

PERFIS DE EXPRESSÃO MONOALÉLICA EM GENES CANDIDATOS
AO *IMPRINTING* GENÔMICO NO CROMOSSOMO 21 E ALTERAÇÕES
EPIGENÉTICAS NA SÍNDROME DE DOWN

ANTONIO FRANCISCO ALVES DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO DE 2016

PERFIS DE EXPRESSÃO MONOALÉLICA EM GENES CANDIDATOS
AO *IMPRINTING* GENÔMICO NO CROMOSSOMO 21 E ALTERAÇÕES
EPIGENÉTICAS NA SÍNDROME DE DOWN

ANTONIO FRANCISCO ALVES DA SILVA

Tese apresentada ao Centro de Biociências
e Biotecnologia – CBB, da Universidade
Estadual do Norte Fluminense, como parte
das exigências para obtenção do título de
Doutor em Biociências e Biotecnologia.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO DE 2016

PERFIS DE EXPRESSÃO MONOALÉLICA EM GENES CANDIDATOS
AO *IMPRINTING* GENÔMICO NO CROMOSSOMO 21 E ALTERAÇÕES
EPIGENÉTICAS NA SÍNDROME DE DOWN

ANTONIO FRANCISCO ALVES DA SILVA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia – CBB, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 28 de janeiro de 2016.

Comissão Examinadora:

Dra. Cláudia Caixeta Franco Andrade (Doutora em Genética) – USP/FMRP

Dra. Regina Célia de Souza Campos Fernandes (Doutora em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – FMC

Dra. Clícia Grativol Gaspar (Doutora em Química Biológica) – UENF.

Dr. Filipe Brum Machado (Doutor em Genética) – UENF.
(Coorientador)

Dr. Enrique Medina-Acosta (Doutor em parasitologia Médica e Molecular) – UENF.
(Orientador)

DEDICATÓRIA

...A Deus, pela sua presença e cuidado constante, por toda paz que excede todo o entendimento...

...A toda minha família por estar sempre presente em minha vida, e por toda torcida e compreensão ao longo desses anos...

...Ao meu sobrinho Isaque, a criança mais bonita que já conheci, que em sua breve passagem por nossa família revelou a verdadeira essência do amor, *que tudo crê, tudo espera, tudo suporta*. Na esperança de que, *ao fechar meus olhos um dia nesse mundo*, estaremos novamente todos reunidos diante daquele que nos amou primeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta**, que ao longo destes onze anos de convivência, mais do que um orientador se tornou um grande amigo. Agradeço por todo tempo dispensado ao meu crescimento científico e formação profissional.

Ao **Dr. Filipe Brum Machado**, por toda amizade, por todo incentivo, e pela colaboração e coorientação, que foram fundamentais para a finalização deste trabalho.

À **Dra. Beatriz dos Santos Ferreira**, por toda amizade, e pela colaboração efetiva na revisão deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios**, pela colaboração e sugestões para a finalização deste trabalho.

As colaboradoras da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP: **Profa. Dra. Érika Cristina Pavarino, Dra. Joice Matos Biselli Périco e Bruna Lancia Zampieri** pela sólida colaboração ao longo destes anos, com o envio de amostras controles.

As colaboradoras do Departamento de Anatomia e Embriologia (Leiden University, Holanda): **Profa. Dra. Susana Marina Chuva de Sousa Lopes e Dra. Maria Gomes Fernandes** por toda colaboração no envio de amostras controles.

À **Profa. Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças**, vice-coordenadora do Departamento de Biociências e Genética da Universidade Estadual do Rio de Janeiro – UERJ, pela efetiva colaboração no envio de amostras controle.

As Professoras **Dra. Regina Célia de Souza Campos Fernandes, Dra. Cláudia Caixeta Franco Andrade e Dra. Clicia Grativol Gaspar**, por aceitarem prontamente o convite para a participação como membros titulares para a banca de defesa desta tese, e por todas as sugestões e correções que foram essenciais para a finalização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica: **Ronaldo da Silva Francisco Junior, Pedro Thyago Mozer Rodrigues e Douglas Terra Machado**, pela colaboração efetiva nas análises dos experimentos *in silico*, fundamentais para a finalização deste trabalho e produção do manuscrito. Em especial ao amigo **Ronaldo da Silva Francisco Junior (Dr. Juninho)**, pelas longas discussões sobre ciência e projetos futuros, pelas “ótimas” ideias sobre empreendedorismo que eu nunca comprei, por toda amizade, companheirismo e espírito de equipe.

A toda família NUDIM. Em especial a **Maria Emilce da Rosa Francelino e Thaís Louvain de Souza**, pela amizade, cuidado, e todo suporte dado ao laboratório durante o meu afastamento, que foram fundamentais na fase final deste trabalho.

Aos amigos: **Hazel Nunes Barboza, Fabrício Moreira Almeida, Giliane da Silva de Souza, David Gitirana da Rocha, Renan Modesto Monteiro, Cristina dos Santos Ferreira, Monique Camila da Silva, Tatiana Cristina Pereira Dutra, Thatiana Lopes Biá Ventura, Eduardo Pinheiro Amaral, Igor Santiago de Carvalho, Thiago Barbosa de Souza, Graziela Araújo de Sá Machado, Luísa Mignone Paixão, Juliana Ywasaki, Cinthya Neves, Viviane Lamim Lovatel** pelo convívio, companheirismo, e aprendizado mútuo ao longo desses anos. Em especial a amiga **Katrine da Silva Leonardo**, por toda amizade, companheirismo, pelas aventuras, pelo estranho “dom” de complicar o simples e simplificar o complicado, mas se fazendo presente em todos os momentos.

A todo o **corpo docente da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF**, que direta ou indiretamente participaram efetivamente da minha formação acadêmica.

À **Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF**, em particular ao **Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia**, pela oportunidade concedida.

À **FAPERJ, CNPq e Fundação Benedito Pereira Nunes**, por todo auxílio técnico e financeiro.

RESUMO

O padrão monoalélico de expressão é característico de genes sensíveis à dosagem. Em humanos, aproximadamente 10% dos genes autossômicos exibem expressão monoalélica. Porém, em parte desses genes a expressão monoalélica não é aleatória. O padrão de expressão ocorre por silenciamento alélico parental-específico ou *imprinting* genômico. A metilação do DNA no contexto CpG é uma das marcas epigenéticas de silenciamento. A expressão monoalélica e alterações epigenéticas devem impactar o fenótipo de aneuploidias como a trissomia 21, base genética para a síndrome de Down (SD), explicando em parte a heterogeneidade fenotípica observada na síndrome. Visando contribuir para a maior compreensão das variações interindividuais na SD, neste trabalho investigamos o padrão de expressão em 10 genes candidatos ao *imprinting* no cromossomo 21: *KRTAP6-2*, *OLIG2*, *SIM2*, *WRB*, *IGSF5*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B*. Adicionalmente, perfis de metilação foram determinados para quatro regiões diferencialmente metiladas (DMRs) candidatas a regiões controladoras de *imprinting*: *TMEM131-DMR*, *MAP3K7CL-cDMR*, *RUNX1-DMR* e *WRB-DMR*. O padrão de expressão dos genes alvos foi determinado por minissequenciamento de 18 SNPs exônicos pela técnica SNUPE multiplex (*Single Nucleotide Primer Extension*) em amostras pareadas DNA/cDNA de células mononucleares de sangue periférico isoladas de indivíduos dissômicos e cinco linhagens embrionárias (HUES-1, HES3, HUES-5, HUES-7 e HUES-15). Para todos os polimorfismos analisados o perfil transcricional foi sugestivo de expressão bialélica, mas não para todos os indivíduos e linhagens embrionárias avaliadas. Perfis transcricionais sugestivos de expressão monoalélica para os genes *OLIG2*, *IGSF5*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B*; e *ADARB1* e *COL6A1*, foram observados em células mononucleares e linhagens embrionárias, respectivamente. O perfil transcricional bialélico observado afasta a predição de *imprinting* para todos os genes candidatos, e pode ser interpretado como um resultado de expressão bialélica constitutiva, como observada para os genes *KRTAP6-2*, *SIM2* e *WRB*, ou resultado da expressão monoalélica aleatória em diferentes linhagens celulares e/ou na mesma linhagem celular por um processo de regulação dinâmico, como o observado para os demais genes. Os perfis de metilação nas DMRs *TMEM131-DMR*, *MAP3K7CL-cDMR*, *RUNX1-DMR* e *WRB-DMR* foram determinados através de ensaios de DESM-QFPCR em uma coorte composta por 15 indivíduos com trissomia materna, seis com trissomia paterna e 12

indivíduos dissômicos. Com exceção da *MAP3K7CL*, que exibiu um estado estável de hemimetilação ($\%_{me}= 0,498$), nos três grupos avaliados, perfis de metilação diferencial, como efeito da cópia extra do cromossomo 21, foram observados na *TMEM131-DMR*, *RUNX1-DMR* e *WRB-DMR*. A *TMEM131-DMR* exibiu um perfil de hemimetilação ($\%_{me}=0,407$) em indivíduos trissômicos, sem diferenças significativas em relação à origem parental da trissomia, e hipermetilação ($\%_{me}=0,858$) em indivíduos dissômicos. Um perfil inverso foi observado na *RUNX1-DMR*, que exibiu um perfil hipermetilado ($\%_{me}=0,729$) em indivíduos trissômicos, independentemente da origem parental, e hipometilado ($\%_{me}=0,262$) em indivíduos dissômicos. Para a *WRB-DMR* um perfil de hemimetilação foi observado em indivíduos dissômicos ($\%_{me}= 0,446$), em contrapartida, metilação diferencial dependente da origem parental foi observada entre os indivíduos trissômicos. Estados contrastantes de hipometilação ($\%_{me}= 0,335$) e hipermetilação ($\%_{me}= 0,684$) foram determinados para os indivíduos com trissomias paterna e materna, respectivamente. A metilação alelo-específico sob *imprinting* materno derivada na *WRB-DMR* foi confirmada através da genotipagem do polimorfismo rs2244352 por duas técnicas associadas SNUPE e DESM-PCR. O estudo de *imprinting* é desafiador dado à complexidade deste fenômeno. Particularidades sobre a expressão monoalélica em genes sob *imprinting* são reconhecidas e englobam desde a expressão monoalélica restrita a um determinado transcrito entre uma série de variantes, a tecidos-específicos ou estágios do desenvolvimento. Contudo, a *WRB-DMR* pode ser a porta de entrada para uma maior compreensão do complexo universo de genes com expressão monoalélica no cromossomo 21, e sua participação na heterogeneidade fenotípica apresentada na SD.

Palavras-chave: DMR, *imprinting*, trissomia 21, *TMEM131*, *MAP3K7CL*, *KRTAP6-2*, *OLIG2*, *SIM2*, *RUNX1*, *WRB*, *IGSF5*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A*, *S100B*.

ABSTRACT

A monoallelic pattern of expression is characteristic of dosage-sensitive genes. In humans, approximately 10% of the genes located in autosomes exhibit monoallelic expression. However, for a proportion of those genes the monoallelic expression is not stochastic. The pattern of expression occurs by silencing of alleles in a parent-of-origin specific manner through genomic imprinting. DNA methylation in the context of the dinucleotide CpG sequence is one of the epigenetic marks involved in the expression silencing of imprinted genes. A monoallelic expression pattern and epigenetic alterations can affect the phenotypes in aneuploidies such as trisomy 21, the genetic basis of Down syndrome (DS), explaining in part the phenotypic heterogeneity observed in the syndrome. Aiming at contributing to the comprehension of the variation among individuals with DS, we investigated the pattern of expression of ten genes that are candidate imprinted genes on chromosome 21: *KRTAP6-2*, *OLIG2*, *SIM2*, *WRB*, *IGSF5*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B*. Furthermore, the profiles of methylation were determined for four differentially methylated regions (DMRs), thought to function as imprinting control regions: *TMEM131-DMR*, *MAP3K7CL-cDMR*, *RUNX1-DMR* e *WRB-DMR*. The allelic pattern of expression of the target genes was determined by *Single Nucleotide Primer Extension* (SNuPE) multiplex sequencing at 18 exonic SNPs in DNA/cDNA paired samples from peripheral mononuclear blood cells from disomic individuals and five established human embryonic stem cell lines (HUES-1, HES3, HUES-5, HUES-7 e HUES-15). For all the SNPs interrogated, the transcriptional profile was indicative of biallelic expression, but not in every sample tested. Transcriptional profiles suggestive of monoallelic expression were observed in blood cells for the *OLIG2*, *IGSF5*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B* genes. In embryonic cell lines, only the *ADARB1* and *COL6A1* genes exhibited a pattern consistent with monoallelic expression. Overall, the observed biallelic profile of transcription rules the prediction of genomic imprinting of the target genes in the samples tested. The observed variation in the pattern of expression may reflect the constitutive biallelic expression (*KRTAP6-2*, *SIM2* e *WRB*) or the stochastic monoallelic expression in different cell lines or even in the same cell line through a dynamic regulatory process (*OLIG2*, *IGSF5*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A*, *S100B*, *ADARB1*). The methylation profiles at the *TMEM131-DMR*, *MAP3K7CL-cDMR*, *RUNX1-DMR* and *WRB-DMR* were determined using methylation-sensitive restriction

enzyme-based PCR (MSRE-PCR) assays in samples from 15 individuals with maternal trisomy 21, six with paternal trisomy 21 and 12 normal disomic individuals. Except for the *MAP3K7CL-cDMR*, which exhibited a constant hemimethylated state ($\%_{me}= 0.498$) in the groups of samples, we observed profiles of differential methylation with the effect of the extra copy of the chromosome 21 at the *TMEM131-DMR*, *RUNX1-DMR* e *WRB-DMR*. The *MEM131-DMR* exhibited a hemimethylated profile ($\%_{me}=0.407$) in trisomic samples, with no significant differences about the parental origin of the trisomy. In contrast, in disomic samples, this DMR was hypermethylated ($\%_{me}=0.858$). A reverse profile of methylation was observed at the *RUNX1-DMR*: hypermethylated ($\%_{me}=0.729$) in trisomic samples regardless of the parental origin of the extra copy of chromosome 21 *versus* hypomethylated ($\%_{me}=0.262$) in disomic samples. For the *WRB-DMR*, while a hemimethylated state was observed in disomic samples ($\%_{me}= 0.446$), in trisomic samples the methylation status were differential depending on the parental origin of the trisomy. In paternal trisomy 21 the *WRB-DMR* was hypomethylated ($\%_{me}= 0.335$) *versus* hypermethylated in maternal trisomy 21 ($\%_{me}= 0.684$). Allele-specific methylation at the maternally imprinted *WRB-DMR* was confirmed by interrogating the neighboring SNP through SNUPE and MSRE-PCR. The study of genomic imprinting is a challenge due to the complexity of the underlining phenomenon and known singularities of the mechanisms of monoallelic expression of imprinted genes, which range from monoallelic expression restricted to a transcript isoform to tissue-specific or developmental stage specific expression. However, the recognition of the imprinted marks at the *WRB-DMR* can be the primary way to comprehend the genes located on the chromosome 21 that exhibit patterns of monoallelic expression and their association with the phenotypic heterogeneity observed in DS.

