo Polycomb. Uma das proteínas mais importantes desse complexo é a SPEN, a qual possui 4 domínios de ligação ao RNA e é recrutada logo nos primeiros momentos do ICX. Ela recruta e ativa a enzima HDAC3, responsável por remover as acetilações presentes nas histonas, ou seja, retira os grupos que promovem a ativação dos genes. Além disso, a SPEN interage com proteínas responsáveis pelo silenciamento epigenético, como NCOR1 e NCOR2. Também é conhecido que regiões da SPEN interferem no maquinário de transcrição do DNA, tal como a RNA polimerase II, impedindo que a transcrição dos genes do cromossomo X seja realizada (DOSSIN *et al.*, 2020; TROTMAN; CALABRESE, 2020).

Outras proteínas do complexo também influenciam no processo, como a Ezh2, que promove metilação da histona H3 (H3K27), hipoacetilação de H3 e H4, hipometilação da H3K4, metilação da H3K9, entre outros (PLATH *et al.*, 2002; PLATH *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003). Todas essas alterações, então, fazem com que o cromossomo X inativado se condense em heterocromatina, a qual é chamada de Cromatina Sexual ou Corpúsculo de Barr (Figura 3). O corpúsculo permanece condensado em intérfase, e pode ser visualizado no microscópio na proximidade do envoltório nuclear das células das mulheres, onde são encontradas diversas enzimas que também atuam na manutenção da estrutura inativa do cromossomo (BARR; BERTRAM, 1949; BRANDÃO, 2015).

Figura 3: Emprego da técnica de RNA-FISH para visualização da Cromatina sexual em células humanas. Em **a**, nota-se ausência de corpúsculos de Barr, visto que são células XY; em **b**, é possível ver um corpúsculo por célula (em verde), localizados na membrana nuclear, por serem células XX.



Fonte: Modificado de HONG; ONTIVEROS; STRAUSS, 1999.

Normalmente, existe apenas um corpúsculo por célula, visto que as mulheres inativam apenas um dos cromossomos X. Entretanto, o ICX segue uma regra que define a quantidade de cromossomos a serem inativados, conhecida como $n-1$. Nela, n corresponde ao número de cromossomos X presentes na célula, e o resultado será equivalente ao número de corpúsculos visíveis na microscopia. Em mulheres normais (XX) e homens com síndrome de Klinefelter (XXY), $n = 2$, logo, pela regra, apenas um cromossomo será inativado. Nos homens (XY) e mulheres com síndrome de Turner (X0), $n = 1$, então não há inativação de nenhum cromossomo. Nos casos em que $n > 2$, como mulheres XXX, a regra também é aplicável (LYON, 1971; KLUG *et al.*, 2010).

3.2.2 Regulação do gene *XIST*

Além do *XIST*, dentro do XIC existem outros genes cujos transcritos também são RNA's não codificantes que atuam como reguladores do *XIST*. Um dos mais conhecidos é o *TSIX*, cujo RNA não codificante regula negativamente o *XIST* (SHIBATA; LEE, 2004). Dessa forma, o *TSIX* torna-se um importante controlador da inativação de apenas um dos cromossomos X, visto que ele está expresso apenas no X ativo (Xa) e bloqueia os eventos que culminam na inativação da sua transcrição (MLYNARCZYK; PANNING, 2000).

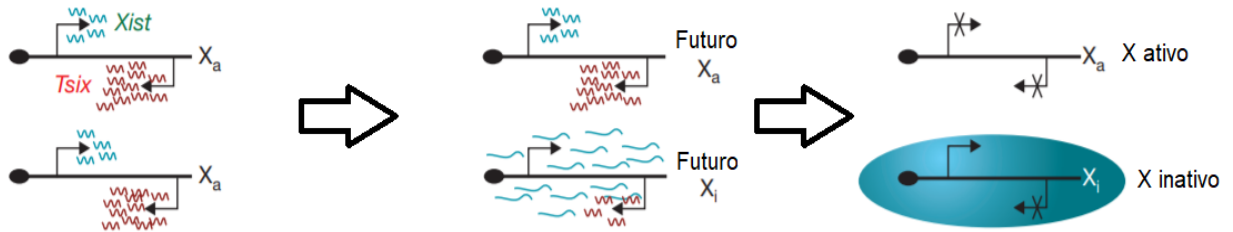
Esse gene está localizado a 3' do gene *XIST* e é transcrito na orientação oposta a ele. O resultado da sua transcrição, então, é uma sequência de RNA não codificante antisense, a qual sobrepõe a unidade de transcrição do *XIST* quase que completamente (exceto a sua região promotora) e impede a sua expressão, a partir de modificações da cromatina da região. Devido a isso, foi nomeado então como *TSIX*, de forma oposta a *XIST* (STAVROPOULOS; LU; LEE, 2001; OHHATA *et al.*, 2008).

Acredita-se que a expressão do *TSIX* em apenas um dos cromossomos se dá devido a um evento que ocorre durante o período de desenvolvimento celular, quando há um momento em que os dois cromossomos X pareiam-se em sua região de XIC. Nesse evento, ocorreria uma quebra de simetria, e o *TSIX*, então, deixaria de ter expressão nos dois alelos e passaria a ter apenas em um, permitindo com que o *XIST* exercesse seu papel no outro (BACHER *et al.*, 2006; XU; TSAI; LEE, 2006). Contudo, ainda não está totalmente esclarecido quais são os motivos que levam a esse evento, apenas que ele é o provável responsável pela escolha de qual cromossomo X será inativado (FRAGA, 2012).

A atividade do *TSIX*, no entanto, varia de acordo com a fase embrionária. No estágio inicial de pré-diferenciação, ele está ativo nos dois cromossomos, reprimindo o *XIST*. Quando ocorre a indução da diferenciação, sua atividade se dá em apenas um dos cromossomos, o qual permanecerá ativo, com *XIST* reprimido. Ele permanece ativo até o *XIST* ser completamente desligado, e então também cessa sua atividade (Figura 4) (MOREY; BICKMORE, 2006).

Entretanto, a atividade de *TSIX* é regulada por um elemento chamado de XCE (elemento controlador do X), localizado a cerca de 15 Kb do *TSIX*, também em XIC. Esse elemento é quem efetivamente define qual cromossomo será inativado, pois impacta diretamente na assimetria do *TSIX*. Em cada cromossomo X existe um XCE, e um deles é mais fraco (localizado no Xi) e o outro mais forte (localizado no Xa). Essa característica é, provavelmente, adquirida no momento de interação entre os XIC's, anteriormente explicada (CHADWICK *et al.*, 2006; HEARD; DISTECHE, 2006).

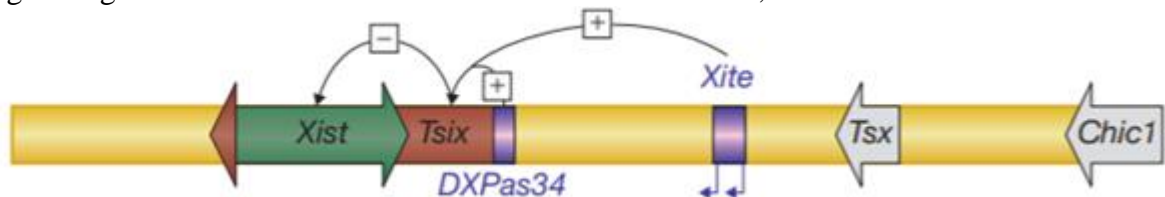
Figura 4: Processo de inativação do cromossomo X de acordo com a atividade do gene *TSIX*. Inicialmente, ambos os cromossomos X estão ativos, pois *TSIX* está ativo reprimindo o *XIST*. Quando se inicia a diferenciação celular, o futuro X_a continua expressando *TSIX* reprimindo o *XIST*, enquanto o futuro X_i (X inativo) passa a expressar apenas o *XIST*. Ao fim, quando o *XIST* é completamente desligado em X_a , *TSIX* também se desliga. No X_i , o *XIST* é transcrito e promove a sua inativação.



Fonte: Modificado de MOREY; BICKMORE, 2006.

