

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CAMILA PIVETTA CAVALHEIRO

**MARCADORES MOLECULARES FORENSES COMO FERRAMENTA NO ESTUDO DE ALTERAÇÕES NA
HERANÇA DO CROMOSSOMO 21**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Escola de Ciências da Saúde e da Vida
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**MARCADORES MOLECULARES FORENSES COMO FERRAMENTA NO
ESTUDO DE ALTERAÇÕES NA HERANÇA DO CROMOSSOMO 21**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Escola de Ciências da Saúde e da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

CAMILA PIVETTA CAVALHEIRO

ORIENTADOR: CLARICE SAMPAIO ALHO

Porto Alegre, RS

2019

Ficha Catalográfica

C376m Cavalheiro, Camila Pivetta

Marcadores moleculares forenses como ferramenta no estudo de alterações na herança do cromossomo 21 / Camila Pivetta
Cavalheiro . – 2019.

49.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho.

1. Genética Forense. 2. Teste de Paternidade. 3. Dissomia
Uniparental. 4. Cromossomo 21. I. Alho, Clarice Sampaio. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

AGRADECIMENTOS

Por detrás das nossas realizações pessoais, além de um considerável esforço próprio, encontram-se normalmente um grande número de pessoas. Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para que este estudo fosse realizado. Em primeiro lugar, a minha orientadora Dra. Clarice Sampaio Alho, para quem não há agradecimentos suficientes. Obrigada pela liberdade de ação que foi decisiva para meu desenvolvimento pessoal. Obrigada pela amabilidade, compreensão, por abrir horizontes e por disponibilizar todos recursos para meu crescimento profissional. Obrigada por ser um exemplo de motivação, profissionalismo e amizade. Ao Dr. Eduardo Ávila pela disponibilidade irrestrita, pela forma exigente e criativa de arguir ideias. Pelas valiosas discussões e críticas. Ao Dr. André Gastaldo pela constante partilha de conhecimento. Aos meus colegas de laboratório pela rotina leve e divertida, especialmente a Klér e ao Lucas, pelo otimismo, amizade e carinho que sempre me disponibilizaram. Aos meus amigos que estiveram comigo ao longo da realização deste trabalho, em especial, à Carol e ao André pelo incentivo constante e compreensão da minha ausência em muitos momentos. À minha família, pela sólida formação e por apoiarem a realização dos meus sonhos. Pelo amor, carinho, estímulo, admiração, e pela presença incansável com que sempre me ajudaram. Amo muito vocês.

Finalmente, à banca avaliadora pela disponibilidade em enriquecer esse trabalho. À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Edital 25/2014 – Pró-Forenses), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica – Chamada nº 16/2014 – INCT) e FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul) pela concessão de bolsas e demais auxílios. Aos professores e funcionários da PUCRS, em especial a Bruna Caldas Remedio. Ao Instituto de Medicina Social e de Criminologia de São Paulo (IMESC) e a Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) por aceitarem colaborar com esse estudo e serem instituições solícitas a pesquisa. Imensamente, obrigada.

RESUMO

Alterações cromossômicas numéricas somáticas estão associados à não-disjunção de cromossomos ou de cromátides-irmãs durante a gametogênese ou durante a fase pós-zigótica precoce. O resgate de monossomias ou trissomias é um mecanismo celular clássico ainda pouco esclarecido que, via pareamento cromossômico, permite que a célula retorne à dissomia. O pareamento ao acaso pode, contudo, manter no indivíduo pares dissômicos oriundos de um único genitor, o qual pode seguir um desenvolvimento fenotípico compatível com a normalidade. A dissomia uniparental (*uniparental disomy*; UPD) corresponde, justamente, a este tipo de alteração, isto é: o descendente apresenta, para um dos pares cromossômicos, a contribuição de apenas um de seus pais. Apesar de ser uma alteração bastante reconhecida na genética humana clínica, no âmbito forense a ocorrência de UPD tem sido pouco cogitada para explicar inconsistências alélicas em estudos de parentesco. Considerando os casos de investigação de paternidade que reportam inconsistências, há uma possibilidade real de que pelo menos uma fração delas não seja ocasionada por eventos *slippage*, mas sim por anormalidades cromossômicas do tipo UPD. Relatamos aqui a investigação de um caso de paternidade (mãe, filho e suposto pai), cuja a chance das inconsistências entre os alelos paternos obrigatórios (APO) e os alelos do suposto pai ser explicada pela ocorrência de isodissomia uniparental materna do cromossomo 21 (imUPD-21) foi 2,56 bilhões de vezes maior do que a chance de ser explicada pela ocorrência de mutação *slippage*. Um total de 350 marcadores de repetição curta (*short tandem repeat*; STR) e polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*; SNP) foram testados, permitindo uma conclusão estatística com $LR=2,56 \times 10^{40}$ de vínculo biológico verdadeiro entre o trio, apesar das oito inconsistências detectadas entre o APO e os alelos do pai. Além disso, nesse trabalho, revisamos mais de 100.000 casos de investigação de paternidade em busca de inconsistências no cromossomo 21, as quais poderiam também ser explicadas pela UPD. Em conclusão, considera-se que investigações semelhantes podem ter estatísticas melhoradas caso sejam levadas em consideração, na formulação das hipóteses, a ocorrência de alterações cromossômicas clássicas.

PALAVRAS-CHAVE

Dissomia Uniparental; Cromossomo 21; Genética Forense; Sequenciamento Massivo Paralelo; Teste de Paternidade; *Ion Torrent*.

ABSTRACT

Somatic numeric chromosomal alterations are associated with non-disjunction of chromosomes or sister chromatids during gametogenesis or during the early postzygotic phase. The rescue of monosomies or trisomies is a classic cellular mechanism, poorly understood, that, via chromosome pairing, allows the cell to return to disomy. Random pairing can, however, maintain in the individual disomic pairs from only a single parent, which may follow a phenotypic development compatible with normality. The uniparental disomy (UPD) corresponds precisely to this type of alteration, that is, the descendant presents, for one of the chromosomal pairs, the contribution of only one of his parents. Despite being a well-recognized chromosomal alteration in clinical human genetics, in the forensic context the occurrence of UPD has been little considered to explain allelic inconsistencies in kinship analysis.

Considering paternity investigation cases that report inconsistencies, there is a real possibility that at least a fraction of them are not caused by slippage events, but rather by UPD chromosomal abnormalities. We report here the investigation of a paternity case (mother, child and alleged father), who's the inconsistencies between the obligatory paternal alleles (OPA) and the alleged father alleles may be explained by the occurrence of maternal uniparental isodisomy of chromosome 21 (imUPD-21) was 2.56 billion times greater than the chance of being explained by the occurrence of slippage mutation. A total of 350 short tandem repeats (STR) markers and single nucleotide polymorphisms (SNP) markers were tested, allowing a statistical conclusion with a $LR = 2.56 \times 10^{40}$ of true biological linkage between the trio, despite eight inconsistencies detected between the OPA and the father's alleles. In addition, in this paper we reviewed over 100,000 paternity investigation cases looking for inconsistencies on chromosome 21, which could also be explained by the UPD. In conclusion, it is considered that similar investigations may have improved statistics if the occurrence of classical chromosomal alterations is considered when formulating the hypotheses.

KEY WORDS

Uniparental Disomy; Chromosome 21; Forensic Genetics; Parallel Mass Sequencing; Paternity test; Ion Torrent.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

| | |
|----------|-------------------------------------------------------|
| AIM | <i>Ancestry informative marker</i> |
| APO | Alelo paterno obrigatório |
| A-SNP | SNP autossômico |
| A-STR | STR autossômico |
| Bps | Pares de bases |
| CODIS | <i>Combined DNA Index System</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| dNTP | <i>Deoxynucleotide</i> |
| FBI | <i>Federal Bureau of Investigation</i> |
| FEPPS | Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde |
| HID | <i>Human identification</i> |
| hUPD | Heterodissomia Uniparental |
| imUPD-21 | Isodissomia uniparental materna do cromossomo 21 |
| IP | Índice de Paternidade |
| IPC | Índice de Paternidade Combinado |
| iUPD | Isodissomia Uniparental |
| LIP | Laboratório de Investigação de Paternidade |
| LR | <i>Likelihood Ratio</i> |
| MI | Meiose I |
| MII | Meiose II |
| MPS | <i>Massive Parallel Sequencing</i> |
| mUPD | Dissomia Uniparental Materna |
| mUPD-21 | Dissomia Uniparental Materna do cromossomo 21 |
| NDNAD | <i>United Kingdom National DNA Database</i> |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| PUCRS | Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul |
| pUPD | Dissomia Uniparental Paterna |
| SD | Síndrome de Down |
| SNP | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| STR | <i>Short Tandem Repeats</i> |
| UPD | Dissomia Uniparental |
| W | Probabilidade de Paternidade |
| Y-SNP | SNP cromossomo Y |
| Y-STR | STR cromossomo Y |

LISTA DE FIGURAS:

FIGURA 1. Mapa do cromossomo 21 - Homo sapiens: GRCh38.p13 (GCF_000001405.39), Chr 21 (NC_000021.9):1 - 46,709,983.

FIGURA 2. Mecanismos de formação da dissomia uniparental e seus resultados: Erros pós-fecundação; Resgate da dissomia a partir de zigoto monossômico; Complementação gamética; Resgate da dissomia a partir de zigoto trissômico.

FIGURA 3. Eletroferograma do marcador D16S539 através de eletroforese capilar (M = mãe, C = criança, SP = suposto pai).

FIGURA 4. Métodos para o cálculo do Índice de Paternidade em trios considerando que todos indivíduos são da mesma subpopulação.

FIGURA 5. Eletroferogramas dos marcadores D21S11 e PENTA D da Família DC21.

ANEXO:

FIGURA 1. A - Eletroferograma do marcador CSF1PO da Família DC21 com aparente mutação *slippage one-step*. **B** - Visualização da mesma inconsistência na Plataforma *Ion Torrent*, através de sequenciamento massivo paralelo.

FIGURA 2. Mapa do cromossomo 21 com as respectivas indicações de cada um dos *loci* de interesse forense que foram investigados nos membros da Família DC21.

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 -REFERENCIAL TEÓRICO | 1 |
| 1.1 - Alterações na herança do cromossomo 21 | 1 |
| 1.1.1 - Dissomia uniparental do cromossomo 21 | 2 |
| 1.2 - Marcadores forenses para a identificação molecular humana como ferramentas no estudo das alterações cromossômicas | 6 |
| 1.2.1 – Marcadores STRs..... | 6 |
| 1.2.2 – Marcadores SNPs | 7 |
| 1.3 - Testes de Paternidade e Análise Estatística Aplicada | 8 |
| 2 - APRESENTAÇÃO DO CASO: Família DC21 | 12 |
| 3 – OBJETIVOS | 14 |
| 4 – ARTIGO CIENTÍFICO | 15 |
| 4.1 – Uniparental Disomy of chromosome 21: A statistical approach and application in paternity tests | 15 |
| 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS | 33 |
| 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |
| ANEXOS | 38 |

1- REFERENCIAL TEÓRICO

1.1- ALTERAÇÕES NA HERANÇA DO CROMOSSOMO 21

Aneuploidias humanas são anomalias genéticas associadas a alterações no número de cromossomos em decorrência da não-disjunção adequada de um ou mais cromossomos durante a meiose (Hassold e Hunt, 2001). São consideradas as anomalias genéticas mais comuns em humanos, sendo a principal causa de abortos e irregularidades funcionais e estruturais no desenvolvimento fetal (Hassold e Hunt, 2007; Maluf e Riegel, 2011).

Acredita-se que a idade materna avançada é o fator de risco mais provável para a não-disjunção meiótica. Ainda que a gametogênese masculina e feminina apresente basicamente os mesmos processos meióticos, existem algumas diferenças marcantes no tempo de início, duração e, principalmente, no número de gametas formados. As divisões meióticas femininas iniciam-se nos ovários da descendente ainda durante o período fetal, em torno da nona semana de gestação, seguindo até algumas semanas após o nascimento, quando os ovócitos imaturos entram em um estado de meiose suspensa. Apenas durante o período em que a mulher está sexualmente madura (10 - 50 anos), a primeira divisão meiótica é concluída (Hunt, 2006). Esse prolongado espaço de tempo entre a suspensão da meiose e a maturação sexual feminina ocasiona um grande acúmulo de efeitos tóxicos (Sherman *et al.*, 2007). Já a espermatogênese inicia-se apenas na puberdade, progredindo de forma ininterrupta e produzindo espermatozoides maduros durante toda fase adulta (Hunt, 2006). Erros podem ocorrer tanto na ovogênese quanto na espermatogênese, no entanto, acredita-se em uma maior prevalência de erros na gametogênese feminina, sendo ainda maior em mulheres com idades avançadas (> 35 anos) (Hassold e Hunt, 2001).