Keywords: *ADARB1*, *COL6A1*, *DIP2A*, DMR, *IGSF5*, imprinting, *KRTAP6-2*, *MAP3K7CL*, *MCM3AP*, *OLIG2*, *RUNX1*, *SIM2*, *S100B*, *TMEM131*, trisomy 21, *WRB*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visualização das marcas epigenéticas do gene <i>KRTAP6-2</i>	50
Figura 2. Visualização das marcas epigenéticas do gene <i>OLIG2</i>	51
Figura 3. Visualização das marcas epigenéticas do gene <i>SIM2</i>	52
Figura 4. Visualização das marcas epigenéticas do gene <i>IGSF5</i>	53
Figura 5. Visualização das marcas epigenéticas do gene <i>ADARB1</i>	54
Figura 6. Visualização das marcas epigenéticas do gene <i>COL6A1</i>	55
Figura 7. Visualização das marcas epigenéticas do gene <i>MCM3AP</i>	56
Figura 8. Visualização das marcas epigenéticas do gene <i>DIP2A</i>	57
Figura 9. Visualização das marcas epigenéticas do gene <i>S100B</i>	58
Figura 10. Ensaio 1 SNUPE Multiplex.	61
Figura 11. Ensaio 2 SNUPE Multiplex.	62
Figura 12. Ensaio 3 SNUPE Multiplex.	62
Figura 13. Perfil Transcricional alélico determinado para o gene <i>KRTAP6-2</i>	66
Figura 14. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>OLIG2</i>	66
Figura 15. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>OLIG2</i>	67
Figura 16. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>SIM2</i>	67
Figura 17. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>IGSF5</i>	68
Figura 18. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>IGSF5</i>	68
Figura 19. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>ADARB1</i>	69
Figura 20. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>COL6A1</i>	69
Figura 21. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>COL6A1</i>	70
Figura 22. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>MCM3AP</i>	70
Figura 23. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>MCM3AP</i>	71
Figura 24. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>DIP2A</i>	71
Figura 25. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>DIP2A</i>	72
Figura 26. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>S100B</i>	72
Figura 27. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>S100B</i>	73
Figura 28. Perfil alélico determinado para os genes <i>H19</i> , <i>ATP10A</i> , e <i>XACT</i>	74
Figura 29. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>KRTAP6-2</i>	76
Figura 30. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>KRTAP6-2</i>	76
Figura 31. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>SIM2</i>	77
Figura 32. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>IGSF5</i>	77
Figura 33. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>ADARB1</i>	78

Figura 34. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>ADARB1</i>	78
Figura 35. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>COL6A1</i>	79
Figura 36. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>COL6A1</i>	79
Figura 37. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>MCM3AP</i>	80
Figura 38. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>DIP2A</i>	80
Figura 39. Perfil Transcricional Alélico determinado para o gene <i>S100B</i>	81
Figura 40. Mapa físico do gene <i>WRB</i> na região 21q22.2 expandido 40Kb.....	85
Figura 41. Mapa físico do gene <i>MAP3K7CL</i> na região 21q21.3 expandido 40Kb.....	86
Figura 42. Perfil de metilação na <i>WRB-DMR</i> em trissomia materna	92
Figura 43. Perfil de metilação na <i>WRB-DMR</i> em trissomia paterna	93
Figura 44. Perfil de metilação na <i>WRB-DMR</i> em dissomia.....	94
Figura 45. Perfil de metilação na <i>WRB-DMR</i> em MHC.	95
Figura 46. Perfil de metilação na <i>WRB-DMR</i> na linhagem HES3.....	96
Figura 47. Metilação alelo-específico na <i>WRB-DMR</i>	99
Figura 48. Perfil de metilação na <i>MAP3K7CL cDMR-4pr</i> em dissomia	102
Figura 49. Perfil de metilação na <i>MAP3K7CL cDMR-4pr</i> em trissomia 21 materna	103
Figura 50. Perfil de metilação na <i>MAP3K7CL cDMR-4pr</i> em trissomia 21 paterna	104
Figura 51. Padrão de metilação alélica na <i>MAP3K7CL cDMR-4</i>	105
Figura 52. Perfil de metilação na <i>MAP3K7CL cDMR4ex</i> em dissomia	108
Figura 53. Perfil de metilação na <i>MAP3K7CL cDMR4ex</i> em trissomia 21 materna	109
Figura 54. Perfil de metilação na <i>MAP3K7CL cDMR4ex</i> em trissomia 21 paterna.	110
Figura 55. Perfil de metilação na <i>TMEM131-DMR</i> em dissomia	114
Figura 56. Perfil de metilação na <i>TMEM131-DMR</i> em trissomia 21 materna	115
Figura 57. Perfil de metilação na <i>TMEM131-DMR</i> em trissomia 21 paterna	116
Figura 58. Padrão de metilação alélica na <i>TMEM131-DMR</i>	117
Figura 59. Perfil de na <i>RUNX1-DMR</i> em dissomia.	120
Figura 60. Perfil de metilação na <i>RUNX1-DMR</i> em trissomia 21 materna.....	121
Figura 61. Padrão de metilação alélica na <i>RUNX1-DMR</i>	122
Figura 62. Perfil transcricional do gene <i>WRB</i> no núcleo familiar 1104	124
Figura 63. Perfil transcricional do gene <i>WRB</i> n o núcleo familiar 902	125
Figura 64. Perfil Transcricional Alélico para o polimorfismo <i>WRB</i> rs1060180	126
Figura 65. Perfil transcricional para o gene <i>WRB</i> na linhagem HUES-1	127
Figura 66. Perfil transcricional para o gene <i>WRB</i> nas linhagens HES3, HUES-5, HUES-7 e HUES-15.....	128

Figura 67. Análise computacional comparada dos padrões de histonas modificadas e perfis de metilação nos genes <i>MEST</i> e <i>WRB</i>	138
---	-----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Percentual de metilação no loco <i>WRB-DMR</i>	91
Gráfico 2. Percentual de metilação no loco <i>WRB-DMR</i>	97
Gráfico 3. Percentual de metilação do loco <i>MAP3K7CL cDMR-4pr</i>	101
Gráfico 4. Percentual de metilação do loco <i>MAP3K7CL cDMR-4ex</i>	107
Gráfico 5. Percentual de metilação no loco <i>TMEM131-DMR</i>	113
Gráfico 6. Percentual de metilação no loco <i>RUNX1-DMR</i>	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos SNPs exônicos selecionados nos genes alvos.....	59
Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas de 18 polimorfismos alvos.	63
Tabela 3. Perfil transcricional alélico determinado para os 18 polimorfismos alvos em sete amostras pertencentes ao biorrepositório NUDIM.	65
Tabela 4. Perfil transcricional alélico determinado para os 18 polimorfismos alvos em cinco linhagens de células-tronco embrionárias.	75
Tabela 5. Identificação de cDMRs no cromossomo 21.....	83
Tabela 6. Caracterização das cDMRs identificadas no cromossomo 21.	84
Tabela 7. Origem parental da cópia extra do cromossomo 21 na coorte de estudo.	88
Tabela 8. Dados das replicatas das amostras de DNA de leucócitos de indivíduos com trissomia 21 materna.	89
Tabela 9. Dados das replicatas das amostras de DNA de leucócitos de indivíduos com trissomia 21 paterna.	90
Tabela 10. Perfil de metilação das amostras de DNA de leucócitos e epitélio bucal em indivíduos controles.	90
Tabela 11. Estado de metilação do fragmento <i>255_MAPK7CL cDMR-4pr</i> em amostra de DNA de indivíduos trissômicos.	100
Tabela 12. Estado de metilação do fragmento <i>255_MAPK7CL cDMR-4pr</i> em amostra de DNA de indivíduos dissômicos.	101
Tabela 13. Estado de metilação do fragmento <i>253_MAPK7CL cDMR-4ex</i> em amostra de DNA de indivíduos trissômicos.	106
Tabela 14. Estado de metilação do fragmento <i>253_MAPK7CL cDMR-4ex</i> em amostra de DNA de indivíduos dissômicos.	106
Tabela 15. Percentual de metilação do fragmento <i>253_TMEN131-DMR</i>	112
Tabela 16. Percentual de metilação do fragmento <i>253_RUNX1-DMR</i>	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADARB1	<i>adenosine deaminase, RNA-specific, B1</i>
ATP10A	<i>ATPase, class V, type 10A</i>
CDKN1C	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>
COL6A1	<i>collagen, type VI, alpha 1</i>
CpG	<i>citossina-fosfato-guanina</i>
CTCF	<i>fator de ligação CCCTC</i>
DESM-QFPCR	<i>digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa por fluorescência</i>
DIP2A	<i>disco interacting protein 2 homolog A</i>
DMR	<i>differentially methylated region</i>
DSCR	<i>Down syndrome critical region</i>
ICR	<i>imprinting control region</i>
IGF2	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IGSF5	<i>immunoglobulin superfamily, member 5</i>
KCNQ1	<i>potassium channel, voltage-gated, kqt-like subfamily, member 1</i>
KCNQ1OT1	<i>KCNQ1-overlapping transcript 1</i>
KRTAP6-2	<i>keratin associated protein 6-2</i>
MAP3K7CL	<i>MAP3K7 C-terminal like</i>
MCM3AP	<i>minichromosome maintenance complex component 3 associated protein</i>
MgCl₂	<i>cloreto de magnésio</i>
MHC	<i>mola hidatiforme completa</i>
OLIG2	<i>oligodendrocyte lineage transcription factor 2</i>
OMIM	<i>online mendelian inheritance in man</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RUNX1	<i>runt-related transcription factor 1</i>
S100B	<i>S100 calcium binding protein B</i>
SIM2	<i>single-minded family bHLH transcription factor 2</i>
SNuPE	<i>Single Nucleotide Primer Extension</i>
TMEM131	<i>transmembrane protein 131</i>
WRB	<i>tryptophan rich basic protein</i>

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Expressão Monoalélica em mamíferos	11
2.2	Marcas epigenéticas de repressão alélica	12
2.2.1	Metilação do DNA	13
2.2.2	Modificações pós traducionais em proteínas histonas.....	15
2.3	Expressão monoalélica randômica	17
2.4	Expressão monoalélica randômica ligada ao X	18
2.5	Expressão monoalélica sob <i>Imprinting</i> genômico	22
2.5.1	Regiões diferencialmente metiladas e <i>Imprinting</i> genômico	26
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS	32
4.1	Objetivo Geral	32
4.2	Objetivos Específicos	32
5	MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1	Aspectos éticos	33
5.2	Amostras biológicas	33
5.3	Determinação da origem parental da trissomia 21	34
5.3.1	QF-PCR multiplex	34
5.4	Identificação de polimorfismos SNPs nos genes alvos	35
5.5	Desenho e síntese de iniciadores.....	35
5.6	Isolamento de gDNA e RNA.....	36
5.7	Determinação do perfil alélico e transcricional nos genes alvos	36
5.7.1	PCR multiplex	36
5.7.2	RT-PCR	37
5.7.3	SNuPE multiplex	38
5.8	Identificação de regiões diferencialmente metiladas no cromossomo 21	39
5.8.1	Análise <i>in silico</i>	39
5.9	Determinação do estado de metilação pontual na <i>WRB-DMR</i> , <i>MAP3K7CL-cDMR</i> , <i>TMEM131-DMR</i> e <i>RUNX1-DMR</i>	39
5.9.1	DESM-QFPCR.....	40
5.9.1.1	DESM-QFPCR para o fragmento <i>254_WRB-DMR</i>	40
5.9.1.2	DESM-QFPCR para o fragmento <i>255_MAP3K7CL-cDMR</i>	41
5.9.1.3	DESM-QFPCR para o fragmento <i>253_MAP3K7CL-cDMR</i>	41
5.9.1.4	DESM-QFPCR para o fragmento <i>253_TMEM131-DMR</i>	42
5.9.1.5	DESM-QFPCR para o fragmento <i>253_RUNX1-DMR</i>	43
5.9.2	Análise Estatística.....	43

5.10	Determinação do estado de metilação alélica na <i>WRB-DMR</i> , <i>MAP3K7CL-cDMR</i> , <i>TMEM131-DMR</i> e <i>RUNX1-DMR</i>	44
5.10.1	DESM-PCR e SNUPE na <i>WRB-DMR</i>	44
5.10.2	DESM-PCR e SNUPE na <i>MAP3K7CL-DMR</i>	45
5.10.3	DESM-PCR e SNUPE na <i>TMEM131-DMR</i>	46
5.10.4	DESM-PCR e SNUPE na <i>RUNX1-DMR</i>	47
6.	RESULTADOS	49
6.1	Caracterização de marcas epigenéticas nos genes alvos.	49
6.2	Seleção de SNPs exônicos para a determinação do perfil transcricional dos genes alvos.....	59
6.3	Painel de iniciadores para a determinação do perfil transcricional dos genes alvos	60
6.4	Ensaio SNUPE Multiplex e dados populacionais.....	61
6.5	Determinação do perfil transcricional alélico em células mononucleares do sangue periférico	64
6.6	Determinação do perfil transcricional alélico em células-tronco embrionárias	74
6.7	Identificação de sequências de DNA candidatas a regiões diferencialmente metiladas (cDMRs) no cromossomo 21.....	82
6.8	Validação dos ensaios DESM-QFPCR para a determinação dos perfis de metilação nas regiões <i>WRB-DMR</i> e <i>MAP3K7CL cDMR-4</i>	87
6.9	Investigação da influência da origem parental da cópia extra do cromossomo 21 no estado de metilação dos locos <i>TMEM131</i> e <i>RUNX1</i>	111
6.10	Investigação do perfil transcricional do gene <i>WRB</i>	123
7.	DISCUSSÃO	129
8.	CONCLUSÕES	141
9.	APÊNDICE A.....	143
10.	REFERÊNCIAS.....	149

1. INTRODUÇÃO

O padrão de expressão monoalélica é característico de genes sensíveis à dosagem. Em humanos, aproximadamente 10% dos genes autossômicos exibem este padrão de expressão (Gimelbrant *et al.*, 2007). Dentro deste repertório gênico a expressão monoalélica é constitutiva e pode ocorrer de maneira dependente ou independente da origem parental.

Em autossomos, a expressão monoalélica sob um modelo determinístico ocorre por silenciamento alélico parental-específico dentro de um mecanismo epigenético denominado *imprinting* genômico (Reik, 2001). Contudo, um modelo estocástico, ainda pouco explorado, denominado expressão monoalélica randômica está mais difundido no genoma humano. A metilação do DNA no contexto CpG e modificações pós-traducionais em proteínas histonas são marcas epigenéticas com papel chave na regulação destes modelos de expressão (Ciccone e Chen, 2009; Ciccone *et al.*, 2009; Henckel *et al.*, 2009; Court *et al.*, 2014; Reinius e Sandberg, 2015).

Embora, modelos de expressão monoalélica, sejam eles determinístico ou aleatório, possam promover uma maior diversidade a nível celular e, potencialmente, maior robustez de um organismo como um todo, este padrão de expressão leva a perda do benefício adquirido pela expressão bialélica em genomas diploides, tal como menor susceptibilidade aos prejuízos causados por mutações e variações ambientais (Levin-Klein e Bergman, 2014).

Neste contexto, o padrão de expressão monoalélica exerce influências importantes na determinação do fenótipo, assim como nas manifestações de doenças em um cenário de mutação devido à nulissomia funcional ou perda de heterozigose (Gendrel *et al.*, 2014).

Ademais, em outro cenário, envolvendo as aneuploidias cromossômicas, a potencial perda do padrão de expressão monoalélica por aquisição de um novo alelo funcional poderia, igualmente, impactar de maneira expressiva as manifestações fenotípicas nestas alterações genéticas.

Um exemplo clássico de aneuploidia autossômica é a trissomia 21, que resulta em uma coleção de fenótipos que caracterizam a síndrome de Down (SD). A trissomia 21 é alteração numérica mais prevalente em neonatos com uma incidência global de 1/660 (Wiseman *et al.*, 2009). Somente na Índia, nascem por hora pelo menos três crianças acometidas por essa anomalia cromossômica (Malini e Ramachandra, 2006).

A trissomia 21 livre é causada pela não disjunção dos cromossomos 21, que ocorre preferencialmente durante os processos meióticos na gametogênese e raramente (2% dos casos) após a fertilização. Aproximadamente 95% dos eventos de não disjunção do cromossomo 21 são de origem materna. Erros de segregação de origem paterna correspondem a 5% de todos os casos (Oliver *et al.*, 2009; Vranekovic *et al.*, 2012).

Entre os trissômicos nascidos vivos, a apresentação clínica é complexa; algumas características ocorrem em graus diferenciados de um indivíduo para outro, incluindo o retardo mental, o dismorfismo facial característico e as complicações cardiovasculares.

Em geral, entre os achados clínicos reconhecíveis estão: braquicefalia, face achatada, olhos com fendas palpebrais oblíquas e voltadas para cima, lobo auricular anormal, com implantação baixa das orelhas, pescoço curto, boca significativamente pequena, língua protrusa, e mãos com dedos relativamente curtos, baixa estatura e hipotonia muscular (Lyle *et al.*, 2009).

A trissomia 21 está associada a inúmeras doenças; ela está entre as principais causas de leucemia na infância. Os indivíduos trissômicos apresentam um risco aumentado de 20 e 600 vezes de desenvolver leucemia linfoblástica aguda e leucemia megacariocítica aguda, respectivamente (Izraeli *et al.*, 2007).

A trissomia 21 também é a principal causa genética de deficiência intelectual e manifestação precoce da doença de Alzheimer (Nizetic *et al.*, 2015). Adicionalmente, as cardiopatias congênitas, principal causa de morbidade e mortalidade na infância, são bastante prevalentes, com uma ocorrência de 40-61% entre os indivíduos acometidos pela SD (Lana-Elola *et al.*, 2011).

Apesar da grande importância clínica da SD, ainda pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares que conduzem as variações fenotípicas nos indivíduos trissômicos. Diversos estudos baseados no mapeamento do cromossomo 21 apontam a alteração na expressão de genes contidos em uma porção da banda 21q, um segmento cromossômico denominado região crítica da SD (Down Syndrome Critical Region, DSCR), como fator determinante do fenótipo apresentado na síndrome (McCormick *et al.*, 1989; Rahmani *et al.*, 1989; Korenberg *et al.*, 1994; Sinet *et al.*, 1994).

Contudo, a causa da variação interindividual fenotípica é, atualmente, um assunto pouco investigado. A presença de padrões de expressão monoalélica, seja em um modelo aleatório ou determinístico, pode explicar em parte o amplo espectro fenotípico encontrados nos trissômicos. Assim, como a potencial perda destes padrões por aquisição de um segundo alelo funcional no estado de trissomia.

A caracterização de genes que evoluíram para a restrição da expressão bialélica no cromossomo 21, bem como o efeito da presença de uma terceira cópia alélica para estes genes sensíveis a dosagem, ainda são assuntos poucos explorados.

No cromossomo 21, a expressão monoalélica sob um modelo estocástico já foi observada em clones de células B-lymphoblastóides (Gimelbrant *et al.*, 2007). Gimelbrant e colaboradores (2007) ao analisarem o perfil transcricional alelo específico de aproximadamente 4000 genes, identificaram no cromossomo 21 sete genes com expressão monoalélica randômica: *APP*, *HLCS*, *DSCAM*, *TMPRSS3*, *PDE9A*, *TRPM2* e *ADARB1*.