Um gene específico faz parte do XCE e atua nessa regulação: o *XITE*. Este é um regulador positivo do *TSIX*, ou seja, sua transcrição leva à ativação e permanência do *TSIX* no futuro X_a e sua ação em *cis*. Como o XCE é forte em apenas um dos cromossomos X (X_i), consequentemente o *XITE* também é, dessa forma, é estabelecida então a assimetria do *TSIX* e a inativação de apenas um X. Além dos genes abordados, outros componentes do XIC (Figura 5) também são estudados e demonstram interferência na regulação do *XIST*, como o *TSX* e *DXPas34* (OGAWA; LEE, 2003).

Figura 5: Estrutura do XIC. Observa-se a regulação positiva exercida pelo *XITE* em *TSIX*, cujo RNA não codificante (seta vermelha) sobrepõe o sítio de transcrição do *XIST* (seta verde) – o regula negativamente. Outras estruturas também são visíveis, como *TSX* e *DXPas34*.



Fonte: Modificado de MOREY; BICKMORE, 2006.

3.2.3 Escape ao ICX

O ICX, além de ser aleatório e fixado, é incompleto. Isso quer dizer que, embora a maioria dos genes presentes no cromossomo X esteja submetida à inativação, cerca de 15% dos genes escapam dela, permanecendo ativos. Outros 10% tem sua expressão variável, ou seja, podem estar ativos em algumas células e em outras não, e esse escape varia de acordo com o tipo de tecido, com características individuais, com a fase do desenvolvimento. Os genes que

escapam são caracterizados por estarem protegidos, imunes às modificações da cromatina que são induzidas pelo ICX (CARREL; WILLARD, 2005; DENG *et al.*, 2014).

Normalmente, esses genes estão localizados na parte distal do braço curto (Xp) do cromossomo X, devido à distância do gene *XIST*, que dificulta a propagação do seu RNA não codificante, e à recente aquisição na evolução, derivada do cromossomo Y (DISTECHE, 1999; HUYNH; LEE, 2003; ROSS *et al.*, 2005; BERLETCH *et al.*, 2011). Existem, ainda, os que estão localizados nas regiões homólogas entre os cromossomos X e Y, as regiões pseudoautossômicas (PAR). No homem, eles são expressos nos dois alelos, logo, para balancear a expressão gênica nos dois sexos, não podem ser inativados nas mulheres (CHANG *et al.*, 2006).

O escape ao mecanismo é importante para garantir as diferenças entre os sexos, visto que grande parte dos genes relacionados aos hormônios sexuais estão localizados no cromossomo X, principalmente na região que sofre o escape. A expressão bialélica dos genes escapados nas mulheres, em comparação à monoalélica nos homens, é o que permite isso, mesmo que seja mais fraca no Xi do que no Xa, levando a uma expressão feminina menor que o dobro da masculina. Em adição a esses genes, o cromossomo Y também promove essa diferença, visto que possui genes que levam ao desenvolvimento masculino, exclusivamente (ARNOLD; BURGOYNE, 2004; VAWTER *et al.*, 2004; XU; DISTECHE, 2006; TALEBIZADEH; SIMON; BUTLER, 2006; JOHNSTON *et al.*, 2008; ARNOLD, 2009; BERMEJO-ALVAREZ *et al.*, 2011).

Além disso, o ICX, associado ao escape de alguns genes, leva à variabilidade genética entre o sexo feminino, devido ao mosaïcismo característico do mecanismo e ao escape inconstante de alguns genes. Esse fato pode ser percebido quando se avalia gêmeas monozigóticas, as quais são menos semelhantes que gêmeos monozigóticos em capacidade de interação social e habilidades verbais (LOAT *et al.*, 2004; MIGEON, 2007).

O escape ainda exerce grande papel em doenças, como a síndrome de Turner. Nesse caso, a mulher possui monossomia do cromossomo X (45,X), o que proporciona a ela várias características, embora, normalmente, 99% dos embriões com esse cariótipo não sobrevivem à gestação. As pacientes portadoras dessa síndrome apresentam uma deficiência dos genes que escapariam ao ICX, o que é responsável por grande parte do fenótipo (ZINN; ROSS, 2001). Já quando há um excesso de cópias do cromossomo X e, conseqüentemente, dos genes que escapam, como no caso da Trissomia do X (47,XXX) ou da síndrome de Klinefelter (47,XXY), diferentes fenótipos também seriam observados, principalmente relacionados ao

desenvolvimento e funcionamento do cérebro (GESCHWIND *et al.*, 2000; TARTAGLIA *et al.*, 2010).

3.3 Silenciamento do cromossomo 21 trissômico

Ainda não se sabe exatamente qual é o impacto que cada gene triplicado na terceira cópia do cromossomo 21 exerce sobre o fenótipo da SD. Algumas teorias afirmam que o que causa efetivamente o fenótipo é a presença extra do material genético, a qual provoca estresse celular e defeitos no ciclo celular, afetando a viabilidade e as funções da célula (SHELTZER *et al.*, 2017). A dificuldade de definir isso se dá pela alta complexibilidade genética e grande variabilidade fenotípica da síndrome e, embora progresso tenha sido feito com estudos em camundongos, ainda há necessidade de esclarecimento de como se dá o desenvolvimento da patologia para que algum tipo de terapia seja desenvolvido (PRANDINI *et al.*, 2007; GARDINER, 2010).

Pensou-se, então, na hipótese de corrigir defeitos derivados de excesso de dose genética em células trissômicas vivas, por meio da inserção de um gene que seria capaz de silenciar epigeneticamente um cromossomo inteiro: o *XIST*. Tal feito tornaria possível investigar a patologia celular e as vias genéticas relacionadas à SD, mesmo com as dificuldades existentes (HALL *et al.*, 2008; NAZOR *et al.*, 2012). Entretanto, é necessária uma análise minuciosa dos possíveis riscos associados a essa técnica, de forma a evitar a criação de uma monossomia (JIANG *et al.*, 2013).

3.3.1 Inserção do gene *XIST* no cromossomo 21

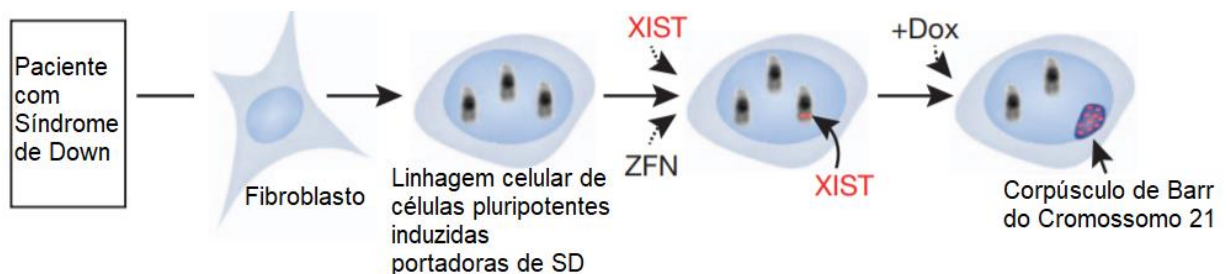
Graças ao tamanho do gene *XIST* e do seu DNA complementar, estes nunca haviam sido inseridos em um cromossomo antes. Porém, pesquisas envolvendo o uso de nucleases dedo de zinco (ZFNs) demonstraram que seria possível integrar uma sequência tão grande quanto essas em uma técnica de edição genômica (URNOV *et al.*, 2010). As ZFNs consistem em proteínas desenvolvidas com o objetivo de reconhecer e quebrar a fita dupla de DNA em um local específico, visto que são uma associação de proteínas dedo de zinco (ZFPs) e endonucleases (KIM; LEE; CARROLL, 2010; KIM *et al.*, 2011). As estruturas dedo de zinco possuem domínios dedo de zinco, os quais mantêm sua estabilidade por uma ligação a no mínimo um átomo de zinco. Esses domínios interagem com diversas moléculas, como DNA e RNA, ligando-se a elas com um grau de precisão muito alto (LAITY; LEE; WRIGHT, 2001; JABALAMELI *et al.*, 2015).

A técnica de montagem das ZFPs envolve a associação de diversos domínios dedo de zinco que possuem sua especificidade de ligação ao DNA bem conhecida. Cada domínio pode se ligar a qualquer uma das 64 combinações de três bases do DNA, ou seja, a qualquer códon, por inteiro. Quando eles são integrados, criam-se então proteínas (ZFPs) capazes de se ligar a qualquer sequência do DNA, de forma extremamente precisa, tornando-se muito úteis para a engenharia genômica (VASCONCELOS; FIGUEIREDO, 2016). Tornam-se ainda mais úteis quando são relacionados a nucleases, permitindo a clivagem específica da sequência de DNA e criando as ZFNs (KLUG, 2010).