No decorrer da disposição dos cromossomos (meiose I) e das cromátides irmãs (meiose II), podem ocorrer falhas na distribuição, de forma a originar embriões com um conjunto cromossômico que pode ser numericamente anormal. Se ocorrer uma incorporação no embrião de cromossomos a mais em relação ao par normal, o portador terá 47 cromossomos ou mais (trissomia ou polissomia). Em contrapartida, a ausência de cromossomos também pode ocorrer, de modo que o indivíduo possuirá 45 cromossomos ou menos (monossomia ou nulissomia) (Nussbaum, Mcinnes e Williard, 2008; Maluf e Riegel, 2011). Dentre as aneuploidias compatíveis com a vida, a trissomia do cromossomo 21 (47,XX,+21 ou 47,XY,+21) é a mais frequente, ocorrendo em um a cada 660 nascidos vivos, sendo considerada a maior causa genética de atraso mental em humanos (Wiseman *et al.*, 2009).

Por fim, com relação a extensão do cromossomo afetado, as UPDs são classificadas como completas, segmentadas e complexas. A UPD completa é diagnosticada quando todo cromossomo possui apenas uma origem, sendo a maioria dos casos relatados. Já a UPD segmentada ocorre quando apenas uma região cromossômica possui e mesma origem e as demais possuem origem biparental (Engel e Antonarkis, 2002). Atualmente, existem em média 120 relatos de UPD segmentada e mais da metade desses casos foram associados à indivíduos com a Síndrome de Beckwith-Widemann (UPD11). As UPDs complexas geralmente estão associadas a translocações simples ou robertsonianas. Neste grupo, a maioria dos relatos envolvem o cromossomo 13 e 14, especialmente a heterodissomia do cromossomo 14 (Liehr, 2010).

Segundo Siegel e Slavotinek (2005); Kotzot e Utermann (2005), a UPD pode decorrer de quatro mecanismos (Figura 2):

1. Resgate da dissomia a partir de zigoto trissômico

Ocorre quando um gameta dissômico é fecundado, ou fecunda, um gameta normal e forma um zigoto trissômico. Desta forma, ocorre o resgate da dissomia em decorrência da perda de um dos três cromossomos por segregação, que pode levar à correção cromossômica da condição normal ou à UPD.

2. Resgate da dissomia a partir de zigoto monossômico

Ocorre quando um gameta normal fecunda, ou é fecundado, por um gameta aneuploide, formando um zigoto monossômico. Esse zigoto então duplica seu cromossomo, antes da primeira mitose, formando um par de cromossomos de mesma origem, sendo classificado como uma isodissomia.

3. Erro pós fecundação

Ocorre quando os dois gametas que participam da fecundação são normais e formam um embrião com cromossomos de origens diferentes, mas durante as primeiras mitoses ocorre uma separação errada das cromátides-irmãs e duas cromátides de um mesmo genitor migram para a mesma célula, enquanto uma das células não recebe nenhuma cromátide desse cromossomo, resultando em uma célula trissômica e outra monossômica. Na próxima mitose, a célula trissômica expulsa o cromossomo de origem diferente enquanto a célula monossômica duplica seu único cromossomo. Neste caso acontece um mosaicismo, tendo células com UPD e células biparentais.

4. Complementação gamética

Ocorre quando o gameta óvulo mantém duas cópias do cromossomo por ter sido fecundado por um espermatozoide nulissômico, resultando na formação de um zigoto com número normal de cromossomos, mas com dois cromossomos de mesma origem. Neste mecanismo, os casos de heterodissomia são mais comuns.

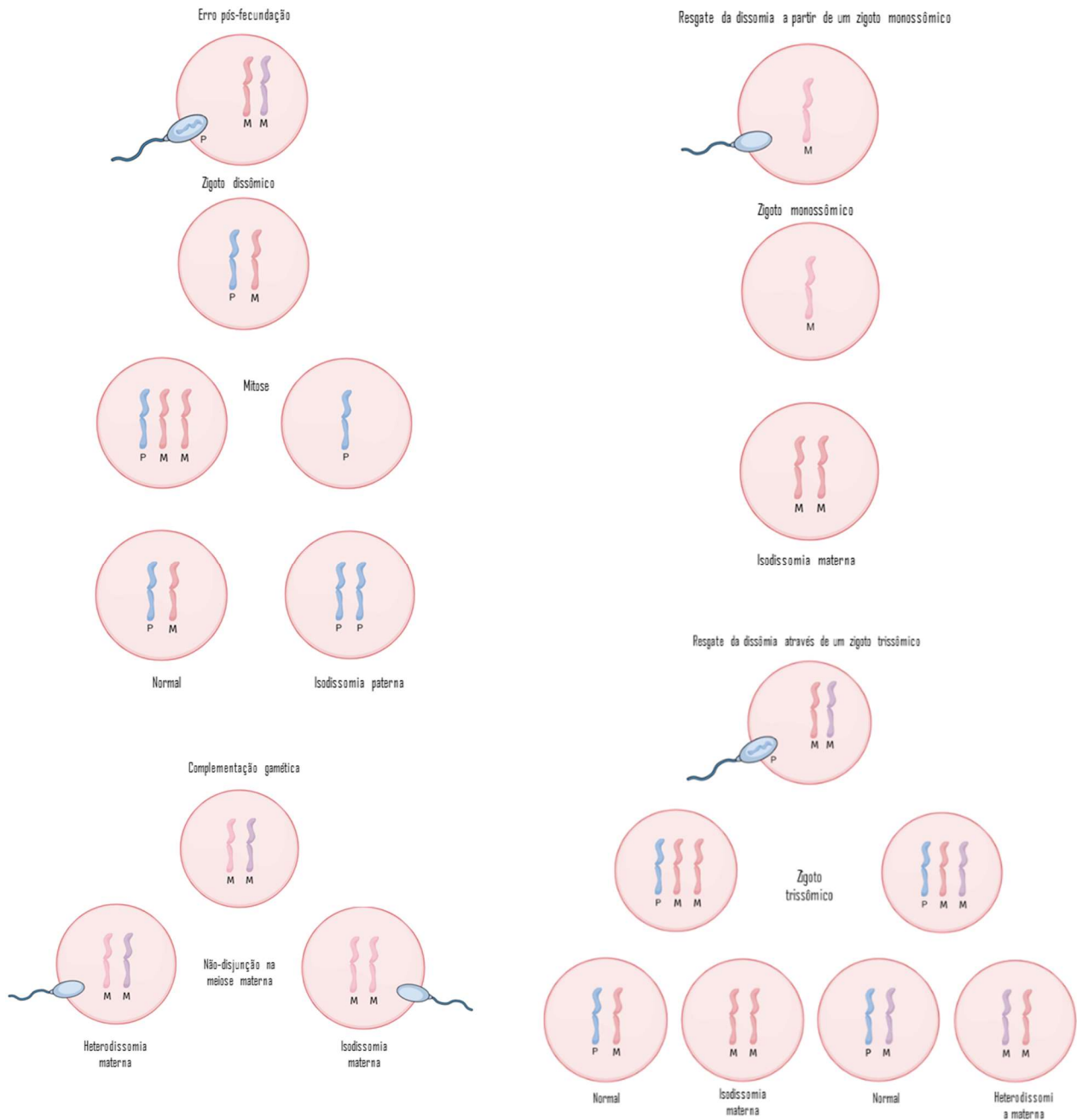


Figura 2. Mecanismos de formação da dissomia uniparental e seus resultados: Erros pós-fecundação; Resgate da dissomia a partir de zigoto monossômico; Complementação gamética; Resgate da dissomia a partir de zigoto trissômico. Fonte: Siegel e Slavotinek, 2005; Kotzot e Utermann, 2005 (adaptado).

A dissomia uniparental, antigamente pouco citada (Warburton, D., 1988), hoje é considerada um fator de diagnóstico para muitas anomalias e síndromes (Eggermann *et al.*, 2005). A UPD está relacionada a fenótipos anormais em um terço dos casos relatados, sendo, esses fenótipos, muito variáveis entre os cromossomos dissômicos (Liehr, 2010). Para os cromossomos 7, 11 e 15 a UPD está fortemente associada às Síndromes de Silver Russel, Beckwith-Wiedemann e Prader-Willi/Angelman, respectivamente (Engel e Antonarkis, 2002). Para o cromossomo 21, existem diagnósticos de abortos espontâneos, malformações estruturais, atraso no desenvolvimento, problemas neurológicos e, na sua grande maioria, fenótipos normais (Henderson *et al.*, 1994; Bartsch *et al.*, 1994; Rogan *et al.*, 1999 e Bruye`re *et al.*, 2000; Maluf e Riegel, 2011).

Devido a muitas UPDs não causarem nenhum fenótipo anormal ou serem inviáveis a vida, poucos estudos objetivaram a aferição da frequência de ocorrência desse fenômeno (Maluf e Riegel, 2011). Robinson (1996), através da análise molecular de pacientes diagnosticados com Síndrome de Prader-Willi (mUPD) e Angelman (pUPD), estipulou que a frequência de UPD para o cromossomo 15 seria de 1/80.000 nascimentos para mUPD, e 1/1.000.000 para pUPD. Levando em consideração que a frequência de eventos de aneuploidia/euploidia devido a não disjunção ocorrem com a mesma frequência para todos cromossomos humanos, o autor aferiu que a frequência de UPD para qualquer cromossomo seria de 1/3.500 nascimentos (0,029%) visto que a frequência de ocorrência de UPD para um único cromossomo é 1 em 80 mil nascimentos (Robison, 1996).

Nos últimos anos, através de novas tecnologias, como o sequenciamento massivo paralelo (MPS) de polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs), tem sido possível detectar, de forma minuciosa, casos de UPD. Estes métodos permitem uma detecção mais precisa das regiões homozigotas e heterozigotas ao longo de todo cromossomo estudado (Yamazawa *et al.*, 2010; Le Scouarnec e Gribble, 2012). O *Ion Torrent* é uma plataforma de sequenciamento MPS que detecta, através de um microchip, a liberação de íons de hidrogênio (H⁺), no sítio 3'OH, a cada incorporação de nucleotídeos complementares à base final livre, emitidos durante a polimerização do DNA. Esse sistema difere dos sequenciadores tradicionais (Técnica de Sanger), pois não utiliza a marcação de bases com fluoróforos, e sim a detecção da mudança de pH toda vez que ocorre a liberação do H⁺ na incorporação de um dNTP durante a síntese da cadeia complementar. Os sequenciadores MPS possuem a capacidade de processar, rapidamente e simultaneamente, milhões de sequências de DNA, possuindo uma efetividade bem maior que a técnica de Sanger (Mardis, 2008; Goodwin, S. *et al.*, 2016).

1.2- MARCADORES FORENSES PARA A IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR HUMANA COMO FERRAMENTAS NO ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS

1.2.1- Marcadores STRs

Marcadores de STR (*short tandem repeats*) são definidos como unidades que se repetem em tandem, estando presentes em cerca de 3% do genoma. São compostos por curtas sequências de nucleotídeos, de um a seis pares de bases de comprimento e estão amplamente dispersos por todo o genoma, sendo a sua distribuição relativamente uniforme entre os cromossomos (Tautz e Renz, 1984; Subramanian *et al.*, 2003; Butler, 2006). Os STRs são marcadores utilizados mundialmente que variam em tamanho (comprimento em pares de bases) devido a inserções e deleções de uma ou mais unidades de repetição ao longo do genoma. Essas alterações são causadas por um fenômeno conhecido como *slippage* ou “derrapagem” da enzima DNA polimerase, o qual gera uma alta taxa de mutação, de cerca de 0,1% por locus e elevado grau de polimorfismos (Walsh *et. al.*, 1996; Butler, 2005). Tais *loci* multialélicos, altamente polimórficos, permitem a ocorrência de grande taxa de heterozigose (Leclercq *et al.*, 2007). Essas características fazem com que marcadores STR sejam altamente informativos, sendo muito utilizados em estudos de investigação de parentesco e em identificação humana forense (Ellegren, 2004). Os STRs de maior importância forense são os que apresentam maior polimorfismo, maior frequência de heterozigotos, menor tamanho e baixa frequência de mutações (Galante-Filho *et al.*, 1999).

Os microssatélites foram primeiramente descritos como instrumentos eficazes para exames de identificação humana no início da década de noventa (Edwards *et al.*, 1991; Edwards *et al.*, 1992), e já em 1997 o *Federal Bureau Investigation* (FBI), dos Estados Unidos da América, selecionou 13 STRs autossômicos para formar uma base de dados conhecida como CODIS (*Combined DNA Index System*). Atualmente, devido ao seu uso no *National DNA Database* (NDNAD) e em outros bancos de dados mundiais, os marcadores STR são os *loci* mais empregados mundialmente para a identificação humana (Gill, 2002; Butler, 2005).