Concomitantemente, um segundo estudo utilizando critérios de predição por genômica computacional comparada identificou 15 genes candidatos à regulação monoalélica sob um modelo determinístico (Luedi *et al.*, 2007).

De acordo com este estudo, os genes *OLIG2*, *PRDM15*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP* e *DIP2A* estariam sujeitos ao *imprinting* paterno (i.e., expressão monoalélica de origem materna), enquanto os genes *PRED4*, *C21orf74*, *KRTAP6-2*, *SIM2*, *IGSF5*, *C21orf89*, *C21orf80*, *S100B* e *HRMT1L1* estariam sujeitos ao *imprinting* materno (i.e., expressão monoalélica de origem paterna).

Neste Contexto, a determinação do *imprinting* genômico no cromossomo 21 tornou-se um estudo relevante. Uma vez que, parte do espectro fenotípico apresentado na SD poderia ser atribuído à alteração do padrão de expressão monoalélica, como um efeito da cópia extra do cromossomo 21 de diferentes origens parentais.

Em outras palavras, a não equivalência dos genomas parentais culminaria em diferentes contribuições fenotípicas na SD por aquisição de diferentes alelos funcionais, explicando parte da variação interindividual entre os acometidos.

O gene *OLIG2* codifica um fator de transcrição que é expresso em células neurais precursoras, capazes de gerar neurônios, astrócitos e oligodendrócitos, controlando a proliferação de células tronco neurais e gliomas (Ligon *et al.*, 2007). Estudo recente demonstrou que o aumento na expressão de *OLIG2* inibe a proliferação de células neurais humanas (Lu *et al.*, 2012).

Em indivíduos trissômicos o retardo mental e a pré-disposição para doença de Alzheimer é, em geral, atribuída a progressiva perda neuronal durante o período embrionário e no cérebro adulto (Guidi *et al.*, 2008). Contudo, restrição na proliferação neuronal durante o desenvolvimento pode contribuir para a formação de um cérebro reduzido em pacientes SD (Lu *et al.*, 2012).

Considerando o cenário de predição do gene *OLIG2* ao *imprinting* paterno, ou seja, expressão exclusivamente materna, este gene torna-se um candidato interessante a ser avaliado, dado a maior prevalência dos eventos de não disjunção de origem materna, e o fato de características como o retardo mental e a neuropatologia da doença de Alzheimer serem fenótipos comuns à SD.

O gene *ADARB1*, codifica uma enzima de edição, com ação RNA adenosina deaminase, convertendo resíduos de adenosina em inosina, que funcionalmente comporta-se como guanosina. Tal modificação de bases, em sequencias codificadoras, modificam os códons podendo ocasionar a substituição de aminoácidos, que podem alterar a estrutura e função do produto proteico. Edição de adenosinas à inosina também podem ocorrer em íntrons de pré-mRNA e na região 3' não traduzida de mRNA, gerando novos sítios de *splicing*, transcritos variantes, e possíveis alvos para microRNAs (Nishikura, 2010).

Em humanos, a expressão diferencial de *ADARB1* foi observada em neoplasias cerebrais (astrocitomas de baixo grau, astrocitomas anaplásico, glioblastomas multiforme e oligodendrogliomas), com menor expressão em relação a tecidos normais. Interessantemente, a superexpressão induzida de *ADARB1* em linhagem U87 de glioblastomas multiformes resultaram na redução da proliferação celular (Paz *et al.*, 2007).

Assim, considerando o cenário predito, de regulação deste gene por *imprinting* paterno e, portanto, a expressão exclusivamente materna, *ADARB1* torna-se um alvo interessante a ser investigado, uma vez, que casos de trissomia 21 de origem materna são mais prevalentes, e a incidência de tumores sólidos entre os acometidos é relativamente de baixa ocorrência (Yang *et al.*, 2002).

O gene *COL6A1*, codifica a subunidade alfa do colágeno tipo VI. O colágeno pertence a uma superfamília de proteínas que constituem a matrix extracelular, importante para a manutenção da integridade de vários tecidos. As mutações nos genes que codificam a subunidade VI de proteínas do colágeno estão associadas com a miopatia de Bethlem, uma forma de distrofia muscular, autossômica dominante com progressão lenta (OMIM #158810).

Em modelos murinos, nocaute para o gene *COL6A1*, foram observados achados clínicos importantes, como o fenótipo da miopatia de Bethlem e osteopenia com alteração da morfologia de osteoblastos, sugerindo a participação deste gene na formação da matriz óssea (Izu *et al.*, 2012).

Interessantemente, elevados níveis de expressão do gene *COL6A1* foram demonstrados na região atrioventricular de fetos portadores de trissomia 21 livre (Gittenberger-De Groot *et al.*, 2003). Adicionalmente, forte associação foi observada entre variações genéticas em *COL6A1* e cardiopatias congênitas (Davies *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1995), as quais são altamente prevalentes na SD (Irving e Chaudhari, 2012).

O gene *MCM3AP* codifica uma acetil transferase de proteínas MCM (*minichromosome maintenance protein*), a qual é essencial para o início da replicação do DNA. Em análises *in vitro*, foi observado um efeito inibitório da replicação do DNA quando o gene *MCM3AP* foi superexpresso em células HeLa

(Takei *et al.*, 2001). Adicionalmente, variação patogênica neste gene foi observada em indivíduos com deficiência intelectual e problemas do comportamento (Schuurs-Hoeijmakers *et al.*, 2013).

Embora não existam muitos estudos descrevendo o padrão de expressão do gene *MCM3AP* em indivíduos dissômicos ou trissômicos, em um estudo recente envolvendo gêmeos discordantes para SD com evento de não disjunção de origem materna, foi observada a superexpressão deste gene (Letourneau *et al.*, 2014). Embora este seja um efeito esperado pelo próprio estado de trissomia, este cenário está em concordância com a predição de *imprinting* paterno ou expressão exclusivamente materna descrita para o gene *MCM3AP*.

O gene *DIP2A* codifica um gene que pode estar envolvido no modelamento de axônios no sistema nervoso central. Embora não exista na literatura nenhum trabalho sobre o impacto deste gene com as manifestações fenotípicas na SD, em um experimento envolvendo a análise de expressão em fibroblasto de um paciente com trissomia 21 de origem materna, foi observada a superexpressão deste gene (Letourneau *et al.*, 2014).

Em um estudo recente, envolvendo a análise de biópsia de cérebro de pacientes acometidos pela doença de Alzheimer, foram observadas alterações no perfil metilação e na expressão de *DIP2A* e outros sete *loci* (De Jager *et al.*, 2014). Neste estudo, os autores apontam o gene *DIP2A* como um gene candidato à susceptibilidade a doença de Alzheimer, dado a sua potencial interação com outros dois genes de susceptibilidade, sendo um igualmente mapeado no cromossomo 21, o gene *APP* o qual apresenta um papel chave na patologia da doença.

Deste modo a investigação da predição de *imprinting* para este gene, torna-se relevante dado à predisposição a manifestação precoce da doença de Alzheimer em pacientes SD.

O gene *KRTAP6-2*, pertence à superfamília das proteínas associadas à queratina, que ao se ligarem aos filamentos intermediários de queratina, através de pontes dissulfeto, conferem rigidez às fibras capilares. Em humanos, são descritos cerca de 100 genes de proteínas associadas à queratina (*KRTAP*), distribuídos em

27 famílias mapeadas nas regiões cromossômicas 11p15.5, 17q21.2, 21q22.1 e 21q22.3 (Gong *et al.*, 2012).

Embora o gene *KRTAP6-2* esteja mapeado na DSCR, até o momento não existem relatos sobre os níveis e o padrão de expressão deste gene em pacientes acometido pela trissomia 21. Além disso, este gene torna-se um alvo interessante para o estudo de *imprinting* parental no cromossomo 21, uma vez que as células epiteliais do folículo piloso estão em constante processo de divisão e diferenciação.

O gene *SIM2* exerce um papel chave no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC). A proteína *SIM2* atua como um fator de transcrição para diversos genes alvos, incluindo os genes *SHH*, *SLIT* e *BREATHLESS/FGF receptor* que estão envolvidos na diferenciação das células neuronais (Rachidi *et al.*, 2005).

A expressão precoce de *SIM2* foi detectada em altos níveis no neuroepitélio, e em baixos níveis ao longo do tubo neural, e estágios posteriores, durante a formação do neocortex, hipocampo e cerebelo. Tais estruturas são essenciais para o funcionamento cerebral, envolvidas nos processos de memorização e aprendizado. Em adição, a expressão de *SIM2* foi observada fora da região cerebral, na região orofaríngea (Rachidi *et al.*, 2005).

Interessantemente, em pacientes com SD a expressão de *SIM2* em sua isoforma secretada *SIM2-s* foi observada em biopsias de carcinomas pancreático, de cólon e próstata, porém, ausentes em tecidos normais (Purvey *et al.*, 2010).

O gene *IGSF5* codifica o fator 5 da superfamília das imunoglobulinas, que em associação com *MAGI1* (proteína guanilato quinase associada à membrana) formam complexos proteicos que mantêm as células fortemente aderidas (*tight junctions*), estas junções íntimas podem regular a permeabilidade do glomérulo renal e de pequenas células intestinais (Hirabayashi *et al.*, 2003).

Polimorfismos na região promotora de *IGSF5* demonstraram ser funcionalmente importantes, resultando em um aumento na transcrição gênica (Buckland *et al.*, 2004). Contudo, embora mapeado na DSCR, não existem relatos sobre os níveis e o padrão de expressão deste gene em pacientes acometido pela trissomia 21.

O gene *S100B* codifica um membro da família *S100*, proteínas com localização nuclear e citoplasmática, envolvidas em processos biológicos, tais como a proliferação e diferenciação celular (Shapiro *et al.*, 2010). Em níveis normais, *S100B* apresenta um papel neuroprotetor. Em contrapartida em níveis alterados um efeito neurotóxico (Griffin *et al.*, 1989). Níveis elevados na expressão de *S100B* já foram descritos em biopsia de cérebro de pacientes com doença de Alzheimer e SD (Griffin *et al.*, 1989; Mrak *et al.*, 1996).

Na trissomia 21, a superexpressão do gene *APP* altera a expressão do gene *S100B*, em um efeito sinérgico. A expressão elevada de ambas as proteínas, promovem um estresse oxidativo, com injúria celular e consequentemente morte celular (Lu *et al.*, 2011).

Neste contexto, dentro da predição de *imprinting* materno, este gene torna-se um bom candidato a ser investigado, visto que a aquisição de mais um alelo funcional em casos de não disjunção paterna, em teoria, poderia exacerbar a interação *APP-S100B*, intensificando a perda precoce da viabilidade neuronal, ainda em estágios iniciais do desenvolvimento, levando a uma maior incompatibilidade para a sobrevivência, explicando em parte, a menor prevalência de pacientes SD com a não disjunção de origem paterna.

Embora na hipótese de genes sensíveis a dosagem no cromossomo 21, as manifestações fenotípicas na SD seja atribuída a alterações na expressão de uma série de genes contíguos, sendo grande parte deste repertório gênico localizado na *DSCR*, estudos recentes tem demonstrado um efeito global da cópia extra, na indução de alterações epigenéticas dentro e fora do cromossomo 21 (Letourneau *et al.*, 2014; Sailani *et al.*, 2015).

Neste contexto, alterações em *cis* e *trans* no cenário epigenético de diversos *loci* no genoma humano podem ser relevantes para variabilidade fenotípica ou severidade exibida na SD.

A alteração global no padrão de expressão gênica na SD como efeito da cópia extra do cromossomo 21 está relacionada com alterações epigenéticas na cromatina dentro de regiões específicas distribuídas de maneira alternada em todo o genoma (Letourneau *et al.*, 2014).

A metilação do DNA é uma das modificações epigenéticas mais bem estudadas, que afeta a capacidade de genes específicos serem expressos sem qualquer mutação no genoma. Este mecanismo, potencialmente, pode estar envolvido na resposta às alterações na dosagem gênica em cenários de aneuploidias (Sailani *et al.*, 2015).

Uma vez que a metilação do DNA é uma marca epigenética importante na regulação gênica, a presença global de regiões diferencialmente metiladas no genoma de indivíduos trissômicos (Kerkel *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2013; Bacalini *et al.*, 2015; Sailani *et al.*, 2015) podem estar associadas à expressão gênica diferencial nestes indivíduos .

Em leucócitos, alterações epigenéticas como efeito da cópia extra do cromossomo 21 já foram observadas por Kerkel e colaboradores (2010). Estes autores, por meio da análise comparada entre leucócitos trissômicos e controles dissômicos confirmaram um padrão de metilação diferencial em oito diferentes *loci*: *CD3Z/CD247* (cromossomo 1), *TMEM131* (cromossomo 2), *SH3BP2* (cromossomo 4), *EIF4E* (cromossomo 4), *TCF7* (cromossomo 5), *PLD6* (cromossomo 17), *SUMO3* (cromossomo 21) e *CPT1B* (cromossomo 22).

O gene *TMEM131*, que codifica uma proteína transmembrana altamente expressa em células tronco hematopoiéticas em estágio de diferenciação, mostrou acentuada perda de metilação ($\Delta\%_{me} = -0,371$) em leucócitos trissômicos. O estabelecimento de uma região diferencialmente metilada, ou uma DMR, específica ao estado de trissomia 21, conduz a hipometilação do promotor da isoforma menor do gene *TMEM131*, aumentando os níveis de expressão desta isoforma em leucócitos de pacientes SD (Kerkel *et al.*, 2010).

A metilação diferencial global, com tendência a um estado de hipermetilação, também já foi descrita em células do epitélio bucal de pacientes. Interessantemente, um estado de hipermetilação, com maior variação média no percentual de metilação ($\Delta\%_{me} = 0,350$) entre os grupos estudados foi observado no primeiro éxon do gene *RUNX1* (Jones *et al.*, 2013).

O gene *RUNX1* codifica um fator de transcrição, com um papel essencial no desenvolvimento de células hematopoiéticas (Bacalini *et al.*, 2015). Alterações

genéticas em *RUNX1* são comumente encontradas em cenários de leucemias (Brettingham-Moore *et al.*, 2015). Adicionalmente, a superexpressão deste fator de transcrição está associada à leucemia aguda linfoblástica (Liu *et al.*, 2009).

No estado de trissomia 21, a expressão diferencial de *RUNX1* foi recentemente descrita em gêmeos monozigóticos discordantes para SD, com a expressão aumentada de *RUNX1* presente no gêmeo trissômico (Letourneau *et al.*, 2014). Estes resultados demonstram a influência da cópia extra, a nível epigenético, na superexpressão de *RUNX1* na SD.

O efeito da cópia extra do cromossomo 21 pode ser observado em diferentes cenários epigenéticos. Recentemente, uma região maternalmente metilada foi identificada em uma porção intrônica do gene *WRB* (Court *et al.*, 2014; Docherty *et al.*, 2014).

Embora existam poucas informações sobre sua função, o gene *WRB* potencialmente codifica uma proteína transmembrana que atua como receptor para ATPase citosólica TRC40, promovendo a inserção de proteínas ancoradas por cauda no retículo endoplasmático (Vilardi *et al.*, 2011).

O padrão de metilação sob *imprinting* materno exibido por este gene conduz a diferentes alterações epigenéticas de acordo com a origem parental. Perfis de metilação diferencial, alternados entre os estados de hipermetilação e hipometilação são esperados para as trissomias de origem materna e paterna, respectivamente. Neste sentido, a origem parental dos eventos de não disjunção afetaria diferentemente o padrão e os níveis de expressão do gene *WRB*.

Em resumo, como efeito da cópia extra do cromossomo 21, as alterações epigenéticas encontradas globalmente no genoma podem impactar diversas interações gênicas, gerando uma importante ligação entre os defeitos no desenvolvimento e o amplo espectro fenotípico encontrado na SD.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Expressão Monoalélica em mamíferos

Em células diplóides presume-se que ambos os alelos materno e paterno herdados sejam expressos simultaneamente e em níveis equivalentes (Eckersley-Maslin *et al.*, 2014). Contudo, em uma pequena parcela do repertório gênico, apenas um dos alelos é preferencialmente expresso, enquanto o outro é transcricionalmente silenciado sob um mecanismo epigenético conhecido como expressão monoalélica (Gendrel *et al.*, 2014).

Em mamíferos, a expressão monoalélica está amplamente difundida entre a família de genes para receptores olfativos, os quais correspondem a 1400 genes em camundongos e cerca de 350 genes agrupados em 40 domínios genômicos em humanos (Young *et al.*, 2002).

A expressão monoalélica de genes codificadores dos receptores olfativos assegura que cada neurônio expresse apenas um alelo para um determinado receptor, possibilitando especificidade no reconhecimento e correta orientação axonal (Eckersley-Maslin *et al.*, 2014).

Um fenômeno clássico, e já bem caracterizado de expressão monoalélica em mamíferos envolve os genes ligados ao cromossomo X. Em um mecanismo conhecido como inativação do cromossomo X (ICX), um de dois cromossomos em células femininas XX é marcado para o silenciamento transcricional, resultando na expressão alelo específica dos genes localizados no remanescente cromossomo X ativo (Xa) (Lyon, 1961).