Em cada ZFN, então, existe mais de um domínio dedo de zinco, levando a uma grande especificidade de ligação ao DNA. Essa, teoricamente, é suficiente para que as nucleases sejam direcionadas a um só *locus* do genoma, o qual pode conter bilhões de pares de base, e garantir que apenas a sequência alvo seja atingida (MAEDER *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de uma ZFN específica para uma sequência de 36 pares de base, localizada no íntron 1 do *locus DYRK1A* do cromossomo 21q22, mostrou-se eficiente para inserir o gene *XIST* transgênico controlado por Doxiciclina no cromossomo 21 de uma linhagem celular de células pluripotentes induzidas de um homem portador da SD (Figura 6). Ao mesmo tempo, inseriu-se o componente de controle da Doxiciclina (rtTA) no cromossomo 19, por meio de outra ZFN específica para o *locus AAVSI* do cromossomo 19, que, se clivado, não causa nenhum efeito adverso conhecido à célula. Após análise das colônias, observou-se, com uso da técnica RNA/DNA FISH, que aproximadamente 99% das colônias positivas para o RNA do *XIST* carregavam o gene na localização prevista, assim como o rtTA (DEKELVER *et al.*, 2010; JIANG *et al.*, 2013).

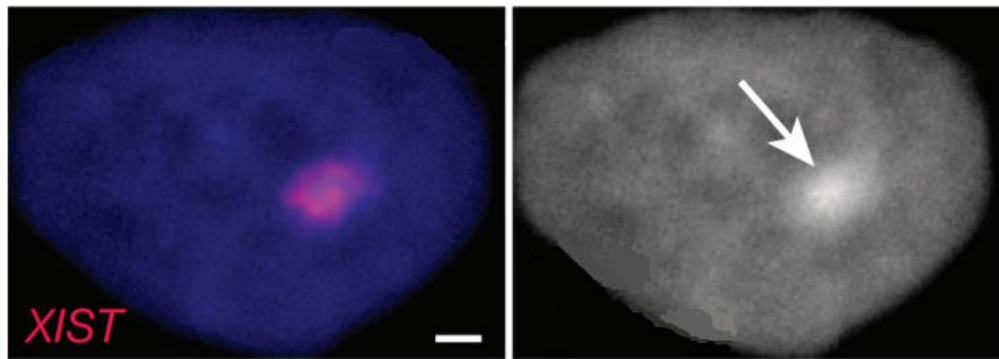
Figura 6: Esquema da inserção do gene *XIST* em uma linhagem celular por meio do uso da ZFN, com posterior formação do corpúsculo de Barr do cromossomo 21.



Fonte: Adaptado de JIANG *et al.*, 2013.

Cerca de 85% das células dessas colônias apresentavam o RNA em um território específico, em volta de um dos cromossomos 21, o que repetia o mecanismo natural de inativação do cromossomo X. Esse cromossomo 21 demonstrava, também, alterações na cromatina, a qual encontrava-se no estado de heterocromatina, altamente condensada, formando o corpúsculo de Barr do cromossomo 21 (Figura 7). Diversos genes específicos do cromossomo 21 foram avaliados para determinar se o silenciamento era completo. Entre eles, o gene *APP*, ligado diretamente ao desenvolvimento de Alzheimer nos pacientes com SD (HEARD, 2005; MÉGARBANÉ *et al.*, 2009).

Figura 7: Formação do corpúsculo de Barr do cromossomo 21 (seta), após inserção do gene *XIST*.



Fonte: Modificado de JIANG *et al.*, 2013.

Observou-se, então, que cada gene avaliado era completamente silenciado em aproximadamente 100% das células que carregavam o RNA do *XIST*, e a técnica se mostrou eficiente para reduzir a expressão excessiva do cromossomo 21 quase que para níveis normais. Esse silenciamento permanecia estável mesmo com a remoção da Doxiciclina e da expressão do *XIST* (CSANKOVSKI; NAGY; JAENISCH, 2001; JIANG *et al.*, 2013).

3.3.2 Impacto fenotípico

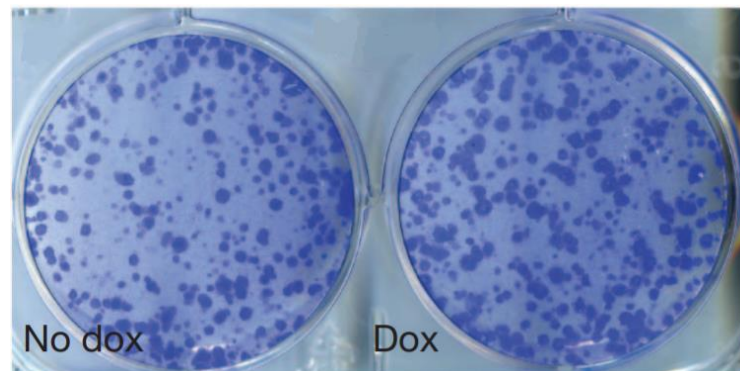
Por meio do silenciamento *in vitro* do cromossomo 21 trissômico em uma linhagem celular e comparação com uma linhagem não silenciada, seria possível determinar quais são as alterações celulares específicas provocadas pela SD, o que, atualmente, é pouco conhecido. O impacto da SD na proliferação das células cerebrais, por exemplo, foi avaliado em laboratório. Ao aplicarem a técnica em uma cultura de fibroblastos portadores da síndrome, notou-se que, com o uso de Doxiciclina, o crescimento celular foi de 18 a 34% maior do que a cultura sem Doxiciclina em uma semana (Figura 8). Em seguida, a técnica foi empregada em culturas de

células progenitoras neurais pluripotentes induzidas e notou-se que, em aproximadamente duas semanas, houve um grande desenvolvimento de rosetas neurais (JIANG *et al.*, 2013).

Concluiu-se, então, que a expressão do gene *XIST* seria capaz de reverter os déficits provocados pela SD na proliferação celular de células progenitoras neurais, tendo importante impacto na hipocelularidade cerebral tipicamente observada em pacientes com a síndrome (GUIDI *et al.*, 2011; HAYDAR; REEVES, 2012).

Além desse estudo, também foi avaliado o impacto da técnica na hematopoese, visto que distúrbios nesse processo são responsáveis pelo desenvolvimento de síndrome mieloproliferativa transitória em grande parte dos portadores da SD, a qual é, normalmente, precursora da leucemia. Ademais, outros defeitos menos severos na hematopoese são encontrados nos portadores, como defeitos no sistema imunológico. Com o estudo, o objetivo era avaliar se o silenciamento do cromossomo 21 extra iria acentuar, normalizar ou não exercer nenhum efeito sobre a produção exagerada de células hematopoiéticas (RAM; CHINEN, 2011; BRUWIER; CHANTRAIN, 2012).

Figura 8: Culturas de fibroblastos após uma semana. Em “No dox”, não foi adicionada a Doxíciclina, e a proliferação celular foi menor, enquanto em “Dox”, houve a adição e maior crescimento celular.



Fonte: Modificado de JIANG *et al.*, 2013.

Para tal, foi usada uma linhagem celular de células pluripotentes induzidas que mimetiza a hematopoese fetal, diferenciada através de corpos embrióides (EB). Ao final, notou-se uma redução de 50-80% nas colônias de megacariócitos (CFU-Mk) e eritrócitos (CFU-E), as quais são as duas células cuja produção é acentuada na SD. Por outro lado, também foi possível observar alterações nas colônias de granulócitos (CFU-G) e monócitos (CFU-M), embora essas tenham sido bem menos significativas que às das linhagens anteriores (CHOU *et al.*, 2008; CHIANG *et al.*, 2018).

Observou-se também que, nesse experimento, houve uma redução na expressão do marcador CD43 nas células, o qual é um dos marcadores que aparecem mais cedo durante a diferenciação celular da hematopoese. Simultaneamente, não houve mudanças na expressão do CD34, o qual já é mais tardio. Tal ocorrido está em concordância com o fato de que há uma superprodução de progenitores hematopoiéticos antes de haver uma superprodução de colônias diferenciadas (KENNEDY *et al.*, 2007; DITADI *et al.*, 2015; CHIANG *et al.*, 2018).

