

TRISSOMIA 22: UMA REVISÃO DOS ASPECTOS CLÍNICOS, ETIOLÓGICOS, PROGNÓSTICOS E ÉTICOS

Carla Andréia Zamprogno Pereira de Oliveira¹; Fábio Gonçalves Coutinho²

¹Médica pediatra, Pós-graduanda em Neonatologia - Instituto de pós graduação Kandler Coutinho

²Médico infectologista, Pós-graduando em Pediatria-USP

RESUMO

O presente artigo buscou revisar as características clínicas, etiológicas, diagnósticas e prognósticas da trissomia do cromossomo 22. Foram pesquisados artigos científicos presentes nos portais MedLine, Lilacs e SciELO, utilizando-se as palavras chaves “Trisomy 22”, “Chromosome 22”. A pesquisa não se limitou a um período determinado e englobou artigos presentes nestes bancos de dados. A trissomia do cromossomo 22 é uma alteração cromossômica que está entre as principais causas de aborto no mundo, só excedida pela trissomia do cromossomo 16. Pode ocorrer por casos mosaicos, não-mosaicos e translocações cromossômicas. Dentre estes, os casos de sobrevivência geralmente constituem-se de mosaicos ou, em sua maioria, produtos de translocações, tornando-se assim raros os casos de sobrevivência não-mosaicos. Esta baixa sobrevivência de casos não-mosaicos relaciona-se às más formações graves, como a microcefalia, alterações cardíacas e renais graves e retardo do crescimento intra-uterino. O conhecimento da trissomia 22 em suas variadas formas, bem como das causas de aborto, sobrevivência e do quadro clínico e prognóstico dos pacientes tem grande importância no que diz respeito aos cuidados neonatais e aos aconselhamentos genéticos. A rapidez na confirmação do diagnóstico é importante para a tomada de decisões referentes às condutas médicas e éticas, junto a gestante e/ou recém-nascido e sua família. A baixa sobrevivência de casos não mosaicos ainda mostra-se um desafio.

Palavras-chave: Trisomy 22, Chromosome 22

ABSTRACT

The present article sought to review the clinical, etiological, diagnostic and prognostic characteristics of the trisomy of chromosome 22. Scientific articles were searched in the portals MedLine, Lilacs and SciELO, using the descriptors “trisomy 22”, “chromosome 22”. The research was not limited to a given period and included articles present in these databases. The trisomy of chromosome 22 is a chromosomal alteration that is among the main causes of abortion in the world, only exceeded by the trisomy of chromosome 16. It can occur by cases mosaics, non-mosaics and chromosome translocations. Among these, survival cases usually consist of mosaics or, for the most part, translocation products, thus making non-mosaic survival cases rare. This low survival rate of nonmosaic cases is associated with severe malformations, such as microcephaly, severe cardiac and renal changes, and intrauterine growth retardation. The knowledge of trisomy 22 in its various forms, as well as the causes of abortion, survival and the clinical and prognostic profile of the patients, is of great importance with regard to neonatal care and genetic counseling. The rapid confirmation of the diagnosis

is important for decision-making regarding medical and ethical behavior, along with the pregnant woman and / or the newborn and her family. The low survival of non-mosaic cases is still a challenge.

Keywords: Trisomy 22, Chromosome 22

INTRODUÇÃO

A definição de cromossomos corresponde à sequências de DNA que contêm diversos tipos de genes. Para se enquadrarem dentro do núcleo, as moléculas de DNA se unem ao nucleossomo, uma estrutura formada por oito unidades de uma proteína chamada histona. A cadeia DNA-nucleossomo constitui a cromatina, o arcabouço dos cromossomos (GRIFFITHS et al, 2001).