Utilizando a Trissomia do cromossomo 21, a origem do cromossomo 21 extra pode ser determinada pelo estudo dos marcadores STR do portador e de ambos genitores (mãe e pai), seguido pelo confronto entre os genótipos observados para cada indivíduo pertencente à família (Hassold e Hunt, 2001). Segundo Thomas e Hassold (2003), existem cinco possíveis resultados que podem ser encontrados na tentativa de elucidar a origem da não-disjunção resultante em Síndrome de Down:

1. Se o portador apresentar três alelos diferentes “abc”, enquanto que o genitor I tem os alelos “ab” e o genitor II tem os alelos “cd”, conclui-se que a cópia extra do cromossomo 21 foi herdada do genitor I, visto que o acometido apresenta ambos os alelos observados em seu perfil, que neste caso estão ausentes no genitor II.
2. Se, para um determinado marcador, o portador apresentar dois alelos diferentes “ac” na proporção 2:1, enquanto que o genitor I os alelos “ab” e o genitor II os alelos “cd” conclui-se que a cópia extra do cromossomo 21 foi herdada do genitor I, visto que o portador apresenta duas cópias do alelo “a”, que neste caso estão ausentes no genitor II.
3. Caso os parentes apresentem, para um determinado marcador, um alelo em comum (genitor I – “ab” e genitor II – “ad”), o sistema alélico não é informativo para a determinação da origem parental no acometido “aad”. Portanto, outros sistemas alélicos devem ser analisados.
4. Através de marcadores pericentroméricos é possível determinar se a heterozigose observada no genitor de origem é mantida ou reduzida à homozigose. Se a heterozigose for mantida, conclui-se que o erro ocorreu durante a meiose I (MI). Se for reduzida, o erro ocorreu na meiose II (MII) ou após a formação do zigoto. Para isso, se o genitor I apresentar os alelos “ab” e o genitor II os alelos “cd” enquanto o acometido os alelos “abc” para o marcador STR analisado, conclui-se que a não disjunção ocorreu na MI, visto que a heterozigose do parental A foi mantida. Seguindo este raciocínio, caso o portador apresente os alelos “aac”, conclui-se que a heterozigose observada no genitor I foi reduzida, o que significa que a não disjunção ocorreu na MII.
5. Os eventos de recombinação também podem ser identificados através da observação da transição do estado de heterozigose para homozigose, ou vice-versa, entre dois marcadores do portador. Por exemplo: o genitor I apresenta para o marcador 1 os alelos “ab” e para o marcador 2 os alelos “fg”, o genitor II apresenta para o marcador 1 os alelos “cd” e para o marcador 2 os alelos “hi” e o portador apresenta para o marcador 1 os alelos “abc” e para o marcador 2 os alelos “ffh” existem indícios de que ocorreu um evento de recombinação entre os dois cromossomos.

1.2.2- Marcadores SNPs

SNP, do inglês *Single Nucleotide Polimorphism*, são variantes que apresentam mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas, diferindo no genoma entre membros da mesma espécie ou entre pares de cromossomos de um mesmo indivíduo, com frequência de pelo menos 1% na população (Brookes, 1999). Esses polimorfismos são formados pela

substituição de uma única base ou por pequenos eventos de deleção/inserção. As mutações mais frequentes são as trocas de uma pirimidina por outra pirimidina (C–T) que resulta na troca do alinhamento A-G na fita complementar. As trocas de purina por uma pirimidina ou vice-versa também são possíveis, contudo, menos comuns. Grande parte dos SNPs são bi-alélicos, ou seja, são identificadas apenas duas variantes em uma espécie. Na maior parte das vezes, os SNPs são encontrados em espaços intergênicos de forma neutra, ou seja, sem função determinada (Liao e Lee, 2010).

Na última década, o interesse em SNPs tem aumentado também na área forense como decorrência da geração de novas tecnologias, as quais permitiram a genotipagem de SNPs em massa. Chips de alta densidade foram criados para genotipar de dezenas e até centenas de milhares de marcadores SNP em um único ensaio, facilitando estudos populacionais (Butler *et al.* 2007). Os SNPs são menos mutáveis, se comparáveis aos STRs, sendo marcadores bastante estáveis e úteis para análises de confirmação de paternidade, identificação individual, detecção de doenças e para diversos estudos populacionais (Jehan e Lakhanpaul, 2006). Paralelamente, a informação gerada dos SNPs pode ser utilizada como marcador no mapeamento genético, na identificação de SNPs funcionais e seu respectivo fenótipo, ou como ferramenta para estudos populacionais, permitindo a comparação do genoma de indivíduos de diferentes populações (Zhang e Hewitt, 2003).

Neste contexto, passa a ser aceitável e atrativo fazer uso dos marcadores forenses do tipo SNP também como ferramentas no estudo de alterações cromossômicas. Na intenção de elucidar a origem (se materna ou paterna) de uma não-disjunção, é factível, portanto, também estudar-se SNPs ou configurações haplotípicas com SNPs tendo como base as considerações apresentadas por Thomas e Hassold (2003).

1.3- Testes de Paternidade e Análise Estatística Aplicada

Seguindo o padrão de herança mendeliana típico, o filho possui 50% do genoma da sua mãe e 50% do genoma do seu pai. Partindo dessa premissa, considera-se que qualquer eventual alelo verificado na criança que não esteja presente no perfil genético da mãe pode ser considerado como o alelo paterno obrigatório (APO) (Figura 3). Entretanto, apenas identificar que o suposto pai possui todos APOs não é suficiente para a conclusão de paternidade biológica. É necessário mensurar o peso dessas evidências genéticas, de forma que as mesmas possam ser referidas numericamente e expressas em escalas verbais e quantitativas. Para isso são efetuados cálculos estatísticos, levando em consideração diversos aspectos baseados nas características da população onde os indivíduos testados estão inseridos, que determinam o índice de paternidade

combinado (IPC) e a probabilidade que o suposto pai tem de ser pai biológico da criança (W). Esta abordagem é a mais comumente empregada em exames de paternidade, e é conhecida como Abordagem Bayesiana (Butler, 2005; Buckleton, 2005).

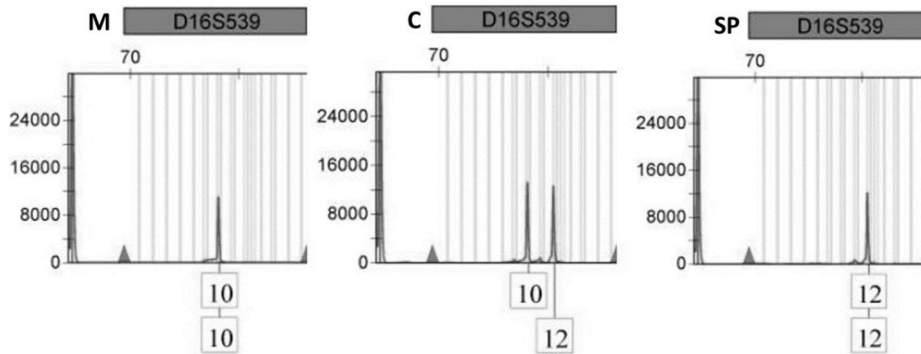


Figura 3. Eletroferograma do marcador D16S539 através de eletroforese capilar (M = mãe, C = criança, SP = suposto pai). Fonte: *software* GeneMapper ID-X v.1.4 (Applied Biosystems).

O índice de paternidade (IP), conceito empregado na aferição do peso da evidência genética encontrada para o caso em tela, utiliza uma análise de razão de verossimilhança (*Likelihood ratio - LR*) que se fundamenta na mensuração relativa entre duas ou mais hipóteses alternativas, geralmente vinculadas à inclusão (H_0) e a de exclusão (H_1) do genitor em uma relação de parentesco biológico. Estes valores são estimados com base no respaldo às hipóteses fornecido pelas evidências genéticas encontradas, buscando determinar qual é mais provável (mais forte), dada a evidência genética encontrada (Buckleton, 2005). Em um caso de paternidade de trio típico, as hipóteses assumem a seguinte formulação:

H_0 = o suposto pai é de fato o pai biológico do filho.

H_1 = o pai biológico do filho é outro indivíduo qualquer, tomado ao acaso na população, e não relacionado com o suposto pai biológico.

Aconselha-se também, na execução dos cálculos matemáticos envolvidos na determinação da LR, a utilização de um fator de correção para compensar os efeitos da eventual ocorrência de subestruturação populacional. Sua inclusão é necessária, pois os cruzamentos entre indivíduos nessas populações podem, eventualmente, divergir das premissas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, ocasionando efeitos de coancestralidade nos alelos observados entre estes indivíduos (Buckleton, 2005). Para indivíduos não-indígenas e de uma mesma população urbana, de tamanho significativo, recomenda-se a utilização do valor $\theta = 0.01$ (NRC II, 1996).

Balding & Nichols (1994; 1995) e Ayres (2000), considerando a subestruturação populacional, propuseram fórmulas para o cálculo do IP (Figura 4).

| Genotype Mother | Genotype Child | Genotype Alleged Father | Same Subpopulation |
|-----------------|----------------|-------------------------|------------------------------------------------------------|
| aa | aa | aa | $\frac{1 + 3\theta}{4\theta + (1 - \theta)p_a}$ |
| ab | | | $\frac{1 + 3\theta}{3\theta + (1 - \theta)p_a}$ |
| bb | | | $\frac{1 + 3\theta}{2\theta + (1 - \theta)p_a}$ |
| bc | | | |
| aa | aa | ab | $\frac{1 + 3\theta}{2(3\theta + (1 - \theta)p_a)}$ |
| ab | | | $\frac{1 + 3\theta}{2(2\theta + (1 - \theta)p_a)}$ |
| ac | | | $\frac{1 + 3\theta}{2(\theta + (1 - \theta)p_a)}$ |
| bb | | | |
| bc | | | |
| bc | | | |
| cc | | | |
| cd | ac | | |
| ab | ab | aa | $\frac{1 + 3\theta}{4\theta + (1 - \theta)(p_a + p_b)}$ |
| | | ab | |
| | | ac | $\frac{1 + 3\theta}{2[3\theta + (1 - \theta)(p_a + p_b)]}$ |

Figura 4. Métodos para o cálculo do Índice de Paternidade em trios considerando que todos indivíduos são da mesma subpopulação. Fonte: Buckleton, 2005.

Para cada marcador estudado, calcula-se o LR considerando a frequência dos alelos da criança na população (p_a e p_b). Após o cálculo individual do LR para cada um dos marcadores, realiza-se a multiplicação de todos LRs para a obtenção do Índice de Paternidade Combinado (IPC), uma vez que a herança de cada um dos polimorfismos avaliados é um evento independente dos demais e, portanto, sua probabilidade de ocorrência simultânea equivale ao produto das probabilidades individuais (Buckleton, 2005). Considera-se que um IPC superior a 10.000 suporta fortemente a hipótese desejada, conforme escala verbal de mensuração de LR proposta (Butler, 2005; Butler 2015).

Os valores do IPC obtidos podem ser interpretados como a probabilidade de os dados genéticos terem sido observados, considerando que o suposto pai é o verdadeiro pai biológico da criança. Entretanto, tal resultado não se propõe a responder à pergunta em questão, que é

qual a chance do suposto pai ser o verdadeiro pai biológico da criança, dado que os dados genéticos obtidos foram observados. A diferença parece sutil, mas são probabilidades distintas. Para que tal resposta seja possível, são utilizadas técnicas estatísticas baseadas no Teorema de Bayes's, o qual assume a seguinte forma (Buckleton, 2005):

$$\frac{\Pr(H_p \setminus E, I)}{\Pr(H_d \setminus E, I)} = \frac{\Pr(E \setminus H_p, I) \Pr(H_p \setminus I)}{\Pr(E \setminus H_d, I) \Pr(H_d \setminus I)}$$

Onde: H_p = hipótese de acusação
 H_d = hipótese de defesa
 E = evidência
 I = *background* da evidência

Em um exame típico, para cada uma das hipóteses alternativas anteriormente reportadas se atribui a mesma probabilidade. Dessa forma, se aplica uma *probabilidade a priori* de 0,5 (50%) para que não exista tendência matemática prévia a favor ou contra a paternidade, ou seja, antes de serem avaliados os dados genéticos, a chance do suposto pai ser o pai biológico verdadeiro da criança é de 50% (Buckleton, 2005).

Partindo, portanto, do IPC encontrado, é possível calcular a Probabilidade de Paternidade (W) através da equação bayesiana: $W = \text{IPC} \times P / [(\text{IPC} \times P + (1 - P))]$, onde P é a probabilidade *a priori* (0,5). Em casos típicos, com inclusão de paternidade, espera-se encontrar $W \geq 99,99$ (Butler, 2005; Butler, 2015; Buckleton, 2005).

Quando são encontradas inconsistências entre o filho e o suposto pai considera-se a ocorrência de algum evento mutacional (AABB, 2003). Desta forma, H_0 passa a ser a probabilidade do suposto pai ser de fato o pai biológico do filho, mas com a ocorrência de mutação e a inclusão da probabilidade dessa ocorrência nos cálculos (Buckleton, 2005).

As mutações mais frequentemente visualizadas em eletroferogramas são aquelas onde os alelos observados diferem em apenas um único número de repetições do motivo do microssatélite (denominada mutação de um passo, ocasionada pelo efeito de *slippage* da polimerase ocorrido durante a replicação da sequência do microssatélite), quando comparados genótipos do filho e genitores. Mutações de dois e três passos são mais raras e exigem adaptações nas taxas de mutação que levem em consideração a distância, em número de repetições do motivo do microssatélite, do alelo mutado (Fimmers *et al.* 1992; Brenner 1997).

2- APRESENTAÇÃO DO CASO: FAMÍLIA DC21

Em 2014 chegou ao Laboratório de Investigação de Paternidade (LIP) da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), um caso para investigação de paternidade de mãe, filho e suposto pai (aqui denominada Família DC21) que apresentou uma particularidade: durante a realização dos testes de rotina, observou-se três inconsistências entre os APOs e o suposto pai. Através de *kits* comerciais para identificação humana (Globalfiler e Power Plex Fusion), foram analisados, inicialmente, 23 *loci* gênicos relativos à investigação cível de parentesco (CSF1PO, D10S1248, D12S391, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D1S1656, D21S11, D22S1045, D2S1338, D2S441, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, FGA, PENTA D, PENTA E, SE33, TH01, TPOX, VWA). A análise dos 23 marcadores STRs forenses, revelou que apenas 20 dos APOs estavam presentes no homem alegado como sendo pai biológico.