A explicação para esse efeito pode ser dada pela redução da sinalização exercida pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), o qual é considerado um candidato como causador da superprodução de megacariócitos e eritrócitos (BHATNAGAR *et al.*, 2016). A hematopoese fetal é dependente da sinalização desse fator e, na SD, ele é produzido em excesso, levando à produção exagerada de células (KLUSMANN *et al.*, 2010). A terceira cópia do cromossomo 21 é capaz de causar um aumento da sua sinalização e, quando silenciada, a reestabelece, normalizando a produção de células hematopoiéticas. Dessa forma, concluiu-se que o silenciamento da trissomia corrige a patologia celular impedindo o seu desenvolvimento, e não apenas suprime o estresse celular geral causado pelo material genético extra (CHIANG *et al.*, 2018).

3.3.3 Importância da técnica

Com o desenvolvimento dessa técnica, tornou-se possível compreender ainda mais como funciona o processo de silenciamento cromossômico a partir da criação de um sistema induzível, além de facilitar os entendimentos sobre o gene *XIST* e seu mecanismo de ação. A inserção de uma molécula de DNA tão grande quanto o *XIST* transgênico usado também foi importante, pois ampliou a quantidade de genes que agora podem ser empregados na engenharia genômica, e que antes eram limitados devido ao tamanho (CARREL; WILLARD, 2005; JIANG *et al.*, 2013).

Outro impacto positivo da técnica é que ela garante mais meios para o estudo das vias específicas que são desreguladas na SD, responsáveis por causar as alterações celulares. Sabendo o que está ocorrendo de forma errada, ou seja, o alvo, seria mais fácil desenvolver terapias mais objetivas e focadas que auxiliariam na amenização do fenótipo da síndrome. Dentre essas terapias, tem-se o emprego do próprio gene *XIST* ou sequências derivadas como estratégia terapêutica, embora ainda seja necessária uma maior pesquisa na área, e o desenvolvimento de medicamentos com um alvo específico, cujo objetivo seria reestabelecer a normalidade celular (THEISEN; SHAFFER, 2010; CZERMINSKI; LAWRENCE, 2020).

É necessário frisar que o emprego da técnica não significaria uma cura para esses pacientes. Para isso, seria necessário inserir o gene nos grupos celulares certos, durante uma fase específica do desenvolvimento, ainda durante o início do desenvolvimento embrionário, o que é muito difícil. Entretanto, a possibilidade de terapia gênica para aqueles portadores da SD é o que torna a técnica tão valiosa, já que traz esperança e uma melhor qualidade de vida tanto para os síndromicos quanto para suas famílias. Com esse avanço, fica claro que o balanceamento de material genético não é mais algo impossível, e que poderia ser aproveitado no futuro (JIANG *et al.*, 2013).

Mesmo com todos os benefícios, diversos estudos ainda precisam ser desenvolvidos para avaliar qual seria o real impacto da inativação do cromossomo 21 trissômico como um todo, visto que ele contém mais de 200 genes que desempenham diferentes papéis na síndrome, ainda desconhecidos. Uma vez que isso for compreendido, a técnica poderá ter inúmeras aplicações, não apenas restritas para a SD, mas para outras desordens cromossômicas, como trissomia do 13 e do 18 (JIANG *et al.*, 2013; CHIANG *et al.*, 2018).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas informações descritas no presente trabalho, fica claro que os pacientes com SD, embora conquistem uma melhor qualidade de vida com terapias e o devido acompanhamento médico, não tem possibilidade de cura. Isso se dá, principalmente, devido à dificuldade de fazer pesquisas sobre a doença e formas de tratamento, visto que é impossível alterar o genoma de todas as células de um indivíduo, mesmo que ainda recém-nascido.

Contudo, o recente desenvolvimento da técnica de edição genômica, que permitiu a inserção do gene *XIST* em células com a síndrome, se torna um importante avanço para a genética humana, já que mostra a possibilidade de interagir com o conteúdo genético de uma forma mais abrangente. Isso representa um grande passo para que a SD e outras aneuploidias consigam ter a mesma representação em estudos e pesquisas, direcionadas ao conhecimento e à cura, que os defeitos que afetam apenas um ou poucos genes.

A técnica torna possível, então, comparar duas linhagens celulares com a SD (uma em que ela é aplicada e outra não), observando quais mudanças ocorrem e quais patologias são corrigidas, e, dessa forma, definir realmente o que a doença é capaz de causar nas células. Assim, a maior compreensão facilita o desenvolvimento de terapias muito mais específicas, as quais podem ter resultados mais promissores que as já existentes, como por exemplo a

prevenção ou controle da síndrome mieloproliferativa transitória e, conseqüentemente, da leucemia, se for possível ativar o gene *XIST* nas células-tronco sanguíneas.

Embora isso ainda não signifique uma cura para os síndrômicos, faz com que eles e suas famílias se sintam mais ouvidos pela comunidade científica. Além disso, alimenta a sua fé para a eventual criação de uma terapia realmente eficaz, que permita que os pacientes consigam viver e participar plenamente em sociedade.

De certa forma, a impossibilidade de cura tem um ponto positivo. Os familiares e as pessoas que convivem com pacientes síndrômicos afirmam não desejar silenciar por completo a SD, pois os indivíduos portadores possuem uma essência muito boa, humana, ensinando lições de paciência e bondade para quem está em volta. A completa eliminação da trissomia gera um medo de perder essas características e, de certa forma, a personalidade do indivíduo.

Portanto, o emprego do gene *XIST* para o silenciamento da trissomia na SD será bastante aceito, não só pela ciência, mas também para as pessoas diretamente envolvidas no cuidado de um síndrômico, já que possibilitará a amenização e o controle das condições que colocam em risco a sua vida, sem que a sua natureza seja eliminada.

REFERÊNCIAS

- AKSAKALLI, S.; ILERI, Z. Management of dental – orthopedic problems in down syndrome. **European Journal of General Dentistry**, Mumbai, v. 1, n. 1, p. 58-62, abr. 2012. Doi: 10.4103/2278-9626.101362.
- AMAN, M. G.; BUICAN, B.; ARNOLD, L. E. Methylphenidate Treatment in Children with Boderline IQ and Mental Retardation: Analysis of Three Aggregated Studies. **Journal of child and adolescent psychopharmacology**, Nova Iorque, v. 13, n. 1, p. 29-40, 2003. Doi: 10.1089/104454603321666171.
- ANTONARAKIS, S. E. *et al.* Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 5, n. 10, p. 725-738, out. 2004. Doi: 10.1038/nrg1448.
- ANTONARAKIS, S. E. *et al.* Down syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, Londres, v. 6, n.9, p. 1-20, fev. 2020. Doi: 10.1038/s41572-019-0143-7.
- ARNOLD, A. P.; BURGOYNE, P. S. Are XX and XY brain cells intrinsically different? **Trends in Endocrinology and Metabolism**, Nova Iorque, v. 15, n. 1, p. 6-11, jan. 2004. Doi: 10.1016/j.tem.2003.11.001.
- ARNOLD, A. P. Mouse Models for Evaluating Sex Chromosome Effects that Cause Sex Differences in Non-Gonadal Tissues. **Journal of Neuroendocrinology**, Eynsham, v. 21, n. 4, p. 377-386, mar. 2009. Doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01831.x.
- ASIM, A. *et al.* “Down syndrome: an insight of the disease”. **Journal of Biomedical Science**, Londres, v. 22, n. 41, p. 1-9, jun. 2015. Doi: 10.1186/s12929-015-0138-y.