De acordo com a posição do centrômero, região central dos cromossomos, é possível classificar os mesmos em quatro tipos: 1) telocêntricos: aqueles que possuem o centrômero em um das extremidades, tendo apenas um braço; 2) acrocêntricos: os que possuem o centrômero bem próximo a uma das extremidades, formando um braço grande e outro muito pequeno; 3) submetacêntricos: são os cromossomos cujo centrômero é um pouco deslocado da região mediana, formando dois braços de tamanhos desiguais; 4) metacêntricos: cromossomos que possuem o centrômero no meio, formando dois braços de mesmo tamanho, uniformemente (NUSSBAUM, 2002).

A espécie humana, por ser diplóide, contém dois conjuntos de cromossomos completos, cada um proveniente de um progenitor. Cromossomos estes cujos pares são denominados “cromossomos homólogos”, pois estes têm sequências de DNA geralmente iguais, podendo exibir pequenas variações. A espécie humana possui 23 pares de cromossomos, sendo 22 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais. Os autossômicos são aqueles que determinam as características comuns à espécie. Já os cromossomos sexuais ou alossômicos são aqueles responsáveis pela determinação do sexo do indivíduo (OSORIO, 2013).

As anomalias cromossômicas surgem decorrentes a erros durante a segregação celular e podem ocorrer por alteração do número, do tamanho ou do ordenamento de partes dos cromossomos, gerando distúrbios genéticos (MORAES et al, 2005).

Os distúrbios genéticos decorrentes de modificações no número (alterações numéricas) ou na estrutura (alterações estruturais) dos cromossomos são denominados mutações cromossômicas e podem ser identificados pela análise do cariótipo (MORAES et al, 2005).

DESENVOLVIMENTO

Este estudo tem como objetivo revisar a trissomia do cromossomo 22 quanto às características genótípicas, clínicas, etiológicas e prognósticas.

O método utilizado para a pesquisa foi a revisão de literatura narrativa, realizada a partir de busca nos portais MedLine, Lilacs e SciELO, utilizando-se os descritores “Trisomy 22”,

“Chromosome 22”. A pesquisa não se limitou a um período determinado e englobou artigos presentes nestes bancos de dados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

AS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ESTRUTURAIS

As alterações cromossômicas estruturais relacionam-se às alterações no número ou no arranjo dos genes em um cromossomo. Estas tendem a ocorrer durante a meiose, quando as quebras cromossômicas ocorrem, ocasionando uma deposição de genes em posições erradas. Os cromossomos que sofrem estas quebras são instáveis durante a divisão celular devido ao fato de que as extremidades quebradas se ligam a outras em idênticas condições. As alterações cromossômicas estruturais podem ser de cinco tipos: deleção, translocação, inversão, isocromossomo (onde incluem-se as duplicações) e genes contíguos (microdeleções) (YOUNG, 2007).

A deleção é a falta de um pedaço de cromossomo, podendo originar um braço mais curto enquanto que a fração acêntrica (sem centrômero) perde-se (degenera), pois quando a célula divide-se eles não têm como prender-se às fibras do fuso. Como efeito clínico desta alteração pode-se citar que a falta de uma parte do cromossomo X ou sua ausência por inteiro pode determinar a síndrome de Turner (ANGIOLUCCI et al, 2010).

A translocação ocorre quando um cromossomo perde um pedaço para outro, ocorrendo um rearranjo estrutural. As translocações podem ocorrer entre cromossomos não homólogos ou entre cromossomos homólogos, e sua importância genético-clínica pode ser citada ao considerar-se algumas trissomias, como a do cromossomo 21, em que alguns casos ocorre não a trissomia simples, mas a translocação cromossomo 21 com o cromossomo 15 ou 14 (ANGIOLUCCI et al, 2010).

A inversão caracteriza-se como um processo pelo qual um cromossomo sofre duas quebras e o pedaço solto liga-se, após ficar invertido em um giro de 180 graus, aos locais quebrados do mesmo cromossomo. Neste caso, não há perda nem ganho de material. Contudo, a inversão prejudica o pareamento dos cromossomos homólogos na meiose e também nas manifestações das características pelos genes. Isso porque a sequência de genes ao longo dos cromossomos tem importância na manifestação normal das características do indivíduo (OSORIO, 2013).