Em autossomos, para um pequeno grupo de genes, a expressão monoalélica ocorre de forma constitutiva, envolvendo a inativação e expressão, sempre, dos mesmos alelos homólogos. Em um modelo determinístico a expressão alelo específica ocorre sob um padrão origem parental dependente, sendo esse mecanismo conhecido como *imprinting* genômico (Reik, 2001), contudo, um modelo estocástico é mais frequentemente observado em autossomos, sendo este fenômeno estabelecido independentemente da origem parental e conhecido como expressão monoalélica randômica (EMR) (Jeffries *et al.*, 2012; Zwemer *et al.*, 2012).

A EMR pode ser classificada dentro de duas categorias: 1) EMR fixada, a qual consiste na expressão alelo específica clonalmente estável de um determinado gene; e 2) a EMR dinâmica, a qual envolve um perfil transiente de expressão monoalélica por transcrição alélica estocástica em um determinado período de tempo. Interessantemente, em processos de repressão alélica, o silenciamento de um determinado alelo pode ser incompleto, com ambos os alelos parentais expressos em diferentes proporções, sendo este cenário conhecido como expressão alélica enviesada (Reinius e Sandberg, 2015).

Em humanos, a EMR é um fenômeno amplamente difundido em todo o genoma (Gimelbrant *et al.*, 2007). Gimelbrant e colaboradores (2007) por estudo de genômica ampla em linhagem linfoblástica descreveram pela primeira vez a extensão da EMR, a qual correspondeu a 10% dos genes autossômicos analisados. Em concordância, estudo posterior em camundongos revelou extensão similar, envolvendo 15% dos genes autossômicos avaliados em linhagem linfoblástica murina (Zwemer *et al.*, 2012).

Para o estabelecimento da EMR fixada são sugeridos dois cenários. Em um primeiro cenário, a expressão monoalélica pode ser iniciada a partir de um modelo bialélico com o silenciamento de um de dois alelos ativos, ou em um segundo cenário, a partir da ativação de um determinado alelo em um gene inicialmente inativo. Independente do cenário de estabelecimento especula-se a participação de modificações em *cis* nos alelos expressos ou inativos na escolha alélica a ser propagada através de múltiplas divisões celulares (Reinius e Sandberg, 2015).

2.2 Marcas epigenéticas de repressão alélica

Os mecanismos epigenéticos desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário (Jones, 2012). Em mamíferos, as marcas epigenéticas mais bem documentadas são a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais de proteínas histonas. Embora a metilação do DNA e as modificações de histonas sejam diferentes assinaturas presentes no repertório epigenético, muitas são as evidências da associação de ambas as marcas no processo de silenciamento gênico em mamíferos (Henckel *et al.*, 2009).

2.2.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA em nucleotídeos citosina é uma característica amplamente difundida no genoma humano, com maior representação nas regiões com alta densidade de dinucleotídeos CpG, denominadas ilhas CpGs (iCpGs). As iCpGs estão presentes em mais da metade dos genes anotados em humanos, coincidindo geralmente com as regiões promotoras (Weber *et al.*, 2007).

Assim, as iCpGs presentes em regiões promotoras, usualmente, escapam as reações de metilação do DNA, exceto nos cenários onde a expressão alélica é permanente reprimida, como nos processos que envolvem a compensação de dose de genes ligados ao X, a repressão de genes sujeitos ao *imprinting* (Yamada *et al.*, 2004) e o silenciamento de elementos de transposição (Liang *et al.*, 2002).

O processo de metilação do DNA com a formação de marcas 5-metilcitosina (5mC) é o principal fator epigenético envolvido na regulação de genes com expressão monoalélica sob *imprinting*. Neste contexto, genes com expressão monoalélica, em geral, apresentam níveis maiores de metilação do DNA quando comparados a sua contraparte com expressão bialélica (Jeffries *et al.*, 2012).

Jeffries e colaboradores (2012) ao investigarem a região promotora de genes com expressão monoalélica e bialélica em amostras de córtex cerebral, medula espinhal e cérebro fetal demonstraram um maior percentual de metilação em genes com expressão monoalélica. Esses resultados demonstraram a importâncias do processo de metilação do DNA na repressão alélica.

O estabelecimento de marcas 5mC é realizado por três enzimas com atividade DNA metil transferase (DNMTs), DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (Liao *et al.*, 2015). Em camundongos, Dnmts são essenciais para o correto desenvolvimento, sendo as deleções desses genes letais no período embrionário (Li *et al.*, 1992). Em modelos *in vitro*, de células tronco embrionárias humanas, deleções em DNMT1 conduzem a uma rápida morte celular, sugerindo que este gene é igualmente essencial para a viabilidade celular em humanos (Liao *et al.*, 2015).

A DNMT1 atua na manutenção da metilação do DNA no processo de replicação, enquanto, as reações de metilação *de novo* são executadas pelas enzimas DNMT3A e DNMT3B, e a proteína sem atividade catalítica DNMT3L, a qual

forma complexos com DNMT3A e DNMT3B (Okano *et al.*, 1999; Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 2007).

O complexo DNMT3A-DNMT3L atua na metilação de sítios CpG espaçados de 8-10 pares de base. Em um cenário de *imprinting*, esta periodicidade no espaçamento do substrato deste complexo é uma característica comum de regiões diferencialmente metiladas (*Differentially Methylated Regions* - DMRs) de origem materna (Jia *et al.*, 2007).

O processo de metilação *de novo* é dinâmico e dependente de DNMT3L, uma vez que este cofator atua estimulando a atividade de ambas as enzimas, DNMT3A e DNMT3B (Okano *et al.*, 1999; Bourc'his *et al.*, 2001; Hata *et al.*, 2002; Jia *et al.*, 2007). A ausência da expressão do alelo DNMT3L materno em linhagem germinativa impede o estabelecimento normal do padrão de *imprinting* em oócitos. Adicionalmente, ausência deste alelo em gametas masculinos, resulta na perda de repressão de elementos de transposição e alterações no processo meiótico (Ooi *et al.*, 2007).

Em genes regulados por *imprinting* a metilação do DNA também está envolvida no controle de marcas repressivas de proteínas histonas (Henckel *et al.*, 2009). Henckel e colaboradores (2009) demonstraram, pela primeira vez, a atuação de um mecanismo integrado de metilação do DNA e de proteínas histonas no silenciamento alelo-específico em regiões controladoras de *imprinting* (*imprinting control region* – ICRs). Em embriões murinos nocautes para Dnmt3L (*DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3-Like*), estes autores observaram que a não aquisição de metilação do DNA nas ICRs afetou drasticamente o padrão de histonas metiladas nestas regiões.

Os padrões alterados de metilação do DNA em ICRs estão presentes em todas as síndromes humanas causadas por perda de *imprinting*. As modulações no estado de metilação das ICR1 e ICR2, regiões controladoras de *imprinting* na banda 11p15.5 do cromossomo 11 humano estão associadas com a manifestação das síndromes de Silver-Russel e Beckwith-Wiedemann. Hipometilação na ICR1, assim como, dissomia materna desta região já foram descritas em pacientes acometidos pela síndrome de Silver-Russel (Netchine *et al.*, 2007; Bullman *et al.*, 2008). A perda de metilação do alelo materno na ICR2 está presente em 60% dos pacientes

acometido pela síndrome de Beckwith-Wiedemann, inibindo a expressão de *CDKN1C* e perda de *imprinting* no gene *IGF2* (Cooper *et al.*, 2005).

2.2.2 Modificações pós traducionais em proteínas histonas

Assim como a metilação do DNA, modificações pós-traducionais de proteínas histonas, tais como metilação por ação das histonas metiltransferases (HMTs) ou acetilação por ação das histonas acetiltransferases (HATs) são importantes marcas epigenéticas nos processos de regulação da expressão gênica (Wang *et al.*, 2008).

Diferentemente das marcas de acetilação em histonas, as quais coincidem com o estado transcricionalmente ativo da cromatina, a posição exata do resíduo de lisina e o seu grau de metilação podem caracterizar tais modificações como marcas de ativação (no contexto H3K4me3, H3K36me3 e H3K79me1/2) ou repressão gênica (no contexto H3K9me3, H3K27me3 e H4K20me3) (Barski *et al.*, 2007; Ciccone e Chen, 2009).

Recentemente, em um estudo envolvendo células neurais humanas foi demonstrado que genes com expressão monoalélica apresentam uma menor representação global de modificações de histonas associadas com atividade transcricional, como H3K4me3, H3K9ac e H3K36me3, e enriquecimento da marca H3K27me3, a qual está associada com a repressão transcricional (Jeffries *et al.*, 2012).

Adicionalmente, um estudo posterior envolvendo a investigação de oito diferentes modificações de histonas em linfoblastos demonstrou como assinatura de genes com expressão monoalélica a presença de duas marcas funcionalmente antagônicas no corpo gênico, tal como H3K36me3 e H3K27me3 (Nag *et al.*, 2013).

As modificações em proteínas histonas estão presentes no estabelecimento ou manutenção do estado de expressão monoalélica em diversos processos biológicos (Ciccone e Chen, 2009; Ciccone *et al.*, 2009; Van Den Berg *et al.*, 2009). Historicamente, a primeira classe de genes descrita com expressão monoalélica envolveu a família de receptores de antígenos. Neste contexto, cada linfócito B e T reconhecem somente um antígeno como resultado da expressão de um único alelo para um determinado receptor, evitando assim, efeitos deletérios como

autoimunidade por múltipla especificidade gerada pela expressão de ambos os alelos (Levin-Klein e Bergman, 2014).

Em células precursoras de linfócitos B a replicação assíncrona é a primeira marca epigenética com potencial para expressão monoalélica. Em células pré-B, os alelos para os receptores celulares são diferencialmente replicados durante a fase S. O alelo a ser expresso é replicado em fase inicial, o qual é marcado por perda de metilação e enriquecimento de modificações de histonas associadas à ativação transcricional, tais como, acetilação em histonas H3 (H3ac) e trimetilação na lisina 4 em histonas H3 (H3K4me3). Em contrapartida, o alelo a ser inativado (exclusão alélica) é replicado em fase tardia e mantém-se metilado (Levin-Klein e Bergman, 2014).

As modificações em proteínas histonas atuam cooperativamente no remodelamento da cromatina, assim como, no estabelecimento de outras marcas epigenéticas na molécula do DNA. Em células embrionárias de camundongo, foi demonstrado que aquisição de marcas 5mC por reações de metilação *de novo* são influenciadas pelo estado de metilação da lisina K4 na histona H3 (H3K4). Na ausência de metilação, Dnmt3l interage com o resíduo N-terminal da histona H3, promovendo a ativação de Dnmt3a. Embora, modificações de histonas do tipo H3K4me1, H3K4me2 e H3K4me3 atuem inibindo esta interação, o processo de formação do complexo H3-Dnmt3l é insensível a metilação em outras posições (Ooi *et al.*, 2007).

Interessantemente, a ligação funcional entre os eventos de metilação do DNA e de proteínas histonas já foi descrita em cenário de expressão monoalélica sob o *imprinting* materno (Ciccone *et al.*, 2009). Ciccone e colaboradores (2009) demonstraram que a aquisição de marcas de metilação destes genes em oócitos ocorre de modo dependente da desmetilação por KDM1B (*Flavin-dependent histone demethylases*) do quarto resíduo de lisina em histonas H3 (H3K4). Estes resultados demonstram um papel protetor das marcas H3K4me1, H3K4me2 e H3K4me3 contra as reações de metilação *de novo*, e a importância dos eventos de desmetilação destas marcas para o estabelecimento correto do padrão de *imprinting* durante a oogênese.

2.3 Expressão monoalélica randômica

A EMR é um fenômeno pelo qual a seleção do alelo a ser expresso ou silenciado é realizada de forma aleatória em um estágio inicial do desenvolvimento. Uma vez estabelecido este mecanismo, essa informação é epigeneticamente herdada e mantida de forma estável para a progênie celular subsequente (Jeffries *et al.*, 2013).

Em autossomos, a seleção aleatória de uma linhagem celular para a expressão de um alelo materno, paterno ou de ambos, ocorre de maneira independente para cada gene, contrário ao observado para os genes ligados ao cromossomo X, onde a inativação ocorre para uma série de genes contíguos em um mesmo cromossomo Xi, seja de origem materna ou paterna (Gimelbrant *et al.*, 2007).

Em mamíferos a EMR é organizada através da replicação assíncrona do DNA. Nesse processo ocorre para cada gene, uma replicação alelo específica envolvendo os cromossomos homólogos em diferentes momentos da fase S (Chess *et al.*, 1994; Ensminger e Chess, 2004; Gimelbrant e Chess, 2006). Em geral, as marcas epigenéticas envolvidas na replicação em fase inicial ou tardia de um determinado alelo permanecem, ainda, desconhecidas (Ensminger e Chess, 2004; Chess, 2013).

Todavia, a metilação alélica-específica já foi observada para o gene murino *Ly49a* (Rouhi *et al.*, 2006). Interessantemente, a presença simultânea de duas modificações de histonas H3K36me3 e H3K27me3, as quais atuam como marcas de atividade e silenciamento transcricional, respectivamente, foram identificadas no corpo gênico de genes com expressão monoalélica randômica (Nag *et al.*, 2013).

O fenômeno de EMR foi primeiramente descrito em um pequeno grupo de genes envolvidos na expressão de receptores celulares, como, receptores de antígenos em linfócitos B e T (Pernis *et al.*, 1965), receptores de interleucinas (Mostoslavsky *et al.*, 2001), e receptores odorantes (Chess *et al.*, 1994). Contudo, estudos posteriores aumentaram este painel, incluindo genes com diferentes funções (Gimelbrant *et al.*, 2007).

Gimelbrant e colaboradores (2007), ao investigarem o perfil transcricional de 4000 genes em linhagem linfoblastóide, observaram que 300 destes genes foram sujeitos a expressão monoalélica randômica, a qual foi transmitida de maneira estável as células filhas, promovendo a diversidade em células individuais bem como na sua descendência clonal.

Jeffries e colaboradores (2012), em uma análise envolvendo cerca de 9550 genes em nove linhagens de células-tronco neurais obtidas de três fetos não relacionados, observaram que a escolha do alelo a ser expresso é mantida mesmo após a diferenciação em neurônios e células da glia. E que, embora a escolha alélica ocorra de forma aleatória, o mesmo não ocorre com o loco a ser regulado, dado a sobreposição do grupo gênico com expressão monoalélica exibida pelas nove linhagens celulares avaliadas. Além disso, os autores descreveram uma correlação negativa entre o desbalanço alélico e os níveis de transcritos.

Nesse contexto, a escolha aleatória para expressão de um de dois alelos em um determinado tecido, pode indicar um importante mecanismo de compensação de dose, a outro passo que, a hemizigose funcional gerada pelo processo de EMR pode favorecer o efeito deletério de mutações recessivas (Jeffries *et al.*, 2013).

Não obstante, a possibilidade em expressar um ou outro alelo, ou ambos, cria uma identidade a nível celular, possibilitando uma variabilidade fenotípica intra e interindividual (Krueger e Morison, 2008). Para qualquer tecido a extensão do perfil de EMR está diretamente relacionada ao momento no desenvolvimento que esta escolha foi realizada, assim, cada indivíduo pode ser considerado um mosaico no que se refere à expressão monoalélica de um grupo de genes autossômicos, o que torna-se uma base epigenética a ser estudada em relação a diferenças funcionais entre indivíduos (Gimelbrant *et al.*, 2007).

2.4 Expressão monoalélica randômica ligada ao X

Em mamíferos eutérios, a inativação do cromossomo X (ICX) em tecidos somáticos é um exemplo clássico de expressão monoalélica estocástica. Diante deste fenômeno, cromossomos maternalmente herdado (X_m) e paternalmente herdado (X_p) são aleatoriamente silenciados em cada célula (Gregg, 2014).

A ICX é um processo epigenético e mitoticamente estável que tem como função crítica o balanceamento da dosagem de genes ligados ao X entre células masculinas e femininas, as quais carregam uma ou duas cópias deste alossomo (Lyon, 1961; Lyon, 1962; Reinius e Sandberg, 2015). Em outras palavras, a ICX atua na compensação de dose do transcriptoma de fêmeas XX e machos XY (Lyon, 1961; Lyon, 1962).

Como consequência, fêmeas XX apresentam mosaicismo de expressão, com tecidos somáticos apresentando duas populações celulares com diferentes cromossomos parentais funcionalmente ativos (Reinius e Sandberg, 2015).

Em geral, no processo de ICX, X_m e X_p apresentam as mesmas chances de serem silenciados. Contudo, desvios na razão de $X_p:X_m$ inativos podem ocorrer, sendo este fenômeno conhecido como ICX enviesada. A ICX enviesada surge como resultado do próprio processo estocástico, ou de diferenças genéticas que podem influenciar o perfil de inativação (Musalkova *et al.*, 2015).