- BACHER, C. P. *et al.* Transient colocalization of X-inactivation centers accompanies the initiation of X inactivation. **Nature Cell Biology**, Londres, v. 8, n. 3, p. 293-299, mar. 2006. Doi: 10.1038/ncb1365.
- BARR, M. L.; BERTRAM, E. G. A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis. **Nature**, Londres, v. 163, p. 676-677, abr. 1949. Doi: 10.1038/163676a0.
- BERLETCH, J. B. *et al.* Genes that escape from X inactivation. **Human Genetics**, Berlim, v. 130, n. 2, p. 237-245, ago. 2011. Doi: 10.1007/s00439-011-1011-z.
- BERMEJO-ALVAREZ, P. *et al.* Transcriptional sexual dimorphism in elongating bovine embryos: implications for XCI and sex determination genes. **Reproduction**, Cambridge, v. 141, n. 6, p. 801-808, jun. 2011. Doi: 10.1530/REP-11-0006.
- BERTAPELLI, F. *et al.* Overweight and obesity in children and adolescents with Down syndrome – prevalence, determinants, consequences, and interventions: A literature review. **Research in Developmental Disabilities**, Nova Iorque, v. 57, p. 181-192, out. 2016.
- BHATNAGAR, N. *et al.* Transient Abnormal Myelopoiesis and AML in Down Syndrome: na Update. **Current Hematologic Malignancy Reports**, Filadélfia, v. 11, n. 5, p. 333-341, out. 2016. Doi: 10.1007/s11899-016-0338-x.
- BIANCHI, D. W. *et al.* **Fetology: Diagnosis and Management of the Fetal Patient**. 2 ed. Nova Iorque: McGraw-Hill Medical, 2010.
- BRANDÃO, D. L. M. **Desvio de inativação do cromossomo X em mulheres brasileiras sem histórico familiar para deficiência intelectual ligada ao X**. 2015. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, Brasília, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes de Atenção à Pessoa com Síndrome de Down**. Brasília, 1ª edição. 2012. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_atencao_pessoa_sindrome_down.pdf. Acesso em: 07 nov. 2019.
- BRUWIER, A.; CHANTRAIN, C. F. Hematological disorders and leucemia in children with Down syndrome. **European Journal of Pediatrics**, Berlim, v. 171, n. 9, p. 1301-1307, set. 2012. Doi: 10.1007/s00431-011-1624-1.
- BULL, M. J.; COMMITTEE ON GENETICS. Clinical Report – Health Supervision for Children With Down Syndrome. **Pediatrics**, Chicago, v. 128, n. 2, p. 393-406, ago. 2011. Doi: 10.1542/peds.2011-1605.
- CARNICER, J. *et al.* Prevalence of coeliac disease in Down's syndrome. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, Londres, v. 13, n. 3, p. 263-267, mar. 2001. Doi: 10.1097/00042737-200103000-00008.
- CARREL, L.; WILLARD, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. **Nature**, Londres, v. 434, p. 400-404, mar. 2005. Doi: 10.1038/nature03479.

- CHADWICK, L. H. *et al.* Genetic Control of X Chromosome Inactivation in Mice: Definition of the *Xce* Candidate Interval. **Genetics**, Baltimore, v. 173, n. 4, p. 2103-2110, ago. 2006. Doi: 10.1534/genetics.105.054882.
- CHANG, S. C. *et al.* Mechanisms of X-chromosome inactivation. **Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library**, Tampa, v. 11, p. 852-866, jan. 2006. Doi: 10.2741/1842.
- CHIANG, J. C. *et al.* Trisomy silencing by XIST normalizes Down syndrome cell pathogenesis demonstrated for hematopoietic defects in vitro. **Nature Communications**, Londres, v. 9, n. 5180, nov. 2018. Doi: 10.1038/s41467-018-07630-y.
- CHOU, S. T. *et al.* Trisomy 21 enhances human fetal erythro-megakaryocytic Development. **Blood**, Washington, D. C., v. 112, n. 12, p. 4503-4506, dez. 2008. Doi: 10.1182/blood-2008-05-157859.
- COPPEDÈ, F. Risk factors for Down syndrome. **Archives of toxicology**, Berlim, v. 90, n. 12, p. 2917-2929, dez. 2016. Doi: 10.1007/s00204-016-1843-3.
- COSTA, L. T.; DUARTE, E.; GORLA, J. I. **Síndrome de Down: crescimento, maturação e atividade física**. 1. ed. São Paulo: Phorte, 2017.
- COSTA, M. T. P. *et al.* Aneuploidia de cromossomos sexuais em gato de pelagem tortoiseshell – relato de caso. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 22, n. 126, p. 40-44, fev. 2017. Disponível em: <http://www.revistaclinicaveterinaria.com.br/edicao/2017/janeiro-fevereiro.html>. Acesso em: 10 abr. 2020.
- COZZI, J. *et al.* A trisomic germ cell line and precocious chromatid segregation leads to recurrent trisomy 21 conception. **Human Genetics**, Berlim, v. 104, n. 1, p. 23-28, jan. 1999. Doi: 10.1007/s004390050905.
- CSANKOVSKY, G.; NAGY, A.; JAENISCH, R. Synergism of Xist RNA, DNA Methylation, and Histone Hypoacetylation in Maintaining X Chromosome Inactivation. **The Journal of Cell Biology**, Nova Iorque, v. 153, n. 4, p. 773-784, mar. 2001. Doi: 10.1083/jcb.153.4.773.
- CUCKLE, H.; MAYMON, R. Development of prenatal screening – A historical overview. **Seminars in perinatology**, Filadélfia, v. 40, n. 1, p. 12-22, fev. 2016. Doi: 10.1053/j.semperi.2015.11.003.
- CZERMINSKI, J. T.; LAWRENCE, J. B. Silencing Trisomy 21 with XIST in Neutral Stem Cells Promotes Neuronal Differentiation. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 52, n. 3, p. 295-308, fev. 2020. Doi: 10.1016/j.devcel.2019.
- DEKELVER, R. C. *et al.* Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 8, p. 1133-1142, ago. 2010. Doi: 10.1101/gr.106773.110.
- DELHANTY, J. D. A. Inherited Aneuploidy: Germline Mosaicism. **Cytogenetic and Genome research**, Basel, v. 133, n. 2-4, p. 136-140, abr. 2011. Doi: 10.1159/000323606.
- DELHANTY, J. D. A.; SENGUPTA, S. B.; GHEVARIA, H. How common is germinal mosaicism that leads to premeiotic aneuploidy in the female? **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Amsterdão, v. 36, n. 12, p. 2403-2418, dez. 2019. Doi: 10.1007/s10815-019-01596-6.

- DENG, X. *et al.* X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease. **Nature Reviews**, Londres, v. 15, p. 367-378, jun. 2014. Doi: 10.1038/nrg3687.
- DISTECHE, C. M. Escapees on the X chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, Washington, D.C., v. 96, n. 25, p. 14.180-14.182, dez. 1999. Doi: 10.1073%2Fpnas.96.25.14180.
- DITADI, A. *et al.* Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages. **Nature Cell Biology**, Londres, v. 17, n. 5, p. 580-591, mai. 2015. Doi: 10.1038/ncb3161.
- DOOLEY, K. J. Congenital Heart Disease and Down Syndrome. In: RUBIN, I. L.; MERRICK, J.; GREYDANUS, D. E.; PATEL, D. R. **Health Care for People with Intellectual and Developmental Disabilities across the Lifespan**. Cham: Springer, 2016, p. 1301-1310. Doi: 10.1007/978-3-319-18096-0_105.
- DOSSIN, F. *et al.* SPEN integrates transcriptional and epigenetic control of X-inactivation. **Nature**, Londres, v. 578, n. 7795, p. 455-460, fev. 2020. Doi: 10.1038/s41586-020-1974-9.
- DOWN, J. L. H. Observations on an ethnic classification of idiots. **London Hospital Clinical Reports**, Londres, v. 3, p. 259-262, 1866. Doi: 10.1038/hdy.1966.69.
- ESBENSEN, A. J. *et al.* Convergent validity of actigraphy with polysomnography and parent reports when measuring sleep in children with Down syndrome. **Journal of intellectual disability research**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 281-291, abr. 2018. Doi: 10.1111/jir.12464.
- FERREIRA, A. R.; FRANCO, M. M. Inativação do cromossomo X em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 3, p. 341-346, set. 2011. Disponível em: <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n3/pag341-346.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2020.
- FRAGA, A. M. **Início e Manutenção da Inativação do Cromossomo X em Células Humanas**. 2012. Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências, na Área de Biologia (Genética), São Paulo, 2012.
- FREEMAN, S. B. *et al.* Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: a report from the National Down Syndrome Project. **Genetics in medicine**, Londres, v. 10, n. 3, p. 173-180, mar. 2008. Doi: 10.1097/GIM.0b013e3181634867.
- GARDINER, K. J. Molecular basis of pharmacotherapies for cognition in Down syndrome. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdão, v. 31, n. 2, p. 66-73, fev. 2010. Doi: 10.1016/j.tips.2009.10.010.
- GARRIDO-GIMENEZ, C.; ALIJOTAS-REIG, J. Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management. **Postgraduate medical journal**, Londres, v. 91, n. 1073, p. 151-162, fev. 2015. Doi: 10.1136/postgradmedj-2014-132672.
- GESCHWIND, D. H. *et al.* Neurobehavioral Phenotype of Klinefelter Syndrome. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, Nova Iorque, v. 6, n. 2, p. 107-116, 2000. Doi: 10.1002/1098-2779(2000)6:2%3C107::AID-MRDD4%3E3.0.CO;2-2 .