A alteração cromossômica estrutural do tipo isocromossomo constitui-se um fenômeno decorrente da divisão transversal do centrômero do cromossomo, produzindo cromossomos anômalos, que possuem dois braços curtos (p) ou dois braços longos (q), separados entre si pelo centrômero, que foi septado horizontalmente. Esta condição caracteriza um evento de duplicação de uma das metades das cromátides e deleção da outra, de tal forma que o cromossomo formado é denominado de isocromossomo, pois tem ligado ao centrômero dois segmentos iguais (OSORIO, 2013).

Por fim, dentre as alterações cromossômicas estruturais temos os genes contíguos ou também denominados microdeleções. Ocorrem devido a microdeleções ou microduplicações, habitualmente menores que 5 milhões de pares de base (5 Mb) e muitas vezes só são

detectadas por meio de estudos de bandamento de alta resolução em prometáfases e técnicas citogenéticas avançadas (OSORIO, 2013).

AS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS NUMÉRICAS

As alterações cromossômicas numéricas originam-se pela união de gametas que portam número de cromossomos anormal, devido processo de divisão meiótica defeituosa.

As aneuploidias são caracterizadas pela falta ou presença de um ou mais cromossomos extras, no conjunto do cariótipo do indivíduo. As aneuploidias podem ser: monossomias, polissomias ou nulissomia. As mais frequentes são as monossomias e as trissomias (FRUHMANN et al, 2011).

Na espécie humana, a monossomia mais comum é a síndrome de Turner, onde os afetados são fenotipicamente femininos, com a falta de um cromossomo X (45X0). Esta ausência de um cromossomo sexual interfere diretamente no desenvolvimento gonadal e somático, de tal forma que os afetados apresentam baixa estatura, ovários rudimentares e infantilismo sexual (OSORIO, 2013).

Dentre as trissomias, as mais comuns são a trissomia do cromossomo 21, definida como Síndrome de Down, a trissomia do 18, Síndrome de Edward, a trissomia do 13, Síndrome de Patau, e a trissomia do cromossomo 22, que está entre as principais causas de aborto espontâneo no mundo (LADONNE, 1996).

A TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 22

A suspeita de trissomia do cromossomo 22 foi descrita pela primeira vez em 1961 por Turner e Jennings, quando identificaram um cromossomo "G" acrocêntrico adicional com várias anomalias, mas com características típicas da trissomia 21. Já em 1971, Hsu et al. em uma pesquisa confirmaram casos de trissomia 22 como translocações cromossômicas, com bandas G e Q (SOU et al, 1987).

A trissomia do cromossomo 22 refere-se à aneuploidia onde existem três cópias do cromossomo 22. É uma síndrome extremamente rara, com uma incidência estimada variando de 1 em 30.000 a 1 em 50.000 nascimentos. É causa comum de abortamentos espontâneos nos três primeiros meses de gravidez, sendo que em raros casos, houve gestação até o sexto mês. São raros também os casos de nascimento de bebês portadores da trissomia, que geralmente morrem antes do primeiro ano de vida. Pesquisas constataram ainda que a trissomia do 22 é a segunda trissomia autossômica mais comum em abortos espontâneos e geralmente menos que 1 de 30.000 fetos nascem vivos (HEINRICH et al, 2013).

A literatura científica da área revela que a trissomia do cromossomo 22 pode ocorrer por casos mosaicos, não-mosaicos e translocações cromossômicas. A maioria dos casos de trissomia 22 é de origem materna. Os casos de sobrevivência geralmente constituem-se de mosaicos ou, em sua maioria, produtos de translocações, tornando-se assim raros os casos de sobrevivência não-mosaicos, sendo até o momento relatado apenas cerca de 30 casos de sobrevivência desta trissomia livre, não mosaica no mundo (PONTES et al, 2015). Esta baixa sobrevivência de casos

não-mosaicos relaciona-se as más formações graves, como a microcefalia, alterações cardíacas e renais graves e retardo do crescimento intrauterino (HEINRICH et al, 2013).