A ICX é um processo dinâmico, que envolve modificações de histonas (Van Den Berg *et al.*, 2009; Fukuda *et al.*, 2014), metilação do DNA (Cotton *et al.*, 2015), e a participação de ncRNAs (Chureau *et al.*, 2002). O estado epigenético e subsequentemente o perfil transcricional de ambos os cromossomos X ativo (X_a) e inativo (X_i) são regulados em *cis* por uma região conhecida como centro de inativação do cromossomo X (X- *inactivation centre*, *Xic*). No loco *Xic* estão mapeados diversos genes para ncRNAs: *Xist*, *Tsix*, *Jpx* e *Ftx*, os quais coordenam o estabelecimento do estado de ICX em fêmeas (Chureau *et al.*, 2002).

Os ncRNAs *Xist* (X-*inactive specific transcript*) e seu transcrito antissentido *Tsix*, executam um papel chave no processo de ICX. Atuando em *cis*, *Xist* recobre todo o X_i , desencadeando uma série de modificações na cromatina, reorganização espacial do cromossomo, e silenciamento transcricional (Sado *et al.*, 2005). Em contrapartida, no X_a o ncRNA *Tsix* regula negativamente *Xist*, promovendo mudanças conformacionais da cromatina em *cis* na região promotora de *Xist* (Sado *et al.*, 2001; Sado *et al.*, 2005).

Durante o estabelecimento do processo de ICX a redução de expressão de *Tsix* em um dos cromossomos X promove em *cis* o aumento de expressão de *Xist*

resultando em um Xi, à medida que a expressão elevada de *Tsix* no outro cromossomo controla a expressão de *Xist*, subsequentemente prevenindo a inativação do Xa (Sado *et al.*, 2001; Sado *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2006). Adicionalmente *Tsix* interage diretamente com DNMT3A, induzindo reações de metilação do DNA na região promotora de *Xist*. Contudo, este processo não ocorre em fases iniciais da ICX, atuando, portanto como um mecanismo secundário de silenciamento no Xi (Sun *et al.*, 2006).

Em modelo murino, a transmissão paterna de deleções no gene *Xist* está relacionada com letalidade embrionária, dado a perda de *imprinting* nos tecidos extraembrionários. Adicionalmente, a transmissão materna de deleções em *Tsix*, sem comprometimento de *Xist*, também está relacionada ao insucesso gestacional, por promover a expressão ectópica em *cis* de *Xist* e, portanto, perda de *imprinting* do alelo *Xist* materno em tecidos extraembrionários. A reativação do alelo *Xist* materno resulta no silenciamento do Xm, sendo esta nulissomia funcional responsável pela letalidade embrionária de ambos os sexos (Sado *et al.*, 2001; Sado *et al.*, 2005).

O ncRNA *Jpx* participa do processo de ICX através de um balanço dinâmico com proteínas CTCF, regulando positivamente a expressão de *Xist*. O gene *Jpx* é um dos poucos genes que escapam a ICX no Xi (Tian *et al.*, 2010). A expressão bialélica de *Jpx* promove sua interação com proteínas CTCF, impedindo sua ligação com a região promotora de *Xist*, mantendo-a em um estado transcricionalmente ativo. Em cenários de expressão monoalélica, machos XY ou fêmeas X0, as concentrações celulares de *Jpx* são incapazes de proteger a interação de proteínas CTCF com o promotor de *Xist*. Este fato demonstra a existência de um limiar funcional na razão *Jpx*:CTCF no processo de ativação de *Xist* por *Jpx* (Sun *et al.*).

Interessantemente, as deleções de *Jpx* em células-tronco em processo de diferenciação resultam em uma cobertura insuficiente por *Xist* no Xi. Embora este fenômeno revele um controle positivo de *Xist* através da coexpressão com *Jpx*, o real mecanismo em que *Jpx* coordena a expressão de *Xist in vivo* permanece desconhecido (Tian *et al.*, 2010).

Assim como *Jpx*, o ncRNA *Ftx* foi apontado como um segundo fator com efeito positivo na expressão de *Xist*, atuando ativamente na inibição de reações de metilação na região promotora de *Xist*. Ademais, deleção de *Ftx* promove a redução

na expressão tanto de *Xist* quanto de *Jpx* (Chureau *et al.*, 2011). Contudo, em um estudo recente foi demonstrado que a deleção de *Ftx* não afeta a taxa de sobrevivência em ambos os sexos, além de não impactar severamente a expressão de *Xist* durante o período de pré-implantação embrionária, sendo, portanto, *Ftx* dispensável para o estabelecimento de ICX em estágios iniciais do desenvolvimento (Soma *et al.*, 2014).

Em modelo murino, dois eventos de inativação do cromossomo X ocorrem durante fases iniciais do desenvolvimento embrionário. O primeiro inicia-se no estágio em que o embrião é formado ainda por quatro células e envolve a inativação preferencial do alelo paterno. A ICX por imprinting do Xp mantém-se até a fase inicial de formação do blastocisto (Takagi e Sasaki, 1975). O segundo, envolve a reativação Xp em epiblasto, e subsequentemente, o estabelecimento do processo de inativação aleatória de ambos os cromossomos X parentais (Lyon, 1961). Interessantemente, o silenciamento preferencial do Xp é mantido nos tecidos extraembrionários (Takagi e Sasaki, 1975).

Em humanos, a ICX inicia-se por uma progressiva transcrição de *XIST* no futuro Xi em embriões femininos, ainda no estágio de oito células. Durante a interfase mórula-blastocisto, transcritos de *XIST* acumulados no processo, recobrem o Xi, promovendo o silenciamento transcricional em *cis* (Van Den Berg *et al.*, 2009). A expressão monoalélica do gene *CHIC1* em blastocistos humanos é uma evidência que assim como em modelo murino, a ICX e, portanto, o mecanismo de compensação de dose inicia-se no período pré-implantação (Van Den Berg *et al.*, 2009). Contudo, em humanos, contrariamente ao observado em modelo murino, o mecanismo de ICX em tecidos embrionário e extraembrionário não é coordenado por *imprinting*, sendo os Xm e Xp aleatoriamente silenciados (Moreira De Mello *et al.*, 2010).

Recentemente, foi proposto que o enriquecimento de assinaturas de histonas H3K9me3 no promotor do *Xist* materno exerce um papel importante no estabelecimento de ICX sob *imprinting* durante a embriogênese (Fukuda *et al.*, 2014). Interessantemente, esta é uma marca comum, associada à metilação do DNA em regiões controladoras de muitos genes autossômicos regulados por *imprinting* (Dindot *et al.*, 2009). Adicionalmente, em embriões humanos um enriquecimento de

assinaturas de histonas H3K27me3, uma marca de repressão transcricional, foi descrita para o Xi em blastocistos (Van Den Berg *et al.*, 2009).

No mecanismo de ICX, a metilação do DNA é uma das marcas epigenéticas mais bem estudadas. O padrão de inativação do cromossomo X pode ser inferido através da metilação diferencial do DNA entre Xa e Xi. Em humanos, o ensaio *Humara*, considerado o teste padrão para determinar a ICX, consiste na investigação do perfil de metilação de sítios CpG associados a um elemento repetitivo no contexto CAG_n mapeados no primeiro éxon do gene codificador do receptor de andrógeno humano (*AR*) (Allen *et al.*, 1992). O polimorfismo do trímero CAG_n permite discriminar os Xp e Xm (Karasawa *et al.*, 2001).

Embora o estado de metilação do gene *AR* reflita o estado de metilação de todo cromossomo X, este ensaio é não informativo em 20% dos casos. Recentemente, novos locos concordantes com o ensaio *Humara* foram descritos para a determinação do padrão de ICX, com perfis alélicos informativos em até 97% dos casos avaliados (Machado *et al.*, 2014; Musalkova *et al.*, 2015).

2.5 Expressão monoalélica sob *Imprinting* genômico

O *Imprinting* genômico é um fenômeno epigenético que ocorre na linhagem germinativa, promovendo a regulação gênica por aquisição de marcas de silenciamento transcricional por um dos genomas parentais. Este mecanismo conduz a um sistema de expressão, ou repressão, monoalélica sob um padrão origem parental dependente (Ferguson-Smith e Surani, 2001; Reik, 2001).

Uma vez estabelecido o *imprinting*, este mecanismo é reproduzido de maneira estável, provendo a expressão monoalélica sempre do mesmo alelo (Garfield *et al.*, 2011). Assim, em um cenário já bem conhecido para genes sujeitos ao *imprinting*, um pequeno grupo de genes é expresso exclusivamente da cópia herdada paternalmente, enquanto outro é expresso exclusivamente da cópia herdada maternalmente (Ferguson-Smith, 2011).

Todavia, a expressão alélica preferencial em genes controlados por *imprinting*, que consiste na expressão de ambos os alelos parentais em níveis diferenciados, com expressão elevada de um determinado alelo já foi relatada (Khatib, 2007). Khatib (2007) ao revisar um grupo de 50 genes, sendo 27 genes

sujeitos ao *imprinting* paterno e 23 genes sujeitos ao *imprinting* materno em modelo murino, observou a expressão preferencial materna em 78% dos genes sob *imprinting* paterno. Em contrapartida, expressão preferencial paterna foi observada em 22% dos genes sob o *imprinting* materno.

A expressão gênica diferencial sob *imprinting* torna os genomas materno e paterno funcionalmente não equivalentes. A não equivalência dos genomas parentais foi primeiramente descrita em embriões ginogenéticos e androgenéticos em camundongos, gerados por transplantação de pronúcleos. Estes experimentos revelaram falhas na evolução gestacional, com anormalidade placentária, e letalidade embrionária antes do desenvolvimento cerebral, demonstrando assim, que ambos os genótipos parentais são necessários para o desenvolvimento embrionário normal (Mcgrath e Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984).

A herança uniparental de genes sujeitos ao *imprinting* está sabidamente associada a fenótipos anormais no desenvolvimento, crescimento e comportamento. Em humanos, a perda e ganho de expressão de genes regulados por *imprinting* estão relacionadas com as síndromes de Silver-Russel, Beckwith-Wiedemann, Prader-Willi e Angelman (Ferguson-Smith, 2011).

As epimutações na ICR1 presente na região 11p15.5 surgem como o principal componente epigenético na manifestação da síndrome de Silver-Russel. Como alterações fenotípicas da síndrome destacam-se o retardo do crescimento intrauterino, redução no crescimento pós-natal, características craniofaciais e uma variedade de malformações menores (OMIM #180860).

Interessantemente, epimutações na ICR1, assim como a deleção de genes específicos na região 11p15.5, KIP2, CDKN1C, H19 e LIT1 atuam promovendo o estabelecimento da alteração fenotípica observada na síndrome de Beckwith-Wiedemann, as quais incluem supercrescimento pré e pós-natal, hemihipertrofia e macroglossia, além de anomalias renais e predisposição para neoplasias de origem embrionária (OMIM #130650).

A síndrome de Prader-Willi é caracterizada pela deleção das cópias funcionais de um ou mais genes paternalmente expressos na região 15q11-q13 do cromossomo 15 humano. Ademais, o estabelecimento dos fenótipos da síndrome de Prader-Willi também pode ocorrer através da dissomia uniparental materna dessa

região. A diminuição da atividade fetal, obesidade, hipotonia muscular e retardo mental fazem parte do repertório clínico encontrado na síndrome (OMIM #176270).

Envolvendo a mesma região cromossômica encontra-se a síndrome de Angelman, a qual como componente epigenético apresenta a perda do gene maternalmente expresso *UBE3A* no cromossomo materno. Embora de rara ocorrência, em 2% dos casos, a síndrome de Angelman pode ser estabelecida através da dissomia uniparental de origem paterna. Entre as alterações fenotípicas destaca-se o retardo mental severo (OMIM #105830).

O *imprinting* genômico é estabelecido durante a gametogênese, e mantido após a fecundação. No indivíduo em desenvolvimento, as marcas epigenéticas de *imprinting* são apagadas em estágios iniciais da formação de células germinativas, e restabelecidas de maneira sexo-dependente em estágio posterior, completando o ciclo de *imprinting* (Li e Sasaki, 2011).

A teoria do conflito parental propõe divergência no papel de genes maternos e paternos durante o desenvolvimento fetal. Um exemplo clássico do conflito parental em modelo murino pode ser observado entre os genes paternalmente expresso *igf2* e maternalmente expresso *igf2r*. O gene *igf2* codifica o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2, o qual atua promovendo o crescimento fetal e placentário. Em contrapartida, o gene *igf2r* codifica o receptor para o gene *igf2*, e atua como um antagonista direto do gene *igf2*, com efeito inibitório ou de regulação do crescimento (Lau *et al.*, 1994).

No contexto da teoria do conflito parental, os genes fetais da linhagem paterna foram selecionados para recrutar uma maior demanda dos recursos maternos quando comparados aos genes da linhagem materna (Haig, 1993). Em outras palavras, os genes sob *imprinting* com expressão exclusivamente paterna evoluíram para potencializar a aquisição das fontes nutricionais materna pela prole, mesmo em detrimento da mãe ou demais indivíduos simultaneamente gestados, isto assegura maior aptidão, e portando, maiores chances de sobrevivência e sucesso reprodutivo.

Por conseguinte, genes controlados por *imprinting* com expressão exclusivamente materna evoluíram para restringir a mobilização das fontes

nutricionais materna para prole, garantindo a divisão igualitária de recursos para prole e a evolução bem sucedida da gestação (Peters, 2014).

A teoria da coadaptação propõe que genes sob *imprinting* atuam de maneira integrada para potencializar o desenvolvimento fetal e a provisão dos recursos maternos (Peters, 2014). Durante o desenvolvimento, uma interação complexa ocorre entre o feto, a placenta e o hipotálamo materno. Esta interação reflete no crescimento e desenvolvimento cerebral do feto, disponibilização dos recursos maternos nos estágios pré e pós-natal e cuidado parental. A coordenação dessa interação se dá, provavelmente, pela coexpressão de genes sob *imprinting* na placenta e no hipotálamo materno (Keverne, 2014)

Genes sujeitos ao *imprinting* desempenham um importante papel no processo de coadaptação entre genitor materno e a prole, estando envolvidos no desenvolvimento da placenta e hipotálamo fetal. Da placenta provêm os recursos para o hipotálamo fetal em desenvolvimento, da qual, ao mesmo tempo, são gerados estímulos hormonais com ação no hipotálamo materno para provisão desses recursos. Os genes paternalmente expressos *PEG1* e *PEG3*, por exemplo, são coexpressos durante o desenvolvimento da placenta e hipotálamo fetal. Mutações desses genes, restritas ao tecido placentário, conduzem déficits similares quando estes mesmos genes estão alterados no hipotálamo em desenvolvimento, demonstrando que placenta e hipotálamo evoluíram coadaptativamente (Keverne, 2014)

Uma característica particular de genes sob *imprinting* é a sua organização agrupada em domínios cromossômicos. Um mesmo domínio pode agrupar genes sujeitos ao *imprinting* materno ou paterno. Esta organização repercute em uma regulação coordenada de uma série de genes em um mesmo domínio (Reik, 2001; Thorvaldsen e Bartolomei, 2007).

Os primeiros genes controlados por *imprinting* descritos foram o *igf2* (Dechiara *et al.*, 1991) e o gene a jusante *H19* (Bartolomei *et al.*, 1991), juntos eles formam o primeiro e mais bem estudado agrupamento de genes sob *imprinting*, o loco *igf2/H19*. Os genes *igf2* e *H19* são reciprocamente regulados por *imprinting* na maioria das células somáticas. Enquanto o gene *igf2* é paternalmente expresso em fatores que promovem o crescimento, o gene *H19* é maternalmente expresso na

forma de um ncRNA de 2,3kb com atividade regulatória, altamente expresso durante a embriogênese (Gabory *et al.*, 2006).

Ainda não se conhece todos os mecanismos de ação do gene H19 na regulação do gene *igf2* no loco *igf2/H19*. Contudo, microRNAs (miR-675) gerados a partir do éxon 1 do gene *H19* já foram descritos como fatores importantes no controle de genes que promovem o crescimento placentário (Keniry *et al.*, 2012).

Em humanos, o loco *IGF2/H19* mapeado na região 11p15 apresenta o mesmo padrão de *imprinting* observado no loco murino, sendo este fenômeno altamente conservado entre ambas as espécies (Ohlsson *et al.*, 1993; Rainier *et al.*, 1993).

Este loco apresenta uma região controladora de *imprinting*, conhecida como ICR1 ou *H19DMR*, a qual é essencial para o estabelecimento de *imprinting* dos genes *IGF2* e *H19*. A ICR1 apresenta diversos sítios CAGCCC (De Pagter-Holthuizen *et al.*, 1987) os quais são alvos para as proteínas dedo de zinco CTCF. Ausência de metilação na ICR1, no alelo materno, permite interação local com as proteínas CTCF, que bloqueia a transcrição do gene *IGF2*, resultando na transcrição exclusiva do gene *H19*, o qual atua diretamente no controle do crescimento. Em contrapartida, a metilação na ICR1 do alelo paterno reprime a transcrição do gene *H19*, resultando na transcrição exclusiva do gene *IGF2*, o qual atua na promoção do crescimento (Huang *et al.*, 2012).

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético importante para o estabelecimento de *imprinting* no loco *IGF2/H19*, bem como no desenvolvimento fetal normal. Uma vez que alterações no padrão de metilação desse loco estão associadas com alterações no crescimento, notoriamente observadas nas síndromes de Silver-Russel e Beckwith-Wiedemann (Jacob *et al.*, 2013).