Ao se analisar a localização cromossômica de dois, dos três marcadores inconsistentes, constatou-se que ambos eram *loci* do cromossomo 21 (D21S11 e Penta D). No *locus* D21S11, a mãe e o filho possuíam em homozigose os mesmos alelos 31.2/31.2, enquanto o susposto pai apresentava o genótipo 29/30. No *locus* Penta D a mãe apresentava o genótipo 12/15, o filho o genótipo 15/15 e o suposto pai o genótipo 9/10 (Figura 5). A terceira inconsistência foi encontrada no *locus* CSF1PO (cromossomo 5) e classificada como uma mutação *slippage* de um passo (Anexo 1 – Figura 1).

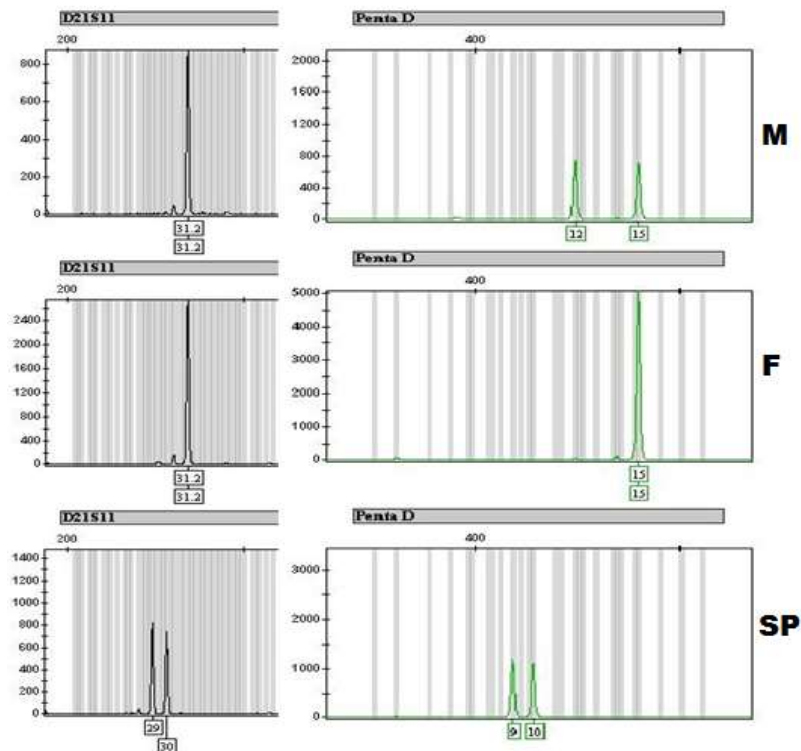


Figura 5. Eletoferogramas dos marcadores STRs D21S11 e PENTA D

(M = Mãe; F = Filho; SP = Suposto Pai).

Pela análise da altura do pico, que em homozigose costuma ser 2x a altura do pico de genótipos heterozigotos, foi possível afirmar de que o Filho era confirmadamente homozigoto no locus D21S11 e no PENTA D, isto é, com a presença de dois, e não de apenas um dos alelos maternos. Diante dessas informações, criou-se a hipótese de que poderia tratar-se de um caso de Dissomia Uniparental materna do cromossomo 21 (mUPD21). A perspectiva de ampliar o estudo desse caso motivou a presente pesquisa, tendo como intuito a caracterização mais precisa dos marcadores STRs dos cromossomos 21 presentes nesses indivíduos, e a expansão da análise incluindo outros marcadores ao longo do cromossomo 21 (Figura 2 – Anexo), a fim de sustentar ou descartar a ocorrência de mUPD21.

3- OBJETIVOS

Esse estudo teve como objetivos:

- Avaliar com fundamento biológico e estatístico, acerca do vínculo biológico de parentesco requerido para o caso DC21, considerando hipóteses que incluam a ocorrência de UPD, além de mutações *slippage*.
- Realizar um levantamento de casos de paternidade com vínculo biológico verdadeiro entre o trio, onde tenham sido detectadas inconsistências alélicas no cromossomo 21 entre o descendente e os genitores, e analisar em quais deles a ocorrência de UPD poderia explicar os genótipos.

4- ARTIGO CIENTÍFICO

Forensic Science International: Genetics

Uniparental Disomy of chromosome 21: A statistical approach and application in paternity tests.

--Manuscript Draft--

| | |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Manuscript Number: | FSIGEN-D-20-00032 |
| Article Type: | Research Paper |
| Section/Category: | Regular Paper |
| Keywords: | Massive Parallel Sequencing; STR; SNP; Uniparental disomy; Isodisomy; paternity test; likelihood ratio; chromosome 21; trisomy rescue |
| Corresponding Author: | Camila Pivetta Cavalheiro, M.D Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL |
| First Author: | Camila Pivetta Cavalheiro, M.D |
| Order of Authors: | Camila Pivetta Cavalheiro, M.D Eduardo Avila André Zoratto Gastaldo Pietra Graebin Carlos Henrique Ares Motta Rodrigo Rodenbusch Clarice Sampaio Alho |
| Abstract: | Considering the overall frequency of paternity investigation cases including mutational events, there is a real possibility that at least a fraction of all inconsistencies reported in paternity cases are caused not by polymerase slippage mutations, but to chromosomal abnormalities, as Uniparental Disomy (UPD). We report here the investigation of a trio paternity case (mother, child and alleged father), with observed inconsistencies that can alternatively be explained by occurrence of maternal uniparental isodisomy of chromosome 21 (imUPD-21). A total of 350 short tandem repeat (STR) and single nucleotide polymorphism (SNP) markers were tested, statistically suggesting true biological linkage between the trio. Additionally, we propose imUPD-21 explains, with significantly greater probability, the occurrence of detected inconsistencies, when compared to alternative hypothesis of multiple and simultaneous slippage mutations. Similar cases could have their statistical conclusions improved or even altered by including unusual chromosomal segregation patterns in the hypothesis formulation, as well as in mathematical calculations. Such reports of allelic inconsistencies being explained by chromosomal alterations are common in clinical genetics, and such situations might have impact on forensic investigation. |

Title: Uniparental Disomy of chromosome 21: A statistical approach and application in paternity tests.

Authors: Cavalheiro, C. P.^{1,2*}; Avila, E.^{1,2,3}; Gastaldo, A. Z.^{1,2}; Graebin, P.^{1,2}; Motta, C. H. A.⁴; Rodenbusch, R.⁵; Alho, C.S.^{1,2}

¹Laboratório de Genética Humana e Molecular | Genética Forense, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Ciências Forenses | Genética Forense, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

³Polícia Federal. Setor Técnico Científico, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Instituto de Medicina Social e Criminalística de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil.

⁵Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil.

* Corresponding author at: Laboratório de Genética Humana e Molecular, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 12C, Sala 235, 90619-900 – Porto Alegre – Brazil - email: camila.cavalheiro@edu.pucrs.br

KEYWORDS

Massive Parallel Sequencing; STR; SNP; Uniparental disomy; Isodisomy; paternity test; likelihood ratio; chromosome 21; trisomy rescue.

ABSTRACT

Considering the overall frequency of paternity investigation cases including mutational events, there is a real possibility that at least a fraction of all inconsistencies reported in paternity cases are caused not by polymerase slippage mutations, but to chromosomal abnormalities, as Uniparental Disomy (UPD). We report here the investigation of a trio paternity case (mother, child and alleged father), with observed inconsistencies that can alternatively be explained by occurrence of maternal uniparental isodisomy of chromosome 21 (imUPD-21). A total of 350 short tandem repeat (STR) and single nucleotide polymorphism (SNP) markers were tested, statistically suggesting true biological linkage between the trio. Additionally, we propose imUPD-21 explains, with significantly greater probability, the occurrence of detected inconsistencies, when compared to alternative hypothesis of multiple and simultaneous slippage mutations. Similar cases could have their statistical conclusions improved or even

altered by including unusual chromosomal segregation patterns in the hypothesis formulation, as well as in mathematical calculations. Such reports of allelic inconsistencies being explained by chromosomal alterations are common in clinical genetics, and such situations might have impact on forensic investigation.

INTRODUCTION

Forensic investigations of typical genetic relatedness (as in paternity trio tests including mother, child and alleged father) starts from the premise that the child always inherits an allele from his mother and another from his father. By convention, alleles found in the child that are not present in maternal genetic profile are considered to be obligate paternal alleles (OPAs). Thus, when the analysis and comparison of genotypes of those involved in a case of genetic kinship are carried out, it is sought to identify if the individual indicated as the alleged father presents all OPAs necessary to complement the child genetic profile. When genetic inconsistencies aren't observed in studied loci between OPAs and alleles found in the man who is claimed to be the father, statistical calculations are performed to evaluate Combined Paternity Index (CPI) and probability of this man to be the biological father of the child in question. Such calculations give the alleged father a statistical probabilistic value, considering population allelic frequency of investigated markers. For this, likelihood ratio analysis is used, between the probability of observing genetic data considering that alleged father is the biological father of the child (null hypothesis) and the probability of genetic findings occurrence giving that the true biological father is any other individual in the population, unrelated and randomly selected (alternative hypothesis).^{[1][2][3]}

Cases where one, two or even three allele inconsistencies are detected between alleged father and the OPAs, usually require an increase in number of evaluated loci, in order to definitively exclude paternity or to consider inconsistencies as possible mutational events.^{[4][5]} Technical recommendations mention slippage mutations as the main cause of inconsistencies in genetic paternity investigations, and also address occurrence of chromosomal alterations responsible for atypical results, including situations of triallelic patterns or trisomy.^{[1][6][7][8][9]} However, no information is available on other variations that deviate from expected classical Mendelian inheritance. Occurrence of Uniparental Disomy (UPD) and other chromosomal abnormalities commonly found in clinical genetics are still poorly reported by forensic genetics studies and can lead to drawbacks in tests results interpretation or even misinterpretation, entailing inconclusive or even false reports.^{[1][9]}

UPD constitutes inheritance of a chromosome pair from a single parent. Four proposed mechanisms describe autosomal UPD in a zygote: 1- Trisomy rescue: when a non-disjunction in meiosis-I (heterodisomy - hUPD), or in meiosis-II (isodisomy - iUPD), in the ovule (maternal UPD - mUPD) or spermatozoid (paternal UPD - pUPD) generates a dysfunctional gamete (24, X + A or 24, Y + A) that binds to a normal gamete (23, X or 23, Y), following trisomy rescue with expelling of third chromosome; 2 - Gamete complementation: when non-disjunction in spermatogenesis generates a nullisomic gamete (22, X-A or 22, Y-A) that binds to a normal ovule (23, X), and there is rescue of monosomy with two secondary oocyte chromatids complementing the $2n = 46$ configuration; 3 - Post fertilization error: when, after the zygote formation, there is a segregation error in blastocyst mitotic divisions, which maintains two identical chromatids; 4 - Monosomic rescue: when non-disjunction in meiosis generates a nullisomic gamete (22, X-A or 22, Y-A) that binds to a normal gamete, followed by monosomy rescue where the chromatid copied during the mitotic division phase is kept.^{[10][11]}

Depending on which chromosome presents a disomic pattern, UPD patients may present syndromic phenotypes or punctual abnormalities, such as delays in physical and mental development; however, UPD cases may also may have phenotypes compatible with normality.^[10] Among chromosomal alterations in this category the mUPD-15, which causes Prader-Willi syndrome, is reported to have the highest frequency (1.25×10^{-5}), followed by Angelman's syndrome (pUPD-15) (1×10^{-6}).^[13] Almost two decades ago, Robinson inferred expected total UPD frequency for total set of chromosomes would be 2.9×10^{-4} , which would be equivalent to a mean UPD frequency per chromosome of 1.32×10^{-5} , regardless of maternal or paternal origin.^[13] However, reports show that UPD wasn't detected in every human chromosomes, as is the case of chromosome 19.^[14] In addition, UDP cases frequency may vary according to maternal age. This data indicates UPD occurrence is not extremely rare and may, therefore, be underestimated.^{[15][16][17]}

Considering average frequency of UPD cases, there is a real possibility that a fraction of detected inconsistencies in paternity cases is caused not to polymerase slippage mutational events, but to uniparental disomy instead. In this line of thought, this article reports the investigation of a paternity case with inconsistencies that could be explained by occurrence of imUPD-21. A total of 350 short tandem repeat (STR) and single nucleotide polymorphism (SNP) markers were tested, statistically suggesting a true biological parental relation between the trio. In addition, over 100,000 paternity investigation cases were reviewed, in search of chromosome 21 inconsistencies which could also be explained by UPD.

MATERIAL AND METHODS:

(I) ETHICAL STATEMENTS

This study was submitted to CEP / CONEP (Comitê de Ética em Pesquisa / Conselho Nacional de Saúde) system and has been approved by the Research Ethics Review Boards of Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CAAE: 87198618.3.0000.5336) and Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (CAAE: 87198618.3.3001.5312), Brazil.