GHEVARIA, H. *et al.* The Contribution of Germinal Mosaicism to Human Aneuploidy. **Cytogenetic and Genome research**, Basel, v. 144, n. 4, p. 264-274, mar. 2015. Doi: 10.1159/000381073.

GHOLIPOUR, T. *et al.* The clinical and neurobehavioral course of Down syndrome and dementia with or without now-onset epilepsy. **Epilepsy and behavior**, San Diego, v. 60, p. 11-16, mar. 2017. Doi: 10.1016/j.yebeh.2016.12.014.

GREGG, A. R. *et al.* ACMG statement on noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy. **Genetics in medicine**, Nova Iorque, v. 15, n. 5, p. 395-398, mai. 2013. Doi: 10.1038/gim.2013.29.

GUIDI, S. *et al.* Widespread Proliferation Impairment and Hypocellularity in the Cerebellum of Fetuses with Down Syndrome. **Brain Pathology**, Zurique, v. 21, n. 4, p. 361-373, jul. 2011. Doi: 10.1111/j.1750-3639.2010.00459.x.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Gestação e Lactação*. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 1059-1073.

HALL, L. L. *et al.* Z-Inactivation Reveals Epigenetic Anomalies in Most hESC but Identifies Sublines That Initiate as Expected. **Journal of Cellular Physiology**, Nova Iorque, v. 216, n. 2, p. 445-452, ago. 2008. Doi: 10.1002/jcp.21411.

HASSOLD, T.; HUNT P. To ERR (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. **Nature Reviews Genetics**, Londres, v. 2, n. 4, p. 280-291, abr. 2001. Doi: 10.1038/35066065.

HAYDAR, T. F.; REEVES, R. H. Trisomy 21 and early brain development. **Trends in Neurosciences**, Barking, v. 35, n. 2, p. 81-91, fev. 2012. Doi: 10.1016/j.tins.2011.11.001.

HEARD, E. Delving into the diversity of facultative heterochromatin: the epigenetics of the inactive X chromosome. **Current Opinion in Genetics and Development**, Londres, v. 15, n. 5, p. 482-489, out. 2005. Doi: 10.1016/j.gde.2005.08.009.

HEARD, E.; DISTECHE, C. M. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 14, p. 1848-1867, jul. 2006. Doi: 10.1101/gad.1422906.

HILL, C. M. *et al.* Home oximetry to screen for obstructive sleep apnoea in Down syndrome. **Archives of disease in childhood**, Londres, v. 103, n. 10, p. 962-967, out. 2018. Doi: 10.1136/archdischild-2017-314409.

HONG, Y.; ONTIVEROS, S. D.; STRAUSS, W. M. A revision of the human XIST gene organization and structural comparison with mouse *Xist*. **Mammalian Genome**, Nova Iorque, v. 11, n. 3, p. 220-224, mar. 2000. Doi: 10.1007/s003350010040.

HULTÉN, M. A. *et al.* On the origin of the maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mosaicism Selection model. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 1, p. 1-9, jan. 2010. Doi: 10.1530/REP-09-0088.

- HULTÉN, M. A. *et al.* Trissomy 21 Mosaicism: We May All Have a Touch of Down Syndrome. **Cytogenetic and Genome research**, Basel, v. 139, n. 3, p. 189-192, jan. 2013. Doi: 10.1159/000346028.
- HUNT, P. A. Meiosis in mammals: recombination, non-disjunction and the environment. **Biochemical Society transactions**, Londres, v. 34, p. 574-577, ago. 2006. Doi: 10.1042/BST0340574.
- HUNTER, A. G. W. Down Syndrome. **Management of Genetic Syndromes**, Hoboken, 3 ed., p. 309-335, abr. 2010. Doi: 10.1002/0471695998.mgs018.
- HUYNH, K. D.; LEE, J. T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. **Nature**, Londres, v. 426, n. 6968, p. 857-862, dez. 2003. Doi: 10.1038/nature02222.
- JABALAMELI, H. R. *et al.* Zinc Finger Nuclease Technology: Advances and Obstacles in Modelling and Treating Genetic Disorders. **Gene**, Amsterdão, v. 558, n. 1, p. 1-5, mar. 2015. Doi: 10.1016/j.gene.2014.12.044.
- JIANG, J. *et al.* Translating dosage compensation to trisomy 21. **Nature**, Londres, v. 500, p. 296-302, ago. 2013. Doi: 10.1038/nature12394.
- JOHNSTON, C. M. *et al.* Large-Scale Population Study of Human Cell Lines Indicates that Dosage Compensation is Virtually Complete. **PLoS Genetics**, São Francisco, v. 4, n. 1, p. 1-9, jan. 2008. Doi: 10.1371/journal.pgen.0040009.
- KENNEDY, M. *et al.* Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. **Blood**, Washington, D. C., v. 109, n. 7, p. 2679-2687, abr. 2007. Doi: 10.1182/blood-2006-09-047704.
- KIM, J. S.; LEE, H. J.; CARROLL, D. Genome editing with modularly assembled zinc-finger nucleases. **Nature Methods**, Nova Iorque, v. 7, n. 2, p. 91, fev. 2010. Doi: 10.1038/nmeth0210-91a.
- KIM, S. *et al.* Preassembled zinc-finger arrays for rapid construction of ZFNs. **Nature Methods**, Nova Iorque, v. 8, n. 1, p. 7, jan. 2011. Doi: 10.1038/nmeth0111-7a.
- KLUG, A. The Discovery of Zinc Fingers and Their Applications in Gene Regulation and Genome Manipulation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 79, n. 1, p. 213-231, jan. 2010. Doi: 10.1146/annurev-biochem-010909-095056.
- KLUG, W. S. *et al.* **Conceitos de Genética**. 9 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- KLUSMANN, J. H. *et al.* Developmental stage-specific interplay of GATA1 and IGF signaling in fetal megakaryopoiesis and leukemogenesis. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 24, n. 15, p. 1659-1672, ago. 2010. Doi: 10.1101/gad.1903410.
- KOUZAK, S. S.; MENDES, M. S. T.; COSTA, I. M. C. Cutaneous mosaicisms: concepts, patterns and classifications. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 88, n. 4, p. 507-517, jul/ago. 2013. Doi: 10.1590/abd1806-4841.20132015.
- KOZMA, C. O que é a síndrome de Down? In: STRAY-GUNDERSEN, K. **Crianças com síndrome de Down: guia para pais e educadores**. Porto Alegre: Artmed, 2007, p. 15-42. Disponível em: https://www.larpsi.com.br/media/mconnect_uploadfiles/c/a/cap_01_64_.pdf. Acesso em: 07 nov. 2019.