Dentre os fatores relacionados à baixa sobrevida de casos de trissomia completa não mosaica do 22, está o fato de que os embriões/fetos produtos de abortamento geralmente apresentam saco vitelino aumentado, com acúmulo de líquido em seu interior, associação que sugere que os genes fundamentais para o desenvolvimento embrionário podem ser localizados no cromossomo 22, e sua sobre expressão pode determinar anormalidades potencialmente letais na circulação embrionária/fetal, tornando incompatível a vida do embrião/feto (LECLERCQ et al, 2010; ANGIOLUCCI et al, 2010).

Ainda em 1981, antes da era da citogenética molecular, Schinzel chegou a questionar se a trissomia completa não-mosaica do cromossomo 22 seria compatível com a sobrevivência intrauterina até o termo, uma vez que muitos casos publicados por naquele período poderiam representar trissomias parciais ou translocações cromossômicas. Desde então, o desenvolvimento de técnicas adicionais (FISH, array technologies) passou a demonstrar que a trissomia completa não-mosaica 22 pode ser compatível com a idade gestacional tardia, incluindo a sobrevivência até o nascimento e até mesmo além, mas em casos raros (HEINRICH et al, 2013). O que torna de grande relevância o estudo destes casos já publicados na literatura científica.

Estudos mostram que a sobrevivência de crianças nascidas vivas com trissomia não mosaica 22 é muito limitada, podendo variar de horas pós-parto a um máximo de 3 anos, como observado em 2 casos já relatados no mundo (KUKOLICH et al., 1989; RAO et al., 2003). Um estudo avaliou a sobrevivência média de 30 casos publicados no mundo, e concluiu que a sobrevida média é de 3,5 dias, sendo as principais causas de morte a insuficiência cardiorrespiratória e infecção (HEINRICH et al, 2013).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Atualmente, o fenótipo de crianças com trissomia 22 parece bem definido, conforme revisto por vários autores da literatura científica (GUZE et al, 2004; BACINO et al, 1995; CROWE et al, 1997; TINKLE et al, 2003). Contudo estas manifestações tendem a variar de acordo com o tipo de trissomia presente no cariótipo: trissomia total (não-mosaicos ou livre) e trissomia parcial (mosaicos ou, em sua maioria, produtos de translocações).

TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 22 TOTAL, LIVRE OU NÃO-MOSAICA

CARACTERÍSTICAS GERAIS DO CARIÓTIPO

Possui como cariótipo 47, XX ou XY +22. Corresponde a uma aneuploidia com a presença de um cromossomo 22 extra. Ocorre na mesma frequência entre os sexos masculino e feminino. É recorrente desenvolvimento embrionário e fetal com crescimento intrauterino retardado, baixo peso, alteração da translucência nugal e expectativa de vida reduzida, sendo raros os casos que ultrapassam o período de lactação (LADONNE et al, 1996; HALL et al 2007).

ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS

Quanto às manifestações neurológicas, em sua maioria, apresentam retardo mental variável (KUKOLICH et al, 1989; EMANUEL et al, 1976).

ALTERAÇÕES DE CABEÇA E PESCOÇO

Das alterações de cabeça, pode-se citar a microcefalia, hipertelorismo, pregas epicânticas frequentes, narinas antevertidas, ponte nasal plana, fissura palatina, micrognatia e orelhas dismórficas, angulosas, de baixa implantação, com apêndices pré-auriculares. Das alterações oculares, há registros de coloboma, podendo acometer além da íris, outras estruturas como coróide, nervo óptico e retina. Quanto às alterações de pescoço, geralmente o mesmo apresenta-se curto e com pregas de pele redundantes (BACINO et al, 1995; CROWE et al, 1997).