(II) CASE STUDY - DISOMY OF CHROMOSOME 21 (DC21)

SAMPLES, DNA EXTRACTION AND QUANTIFICATION: Mother, child and alleged father were assisted by Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul – SES/RS –, Brazil for the purpose of paternity investigation. During anamnesis, all three individuals presented a phenotype compatible with normality. DNA from blood and oral mucosa was collected in FTA (Whatman, Maidstone, United Kingdom) and swabs, respectively, and was extracted using the QIAmp DNA Investigator kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's recommendations.^[18] DNA quantification was performed with the Qubit dsDNA High Sensitivity assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, United States) on the Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific Inc.).^[19]

AMPLIFICATION OF STRs MARKERS WITH COMMERCIAL KITS: DNA samples were amplified with commercially available kits for human identification-oriented STRs markers Globalfiler (Thermo Fisher Scientific Inc.), PowerPlex Fusion (Promega Corporation, Madison, WI, United States) and PowerPlex Y23 (Promega Corporation), according to the manufacturer's instructions.^{[20][21][22]} An additional analysis of chromosome 21 was performed by multiplex PCR, with a set of fluorescently labeled primers for the simultaneous amplification of four 21-STR loci: D21S1435 (21q21.1), D21S1437 (21q21.1), D21S2052 (21q21.1) and D21S2055 (21q22.2). Primer sequences are available in Supplementary Table 1. PCR was performed on Veriti 96-well Thermal Cycler equipment (Thermo Fischer Scientific Inc.) under following conditions: 95°C 15'; 10 cycles 94°C 30'', 60°C 90'', 72°C 60''; 15 cycles 94°C 30'', 58°C 90'', 72°C 60''; 60°C 60'. PCR products were separated by capillary electrophoresis in 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Allele call and genetic profile analysis were performed on GeneMapper ID-X v.1.4 software (Thermo Fisher Scientific Inc.).^[23]

MASSIVE PARALLEL SEQUENCING (MPS): Three MPS panels designed for Ion Torrent Platform (Thermo Fischer Scientific Inc.) were used: Precision ID Identity (comprising 90 HID A-SNP and 34 Y-SNP), Precision ID Ancestry (165 AIM A-SNP) and Precision ID Globalfiler NGS STR (31 STRs), using 1ng of total genomic DNA per reaction. Libraries were constructed with Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Thermo Fischer Scientific Inc.) according to manufacturer's instructions using a different barcodes for each sample in a same run (Ion Xpress Barcode Adaptors 1–96 Kit or IonCode Barcode Adapters 1-384 Kit) (Thermo Fisher Scientific Inc.).^[24] Library purification was performed with magnetic beads (Agencourt Ampure XP Magnetics Beads, Beckman Coulter, FL, United States) and final quantification of amplified samples was performed in Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, using Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo Fischer Scientific Inc.). An equimolar pool was prepared with final concentration of 20 pM of each library. Amplicons pool was amplified by emulsion PCR using Ion One Touch 2 Instrument (Thermo Fischer Scientific Inc.) with Ion PGM HiQ Template Kit, following manufacturer's protocol. PCR products underwent an ISP (Ion Sphere Particles) enrichment process using Ion Touch Enrichment System (ES) (Thermo Fischer Scientific Inc.). Finally, 318 Chip Kit v2 (Thermo Fisher Scientific Inc.) was loaded with a volume of 30 µl. Sequencing reaction was performed on Ion Torrent PGM™ Sequencer using PGM Hi-Q Sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific Inc.). Sequencing results were generated by Torrent Suite Software v5.0 (Thermo Fischer Scientific Inc.) using Hg19 as reference genome. Secondary analysis, such as number of reads, was calculated through Coverage Analysis v5.0 plugin. For allele call and analysis of polymorphisms included in both SNPs panels, HID SNP Genotyper v4.3.1 plugin was used. BAM (Binary Alignment Map) files for all samples were visualized through the IGV (Integrative Genomic Viewer) software.^{[24][25][26]} All SNPs were independently reviewed by two collaborators and manual corrections were applied, when necessary. For STR markers, HID STR Genotyper v.4.0 plugin (Thermo Fischer Scientific Inc.) was used, and all markers presenting coverage under 50x were reviewed. Amplicons presenting sequences with a single repeat motif shorter or longer than corresponding alleles and with read number under 20% of main peaks were considered stutters.

STATISTICAL ANALYSIS: Familias v.3.2.4 software was used to evaluate statistical parameters and calculate the LR (Likelihood Ratio) for A-STRs markers and, after that, Combined Parenthood Index (CPI).^[27] For the A-SNP markers, formulas proposed by Balding and Nichols (1994, 1995) and Ayres (2000) were used.^{[28][29][30]} For Y-STR and Y-SNP markers, the formula $PI = 1/f$ was used, being f the frequency found for the Y-STR haplotype in Brazilian population, according to available population databases.^{[1][31]} Kappa method was used, which estimates

haplotype frequency based on the proportion of singletons within a sample of a population, and resulting expected frequency for obtained haplotype is 4.5×10^{-5} , according to database available for Brazilian population via YHRD online platform.^[31] All calculations were performed adopting a conservative approach, where corrections for population substructure ($\theta = 0.01$) and minimum allele frequency ($5/2N$) were observed.^[1] Paternity probability was estimated using an *a priori* probability of 0.5 for both null and alternative hypotheses. For mUPD-21 occurrence hypothesis, a frequency of 1.25×10^{-5} was used, which is observed for mUPD-15 and is the only chromosomal UPD frequency estimated, and as such proposed as the general frequency for mUPD occurrence.^[13] Allele frequencies used in CPI calculations, for autosomal STRs markers, were based on available Brazilian frequencies. A comprehensive list of references adopted for each marker is presented in Supplementary Table 2.^{[32][33][34][35][36][37][38]} For inconsistency analysis in STRs, equal probability mutation model was used for all loci (where number of motif repetitions are not considered for calculations), as well as the following mutation rates: CSF1PO= 1.5×10^{-3} , D21S11= 1.6×10^{-3} , PENTA D= 6.5×10^{-4} .^{[39][40]} Markers D21S1435, D21S1437, D21S2052, D21S2055 and D5S2800 were not included in IPC calculations, since they have unknown frequencies in Brazilian population and no studies of linkage equilibrium were performed, for the same population. HID autosomal SNP markers frequencies were described for Brazilian population by Avila et al. (2019).^[41] For AIM autosomal SNPs, Brazilian population frequencies were obtained and internally validated in Laboratory of Human and Molecular Genetics (data to be published). Since no information regarding ancestry of individuals examined in this case was available, ethnic bias was minimized by constructing a reference database where ethnic composition mimics overall biogeographical ancestry found in Brazilian population. Therefore, we applied general Brazilian frequencies for each locus, instead of specific ethnic group allele frequencies. For SNPs in which mutations were detected, general mutation rate of 1×10^{-8} was used, as mutation rates per locus are yet to be determined.^[2]

(III) ANALYSIS OF OTHER PATERNITY CASES:

A total of 116,224 paternity cases were reviewed, referring to information contained in results reports and electroferograms (8,307 cases from 2015 to 2017 from Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul – SES/RS, Brazil; 107,917 cases from 2008 to 2017 of Instituto de Medicina Social e Criminalística de São Paulo, IMESC, SP, Brazil). In this evaluation, all paternity trio cases (mother, child and alleged father) with results proposing a true biological link, verified by $IPC \geq 10,000$ and $PP \geq 99.99\%$, that presented mutations and/or chromosomal alterations in chromosome 21 loci of were computed.

RESULTS AND DISCUSSION

(I) CASE STUDY DC21

During our routine paternity test protocol execution, genetic compatibility between mother and child was found in 100% of the 23 autosomal STR loci evaluated; regarding OPA and alleged father alleles, concordance was found in 20 of 23 autosomal STR. The three inconsistencies detected between alleles present in child and in alleged father profiles were (in bold the child's inconsistent allele) CSF1PO: M = 11-14; C = **10-11**; AF = 11-12; D21S11: M = 31.2-31.2; C = **31.2-31.2**; AF = 29-30 and PENTA D: M = 12-15; C = **15-15**; AF = 9-10. When considered 23 Y-STR markers, child and alleged father share the same haplotype. This data was considered insufficient for issuance of a conclusive report.

Regarding autosomal STRs, the inconsistency found in CSF1PO marker was considered as an independent, one-step slippage mutational event with unknown origin. Inconsistencies in two 21-chromosome STR markers (D21S11 and PENTA D) shows that the child presents only one maternal allele in homozygosis, which was suggestive of imUPD21 occurrence. Thus, to evaluate the possibility of imUPD21, an assay was performed with amplification of extra markers, including four new 21-chromosome STRs and MPS genotyping of 289 SNPs (255 A-SNPs and 34 Y-SNPs), plus 11 STRs, one Y-STR, one Y-INDEL and amelogenin locus. Complete results show that: i- in all four 21-chromosome STRs, child's profile presented a homozygous pattern for a single maternal allele, and all of them were inconsistent with alleged father alleles; ii- genetic compatibility in all 255 autosomal SNPs analyzed between mother and child, and 254 of 255 in autosomal SNPs between child's OAP and alleged father alleles; this single allelic inconsistency occurred at locus 21q22.2 (rs914165: M = AG; C = AA; AF = GG). This result once again repeats the pattern observed in child profile, where only a single maternal allele is present in homozygosis. iii- Y-chromosome SNP markers confirmed that child and alleged father have the same haplotype, classified as haplogroup "E" (African origin) by genotyping plugins. iv- autosomal STR markers, evaluated by the MPS system included in analysis, confirmed the results found in previous genotyping performed by capillary electrophoresis; in an extra locus, however, a single inconsistency between mother and child was identified (D1S1677: M = 14-14, C = 12-12, AF = 12-13), which was considered as maternal drop-out allele, due to the low reading coverage observed at the locus (<30x) or, with less possibility, as a null allele or maternal two-step slippage mutation. Table 1 presents all genotypes supporting imUPD21 occurrence hypothesis. It is

important to notice that, while some SNP markers genotypes found for all three individuals do not unmistakably support an imUPD21 event (since normal genetic inheritance can also explain this genotypes), all of them are compatible with imUPD21 hypothesis. Only a single 21-chromosome SNP marker was consistent with UPD hypothesis and would not fit Mendelian segregation model. This result shows that biallelic SNP markers have a lower discrimination power for evidencing this kind of occurrence than the more polymorphic STR counterparts. For these markers set, Brazilian frequencies (when available) for alleles present in the child profile shows that probability of a random person in Brazilian population to be homozygous for all these markers with the same alleles is approximately 1 in 80 millions.

Table 1: Chromosome 21 genotypes for evaluated trio. All observed results support imUPD21 occurrence. All genotypes observed for child are homozygous. Data regarding inconsistencies found in other chromosomes (in number of 2) are not presented.

| MARKER | LOCATION | MOTHER | CHILD | OPA | FATHER |
|------------------|----------|-----------|-------------|-------|-------------|
| D21S11 | 21q21.1 | 31.2-31.2 | 31.2-31.2 | 31.2 | 29-30 |
| PENTA D | 21q22.3 | 12-15 | 15-15 | 15 | 9-10 |
| D21S2052* | 21q21.1 | 210-214 | 210-210 | 210 | 224-224 |
| D21S2055* | 21q22.2 | 356-359.4 | 359.4-359.4 | 359.4 | 352.1-352.1 |
| D21S1437* | 21q21.1 | 534-534 | 534-534 | 534 | 528-542 |
| D21S1435* | 21q21.1 | 172-180 | 180-180 | 180 | 164-172 |
| rs722098 | 21q21.1 | AG | AA | A | AG |
| rs2830795 | 21q21.1 | AA | AA | A | AG |
| rs2831700 | 21q21.1 | AG | AA | A | AG |
| rs914165 | 21q22.2 | AG | AA | A | GG |
| rs221956 | 21q22.3 | CC | CC | C | CC |
| rs2835370 | 21q22.2 | TT | TT | T | TT |

*analyzed by allele size (pb); OPA: Obligate paternal allele.

With all genetic results found, statistical calculations were carried out to verify obtained CPI for alleged father in this trio paternity test. LR (likelihood ratio) was computed using traditional methods, and divergences were assigned as mutational events. Results are presented as follows:

(i)- LR calculated under traditional mutation model (LR_{μ}):

$LR_{\mu} = \text{Null Hypothesis} / \text{Alternative Hypothesis}$ (Table 2) where Null hypothesis considered the probability of the child is a biological son of both mother and alleged father; Alternative Hypothesis considers the child is a son of the mother and of another random man in Brazilian population, unrelated to alleged father. Equal probabilities mutation model was used to explain

inconsistencies in CSF1PO, D21S11, Penta D and rs914165. Results for all different markers and technologies applied are summarized in Table 2.

Table 2. Likelihood Ratio of Null hypothesis including STR mutation rates to CSF1PO, D21S11 and Penta D loci, and SNP mutation rate to rs914165 locus *versus* Alternative hypothesis.

| MARKERS (TECHNOLOGY) | LR_μ | ACCUMULATED LR | INCONSISTENCIES |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------|
| STRs (CE) | 2.54x10 ³ | 2.54x10 ³ | 3 mutations |
| Y-STR + Y-SNP (CE + MPS) | 2.33x10 ⁴ | 5.89x10 ⁷ | None |
| STRs (MPS) | 8.33x10 ⁴ | 4.91x10 ¹² | 1* (not defined) |
| SNPs HID (MPS) | 1.38 | 6.78x10 ¹² | 1 mutation |
| SNPs AIM (MPS) | 1.47x10 ¹⁷ | 9.97x10 ²⁹ | None |
| | LR_μ | 9.97x10²⁹ | |

CE= Capillary Electrophoresis; MPS= Massive Paralel Sequency; *Inconsistency in D1S1677 marker was not included in calculations (see above).