- KRINSKY-MCHALE, S. J. *et al.* Ophthalmic Disorders in Adults with Down Syndrome. **Current Gerontology and Geriatrics Research**, Nova Iorque, v. 2012, p. 1-9, abr. 2012. Doi: 10.1155/2012/974253.
- KRINSKY-MCHALE, S. J. *et al.* Vision Deficits in Adults with Down Syndrome. **Journal of Applied Research in Intellectual Disabilities**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 247-263, mai. 2014. Doi: 10.1111/jar.12062.
- LAITY, J. H.; LEE, B. M.; WRIGHT, P. E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, Londres, v. 11, n. 1, p. 39-46, fev. 2001. Doi: 10.1016/s0959-440x(00)00167-6.
- LEE, J. T.; DAVIDOW, L. S.; WARSHAWSKY, D. *Tsix*, a gene antisense to *Xist* at the X-inactivation centre. **Nature genetics**, Londres, v. 21, p. 400-404, abr. 1999. Doi: 10.1038/7734.
- LEJEUNE J.; GAUTIER M.; TURPIN R. Étude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. **Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences**, Paris, v. 248, n. 11, p. 1721-1722, mar. 1959.
- LOAT, C.S. *et al.* X Inactivation as a Source of Behavioural Differences in Monozygotic Female Twins. **Twin Research**, Houndsmills, v. 7, n. 1, p. 54-61, fev. 2004. Doi: 10.1375/13690520460741444.
- LODA, A.; HEARD, E. *Xist* RNA in action: Past, present, and future. **PLoS Genetics**, São Francisco, v. 15, n. 9, p. 1-17, set. 2019. Doi: 10.1371/journal.pgen.1008333.
- LOTT, I. T.; HEAD, E. Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research. **Nature reviews neurology**, Londres, v. 15, n. 3, p. 135-147, mar. 2019. Doi: 10.1038/s41582-018-0132-6.
- LYON, M. F. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus L.*). **Nature**, Londres, v. 190, p. 372-373, abr. 1961. Doi: 10.1038/190372a0.
- LYON, M. F.; Possible Mechanisms of X Chromosome Inactivation. **Nature New Biology**, Londres, v. 232, n. 34, p. 229-232, ago. 1971. Doi: 10.1038/newbio232229a0.
- MACLENNAN, S. Down's Syndrome. **InnovAIT**, Londres, v. 13, n. 1, p. 47-52, nov. 2019. Doi: 10.1177/2F1755738019886612.
- MAEDER, M. L. *et al.* Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 31, n. 2, p. 294-301, jul. 2008. Doi: 10.1016/j.molcel.2008.06.016.
- MÉGARBANÉ, A. *et al.* The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: The past, present, and future of research and treatment of Down syndrome. **Genetics in Medicine**, Nova Iorque, v. 11, n. 9, p. 611-616, set. 2009. Doi: 10.1097/GIM.0b013e3181b2e34c.
- MIGEON, B. R. Why Females Are Mosaic, X-Chromosome Inactivation, and Sex Differences In Disease. **Gender Medicine**, Hillsborough, v. 4, n. 2, p. 97-105, jun. 2007. Doi: 10.1016/s1550-8579(07)80024-6.
- MLYNARCZYK, S. K.; PANNING, B. X inactivation: *Tsix* and *Xist* as yin and yang. **Current Biology**, Cambridge, v. 10, n. 24, p. 899-903, dez. 2000. Doi: 10.1016/s0960-9822(00)00847-2.

- MOINDROT, B.; BROCKDORFF, N. RNA binding proteins implicated in Xist-mediated chromosome silencing. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Londres, v. 56, p. 58-70, ago. 2016. Doi: 10.1016/j.semcdb.2016.01.029.
- MORALES-DEMORI, R. Congenital heart disease and cardiac procedural outcomes in patients with trisomy 21 and Turner syndrome. **Congenital heart disease**, Malden, v. 12, n. 6, p. 820-827, dez. 2017. Doi: 10.1111/chd.12521.
- MOREL, F. *et al.* Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. **International Journal of Andrology**, Londres, v. 27, n. 4, p. 200-212, ago. 2004. Doi: 10.1111/j.1365-2605.2004.00490.x
- MOREY, C.; BICKMORE, W. Sealed with a X. **Nature Cell Biology**, Londres, v. 8, n. 3, p. 207-209, mar. 2006. Doi: 10.1038/ncb0306-207.
- MORRIS, J. K. *et al.* Major Congenital Anomalies in Babies Born With Down Syndrome: A EUROCAT Population-Based Registry Study. **American Journal of Medical Genetics**, Hoboken, v. 164, n. 12, p. 2979-2986, dez. 2014. Doi: 10.1002/ajmg.a.36780.
- MORRISON, M. L.; MCMAHON, C. J. Congenital Heart Disease in Down Syndrome. In: DEY, S. **Advances in Research on Down Syndrome**. Londres: IntechOpen, 2018, p. 95-108. Doi: 10.5772/intechopen.71060.
- MORTON, C. C.; LEE, C. Cytogenetics in Reproduction. In: STRAUSS, J. F.; BARBIERI, R. L. **Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology: Physiology, Patophysiology, and Clinical Management**. 6 ed. Amsterdão: Elsevier, 2009, p. 777-799. Doi: 10.1016/B978-1-4160-4907-4.00031-0.
- NAZOR, K. L. *et al.* Recurrent Variations in DNA Methylation in Human Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Derivatives. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 10, n. 5, p. 620-634, mai. 2012. Doi: 10.1016/j.stem.2012.02.013.
- NEVILL, R. E.; BENSON, B. A. Risk factors for challenging behaviour and psychopathology in adults with Down syndrome. **Journal of intellectual disability research**, Oxford, v. 62, n. 11, p. 941-951, nov. 2018. Doi: 10.1111/jir.12541.
- NICHD. **What are common treatments for Down Syndrome?** Bethesda, 2017. Disponível em: <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/down/conditioninfo/treatments>. Acesso em: 24 mar. 2020.
- NIH. **XIST gene**. Bethesda, 2020. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/XIST#conditions>. Acesso em: 10 abr. 2020.
- NICHOLAS, F. W. **Introduction to Veterinary Genetics**. 3 ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2009.
- NIGHTENGALE, E. Hearing Loss in Children with Down Syndrome. **The Hearing Journal**, Baltimore, v. 71, p. 10-12, fev. 2018. Doi: 10.1097/01.HJ.0000530645.24806.bf.
- OGAWA, Y.; LEE, J. T. *Xite*, X-Inactivation Intergenic Transcription Elements that Regulate the Probability of Choice. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 11, n. 3, p. 731-743, mar. 2003. Doi: 10.1016/s1097-2765(03)00063-7.
- OHHATA, T. *et al.* Crucial role of antisense transcription across the *Xist* promoter in *Tsix*-mediated *Xist* chromatin modification. **Development**, Cambridge, v. 135, n. 2, p. 227-235, jan. 2008. Doi: 10.1242/dev.008490.

- OHNO, S. **Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes**. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1967. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-88178-7>. Acesso em: 07 nov. 2019.
- ONU. **World Down Syndrome Day 21 March**. Nova York, 2019. Disponível em: <https://www.un.org/en/events/downsyndromeday/background.shtml>. Acesso em: 27 ago. 2019.
- PAIVA, C. F.; MELO, C. M.; FRANK, S. P. **Síndrome de Down: etiologia, características e impactos na família**. 2018. Disponível em: <https://facsapaulo.edu.br/wp-content/uploads/sites/16/2018/05/ed2/11.pdf>. Acesso em: 05 set. 2019.
- PATTERSON, D. Molecular genetic analysis of Down syndrome. **Human Genetics**, Berlim, v. 126, p. 195-214, jun. 2009. Doi: 10.1007/s00439-009-0696-8.
- PAZZA, R.; KAVALCO, K. F. **Uma pequena introdução à genética de felinos domésticos**. 1 ed. Rio Paranaíba: Araucaria Comunicação e Editora, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Rubens_Pasa/publication/309653509_Uma_pequena_introducao_a_genetica_de_felinos_domesticos/links/581bda8108ae40da2ca9241d/Uma-pequena-introducao-a-genetica-de-felinos-domesticos.pdf. Acesso em: 10 abr. 2020.
- PINTER, S. F. A Tale of Two Cities: How Xist and its partners localize to and silence the bicompartamental X. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Londres, v. 56, p. 19-34, ago. 2016. Doi: 10.1016/j.semcdb.2016.03.023.
- PLATH, K. *et al.* Xist RNA and the Mechanism of X Chromosome Inactivation. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 36, p. 233-278, 2002. Doi: 10.1146/annurev.genet.36.042902.092433.
- PLATH, K. *et al.* Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation. **Science**, Nova Iorque, v. 300, n. 5616, p. 131-134, abr. 2003. Doi: 10.1126/science.1084274.
- PRANDINI, P. *et al.* Natural Gene-Expression Variation in Down Syndrome Modulates the Outcome of Gene-Dosage Imbalance. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 81, n. 2, p. 252-263, ago. 2007. Doi: 10.1086/519248.
- PRESSON, A. P. *et al.* Current Estimate of Down Syndrome Population Prevalence in the United States. **The Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 163, n. 4, p. 1163-1168, out. 2013. Doi: 10.1016/j.jpeds.2013.06.013.
- PRZANOWSKI, P.; WASKO, U.; BHATNAGAR, S. Novel molecular players of X chromosome inactivation: new technologies and new insights. **Journal of Translational Genetics and Genomics**, Alhambra, v. 2, n. 2, p. 1-15, fev. 2018. Doi: 10.20517/jtgg.2017.03.
- RALSTON, S. J. *et al.* Pregnancy Outcomes After Prenatal Diagnosis of Aneuploidy. **Obstetrics and gynecology**, Nova Iorque, v. 97, n. 5, p. 729-733, mai. 2001. Doi: 10.1016/s0029-7844(01)01129-2.
- RAM, G.; CHINEN, J. Infections and immunodeficiency in Down syndrome. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v. 164, n. 1, p. 9-16, abr. 2011. Doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04335.x.
- ROIZEN, N. J.; PATTERSON, D. Down's Syndrome. **Lancet**, Londres, v. 31, n. 9365, p. 1281-1289, abr. 2003. Doi: 10.1016/S0140-6736(03)12987-X.