2.5.1 Regiões diferencialmente metiladas e *Imprinting* genômico

Dentro do conceito de *imprinting*, são denominadas como regiões diferencialmente metiladas (*Differentially Methylated Regions*) ou DMRs, as regiões no DNA onde marcas de metilação diferencial entre os genomas materno e paterno são observadas. As DMRs são assinaturas epigenéticas comuns a genes sujeitos ao *imprinting* e executam um papel importante no silenciamento e expressão monoalélica origem parental-dependente (Du *et al.*, 2003; Court *et al.*, 2014).

Estas regiões compreendem sequências de DNA ricas em dinucleotídeos CpG, com perfis de metilação antagônicos entre os alelos parentais (Choufani *et al.*, 2011). O estado de hemimetilação nas DMRs são gerados por aquisição alelo-específica de um grupo metila na posição 5' da citosina em um contexto CpG (Jones, 2012).

DMRs primárias ou germinativas (gDMRs) adquirem seu estado diferencialmente metilado durante a gametogênese, por reações de metilação *de novo*, quando há segregação dos genótipos parentais (Court *et al.*, 2014). Em contrapartida DMRs secundárias ou somáticas adquirem seu estado diferencialmente metilado após a fertilização. Algumas DMRs somáticas são tecido-específicas, porém coordenadas por uma gDMR (Ferguson-Smith, 2011).

As gDMRs atuam como ICRs e, portanto, executam um papel importante na expressão monoalélica de genes sob *imprinting* dentro de um mesmo domínio cromossômico (Williamson *et al.*, 2006; Edwards e Ferguson-Smith, 2007).

Posicionalmente, existem diferenças entre gDMRs de origem materna e paterna. As gDMRs maternas localizam-se nas regiões promotoras, enquanto gDMRs paternas estão localizadas nas regiões intergênicas (Williamson *et al.*, 2006; Gregg, 2014).

As duas gDMRs mas bem estudadas em mamíferos são a ICR1 e ICR2. A ICR1 ou *H19DMR* é paternalmente metilada, enquanto a ICR2 ou *KvDMR1* é maternalmente metilada, ambas estão mapeadas na região distal do cromossomo 7 em camundongos, sintênica a banda 11p15.5 do cromossomo 11 humano. A ICR1 coordena a expressão dos genes paternalmente expressos, *Igf2*, e maternalmente expresso *H19* (Bartolomei *et al.*, 1991; Dechiara *et al.*, 1991; Feil *et al.*, 1994), enquanto ICR2 atua no controle dos genes maternalmente expressos *Kcnq1*, *Cdkn1c*, *Ascl2*, *Phlda2*, *Tssc4*, e *Slc22a1l* (Fitzpatrick *et al.*, 2002).

A ICR1 atua no loco *igf2/H19* como um elemento isolador sensível a metilação (Murrell *et al.*, 2004), a qual desempenha um papel importante na manutenção do *imprinting* recíproco dos genes *H19* e *IGF2* (Thorvaldsen *et al.*, 1998). Os genes *IGF2* e *H19* compartilham um mesmo elemento acentuador da transcrição gênica, o qual atua no loco *IGF2/H19* de modo dependente do estado de metilação da *H19DMR* (Thorvaldsen *et al.*, 1998). Em camundongos a ausência de

metilação do alelo materno na *H19DMR* promove a interação com os fatores de repressão transcricional CTCF (Bell e Felsenfeld, 2000; Schoenherr *et al.*, 2003; Szabo *et al.*, 2004).

Esta interação previne a metilação *de novo* no alelo materno, exercendo um efeito de silenciamento em *cis* de *igf2* (Lopes *et al.*, 2003; Kurukuti *et al.*, 2006). Não obstante, metilação no cromossomo paterno, impede a ligação dos fatores CTCF à ICR1, promovendo o recrutamento de acentuadores para o promotor de *igf2*, deixando o alelo *H19* livre para as reações de metilação *de novo* (Cerrato *et al.*, 2008).

Em humanos, embora este mecanismo seja conservado, o papel de CTCF na ICR1 materna parece ser insuficiente para regulação do loco *IGF2/H19* em muitos tecidos (Ulaner *et al.*, 2003).

O loco *Igf2/H19* é epigeneticamente regulado por particionamento da cromatina materna e paterna em distintas conformações que resultam em domínios de atividade e repressão transcricional (Murrell *et al.*, 2004). Em tecidos embrionários, para o gene *igf2* são descritas duas regiões paternalmente metiladas, a DMR1 localizada na região promotora, e a DMR2 com localização intergênica (Feil *et al.*, 1994; Lopes *et al.*, 2003).

Entre os alelos parentais, as DMRs de *igf2* interagem de forma distinta com a *H19DMR*. No cromossomo paterno a DMR2 interage fisicamente com a ICR1 metilada formando uma estrutura em anel nesta região cromossômica. Esta conformação cromossômica promove a interação da região promotora de *igf2* com o acentuador *H19*, resultando na transcrição exclusiva do alelo *igf2* paterno (Ling *et al.*, 2006).

Em contrapartida, no cromossomo materno, uma conformação semelhante é adquirida na cromatina através da interação da DMR1 com a ICR1 não metilada associada a proteínas CTCF. Esta interação resulta na partição da região promotora de *igf2* dentro da conformação em forma de anel adquirida pela cromatina. Esta conformação impede o acesso de fatores de transcrição ao gene *igf2*, promovendo o seu silenciamento, e conseqüentemente, a transcrição exclusiva do alelo *H19* materno (Ling *et al.*, 2006).

Deleções parciais na *H19DMR* têm sido encontradas em pacientes com fenótipo de supercrescimento. Quando associadas ao alelo materno, tais mutações resultam em um estado de hipermetilação na porção não deletada, com consequente perda de *imprinting* no loco *IGF2/H19*, e estabelecimento dos fenótipos da síndrome de Beckwith-Wiedemann (Cerrato *et al.*, 2008). Não menos importante, embora rara, deleções na *KvDMR1* ou ICR2 herdada maternalmente também foram descritas como causa da síndrome em duas gerações (Algar *et al.*, 2011).

A ICR2 está fisicamente localizada dentro de uma ilha CpG, no íntron 10 do gene *KCNQ1*. Nesta região está contido o promotor para o ncRNA *KCNQ1OT1*, o qual é paternalmente transcrito em orientação antissentido ao gene *KCNQ1* (Mancini-Dinardo *et al.*, 2003). A ICR2 desempenha um papel importante no silenciamento *in cis* dos genes maternalmente expressos *KCNQ1*, *CDKN1C*, *ASCL2*, *PHLDA2*, *TSSC4*, e *SLC22A1L* no cromossomo paterno, sendo este processo altamente conservado em humanos e modelo murino (Horike *et al.*, 2000; Fitzpatrick *et al.*, 2002).

A *KvDMR1* coordena o *imprinting* deste domínio através de mecanismos que englobam ação do ncRNA *Kcnq1ot1* e bloqueio de acentuadores (Shin *et al.*, 2008). O ncRNA *Kcnq1ot1* atua no cromossomo paterno criando um domínio de repressão transcricional, que envolve aquisição de marcas de histonas modificadas, tais como H3K9me2 e H3K27me3 (Redrup *et al.*, 2009).

A repressão transcricional na *KvDMR1* por bloqueio de acentuadores, ocorre através da ligação de fatores de repressão CTCF na *KvDMR1* no alelo não metilado (Fitzpatrick *et al.*, 2007), semelhante ao processo de regulação de *imprinting* coordenado no domínio 1 pela *H19DMR*.

Por muito tempo a estratégia para a identificação de genes controlados por *imprinting* consistiu exclusivamente em métodos baseados no fenótipo e sequenciamento de transcritos em modelo murino, com subsequente confirmação do estado de *imprinting* nos ortólogos humanos (Nakabayashi *et al.*, 2011).

Apesar de bem sucedida, esta estratégia metodológica apresenta algumas limitações, como a omissão de genes sob *imprinting* por fenótipos que são letais e ausência de polimorfismos exônicos informativos para a determinação dos perfis de expressão monoalélica (Sharp *et al.*, 2010), além de não permitir a identificação de

genes exclusivamente sujeitos ao *imprinting* em humanos (Nakabayashi *et al.*, 2011).

Somente em modelo murino são conhecidos cerca de 120 genes controlados por *imprinting*, associados com 20 DMRs primárias, sendo 17 gDMRs maternas e 3 gDMRs paternas (Proudhon *et al.*, 2012). Em humanos, o número de genes sob *imprinting* conhecidos é um pouco menor, equivalendo em número cerca de 2/3 dos genes descritos em camundongos. Entretanto, com uma maior densidade de regiões no genoma com função regulatória, as quais correspondem a 67 DMRs conhecidas, divididas em quatro categorias: 29 gDMRs materna, 2 gDMRs paterna, 15 gDMRs materna placenta-específica; e 21 DMRs secundárias (15 maternas e 6 paternas) (Okae *et al.*, 2014).

Assim como a expressão monoalélica origem parental-dependente, a metilação diferencial do DNA sob esse mesmo padrão é uma assinatura clássica de genes sujeitos ao *imprinting*, promovendo sinais regulatórios em *cis* (Choufani *et al.*, 2011).

Neste contexto, na última década, com o aprimoramento das tecnologias para a determinação dos perfis de metilação no genoma humano, através da análise de tecidos e células de origem uniparental, diversas candidatas a DMRs e consequentemente novos genes candidatos ao *imprinting* foram identificados especificamente em humanos (Sharp *et al.*, 2010; Choufani *et al.*, 2011; Nakabayashi *et al.*, 2011; Hannula-Jouppi *et al.*, 2014).

A grande vantagem dessa estratégia consiste no fato de que marcas de metilação alelo específica em genes controlados por *imprinting* são geralmente conservadas, inclusive em tecidos onde a expressão ocorre de maneira bialélica (Dockery *et al.*, 2009; Frost *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar da grande importância clínica da SD, o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos eventos de não disjunção do cromossomo 21, ainda é bastante escasso. Buscando esclarecer essas questões iniciamos em 2006 um estudo sobre a incidência da trissomia 21 no município de Campos dos Goytacazes-RJ (Alves Da Silva *et al.*, 2008). Os dados obtidos permitiram compreender a alta prevalência de indivíduos acometidos nascidos de mães jovens, distantes da faixa etária considerada de risco (>35 anos). Este fenômeno esteve, intrinsecamente, relacionado à elevada taxa de natalidade dentro de um mesmo grupo etário materno. Com esse estudo, validamos uma metodologia em citogenética molecular para o diagnóstico da trissomia 21, a qual, atualmente, está inserida na rotina do nosso laboratório. Ao longo desses anos, dentro do âmbito laboratorial, questionamentos (entre pais e os profissionais da saúde envolvidos) sobre a maior prevalência de trissomia 21 de origem materna, fatores de risco, outros que não a idade materna no momento da concepção, e o perfil altamente variável das características fenotípicas na SD têm gerado importantes discussões. Recentemente divergências no fenótipo foram observadas entre os casos de origem materna e paterna (Muranjan *et al.*, 2010), ademais, quinze genes mapeados no braço longo do cromossomo 21 humano foram preditos como candidatos ao *imprinting* (Luedi *et al.*, 2007; Docherty *et al.*, 2014). Visando uma melhor compreensão das variações na morbidade e mortalidade na SD, o presente estudo consistiu na investigação dos padrões alélicos de expressão de genes candidatos ao *imprinting* e a sua possível correlação com o viés parental na prevalência e variação fenotípica na SD.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Determinação experimental do perfil transcricional alélico em genes preditos ao *imprinting* no cromossomo 21: *KRTAP6-2*, *OLIG2*, *SIM2*, *WRB*, *IGSF5*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B*. Bem como, a identificação e caracterização de novas DMRs e seu papel no controle dos genes preditos ao *imprinting* no cromossomo 21.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Caracterizar, *in silico*, as marcas epigenéticas presentes nos genes alvos e sua possível associação com a regulação por *imprinting*.
- ✓ Selecionar SNPs exônicos potencialmente informativos nos genes alvos.
- ✓ Desenvolver um ensaio SNUPE multiplex para genotipar o SNPs selecionados.
- ✓ Determinar o perfil transcricional alélico nos genes alvos em amostras biológicas relevantes.
- ✓ Identificar novas DMRs no cromossomo 21.
- ✓ Desenvolver ensaios DESM-QFPCR para determinar o perfil de metilação nas regiões *TMEM131-DMR*, *MAP3K7CL-cDMR*, *RUNX1-DMR* e *WRB-DMR*.
- ✓ Desenvolver ensaios SNUPE-DESM para determinar o perfil de metilação alélica nas regiões *TMEM131-DMR*, *MAP3K7CL-cDMR*, *RUNX1-DMR* e *WRB-DMR*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

Este projeto faz parte da grande linha de pesquisa intitulada “*Desenvolvimento de testes moleculares rápidos, altamente eficientes e econômicos para o diagnóstico de doenças genéticas humanas: Fortalecendo a interiorização da Genética no SUS*”, cujo projeto geral foi aprovado pela Comissão Regional de Ética em Seres Humanos da Faculdade de Medicina de Campos, com folha de rosto FR278769. Todas as amostras biológicas pertencentes ao biorrepositório NUDIM foram coletadas mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos doadores, por profissional autorizado ou remetida por especialistas que colaboraram com o estudo.

5.2 Amostras biológicas

Para a determinação do perfil transcricional nos genes alvos deste estudo, foram genotipadas 30 amostras biológicas pertencentes ao biorrepositório NUDIM. Destas sete foram amostras pareadas DNA/RNA isolados de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos adultos. Foram utilizadas também amostras pareadas DNA/RNA de cinco linhagens de células-tronco embrionárias humanas: HUES-1, HES3, HUES-5, HUES-7 e HUES-15, gentilmente cedidas pela Dra. Susana Chuva de Sousa Lopes, professora associada da Leiden University Medical Center, Holanda.

Para a determinação do perfil de metilação nas regiões alvos deste estudo, foram avaliadas amostras de DNA de 21 trios com trissomia 21: sendo as amostras biológicas de 15 desses trios pertencentes ao biorrepositório da UPGEN, as quais foram cedidas pela Dra. Érika Cristina Pavarino, professora adjunta da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP; e seis destas pertencentes ao biorrepositório do Departamento de Genética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, as quais foram cedidas pela Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças, professora associada da UERJ e vice-coordenadora do Programa de Genética Humana e Aconselhamento Familiar.

5.3 Determinação da origem parental da trissomia 21

A origem parental da trissomia 21 foi determinada na coorte de estudo através da genotipagem de treze marcadores microssatélites, D21S369, D21S1993, D21S14446264, D21S14507484, D21S14591269, D21S14618215, D21S15368162, D21S11, D21S26583121, D21S226, D21S1270, IFNAR e D21S35642814, distribuídos na região 21q, através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa por fluorescência (QF-PCR). A cópia extra do cromossomo 21 foi identificada por análise de segregação alélica nos 21 núcleos familiares avaliados (trios formados por indivíduo trissômico e seus genitores), e a origem parental determinada através da correspondência da cópia extra com o genótipo do genitor de origem.

5.3.1 QF-PCR multiplex

Para a técnica de QF-PCR, foram utilizados iniciadores modificados com diferentes marcações de fluorescência. Os iniciadores sentido para os treze locos analisados foram modificados com as marcações 6-FAM™, VIC® , NED™ e PET™ (*Applied Biosystems™*). As reações de amplificação foram realizadas em dois ensaios multiplex, preparadas em um volume de 12,5µL sob a seguinte formulação: 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de TaqGold polimerase. Para o ensaio 1, foi utilizado a seguinte concentração de iniciadores descritos no apêndice A: 0,8µM dos pares de iniciadores D21S369, D21S1993, D21S11, D21S26583121, D21S226, D21S1270, IFNAR, e 0,4µM do par de iniciadores D21S35642814. Para o ensaio 2, foi utilizado a seguinte concentração de iniciadores: 0,8µM do par de iniciadores D21S14446264, 0,64µM do par de iniciadores D21S14507484, 0,32µM do par de iniciadores D21S14591269, 0,08µM do par de iniciadores D21S14618215, 1,2µM do par de iniciadores D21S15368162. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp® 9700 ou *Veriti® 96-Well VeriFlex (Applied Biosystems™)*, sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos.

Alíquotas de 0,5µL do produto de amplificação foram adicionadas a uma mistura contendo 10µL de formamida *Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems™)* e 0,1µL do peso molecular *GeneScan™ 500LIZ® Size Standard (Applied*

Biosystems[™]) e submetidas à eletroforese em capilar utilizando a plataforma *ABI 310 Applied Biosystems*[™] calibrada com a *Matrix Standard Set DS-33 Applied Biosystems*[™]. Os perfis alélicos gerados para os marcadores microssatélites na coorte de estudo foram visualizados na plataforma GeneMapper ID v3.2 ou GenoTyper v3.7 *Applied Biosystems*[™]. A origem parental da trissomia 21, foi determinada através do confronto dos perfis alélicos dos indivíduos trissômicos e seus genitores.