Paternity Probability (with a *prior* of 0.5) is > 99,9999999999%. This result was considered robust enough to support a paternity inclusion conclusion in report issued by the laboratory. Despite that, all observed results are compatible with occurrence of imUPD-21. In order to evaluate impact of such rare event in paternity investigation reports, we demonstrate a statistic model considering reported frequency of mUPD-15. In this model, all 21-chromosome markers are not accounted as events with independent probabilities; instead, they are considered together as a single probabilistic event, with a frequency equivalent to the incidence of a single chromosome isodisomy. Thus, we designed the following model, and LR values are presented in Table 3.

(ii)-LR considering the occurrence of imUPD-21 (LR_{μ+imUPD21})

LR_{μ+imUPD21}= Null Hypothesis/Alternative Hypothesis (Table 3) are the same as in previous applied model. Equal probabilities mutation model was used to explain inconsistency in CSF1PO marker only. The frequency for each evaluated 21-chromosome allele markers were included in LR calculations and, a single event of isodisomy, with a frequency equivalent to populational probability of this kind of event occurrence, was included in IPC calculations. For the imUPD event (italic in table 3) was calculated the LR for the eight inconsistent markers and than multiplied by the UPD15 frequency.

Table 3. Likelihood Ratio of Null hypothesis including STR mutation rate to CSF1PO locus, and imUPD-21 *versus* Alternative hypothesis.

| MARKERS (TECHNOLOGY) | LR_{μ+imUPD21} | ACCUMULATED LR | INCONSISTENCIES |
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------|
|-----------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------|

| | | | |
|--------------------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------|
| STRs (CE) | 6.18x10 ⁹ | 6.18x10 ⁹ | 1 mutation |
| Y-STR + Y-SNP (CE + MPS) | 2.33x10 ⁴ | 1.44x10 ¹⁴ | None |
| STRs (MPS) | 8.33x10 ⁴ | 1.20x10 ¹⁹ | 1* (not defined) |
| SNPs HID (MPS) | 9.84x10 ⁷ | 1.18x10 ²⁷ | imUPD-21 |
| SNPs AIM (MPS) | 1.12x10 ¹⁷ | 1.32x10 ⁴⁴ | None |
| <i>imUPD event</i> | 1.94x10 ⁻⁴ | 2.56x10 ⁴⁰ | 8 in 12 markers |
| TOTAL | | | |
| | LR_{μ+imUPD21}: | 2.56x10⁴⁰ | |

CE= Capillary Electrophoresis; MPS= Massive Parallel Sequencing; *Inconsistency in D1S1677 marker was not included in calculations (see above).

Since paternity inclusion was proposed, an extra comparison was executed, based in results presented in Tables 2 and 3. A new LR was demonstrate, based on the following hypothesis: $LR = H_0 / H_1$, where H_0 considers the chance of alleged father is the biological father including an occurrence of imUPD-21 in addition to mutation model (CSF1PO), and H_1 defines the chance of alleged father is the biological father under assumption that all inconsistencies are derived from mutations only. Obtained LR was equivalent to 2.56x10⁴⁰, showing that the chance of explaining the true biological relation between alleged father and child in the DC21 case with the occurrence of imUPD-21 is 2.56 billion times more likely than the chance of explaining the true biological relation between alleged father and child in case of DC21 based on mutations only. This ratio may still be underestimated, since proposed mutation model used to explain inconsistencies in loci CSF1PO, D21S11, Penta D accounts for equal probabilities mutations only. If a stepwise model were considered, mutation rates for both chromosome 21 STR markers would be significantly smaller, since adjusts in mutation frequency would consider 1 and a half step and 5 steps mutations, respectively.

As far as we know, aneuploidy/euploidies are events arising from non-disjunction errors in random meiosis and, by theory, would occur with the same frequency for any human chromosome.^{[42][43]} Drastic changes, such as monosomies and most autosomal chromosome trisomies, interfere in the viability of gametes, zygotes, embryos and/or fetuses, and therefore are not commonly observed. Human chromosomes 21, 18 and 13 have the lowest gene numbers (232, 269 and 321 genes, respectively), and present the highest rates of trisomy occurrences. Only trisomic individuals able to complete development to adulthood are 21-chromosome trisomic subjects.^[44] Based on this understanding and in individuals of the CD21 case anamnesis (which have phenotype compatible with normality), and based on the genetics dates (child presents one maternal chromosome duplicated) the following possibility is suggested to explain observed results: the formation of a 47XY + 21 trisomy karyotype zygote (or blastomers) due to

non-disjunction of maternal sister chromatids of 21 chromosomes during meiosis II, which allowed the continuity of development, followed by the trisomy rescue with the loss of paternal chromosome 21.

(II) ANALYSIS OF OTHER PATERNITY CASES

In view of scarcity of UPD forensic reports, a data review was performed in routine kinship analysis results to investigate possible unreported or unidentified UPD-21 cases. [5][45][46][47][48][49][50] In a total of 116,224 trial exams, 121 cases involving inconsistencies in loci of chromosome 21 were found: 16 cases with triallelic pattern (15 of maternal origin and one of non-determined origin) and 105 inconsistencies denominated as mutational events (54 of paternal origin, 34 of maternal origin and 17 of undetermined origin). Only two of those cases were determined to be compatible with a possible UPD event, where the child's profiles for 21-chromosome markers exhibits a single parental allele in homozygosity and not shared by the other parent. This phenomenon was observed for at least two different 21-STR markers in each trio. Genotypes for those cases are: case A (ipUPD-21) D21S11: M = 28-29; C = 28-28; AF = 28-30; Penta D: M = 12-12; C = 10-10; AF = 10-10, which was interpreted as a two-steps maternal mutation event in Penta D locus; and case B (imUPD-21) D21S11: M = 29-29; C = 29-29; AF = 30-31; Penta D: M = 9-15; C = 15-15; AF = 10-15, which was reported as a paternal one-step mutation at the D21S11 locus. Both cases could be actually UPD cases, but due to allele sharing between parents and child in one of tested markers, slippage mutation hypothesis was accepted. Visualization of UPD occurrence, and its possible identification, is only possible when at least two or more markers for a single chromosome are genotyped.

CONCLUSION

In DC21 case study, 350 markers were analyzed and statistically supported a biological kinship between the trio (mother, child, alleged father), and showed that imUPD-21 explains, with a significantly greater probability, the occurrence of observed inconsistencies, when compared to alternative hypothesis of multiple and simultaneous slippage mutations. Similar cases could have statistics results improved by considering UPD or other abnormalities occurrence probability in hypotheses formulation and mathematical calculations, with allelic inconsistencies being explained by well-known, and not so rare in clinical genetics, chromosomal alterations. The main difficulty is the scarcity of reports and population studies that measure the

frequency of UPD, for each chromosome, with greater precision. We reinforce the importance that research groups and institutions include the occurrence of classic chromosomal abnormalities in their technical recommendations and other publications.

DECLARATION OF COMPETING INTEREST

Authors declare they have no conflict of interest.

FINANCIAL SUPPORT

Present work was funded by grants provided by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa Científica - Chamada nº 16/2014 – INCT) and FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul).

CREDIT AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT

C.P. Cavalheiro: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data curation, Writing - original draft, Visualization, Project administration. E. Avila: Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - review & editing. A. Z. Gastaldo: Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - review & editing. P. Graebin: Investigation, Resources, Data curation. C. H. A. Motta: Data curation, Formal analysis, Resources. R. Rodenbush: Data curation, Formal analysis, Resources. C.S. Alho: Conceptualization, Resources, Data curation, Writing - review & editing, Project administration, Supervision, Funding acquisition.

REFERENCES

- [1] C. Triggs, J. Buckleton, S. Walsh, *Forensic DNA Evidence Interpretation*. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- [2] J. M. Butler, *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005.
- [3] J. M. Butler, *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation*, 1st ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2015.
- [4] A. Mansuet-lupo, J. Henke, L. Henke, C. Blank, A. Ernsting, P. Kozlowski, P. Rouger, and V. Van Huffel, "Forensic Science International : Genetics A paternity case with three genetic incompatibilities between father and child due to maternal uniparental disomy 21 and a mutation at the Y chromosome," *Forensic Science International: Genetics*, vol. 3, pp. 141–143, 2009.

- [5] J. C. Guzmán-Alberto, G. Martínez-Cortes, and H. Rangel-Villalobos, "Inference of maternal uniparental disomy of the entire chromosome 2 from a paternity test," *International Journal of Legal Medicine*, vol. 133, pp. 71–75, 2019.
- [6] American Association of Blood Banks Relationship Testing Program Unit, "Annual Report Summary for Testing In 2003." [Online]. Available from <https://www.aabb.org/sa/facilities/Documents/ptannrpt03.pdf>, 2003.
- [7] D. W. Gjertson, C. H. Brenner, M. P. Baur, A. Carracedo, W. R. Mayr, F. Guidet, J. A. Luque, V. L. Pascali, M. Prinz, P. M. Schneider, and N. Morling, "ISFG : Recommendations on biostatistics in paternity testing," vol. 1, pp. 223–231, 2007.
- [8] Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. "Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories." [Online]. Available from: <https://www.swgdam.org/publications>, 2017.
- [9] C. H. Brenner, "Forensic Mathematics", DNA profile probability. [Online]. Available: <http://dna-view.com/>. [Accessed: 20-Feb-2019].
- [10] Engel, E.; Antonarakis, S. E. (2002). *Genomic Imprinting and Uniparental Disomy in Medicine*. 1 st ed. New York: Wiley-Liss, Inc.
- [11] R. L. Nussbaum, R. R. Mcinnes, and H. F. Willard, *Genética Médica*, 7th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2008.
- [12] S. W. Maluf and M. Riegel, *Citogenética Humana*. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- [13] W. P. Robinson, S. Langlois, S. Schuffenhauer, B. Horsthemk, R. C. Michaelis, S. Christian, D. H. Ledbetter, A. Schinzel. "Cytogenetic and Age-dependent risk factor associated with uniparental disomy 15," *Prenatal Diagnosis*, vol. 16, pp. 837–844, 1996.
- [14] Liehr, T. (2014). [Online] Uniparental Disomy. Available at: <http://upd-tl.com/upd.html> [Accessed 20 Feb. 2019].
- [15] W. P. Robinson, "Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences," *Bioessays*, vol. 22, pp. 452–459, 2000.
- [16] W. P. Robinson, S. L. Christian, B. D. Kuchinka, M. S. Pen, S. Das, W. P. Robinson, L. Christian, D. Kuchinka, S. Pen, S. Schuffenhauer, A. Schinzel, and T. J. Hassold, "Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15," no. 2, pp. 349–358, 2000.
- [17] T. Liehr, "Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD)," *Molecular Cytogenetics*, vol. 3, no. 8, pp. 1–7, 2010.
- [18] QIAGEN, "QIAamp® DNA Investigator Sample & Assay Technologies", no. June, pp. 1–60, 2012.