ALTERAÇÕES DE TRONCO

Estudos identificaram presença de cardiopatia congênita em 2/3 dos casos. Há registros ainda de casos com artéria umbilical única, deslocamento congênito de quadris e alterações anorretais e renais (HEINRICH et al, 2013). Outros estudos mostraram a ocorrência de problemas respiratórios, mamilos baixos (SOU et al, 1987) e estrabismo (PENCHAS-ZADEH e COCO 1975; EMANUEL et al., 1976).

ALTERAÇÕES DE MEMBROS

Foram identificados casos com mãos com polegares anormais (largos ou mal posicionados) e polidactilias (HEINRICH et al, 2013).

ALTERAÇÕES DERMATÓGLIFAS

Pode-se citar o excesso de verticilos e trirradio axial distal (OSORIO, 2013).

TRISSOMIA DO CROMOSSOMO 22 PARCIAL, MOSAICA OU PRODUTO DE TRANSLOCAÇÕES

CARACTERÍSTICAS GERAIS DO CARIÓTIPO

Possui como cariótipo 47, XX ou XY +22q. Corresponde a uma aneuploidia com a presença do braço curto extra de cromossomo 22. Ocorre com maior frequência no sexo feminino. O desenvolvimento embrionário e fetal tende a ser compatível com a vida, sendo comuns os casos de sobrevivência até a idade de jovem ou adulto (GUZE et al, 2004; SOU et al, 1987)

ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS

Quanto às manifestações neurológicas, pode ocorrer retardo mental leve a grave KUKOLICH et al, 1989; EMANUEL et al, 1976).

ALTERAÇÕES DE CABEÇA E PESCOÇO

Das alterações de cabeça, pode-se citar pregas epicânticas e fendas palpebrais antimongolóides, micrognatia, orelhas de baixa implantação, com sulcos e apêndices préauriculares, e casos frequentes de surdez. Das alterações oculares, há registros frequentes de coloboma de íris. Devido esta frequente alteração, a trissomia mosaica é frequentemente denominada “Síndrome do Olho do Gato”, uma vez que com a alteração da íris e de outras estruturas oculares há uma semelhança quando se observa o olho do indivíduo. Quanto às alterações de pescoço, não há particularidades (TINKLE et al, 2003; HEINRICH et al, 2013).

ALTERAÇÕES DE TRONCO

Assim como no quadro de trissomia não mosaica, a trissomia parcial ou mosaica também ocasiona cardiopatia congênita, porém em menor incidência, em cerca de 50% dos casos, com defeitos complexos em grandes vasos sanguíneos. Há também relatos de alterações no retorno venoso pulmonar, comprometendo a função respiratória. Além disso, mantêm-se relatos de atresia anal, aplasia renal e deslocamento congênito de quadris (HEINRICH et al, 2013; SOU et al, 1987).

ALTERAÇÕES DE MEMBROS

Pode-se citar também, de igual forma, casos com mãos com polegares mal posicionados (OSORIO, 2013).

ALTERAÇÕES DERMATÓGLIFAS

Não identificadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudar a citogenética de eventos raros relacionados às alterações cromossômicas é de extrema relevância social e científica, além de ser fundamental para a saúde pública, uma vez que estes estudos dão suporte a diversas ações estratégicas para o enfrentamento das questões relacionadas à perda gestacional e à compreensão de eventos adversos relacionados ao nascimento, crescimento e desenvolvimento de crianças com anomalias.

O conhecimento da trissomia 22 em suas variadas formas, bem como das causas de aborto, sobrevida e do quadro clínico e prognóstico dos pacientes tem grande importância no que diz respeito aos cuidados neonatais e aos aconselhamentos genéticos, porque apesar de ser uma síndrome rara, tem grandes implicações relacionadas à sua gravidade. A rapidez na

confirmação do diagnóstico é importante para a tomada de decisões referentes às condutas médicas e éticas, junto a gestante e/ou recém-nascido e sua família. A baixa sobrevida de casos não-mosaicos ainda mostra-se um desafio.

REFERÊNCIAS

ANGIOLUCCI, M. et al. Association between different morphological types and abnormal karyotypes in early pregnancy loss. *Ultrasound Obstet Gynecol.* Feb; 37(2):219-25. Epub. 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20503243> >. Acesso em 10 jan 2017.