5.4 Identificação de polimorfismos SNPs nos genes alvos

Para a determinação do perfil alélico e transcricional dos genes alvos, foram selecionados SNPs exônicos, com variações sinônimas e não sinônimas, com base em anotações disponíveis nos bancos de dados *Ensembl Genome Browser* (<http://www.ensembl.org/index.html>, acessado em março de 2012) e *dbSNP Short Genetic Variations* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, acessado em março de 2012). Quando possível, foi obedecido os seguintes critérios no processo de seleção: i) SNPs com dados populacionais já validados; ii) pelo menos um SNP com MAF >0,4 ou dois SNPs com MAF >0,2 por gene; iii) mapeado em mais de um transcrito anotado.

5.5 Desenho e síntese de iniciadores

Os iniciadores específicos às regiões de interesse foram desenhados utilizando os programas online: *OligoPerfect*[™] *Designer da Invitrogen*[™] (<http://www.invitrogen.com/>). O potencial de formação de grampos e auto complementariedade entre os pares de iniciadores foram verificadas através das ferramentas *OligoCalc - Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>, acessado em março de 2012) e *AutoDimer Vs1* (<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>, acessado em março de 2012).

Para avaliar a complementariedade específica de cada par de iniciadores as regiões de interesse, foram utilizadas as ferramentas on-line *In Silico PCR UCSC* (*University of California Santa Cruz, USA* – <http://www.genome.ucsc.edu>, acessado em março de 2012) e *Primer-BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, acessado em março de 2012).

Os Iniciadores sem modificações foram sintetizados pela empresa DNA Express Biotecnologia, enquanto, os iniciadores modificados com a fluorescência 6-FAM foram sintetizados pela *Invitrogen™ LifeTechnologies*.

5.6 Isolamento de gDNA e RNA

A partir de 4mL de sangue total coletado em tubos de EDTA, células mononucleares foram isoladas por gradiente de *Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare)*. Amostras de gDNA e RNA foram isoladas das células mononucleares utilizando o kit de extração e purificação de DNA, RNA e proteínas *Allprep DNA RNA Protein Mini Kit (QIAGEN)*, conforme as especificações dos fabricantes.

5.7 Determinação do perfil alélico e transcricional nos genes alvos

5.7.1 PCR multiplex

Alíquotas de 25ng de gDNA foram submetidas à amplificação dos genes alvos em três reações multiplex. As reações de amplificação foram preparadas em um volume de 12,5µL sob a seguinte formulação: 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de TaqGold polimerase. Para o ensaio 1, foi utilizado a seguinte concentração de iniciadores descritos no apêndice A: 1,6µM do par *SIM2* (D1), 1,2µM do par *COL6A1* (D16), 0,8µM do par *S100B* (D20), 1,2µM do par *ATP10A* (D23); para o ensaio 2 foi utilizado a seguinte concentração de iniciadores descritos no apêndice A: 0,8µM do par *IGSF5* (D2), 1,2µM do par *KRTAP6-2* (D5), 0,8µM do par *ADARB1* (D6), 0,8µM do par *ADARB1* (D7), 0,8µM do par *ATP10A* (D24); para o ensaio 3 foi utilizado a seguinte concentração de iniciadores descritos no apêndice A: 0,8µM do par *MCM3AP* (D11), 0,2µM do par *MCM3AP* (D18), 0,8µM do par *DIP2A* (D13), 0,2µM do par *DIP2A* (D19), 1,6µM do par *OLIG2* (D17).

Para o gene *WRB*, as reações foram realizadas em uniplex em um volume de 12,5µL sob a seguinte formulação: 0,8µM do par de iniciadores *WRB* (D30) ou *WRB* (D32), descritos no apêndice A, 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold® (*LifeTechnologies*).

As reações de PCR foram realizadas nos termocicladores GeneAmp® 9700 ou Veriti® 96-Well VeriFlex (*Applied Biosystems™*), sob o seguinte ciclo térmico: (i)

95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos. Os fragmentos gerados foram analisados em gel de agarose 2% (2g de agarose/100mL de TAE 1X, w/v), corados com *GelRed*[™] (*Biotium*) conforme as especificações do fabricante, e visualizados em transluminador de U.V.

5.7.2 RT-PCR

Após isolamento, 1µg de RNA total foi convertido em cDNA utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*LifeTechnologies*) de conforme as especificações dos fabricantes. Após a transcrição reversa, uma alíquota de 1µL de cDNA foi submetida à amplificação com iniciadores específicos aos transcritos de cada gene alvo. As reações de amplificação foram preparadas em um volume de 12,5µL sob a seguinte formulação: mix de iniciadores a 0,8µM, 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase *AmpliTaq Gold*[®] (*LifeTechnologies*). As reações foram realizadas nos termocicladores *GeneAmp*[®] 9700 ou *Veriti*[®] 96-Well *VeriFlex* (*Applied Biosystems*[™]), a reação de amplificação foi realizado sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 40 ciclos à 94°C por um minuto, 60°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos. Os fragmentos gerados foram analisados em gel de agarose 2% (2g de agarose/100mL de TAE 1X), corados com *GelRed*[™] (*Biotium*) conforme as especificações do fabricante, e visualizados em transluminador de U.V. Na tabela 1 estão descritos os iniciadores para os dez genes alvos: *KRTAP6-2*, *OLIG2*, *SIM2*, *WRB*, *IGSF5*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B*; e os dois genes controles *H19* e *ATP10A*.

5.7.3 SNUPE multiplex

A técnica SNUPE foi realizada utilizando o kit comercial *ABI PRISM[®] SNaPshot[™] Multiplex Kit*. O kit *ABI PRISM[®] SNaPshot[™] Multiplex* consiste em um mix com DNA polimerase AmpliTaq[®] e ddNTPs modificados, ddATP-dR6G, ddCTP-dTAMRA[™], ddGTP-dR110 e ddTTP-dROX[™] em solução tampão.

Para determinação do perfil alélico e transcricional, os fragmentos gerados por PCR e RT-PCR foram purificados, com *ExoSAP-IT USB*, um mix das enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina. Para cada alíquota de 5µL dos produtos de amplificação foram adicionados 2µL de *ExoSAP-IT*. As reações foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700 (*Applied Biosystems[™]*) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. Após purificação, reações de SNUPE multiplex foram realizados em um volume final de 5µL sob a seguinte formulação: 1µL do produto de amplificação purificado com *ExoSAP-IT*, 0,4µM de cada iniciador, *SNaPshot[™] reaction mix* 1X. As reações SNUPE multiplex foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700 (*Applied Biosystems[™]*) sob o seguinte ciclo térmico repetido 25 vezes: (i) 96°C por 10 segundos, (ii) 50°C por 5 segundos e (iii) 60°C por 30 segundos. Ao término dos ensaios SNUPE multiplex foi realizada uma segunda etapa de purificação utilizando a enzima fosfatase alcalina *FastAP[™] Thermo Scientific[™]*, aos produtos do minissequenciamento foram adicionados 1U de *FastAP[™]*, e as reações de purificação foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700 (*Applied Biosystems[™]*) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 10 minutos e 80°C por 5 minutos. Alíquotas de 0,5µL do produto purificado foram adicionadas a uma mistura contendo 10µL de formamida *Hi-Di[™]Formamide* (*Applied Biosystems[™]*) e 0,2µL do peso molecular *GeneScan[™] 120LIZ[®] Size Standard* (*Applied Biosystems[™]*) e submetidas à eletroforese em capilar utilizando a plataforma *ABI 310 Applied Biosystems[™]* calibrada com a *Matrix Standard Set DS-02 Applied Biosystems[™]*. Os perfis alélicos e transcricionais gerados foram visualizados na plataforma GeneMapper ID v3.2 *Applied Biosystems[™]*. Foram considerados como perfis transcricionais bialélicos, a manutenção de heterozigose em amostras pareadas DNA/cDNA de um mesmo indivíduo. Perda da heterozigose em amostras de cDNA, em análises pareadas DNA/cDNA de um mesmo indivíduo, caracterizaram o perfil transcricional monoalélico.

5.8 Identificação de regiões diferencialmente metiladas no cromossomo 21

Na plataforma de visualização UCSC Browser (<https://genome.ucsc.edu/index.html>, acessado em janeiro de 2015), foi criada uma seção customizada constituída de 62 projetos metilomas de diferentes tecidos e linhagens celulares humanas. A esta seção customizada foram adicionadas informações da localização de regiões promotoras e ilhas CpG, sítios para elementos regulatórios, sítios de restrição para enzimas sensíveis à metilação, assinaturas epigenéticas em histonas associadas à ativação e repressão gênica, e polimorfismos SNPs. Adicionalmente, esta seção foi calibrada com informações de quatro pontos de interseção de hemimetilação entre quatro diferentes projetos metilomas: CD133HSC-Neutrófilo; IMR90-Linfócito B; Neutrófilo-IMR90; Linfócito B-Neutrófilo, que foram utilizados como indicadores, *in silico*, de regiões candidatas a regiões diferencialmente metiladas no cromossomo 21.

5.8.1 Análise *in silico*

Em uma janela de detecção fixa de 5Mb, foi realizada uma varredura de todo o cromossomo 21 em busca de regiões candidatas a regiões diferencialmente metiladas (cDMRs). A interseção de perfis de hemimetilação em pelo menos um ponto, dos quatro cenários possíveis, CD133HSC-Neutrófilo; IMR90-Linfócito B; Neutrófilo-IMR90; Linfócito B-Neutrófilo, foi utilizada como parâmetro de pré-seleção das novas cDMRs. Em uma janela de 40Kb, foi realizada a caracterização qualitativa das cDMRs pré-selecionadas na primeira etapa com base no estado quantitativo de metilação para todos os 62 projetos metilomas. Foram utilizados como critérios de exclusão: (i) hemimetilação em linhagem germinativa (espermatozoide/oócito), e (ii) desvio do perfil de hemimetilação em pelo menos 11% dos metilomas referência avaliados.

5.9 Determinação do estado de metilação pontual na *WRB-DMR*, *MAP3K7CL-cDMR*, *TMEM131-DMR* e *RUNX1-DMR*

Para a determinação do estado de metilação pontual nas regiões *WRB-DMR*, *MAP3K7CL-cDMR*, *TMEM131-DMR* e *RUNX1-DMR* foram desenvolvidos ensaios de digestão enzimática sensível a metilação associada a PCR quantitativa por fluorescência – DESM-QFPCR, descrita por Machado (2012).

5.9.1 DESM-QFPCR

O ensaio DESM-QFPCR, consiste na amplificação multilocos (QFPCR), de dois locos controles de digestão enzimática, um controle positivo (CP) com sítios de restrição a enzimas sensíveis a metilação, e um controle negativo (CN) sem sítios de restrição, e um loco alvo, a ser investigado o estado de metilação, em amostras tratadas (ensaio teste) e não tratadas (ensaio referência) com enzimas de restrição sensíveis a metilação (DESM). O percentual de metilação no loco alvo pode ser quantificado em unidades relativas de fluorescência em relação ao loco CN, pela razão entre os valores de área de cada fragmento nos ensaios teste e referência.

Como controle positivo foi utilizado uma região abrangendo 248-249pb no gene *ESCO2*, sabidamente desmetilada, contendo quatro sítios HhaI, um sítio BstUI, e um sítio HpaII. O fragmento controle foi escolhido com base na posição física da sonda controle de digestão *ESCO2* presente no kit comercial *SALSA MLPA® ME030 BWS/RSS probemix (MRC Holland)*. Como controle negativo foi utilizada uma região de 269-271pb no gene *WRB* (21q22.2) sem sítios de restrição para as enzimas HhaI, BstUI e HpaII. Na *WRB-DMR* foi investigado o estado de metilação de nove sítios CpG-HhaI em um fragmento de 254pb na CpG:27 do gene *WRB*. Na *MAP3K7CL-cDMR* foi investigado o estado de metilação de um total de cinco sítios CpG-HhaI, dois sítios em um fragmento de 255pb e três sítios em um fragmento de 253pb, ambos na CpG:41 do gene *MAP3K7CL*. Na *TMEM131-DMR cDMR* foi investigado o estado de metilação de dois sítios CpG-HpaII na região intrônica do gene *TMEM131*. Na *RUNX1-DMR* foi investigado o estado de metilação de quatro sítios CpG-HhaI em um fragmento de 253pb na CpG:53 do gene *RUNX1*. Para realização dos ensaios QFPCR, os iniciadores sentido para os locos CP, CN, *WRB-DMR*, *MAP3K7CL-DMR*, *TMEM131-DMR* e *RUNX1-DMR* receberam a modificação 6-FAM na posição 5'.

5.9.1.1 DESM-QFPCR para o fragmento 254_ *WRB-DMR*

Reações DESM foram preparadas em volume final de 10µL, contendo 200ng de DNA, tampão CutSmart® 1X, e 6U de HhaI CutSmart® (*New England Biolabs*), as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems™*) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 65°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 1µL do DNA digerido foi submetida à amplificação por QFPCR. A reação de amplificação foi preparada em

volume final de 12,5µL sob a seguinte formulação dos iniciadores descritos no apêndice A: 0,8 µM do par de iniciadores *ESCO2* (CP), 0,8 µM do par de iniciadores *WRB* (CN), 0,8 µM do par de iniciadores *WRB-DMR* (D35), 1M de betaína (*SIGMA-ALDRICH*[®]), 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold[®] (*LifeTechnologies*). Para cada ensaio teste, foi preparado um ensaio referência, onde não foi adicionado a enzima de restrição HhaI. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp[®] 9700 ou Veriti[®] 96-Well VeriFlex (*Applied Biosystems*[™]), a reação de amplificação foi realizado sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos.

5.9.1.2 DESM-QFPCR para o fragmento 255_ *MAP3K7CL-cDMR*

Reações DESM foram preparadas em volume final de 10µL, contendo 200ng de DNA, tampão CutSmart[®] 1X, e 6U de HhaI CutSmart[®] (*New England Biolabs*), as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700 (*Applied Biosystems*[™]) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 65°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 1µL do DNA digerido foi submetida à amplificação por QFPCR. A reação de amplificação foi preparada em volume final de 12,5µL sob a seguinte formulação dos iniciadores descritos no apêndice A: 0,2µM do par de iniciadores *ESCO2* (CP), 0,64 µM do par de iniciadores *WRB* (CN), 1,2 µM do par de iniciadores *MAP3K7CL-cDMR* (D38), 1M de betaína (*SIGMA-ALDRICH*[®]), 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold[®] (*LifeTechnologies*). Para cada ensaio teste, foi preparado um ensaio referência, onde não foi adicionado a enzima de restrição HhaI. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp[®] 9700 ou Veriti[®] 96-Well VeriFlex (*Applied Biosystems*[™]), a reação de amplificação foi realizada sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 63°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos.

5.9.1.3 DESM-QFPCR para o fragmento 253_ *MAP3K7CL-cDMR*

Reações DESM foram preparadas em volume final de 10µL, contendo 200ng de DNA, tampão CutSmart[®] 1X, e 6U de HhaI CutSmart[®] (*New England Biolabs*), as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700

(*Applied Biosystems*[™]) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 65°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 1µL do DNA digerido foi submetida à amplificação por QFPCR. A reação de amplificação foi preparada em volume final de 12,5µL sob a seguinte formulação dos iniciadores descritos no apêndice A: 0,64µM do par de iniciadores *ESCO2* (CP), 0,4 µM do par de iniciadores *WRB* (CN), 0,64 µM do par de iniciadores *MAP3K7CL-cDMR* (D37), 1M de betaína (*SIGMA-ALDRICH*[®]), 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold[®] (*LifeTechnologies*). Para cada ensaio teste, foi preparado um ensaio referência, onde não foi adicionado a enzima de restrição HhaI. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp[®] 9700 ou *Veriti*[®] 96-Well *VeriFlex* (*Applied Biosystems*[™]), a reação de amplificação foi realizada sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos.

5.9.1.4 DESM-QFPCR para o fragmento 253_ *TMEM131-DMR*

Reações DESM foram preparadas em volume final de 10µL, contendo 200ng de DNA, tampão CutSmart[®] 1X, e 3U de HpaII CutSmart[®] (*New England Biolabs*), as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700 (*Applied Biosystems*[™]) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 80°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 1µL do DNA digerido foi submetida à amplificação por QFPCR. A reação de amplificação foi preparada em volume final de 12,5µL sob a seguinte formulação dos iniciadores descritos no apêndice A: 0,64µM do par de iniciadores *ESCO2* (CP), 0,96 µM do par de iniciadores *WRB* (CN), 0,8 µM do par de iniciadores *TMEM131-DMR* (D48), 1M de betaína (*SIGMA-ALDRICH*[®]), 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold[®] (*LifeTechnologies*). Para cada ensaio teste, foi preparado um ensaio referência, onde não foi adicionado a enzima de restrição HpaII. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp[®] 9700 ou *Veriti*[®] 96-Well *VeriFlex* (*Applied Biosystems*[™]), a reação de amplificação foi realizada sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos.

5.9.1.5 DESM-QFPCR para o fragmento 253_RUNX1-DMR

Reações DESM foram preparadas em volume final de 10µL, contendo 200ng de DNA, tampão CutSmart® 1X, e 6U de HhaI CutSmart® (*New England Biolabs*), as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems*™) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 65°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 1µL do DNA digerido foi submetida à amplificação por QFPCR. A reação de amplificação foi preparada em volume final de 12,5µL sob a seguinte formulação dos iniciadores descritos no apêndice A: 0,2µM do par de iniciadores ESCO2 (CP), 0,2 µM do par de iniciadores WRB (CN), 2µM do par de iniciadores RUNX1-DMR (D43), 1M de betaína (*SIGMA-ALDRICH*®), 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold® (*LifeTechnologies*). Para cada ensaio teste, foi preparado um ensaio referência, onde não foi adicionado a enzima de restrição HhaI. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp® 9700 ou Veriti® 96-Well VeriFlex (*Applied Biosystems*™), a reação de amplificação foi realizada sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos.