- [19] Life technologies, "Qubit® dsDNA HS Assay User Guide", pp. 1-9, 2015.
- [20] Applied Biosystems™, "GlobalFiler™ PCR Amplification Kit User Guide - User Guide", vol. 4476135, no. 4477604, pp. 1–166, 2016.
- [21] P. Corporation, *PowerPlex®*, "Fusion System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers Instructions for Use of Products DC2402 and DC2408", pp. 1–184, 2017.
- [22] Promega, *PowerPlex®*, "Y23 System for Use on the Genetic Analyzers", pp. 1–86, 2017.
- [23] Applied Biosystems™, "GeneMapper® ID-X Software Version 1.4 User Bulletin", pp.1-61, 2012.
- [24] T. Fisher Scientific, "Precision ID Panels with the Ion PGM System Application Guide", no. MAN0015830, pp. 1–114, 2017.
- [25] J. P. M. James T. Robinson, Helga Thorvaldsdóttir, Wendy Winckler, Mitchell Guttman, Eric S. Lander, Gad Getz, "Integrative Genomics Viewer," *Nat. Biotechnol.*, vol. 29, pp. 24–26, 2011.
- [26] J. P. M. Helga Thorvaldsdóttir, James T. Robinson, "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration.," *Brief. Bioinform.*, vol. 14, pp. 178–192, 2013.
- [27] D. Kling, A. O. Tillmar, and T. Egeland, "Familias 3 - Extensions and new functionality," *Forensic Sci. Int. Genet.*, vol. 13, pp. 121–127, Nov. 2014.
- [28] D. J. Balding and R. A. Nichols, "DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands," *Forensic Science International*, vol. 64, no. 2–3, pp. 125–140, 1994.
- [29] D. J. Balding & R. A. Nichols, "A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity and paternity," *Genetica*, vol. 96, pp. 3–12, 1995.
- [30] K. L. Ayres, "Relatedness testing in subdivided populations," *Forensic Science International*, vol. 114, no. 2, pp. 107–115, 2000.
- [31] S. Willuweit and L. Roewer. YHRD : Y-Chromosome STR Haplotype Reference Database. [online] Yhrd.org. Available at: <https://yhrd.org>, 200-2019.
- [32] T. da Silva. Estudo de concordância entre três kits comerciais para a identificação humana e determinação da frequência do locus D6S1043 em uma amostra do Rio Grande do Sul. Novo Hamburgo, RS, Brasil: Universidade Feevale, 2012. Accessed: Feb 20, 2019. Available from: <http://biblioteca.feevale.br/Artigo/ArtigoTiagoSilva.pdf>
- [33] P. E. Raimann, A. P. A. de Oliveira, R. Rodenbusch, J. B. Picanço, T. C. K. Albuquerque, and C. S. Alho, "Genetic data for D1S1677, D2S441, D4S2364, D10S1248, D14S1434 and D22S1045 miniSTR loci from the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil," *Forensic*

- Science International: Genetics*, vol. 6, no. 1, pp. e42–e43, 2012.
- [34] V.R.C.Aguiar, E.V.Wolfgramm, F.S.V.Malta, A.G.Bosque, A.C.Mafia, V.C.O.Almeida, F.A.Caxito, V.C.Pardini, Ferreira, A.C.S.Souza, I.D.Louro, “Updated Brazilian STR allele frequency data using over 100,000 individuals: an analysis of CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, Penta D, Penta E, TH01, TPOX and vWA loci,” *Forensic Science International: Genetics* vol. 6, pp. 504–509, 2012.
- [35] T.F.C.Pereira, M.Malaghini, J.C.M. Magalhães, R.Moura-Neto and V.S.Sotomaior, “Genetic data for 26 autosomal STR markers from Brazilian population,” *International Journal of Legal Medicine*, pp. 1305–1307, 2018.
- [36] P. Raimann, G. Hirschfeld-Campolongo, S. Schumacher, S. Esteves de Mattos Almeida, C. Silva, R. Rodenbusch, A. Simões Bassini, L. de Souza, E. César Soares Nascimento, E. Santana de Oliveira, V. R. Dias E Santos, E. Cristina Lopes de Oliveira, E. Aurora Auler-Bittencourt, R. Casemiro da Rocha Hirschfeld-Campolongo, M. Luiza Almeida Prado Oliveira E Sousa, H. Figueiredo, B. Boiko Pereira de Figueiredo, R. Silva, and R. Moura-Neto, *Population genetic analyses of the AmpFISTR® NGM™ in Brazil*, vol. 126. 2011.
- [37] L. de Assis Poiares, P. de Sá Osorio, F. A. Spanhol, S. C. Coltre, R. Rodenbusch, L. Gusmão, A. Largura, F. Sandrini, and C. M. D. da Silva, “Allele frequencies of 15 STRs in a representative sample of the Brazilian population,” *Forensic Sci. Int. Genet.*, vol. 4, no. 2, pp. e61–e63, Feb. 2010.
- [38] R. Rodenbusch, S. Schumacher, A. Z. Gastaldo, F. G. L. Chula, L. P. Maciel, T. Grandi, C. T. Michelon, C. Costi, and C. M. D. da Silva, “Population genetic data for 11 STR loci, including SE33, in Southern Brazil,” *Leg. Med.*, vol. 11, no. 4, pp. 200–202, 2009.
- [39] A. C. Mardini, R. Rodenbusch, S. Schumacher, F. G.L. Chula, C. T. Michelon, A. Z. Gastaldo, L. P. Maciel, S. E.D.M. Almeida and C.D.S. Maria, “Mutation rate estimates for 13 STR loci in a large population from Rio Grande do Sul, Southern Brazil,” *International Journal of Legal Medicine*, vol.127, pp. 45–47, 2013.
- [40] J. Martinez, D. F. Braganholi, I. B. Ambrósio, F. S. Polverari, R. Maria, B. Cicarelli, F. S. Polverari, R. Maria, and B. Cicarelli, “Mutation rates for 20 STR loci in a population from São Paulo state, Southeast, Brazil” . *Ann. Hum. Biol.*, vol. 44, pp. 1–4, 2017.
- [41] E. Avila, A. B. Felkl, P. Graebin, C. P. Nunes, and C. S. Alho. Forensic characterization of Brazilian regional populations through massive parallel sequencing of 124 SNPs included in HID ion Ampliseq Identity Panel. *Forensic Science International: Genetics*, vol. 40, pp. 74–84, 2019.

- [42] T. C. Hsu and P. S. Moorhead, "Chromosome anomalies in human neoplasms with special reference to the mechanisms of polyploidization and aneuploidization in the hela strain," *Ann. New York Acad. Sci.*, vol. 63, pp. 1083–1094, 1953.
- [43] D. Rasnick, "Aneuploidy theory explains tumor formation, the absence of immune surveillance, and the failure of chemotherapy," *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 136, no. 1, pp. 66–72, 2002.
- [44] P. Vodicka, L. Musak, L. Vodickova, S. Vodenkova, C. Catalano, M. Kroupa, A. Naccarati, Z. Polivkova, V. Vymetalkova, A. Försti, and K. Hemminki, "Genetic variation of acquired structural chromosomal aberrations," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 836, no. April, pp. 13–21, 2018.
- [45] G. Bein, B. Driller, M. Schürmann, P. M. Schneider, H. Kirchner, "Pseudo-exclusion from paternity due to maternal uniparental disomy 16," *International Journal of Legal Medicine*, vol. 111, pp. 328–330, 1998.
- [46] X. Ou, C. Liu, S. Chen, J. Yu, Y. Zhang, S. Liu, and H. Sun, "Complete paternal uniparental isodisomy for Chromosome 2 revealed in a parentage testing case". *Transfusion*, vol. 53, pp. 1266–1269, 2013.
- [47] M. Chen, J. Jiang, C. Li, H. Ren, W. Chen, Z. Liu, F. Cheng, J. Zhao, T. Chen, C. Chen and J. Yan, "Non-pathological complete paternal uniparental isodisomy of chromosome 2 revealed in a maternity testing case". *International Journal of Legal Medicine*, vol. 132, pp. 1-5, 2018.
- [48] R. Wegener, V. Weirich, E. M. Dauber and W. R. Mayr, "Mother--child exclusion due to paternal uniparental disomy 6,". *International Journal of Legal Medicine*, vol. 120, pp. 282–285, 2006.
- [49] C. Xiao, Y. Wang, F. Liao, S. Yi and D. Huang, "Microdeletion at 8q24 . 13 rather than multistep microsatellite mutation resulting in the genetic inconsistency at the D8S1179 locus in a true trio". *International Journal of Legal Medicine*, vol. 132, pp. 1-8, 2018.
- [50] E. R. Kerr, G. M. Stuhlmiller, G. C. Maha, M. A. Ladd, F. M. Mikhail, R. P. Koester and A. C. E. Hurst, "Maternal uniparental isodisomy for chromosome 6 discovered by paternity testing : a case report,". *Molecular Cytogenetics*, vol. 11, pp. 1-4, 2018.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

TABLE 1: Set of fluorescent labeled primers designed for STRs markers on chromosome 21.

| PRIMERS | SEQUENCE 5'→3' |
|-------------------|----------------------------|
| D21S2052_F | 6FAM/GCACCCCTTTATACTTGGGTG |
| D21S2052_R | TAGTACTCTACCATCCATCTATCCC |
| D21S2055_F | 6FAM/GGGTTCTCCAGAGAAACAGAA |
| D21S2055_R | GGGCAGCAGGAACTATACCA |
| D21S1437_F | 6FAM/CCATGTTCCCGAAATGATCT |
| D21S1437_R | TGAGGTGCTCCCAAACCTCTT |
| D21S1435_F | VIC/CCCTCTCAATTGTTTGTCTACC |
| D21S1435_R | GCAAGAGATTTTCAGTGCCAT |

TABLE 2. Frequency references used for each STR marker used in calculations.

| STR MARKER | REFERENCE | STR MARKER | REFERENCE |
|-------------------|---------------------------------|-------------------|------------------------------|
| SE33 | Rodenbusch <i>et al.</i> , 2009 | D13S317 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 |
| D19S433 | Poiares <i>et al.</i> , 2010 | FGA | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 |
| D2S1338 | Poiares <i>et al.</i> , 2010 | D6S1043 | Silva <i>et al.</i> , 2012 |
| D3S1358 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D10S1248 | Raimann <i>et al.</i> , 2012 |
| TH01 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D22S1045 | Raimann <i>et al.</i> , 2012 |
| D21S11 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D2S441 | Raimann <i>et al.</i> , 2012 |
| D18S51 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D1S1656 | Raimann <i>et al.</i> , 2012 |
| PENTA E | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D12S391 | Raimann <i>et al.</i> , 2012 |
| D5S818 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D14S1434 | Raimann <i>et al.</i> , 2012 |
| D13S317 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D1S1677 | Pereira <i>et al.</i> , 2018 |
| D7S820 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D2S1776 | Pereira <i>et al.</i> , 2018 |
| D16S539 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D3S4529 | Pereira <i>et al.</i> , 2018 |
| CSF1PO | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D4S2408 | Pereira <i>et al.</i> , 2018 |
| PENTA D | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D6S474 | Pereira <i>et al.</i> , 2018 |
| vWA | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D12ATA63 | Pereira <i>et al.</i> , 2018 |
| D8S1179 | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | D14S1434 | Pereira <i>et al.</i> , 2018 |
| TPOX | Aguiar <i>et al.</i> , 2012 | | |

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados nesse estudo trazem um alerta para a comunidade forense, pois suportam a existência de inconsistências alélicas, em estudos de parentesco, que não são decorrentes de mutações locais, mas sim de alterações na herança cromossômica. Tal evidência exige uma atenção especial para a formulação de hipóteses e de cálculos que irão concluir sobre a veracidade do vínculo biológico. No presente estudo, se demonstrou que é plausível e indicado adotar matematicamente a ocorrência de Dissomia Uniparental em cálculos de IPC. A principal dificuldade para aderir a essa prática ainda é a escassez de relatos e de estudos populacionais que afirmam a frequência de UPD, para cada um dos cromossomos, com maior precisão.

Reforça-se a importância que grupos de pesquisa, instituições e pesquisadores, incluam a ocorrência de alterações cromossômicas clássicas em suas recomendações técnicas e nas demais publicações.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Association of Blood Banks Relationship Testing Program Unit (2003). **Annual Report Summary for Testing In 2003.** [Online]. Disponível em: <https://www.aabb.org/sa/facilities/Documents/ptannrpt03.pdf>, 2003. Acesso em: 18 de fevereiro de 2019.
- Ayres, K. L. (2000). **Relatedness testing in subdivided populations.** Forensic Science International, vol. 114, no. 2, pp. 107–115.
- Balding, D. J., Nichols, R. A. (1994). **DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands.** Forensic Science International, vol. 64, no. 2–3, pp. 125–140.
- Balding, D. J., Nichols, R. A. (1995). **A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity and paternity.** Genetica, vol. 96, pp. 3–12.
- Bartsch, O., Petersen, M.B., Stuhlmann, I., Mau, G., Frantzen, M., Schwinger, E., Antonarakis, S.E., Mikkelsen, M. (1994). **Compensatory uniparental disomy of chromosome 21 in two cases.** J Med Genet, 31. p.534–540.
- Brenner, C. (1997). **Symbolic kinship program,** Genetics 145; 535–542.
- Brookes, A.J. (1999). **The essence of SNPs.** Gene, v.234, n.2, p.177-186.
- Bruye`re, H., Rups, R., Kuchinka, B.D., Friedman, J.M., Robinson, W.P. (2000). **Recurrent trisomy 21 in a couple with a child presenting trisomy 21 mosaicism and maternal uniparental disomy for chromosome 21 in the euploid cell line.** Am J Med Genet, 94. p.35–41.
- Butler J. M. (2005). **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers. 2 ed.,** New York: Elsevier. 660p.
- Butler J. M. (2006). **Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing.** J Forensic Sci, 51. p. 253-265.
- Butler J.M., Coble M.D. & P.M. Vallone (2007). **STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing.** Forensic Science, Medicine, and Pathology 3: 200-205.
- Butler, J.M. (2015). **Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Interpretation,** 1st ed. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Cooley WC, Graham JM. (1991). **Down syndrome: An update and review for the primary pediatrician.** Clin Pediat; 30. p. 259-262.