BACINO, C.A. et al. Clinical and molecular studies in full trisomy 22: further delineation of the phenotype and review of the literature. *Am J Med Genet.* 1995; 56:359–365. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7604844> >. Acesso em 10 jan 2017.

CROWE C.A. et al. Mosaic trisomy 22: A case presentation and literature review of trisomy 22 phenotypes. *Am J Med Gen.* 71: 406-413. 1997. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9286446> > . Acesso em 20 jan 2017.

EMANUEL, B.S. et al . Abnormal chromosome 22 and recurrence of trisomy-22 syndrome. *J. med. Genet.*, 13, 501-506. (1976). Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1013477/> >. Acesso em: 05 dez 2016.

FRUHMANN, G. et al. Suspected trisomy 22: modification, clarification, or confirmation of the diagnosis by aCGH. *Am J Med Genet* 155: 434–438, 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21271668> >. Acesso em 15 jan 2017.

GRIFFITHS, A.J.F et al. *Genética moderna*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GUZE, C. et al. Isochromosome 22 in trisomy 22 mosaic with five cell lines. *Am J Med Genet A.* 2004; 124:79–84. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679591> >. Acesso em 10 jan 2017.

HALL, H.E. et al. The origin of trisomy 22: evidence for acrocentric chromosome-specific patterns of nondisjunction. *Am J Med Genet* 143A:2249–2255, 2007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705154> >. Acesso em 15 jan 2017.

HEINRICH, T et al. Live-Born Trisomy 22: Patient Report and Review. *Mol Syndromol.* 2013 Jan; 3(6): 262–269. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569106/> >. Acesso em 05 nov 2016.

KUKOLICH, M.K. et al. Trisomy 22: no longer an enigma. *Am J Med Genet.* 1989;34:541– 544. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2624265> > . Acesso em 15 jan 2017.

LADONNE, J.M. et al. Syndrome phenotype and trisomy 22. *Am J Med Genet,* 61: 68- 70. 1996. Disponível em: < [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)10968628\(19960102\)61:1%3C68::AID-AJMG13%3E3.0.CO;2-U/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)10968628(19960102)61:1%3C68::AID-AJMG13%3E3.0.CO;2-U/full) >. Acesso em 15 jan 2017.

LECLERCQ, S. et al. Mosaic trisomy 22: five new cases with variable outcomes. Implications for genetic counselling and clinical management. *Prenat Diagn* 30: 168–172, 2010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20020488> >. Acesso em 15 jan 2017.

MORAES, A.C. et al. Abordagem citogenética e molecular em material de abortos espontâneos. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005; 27(9): 554-60. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbgo/v27n9/27566.pdf> > Acesso em: 05 nov 2016.

NUSSBAUM, R.L. Thompson & Thompson Genética Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

OSORIO, M.R.B. Genética Humana. 3 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2013.

PENCHASZADEH, V.B.; COCO, R. Trisomy 22. Two new cases and delineation of the phenotype. J. med. Genet., 12, 193-199. (1975). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/49427> >. Acesso em: 05 dez 2016.

PONTES, S.E. et al. Relato de caso: trissomia do cromossomo 22 não mosaico em recém nascido. Anais. Ribeirão Preto: SBGM, 2015. Disponível em:< http://www.oxfordeventos.com.br/geneticamedica/admin/trabalhosPDF/GM_P_CI_015.pdf >. Acesso em: 05 jan 2017.

RAO, V.B. et al. Trisomy 22 with unusual phenotype. Indian Pediatr. 2003; 40:371– 372. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12736417> >. Acesso em 10 jan 2017.

SOU, S. et al. Prenatal Diagnosis of Partial Trisomy 22 Derived from a Maternal t(11; 22) (q23; q 11). Tohoku J. exp. Med., 1987. n 153, 389-393. Disponível em:< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3441929> >. Acesso em: 10 dez 2016.