- ROSS, M. T. *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. **Nature**, Londres, v. 434, n. 7031, p. 325-337, mar. 2005. Doi: 10.1038/nature03440.
- ROUBERTOUX, P. L.; KERDELHUÉ, B. Trisomy 21: From Chromosomes to Mental Retardation. **Behavior Genetics**, Nova Iorque, v. 36, n. 3, p. 346-354, mai. 2006. Doi: 10.1007/s10519-006-9052-0.
- RUSSEL, L. B. Mammalian X-Chromosome Action: Inactivation Limited in Spread and in Region of Origin. **Science**, Nova Iorque, v. 140, n. 3570, p. 976-978, mai. 1963. Doi: 10.1126/science.140.3570.976.
- SHELTZER, J. M. *et al.* Single-chromosomes Gains Commonly Function as Tumor Suppressors. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 31, n. 2, p. 240-255, fev. 2017. Doi: 10.1016/j.ccell.2016.12.004.
- SHERMAN, S. L. *et al.* Epidemiology of Down Syndrome. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Review**, Nova Iorque, v. 13, n. 3, p. 221-227, jul. 2007. Doi: 10.1002/mrdd.20157.
- SHIBATA, S.; LEE, J. T. *Tsix* Transcription – versus RNA-based Mechanisms in *Xist* Repression and Epigenetic Choice. **Current Biology**, Londres, v. 14, n. 19, p. 1747-1754, out. 2004. Doi: 10.1016/j.cub.2004.09.053.
- SILVA, J. *et al.* Establishment of Histone H3 Methylation on the Inactive X Chromosome Requires Transient Recruitment of Eed-Enx1 Polycomb Group Complexes. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 4, n. 4, p. 481-495, abr. 2003. Doi: 10.1016/s1534-5807(03)00068-6.
- SMITH, D. S. Health Care Management of Adults with Down Syndrome. **American family physician**, v. 64, n. 6, p. 1031-1038, set. 2001. Disponível em: <https://dsagsl.org/wp-content/uploads/2014/04/health-care-for-adults-with-Down-syndrome.pdf>. Acesso em: 21 mar. 2020.
- STARBUCK, J. M. On the Antiquity of Trisomy 21: Moving Towards a Quantitative Diagnosis of Down Syndrome in Historic Material Culture. **Journal of Contemporary Anthropology**, West Lafayette, v. 2, nov. 2011. Disponível em: <https://docs.lib.purdue.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1019&context=jca>. Acesso em: 05 fev. 2020.
- STOLL, C. *et al.* Associated congenital anomalies among cases with Down syndrome. **European Journal of Medical Genetics**, Amsterdão, v. 58, n. 12, p. 674-680, dez. 2015. Doi: 10.1016/j.ejmg.2015.
- STAVROPOULOS, N.; LU, N.; LEE, J. T. A functional role for *Tsix* transcription in blocking *Xist* RNA accumulation but not in X-chromosome choice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington DC., v. 98, n. 18, p. 10232-10237, ago. 2001. Doi: 10.1073/pnas.171243598.
- TALEBIZADEH, Z.; SIMON, S. D.; BUTLER, M. G. X chromosome gene expression in human tissue: Male and female comparisons. **Genomics**, San Diego, v. 88, n. 6, p. 675-681, dez. 2006. Doi: 10.1016/j.ygeno.2006.07.016.
- TARTAGLIA, N. R. *et al.* A review of trisomy X (47,XXX). **Orphanet Journal of Rare Diseases**, Londres, v. 5, n. 8, p. 1-9, mai. 2010. Doi: 10.1186/1750-1172-5-8.

- TAYLOR-PHILLIPS, S. *et al.* Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. **BMJ open**, Londres, v. 6, n. 1, p. 1-13, jan. 2016. Doi: 10.1136/bmjopen-2015-010002.
- THEISEN, A.; SHAFFER, L. G. Disorders caused by chromosome abnormalities. **The Application of Clinical Genetics**, Auckland, v. 3, n. 1, p. 159-174, dez. 2010. Doi: 10.2147/TACG.S8884.
- TROTMAN, J. B.; CALABRESE, J. M. How to silence an X chromosome. **Nature**, Londres, v. 578, n. 7795, p. 455-460, fev. 2020. Doi: 10.1038/d41586-020-00207-0.
- UNESP. **Tipos de Revisão de Literatura**. Faculdade de Ciências Agronômicas. Botucatu, 2015. Disponível em: <https://www.fca.unesp.br/Home/Biblioteca/tipos-de-evisao-de-literatura.pdf>. Acesso em: 21 out. 2019.
- URNOV, F. D. *et al.* Genome editing with engineered zinc finger nucleases. **Nature Reviews**, Londres, v. 11, n. 9, p. 636-646, set. 2010. Doi: 10.1038/nrg2842.
- UTSWMED. **Why does a woman's age impact the risk of Down syndrome in her baby?** Dallas, 2017. Disponível em: <https://utswmed.org/medblog/age-matters-down-syndrome/>. Acesso em: 05 fev. 2020.
- VASCONCELOS, M. J. V.; FIGUEIREDO, J. E. F. **Edição de Genoma com Nuclease "Zinc Finger"**. 1 ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/152798/1/doc-201.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2020.
- VAWTER, M. P. *et al.* Gender-Specific Gene Expression in Post-Mortem Human Brain: Localization to Sex Chromosome. **Neuropsychopharmacology**, Londres, v. 29, n. 2, p. 373-384, fev. 2004. Doi: 10.1038/sj.npp.1300337.
- WILSON, R. D.; POON, L. C.; GHIDINI, A. Current controversies in prenatal diagnosis 3: is there still a value in a nuchal translucency screening ultrasound in conjunction with maternal plasma non-invasive cell-free DNA testing? **Prenatal diagnosis**, Chichester, v. 36, n. 1, p. 20-24, jan. 2016. Doi: 10.1002/pd.4719.
- WUTZ, A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. **Nature Reviews**, Londres, v. 12, p. 542-553, ago. 2011. Doi: 10.1038/nrg3035.
- XU, J.; DISTECHE, C. M. Sex differences in brain expression of X- and Y-linked genes. **Brain Research**, Amsterdão, v. 1126, n. 1, p. 50-55, dez. 2006. Doi: 10.1016/j.brainres.2006.08.049.
- XU, N.; TSAI, C. L.; LEE, J. T. Transient Homologous Chromosome Pairing Marks the Onset of X Inactivation. **Science**, Nova Iorque, v. 311, n. 5764, p. 1149-1152, fev. 2006. Doi: 10.1126/science.1122984.
- ZHAO, W. *et al.* Robertsonian Translocations: an overview of 872 Robertsonian translocations identified in a diagnostic laboratory in China. **PLoS ONE**, São Francisco, v. 10, n. 5, mai. 2015. Doi: 10.1371/journal.pone.0122647.
- ZINN, A.R.; ROSS, J. L. Molecular Analysis of Genes on Xp Controlling Turner Syndrome and Premature Ovarian Failure (POF). **Seminars in Reproductive Medicine**, Nova Iorque, v. 19, n. 2, p. 141-146, jun. 2001. Doi: 10.1055/s-2001-15394.