- Cre'au-Goldberg, N., Gegonne, A., Delabar, J., Cochet, C., Cbanis, M.O., Stehelin, D., et al (1987). **Maternal origin of a de novo balanced t(21q21q) identified by ets-2 polymorphism.** Hum Genet. Aug, 76. p.396-398.
- Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., Caskey, C. T. (1991). **DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats.** Am J Hum Genet, 49. p.746–756.
- Edwards, A., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, C. T., Chakraborty, R. (1992). **Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups.** Genomics, 12. p. 241–253.
- Eggermann T., Meyer E., Ranke M.B., Holder, M., Spranger, S., Zerres, K., Wollmann, H.A. (2005). **Diagnostic proceeding in Silver-Russell syndrome.** Mol Diagn, 9:205-209
- Ellegren, H. (2004). **Microsatellites: simple sequences with complex evolution.** Nat Rev Genet, v.5. p. 435-445.
- Engel, E. (1980). **A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy.** Am J Med Genet, 6. p. 137-143.
- Engel, E.; Antonarakis, S. E. (2002). **Genomic Imprinting and Uniparental Disomy in Medicine.** 1 st ed. New York: Wiley-Liss, Inc.
- Fimmers, R., Henke, L., Henke, J., Baur, M. (1992). **How to deal with mutations in DNA-testing.** Advances in Forensic Haemogenetics, vol. 4, Springer-Verlag, Berlin, pp. 285–287
- Galante, F. H., Figini, A. L., Reis, A. B., Jobim, L. F., Silva, M. (1999). **Identificação Humana.** 1ª ed. Porto Alegre: Sagra Luzzatto, p. 239-303.
- Gill, P. (2002). **Role of short tandem repeat DNA in forensic casework in the UK— past, present, and future perspectives.** BioTechniques, 32. p. 366–372.
- Goodwin, S.; Mcpherson, J. D.; Mccombe, W. R. (2016). **Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies.** Nature Reviews Genetics, v. 17, n. 6. p. 333–351.
- Hassold, T., Hunt, P. (2001). **To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy.** Nat Rev Genet, v.2. p.280-291.
- Hassold, T., Hall, H., Hunt, P. (2007). **The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going.** Hum Mol Genet. n.2. p. 203-208.
- Henderson, D.J., Sherman, L.S., Loughna, S.C., Bennett, P.R., Moore, G.E. (1994). **Early embryonic failure associated with uniparental disomy for human chromosome 21.** Hum Mol Genet, 3. p. 1373–1376.
- Hunt, P.A. (2006). **Meiosis in mammals: recombination, non-disjunction and the environment.** Biochemical Society Transactions, v.34. p.574-577.
- Jehan, T., Lakhanpaul, S. (2006). **Single Nucleotide Polymorphism (SNP) – Methods and application in plant genetics: a review.** Indian Journal of Biotechnology, v.5. p.435-459.

- Kotzot, D., Utermann, G. (2005). **Uniparental disomy (UPD) other than 15: phenotypes and bibliography update.** *Am Med Genet A*, 136. p. 287-305.
- Leclercq, S., Rivals, E., Jarne, P. (2007). **Detecting microsatellites within genomes: significant variation among algorithms.** *BMC Bioinformatics*, v.8. 125. p. 1-18.
- Le Scouarnec, S., Gribble, S. M. (2011). **Characterising chromosome rearrangements: recent technical advances in molecular cytogenetics.** *Heredity*, v. 108, p. 75.
- Liao, M. P.Y., Lee, K.H. (2010). **From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications.** *Biochemical Engineering Journal*, v.49. p. 149-158.
- Liehr, T. (2010). **Cases with uniparental disomy (UPD).** [Online] Disponível em: <http://www.med.unijena.de/fish/sSMC/00START-UPD.htm>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2019.
- Liehr, T. (2010). **Cytogenetic contribution to uniparental disomy (UPD).** *Molecular Cytogenetics*, v. 3, n. 8, p. 1–7.
- Mardis, E. R. (2008). **Next-Generation DNA Sequencing Methods.** *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 9, n. 1, p. 387–402.
- Maluf, S. W.; Riegel, M. (2011). **Citogenética Humana.** Porto Alegre: Artmed. 336 p.
- McInnis, M.G., Chakravarti, A., Blaschak, J., Petersen, M.B., Sharma, V., Avramopoulos, D., Blouin, J.L., Konig, U., Brahe, C., Matise, T.C., Warren, A.C., Talbot, C.C., Roeckhoven, M.L. e Antonarakis, S.E. (1993). **A Linkage Map of Human Chromosome 21: 43 PCR Markers at Average Intervals of 2.5 cM.** *Genomics*, v.16. p.562-571.
- National Research Council - NRC. (1996). **The Evaluation of Forensic DNA Evidence.** Washington, (DC); National Academy Press.
- Nussbaum, R. L.; McInnes, R. R.; Williard, H. F. (2008). **Genética Médica.** 7. ed. [S.l.]: Elsevier, 9788535221497.
- Peterson, A., Patil, N., Robbins, C., Wang, L., Cox, D.R., Myers, R.M. (1994). **A transcript map of the Down syndrome critical region on chromosome 21.** *Hum Mol Genet*. p.1735-1742.
- Rogan, P.K., Sabol, D.W., Punnett, H.H. (1999). **Maternal uniparental disomy of chromosome 21 in a normal child.** *Am J Med Genet*, 83. p.69–71.
- Robinson, W. P., Langlois, S., Schuffenhauer, S., Horsthemke, B., Michaelis, R.C., Christian, S., Ledbetter, D.H., Schinzel, A. (1996). **Cytogenetic and Age-dependent risk factor associated with uniparental disomy 15.** *Prenatal Diagnosis*, v. 16, p. 837–844.
- Sherman, S.L., Allen, E.G., Bean, L.H. e Freeman, S.B. (2007). **Epidemiology of Down syndrome.** *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, v.13. p.221-227.
- Sigel, D.H., Slavotinek, A. (2005). **Uniparental Disomy.** *Pediatr Dermatol*, 22. p. 482-487.

- Subramanian S., Mishra R., Singh L., (2003). **Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions.** *Genome Biol.* 4: R13.
- Tautz, D., Renz, M. (1984). **Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes.** *Nucleic Acids*, v.12. p. 4126-4138.
- Thomas, N.S., Hassold, T.J. (2003). **Aberrant recombination and the origin of Klinefelter syndrome.** *Human Reproduction*, v.9. p.309-317.
- Wiseman, F.K., Alford, K.A., Tybulewicz, V.L. e Fisher, E.M. (2009). **Down syndrome recent progress and future prospects.** *Hum Mol Genet*, v.18. p. 75- 83.
- Yamazawa, K., Ogata, T., Ferguson-Smith, A.C. (2010). **Uniparental disomy and human disease: na overview.** *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 154C. p. 329-334.
- Zhang, D.X., Hewitt, G.M. (2003). **Molecular DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects.** *Molecular Ecology*, v.12, n.3. p. 563- 584.
- Warburton, D. (1998). **Uniparental disomy: a rare consequence of the high rate of aneuploidy in human gametes.** *Am J Hum Genet*, 42:215-216.
- Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R. (1996) **Nucleic Acids Research**, 24, 2807–2812.

ANEXOS

FIGURA 1. A - Eletroferograma do marcador CSF1PO da família DC21 com aparente mutação *slippage one-step* (M: mãe, F: filho, SP: suposto pai). **B** - Visualização da mesma inconsistência na Plataforma Ion Torrent, através de sequenciamento massivo paralelo.

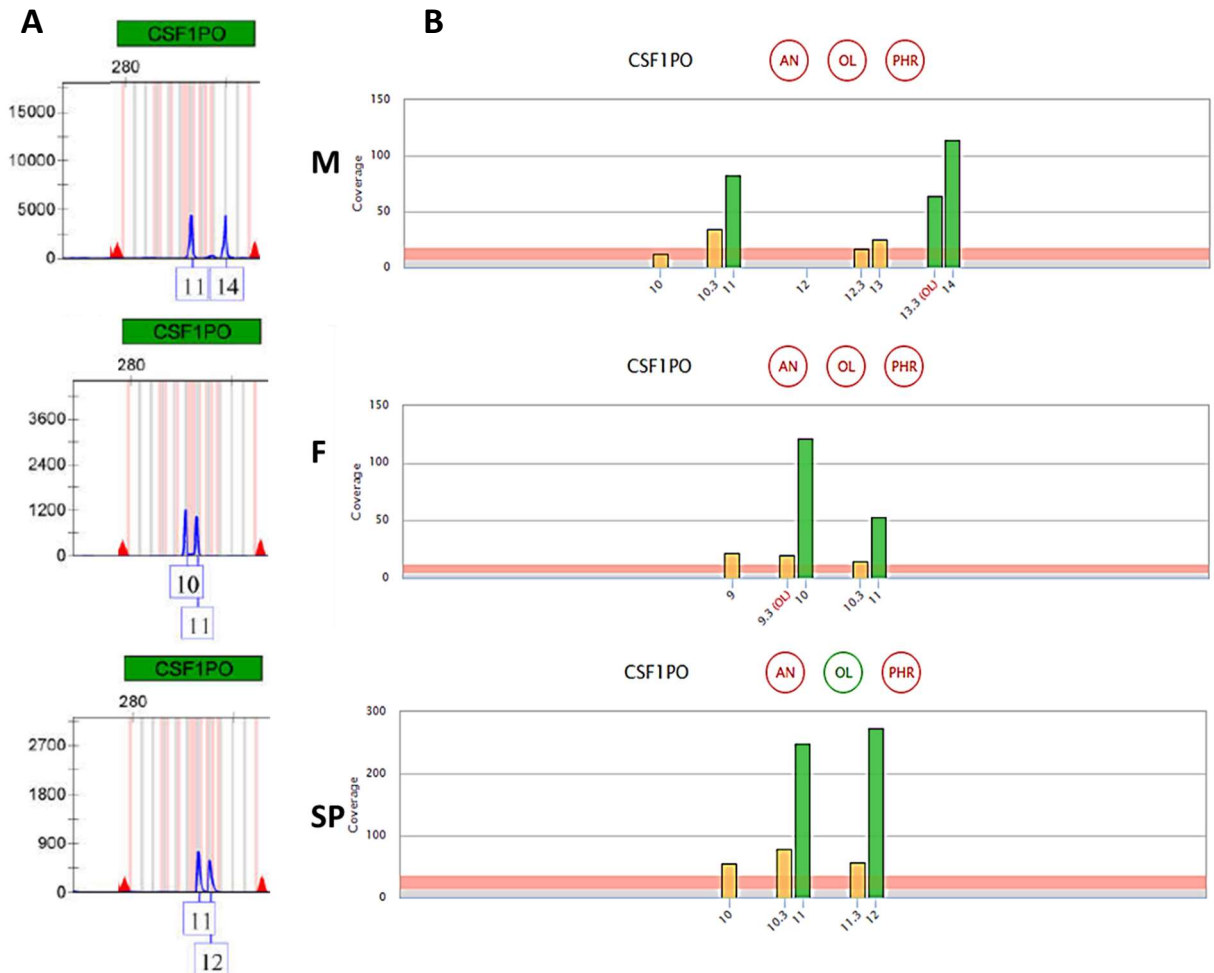
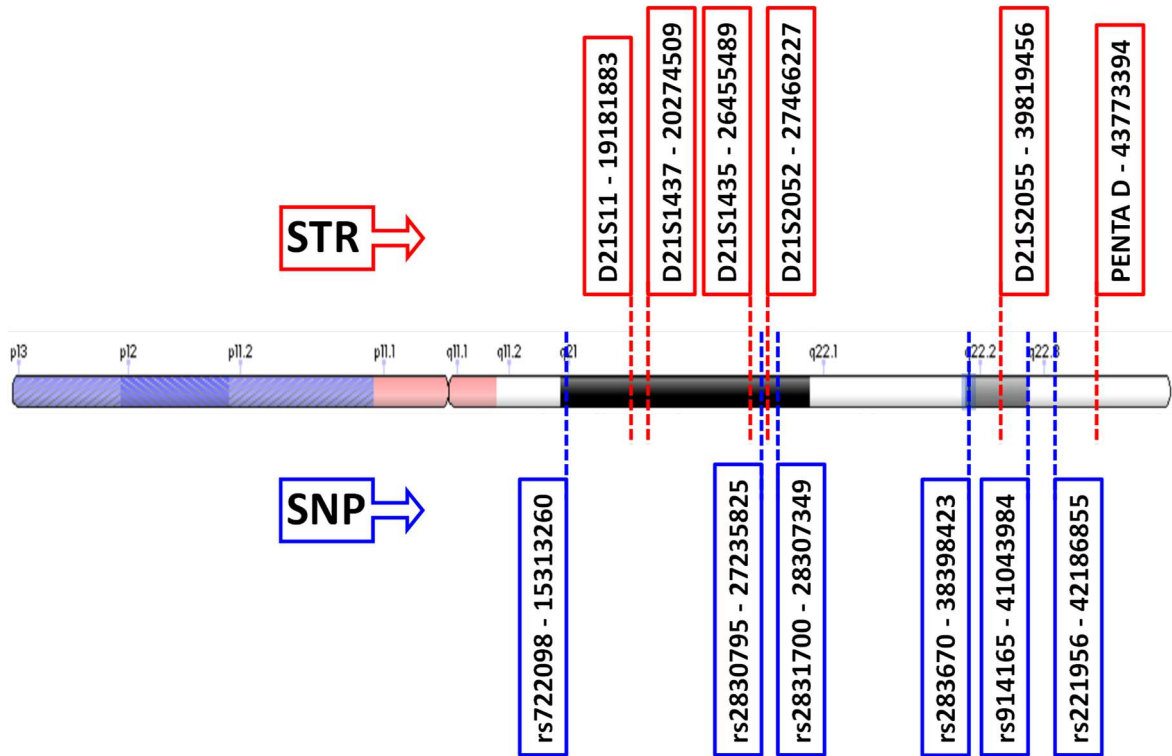


FIGURA 2 – Mapa do cromossomo 21 com as respectivas indicações de cada um dos loci de interesse forense que foram investigados nos membros da família DC21.





Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br