Alíquotas de 0,5µL do produto de amplificação foram adicionadas a uma mistura contendo 10µL de formamida *Hi-Di*™ *Formamide* (*Applied Biosystems*™) e 0,1µL do peso molecular *GeneScan*™ *500LIZ*® *Size Standard* (*Applied Biosystems*™) e submetidas à eletroforese em capilar utilizando a plataforma *ABI 310 Applied Biosystems*™ calibrada com a *Matrix Standard Set DS-33 Applied Biosystems*™. Os perfis alélicos gerados para os ensaios teste e referência foram visualizados na plataforma *GeneMapper ID v3.2 Applied Biosystems*™.

O estado de metilação das regiões alvos foi calculado através da razão das áreas de cada alelo amplificado, nos ensaios teste e referência. O fator de correção foi aplicado de acordo como descrito por Busque e colaboradores (2009).

5.9.2 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados das triplicatas dos ensaios de DESM-QFPCR, foi utilizado o software *GraphPad Prism v5.01*. Análise da variância (ANOVA) foi realizada por meio do teste de Tukey, a 5% de significância. Para análises pareadas entre dois grupos foi aplicado o teste T-student, com intervalo de confiança de 95%.

5.10 Determinação do estado de metilação alélica na *WRB-DMR*, *MAP3K7CL-cDMR*, *TMEM131-DMR* e *RUNX1-DMR*

Para determinação do estado de metilação alélica, os polimorfismos, rs2299739 e rs2244352 mapeados na *WRB-DMR*, rs2853831 mapeado na *MAP3K7CL-cDMR*, rs2044458 e rs6760008 mapeados na *TMEM131-DMR* e rs8126699 mapeado *RUNX1-DMR*, foram genotipados por SNUPE após reações de DESM-PCR das regiões alvos.

5.10.1 DESM-PCR e SNUPE na *WRB-DMR*

Reações DESM foram preparadas em volume final de 10 μ L, contendo 200ng de DNA, tampão CutSmart[®] 1X, e 6U de HhaI CutSmart[®] (*New England Biolabs*), as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700 (*Applied Biosystems*[™]) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 65°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 1 μ L do DNA digerido foi submetida à amplificação das regiões que flanqueiam os polimorfismos rs2299739 e rs2244352. Nesse ensaio foi utilizada uma versão sem modificação FAM para amplificação do fragmento *254_WRB-DMR* (descrito no apêndice A). A reação de amplificação foi preparada em volume final de 12,5 μ L sob a seguinte formulação: 0,8 μ M do par de iniciadores *WRB-DMR* (D35), 1M de betaína (*SIGMA-ALDRICH*[®]), 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold[®] (*LifeTechnologies*). Para cada ensaio teste, foi preparado um ensaio referência, onde não foi adicionado a enzima de restrição HhaI. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp[®] 9700 ou *Veriti*[®] 96-Well *VeriFlex* (*Applied Biosystems*[™]), a reação de amplificação foi realizada sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos. Após amplificação, para cada alíquota de 5 μ L dos produtos de amplificação foram adicionados 2 μ L de *ExoSAP-IT*. As reações de purificação foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700 (*Applied Biosystems*[™]) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. Após purificação, reações de SNUPE multiplex foram realizados em um volume final de 5 μ L sob a seguinte formulação: 1 μ L do produto de amplificação purificado, 0,4 μ M do mix dos iniciadores rs2299739 (S37) e rs2244352 (S40), descritos no apêndice A, e *SNaPshot*[™] *reaction mix* 1X. As reações SNUPE multiplex foram realizadas no termociclador

GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems*™) sob o seguinte ciclo térmico repetido 25 vezes: (i) 96°C por 10 segundos, (ii) 50°C por 5 segundos e (iii) 60°C por 30 segundos. Ao término dos ensaios SNuPE multiplex foi realizada uma segunda etapa de purificação utilizando a enzima fosfatase alcalina *FastAP*™ *Thermo Scientific*™, aos produtos do minissequenciamento foram adicionados 1U de *FastAP*™, e as reações de purificação foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems*™) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 10 minutos e 80°C por 5 minutos.

5.10.2 DESM-PCR e SNuPE na *MAP3K7CL-DMR*

Reações DESM foram preparadas em volume final de 10µL, contendo 200ng de DNA, tampão CutSmart® 1X, e 6U de HhaI CutSmart® (*New England Biolabs*), as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems*™) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 65°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 1µL do DNA digerido foi submetida à amplificação da região que flanqueia o polimorfismo rs2853831. Nesse ensaio foi utilizada uma versão sem modificação FAM para amplificação do fragmento *255_MAP3K7CL-cDMR* (descrito no apêndice A). A reação de amplificação foi preparada em volume final de 12,5µL sob a seguinte formulação: 0,8µM do par de iniciadores *MAP3K7CL-cDMR* (D38), 1M de betaína (*SIGMA-ALDRICH*®), 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold® (*Life Technologies*). Para cada ensaio teste, foi preparado um ensaio referência, onde não foi adicionado a enzima de restrição HhaI. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp® 9700 ou *Veriti*® *96-Well VeriFlex* (*Applied Biosystems*™), a reação de amplificação foi realizada sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 63°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos. Após amplificação, para cada alíquota de 5µL dos produtos de amplificação foram adicionados 2µL de *ExoSAP-IT*. As reações de purificação foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems*™) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. Após purificação, reações de SNuPE multiplex foram realizadas em um volume final de 5µL sob a seguinte formulação: 1µL do produto de amplificação purificado, 0,4µM do iniciador rs2853831 (S42), descrito no apêndice A, e *SNaPshot*™ *reaction mix* 1X. As

reações SNuPE multiplex foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems*™) sob o seguinte ciclo térmico repetido 25 vezes: (i) 96°C por 10 segundos, (ii) 50°C por 5 segundos e (iii) 60°C por 30 segundos. Ao término dos ensaios SNuPE multiplex foi realizada uma segunda etapa de purificação utilizando a enzima fosfatase alcalina *FastAP*™ *Thermo Scientific*™, aos produtos do minissequenciamento foram adicionados 1U de *FastAP*™, e as reações de purificação foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems*™) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 10 minutos e 80°C por 5 minutos.

5.10.3 DESM-PCR e SNuPE na *TMEM131-DMR*

Reações DESM foram preparadas em volume final de 10µL, contendo 200ng de DNA, tampão CutSmart® 1X, e 6U de HpaII CutSmart® (*New England Biolabs*), as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems*™) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 80°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 1µL do DNA digerido foi submetida à amplificação das regiões que flanqueiam os polimorfismos rs2044458 e rs6760008. Nesse ensaio foi utilizada uma versão sem modificação FAM, para amplificação o fragmento *499_WRB-DMR*. A reação de amplificação foi preparada em volume final de 12,5µL sob a seguinte formulação: 0,8µM do par de iniciadores *TMEM131-DMR* (D49), descrito no apêndice A, 1M de betaína (*SIGMA-ALDRICH*®), 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold® (*LifeTechnologies*). Para cada ensaio teste, foi preparado um ensaio referência, onde não foi adicionado a enzima de restrição HpaII. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp® 9700 ou *Veriti*® *96-Well VeriFlex* (*Applied Biosystems*™), a reação de amplificação foi realizada sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos. Após amplificação, para cada alíquota de 5µL dos produtos de amplificação foram adicionados 2µL de *ExoSAP-IT*. As reações de purificação foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems*™) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. Após purificação, reações de SNuPE multiplex foram realizadas em um volume final de 5µL sob a seguinte formulação: 1µL do produto de amplificação purificado, 0,4µM do mix dos iniciadores

rs6760008 (S52) e rs2044458 (S53), descritos no apêndice A, e *SNaPshot™ reaction mix 1X*. As reações SNUPE multiplex foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems™*) sob o seguinte ciclo térmico repetido 25 vezes: (i) 96°C por 10 segundos, (ii) 50°C por 5 segundos e (iii) 60°C por 30 segundos. Ao término dos ensaios SNUPE multiplex foi realizada uma segunda etapa de purificação utilizando a enzima fosfatase alcalina *FastAP™ Thermo Scientific™*, aos produtos do minissequenciamento foram adicionados 1U de *FastAP™*, e as reações de purificação foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems™*) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 10 minutos e 80°C por 5 minutos.

5.10.4 DESM-PCR e SNUPE na *RUNX1-DMR*

Reações DESM foram preparadas em volume final de 10µL, contendo 200ng de DNA, tampão CutSmart® 1X, e 6U de HhaI CutSmart® (*New England Biolabs*), as reações de digestão enzimática foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems™*) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 120 minutos e 65°C por 20 minutos. Após digestão, uma alíquota de 1µL do DNA digerido foi submetida à amplificação da região que flanqueia o polimorfismo rs8126699. Nesse ensaio foi utilizada uma versão sem modificação FAM para amplificação do fragmento *636_RUNX1-DMR*. A reação de amplificação foi preparada em volume final de 12,5µL sob a seguinte formulação: 0,8µM do par de iniciadores *RUNX1-DMR* (D44), descrito no apêndice A, 1M de betaína (*SIGMA-ALDRICH®*), 0,2mM de dNTPs, 15mM de Tris-HCl, 50mM KCl, 2mM de MgCl₂, 1,25U de DNA polimerase AmpliTaq Gold® (*Life Technologies*). Para cada ensaio teste, foi preparado um ensaio referência, onde não foi adicionado a enzima de restrição HhaI. As reações foram realizadas nos termocicladores GeneAmp® 9700 ou Veriti® 96-Well VeriFlex (*Applied Biosystems™*), a reação de amplificação foi realizada sob o seguinte ciclo térmico: (i) 95°C por 11 minutos, (ii) 28 ciclos à 94°C por um minuto, 59°C por um minuto, 72°C por um minuto, e (iii) 60°C por 60 minutos. Após amplificação, para cada alíquota de 5µL dos produtos de amplificação foram adicionados 2µL de *ExoSAP-IT*. As reações de purificação foram realizadas no termociclador GeneAmp® 9700 (*Applied Biosystems™*) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. Após purificação, reações de SNUPE multiplex foram realizadas em um volume final de 5µL sob a seguinte formulação: 1µL do produto de

amplificação purificado, 0,4 μ M do iniciador rs8126699 (S50), descrito no apêndice A, e *SNaPshot*[™] *reaction mix* 1X. As reações SNUPE multiplex foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700 (*Applied Biosystems*[™]) sob o seguinte ciclo térmico repetido 25 vezes: (i) 96°C por 10 segundos, (ii) 50°C por 5 segundos e (iii) 60°C por 30 segundos. Ao término dos ensaios SNUPE multiplex foi realizada uma segunda etapa de purificação utilizando a enzima fosfatase alcalina *FastAP*[™] *Thermo Scientific*[™], aos produtos do minissequenciamento foram adicionados 1U de *FastAP*[™], e as reações de purificação foram realizadas no termociclador GeneAmp[®] 9700 (*Applied Biosystems*[™]) sob a seguinte condição térmica: 37°C por 10 minutos e 80°C por 5 minutos.

Alíquotas de 0,5 μ L dos ensaios SNUPE foram adicionadas a uma mistura contendo 10 μ L de formamida *Hi-Di*[™] *Formamide* (*Applied Biosystems*[™]) e 0,2 μ L do peso molecular *GeneScan*[™] *120LIZ*[®] *Size Standard* (*Applied Biosystems*[™]) e submetidas à eletroforese em capilar utilizando a plataforma *ABI 310 Applied Biosystems*[™] calibrada com a *Matrix Standard Set DS-02 Applied Biosystems*[™]. Os perfis alélicos e transcricionais gerados foram visualizados na plataforma *GeneMapper ID v3.2 Applied Biosystems*[™]. O estado de metilação alélica foi determinado através de análise pareada dos perfis alélico determinados para os polimorfismos *WRB-DMR*, rs2853831 mapeado na *MAP3K7CL-cDMR*, rs2044458 e rs6760008 mapeados na *TMEM131-DMR* e rs8126699 mapeado *RUNX1-DMR*, em amostras tratadas e não tratadas com as enzimas de restrição sensíveis a metilação HhaI e HpaII. Em condições ótimas as enzimas HhaI e HpaII clivam apenas DNA não metilado, neste contexto, a manutenção de heterozigose em amostras tratadas foram considerados como locos com metilação alélica recíproca. Perdas de heterozigose em amostras tratadas foram consideradas como locos com metilação alelo-específica.

6. RESULTADOS

6.1 Caracterização de marcas epigenéticas nos genes alvos.

Utilizando as duas seções customizadas criadas na plataforma UCSC Browser, os perfis de metilação e modificações em proteínas histonas foram caracterizados para os genes alvos: *KRTAP6-2*, *SIM2*, *IGSF5*, *S100B*, com predição de *imprinting* paterno; e *OLIG2*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A*, predição de *imprinting* materno. Na seção 1, as marcas epigenéticas nos genes alvos foram determinadas através de dados de seis estudos metilomas disponíveis na plataforma UCSC: espermatozoide, oócitos, blastocisto, células embrionárias, células sanguíneas e tecido cerebral. Na seção 2, foram analisadas nos genes alvos as modificações pós-traducionais em proteínas histonas por processos de acetilação e metilação. Foram avaliadas 22 modificações de histonas: H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac, associadas com promotores ativos, e H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3, associadas com repressão transcricional.

Nesta análise *in silico* integrada, das seções de metiloma e código de histonas na plataforma UCSC, não foram encontradas assinaturas de hemimetilação ou enriquecimento de marcas repressivas em proteínas histonas que corroborassem com os padrões de *imprinting* preditos para os genes *KRTAP6-2*, *OLIG2*, *SIM2*, *IGSF5*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A*, *S100B* (figuras 1-9).

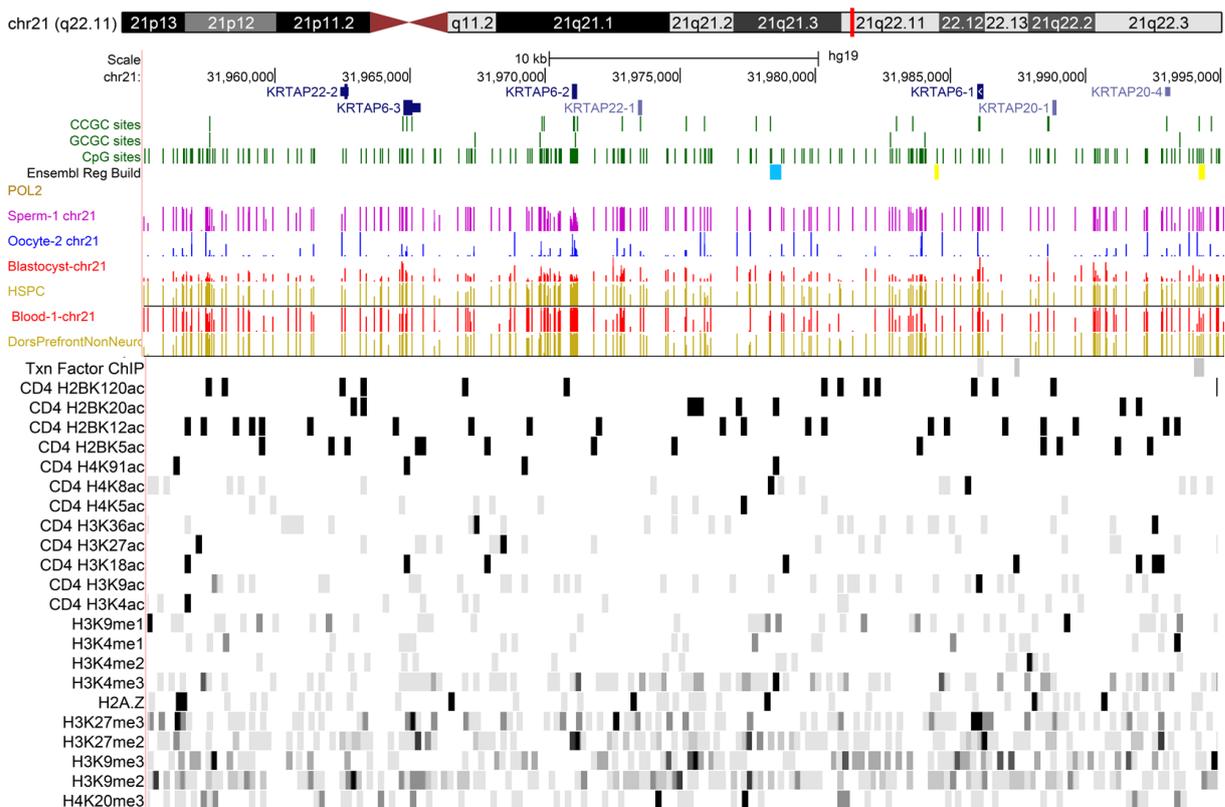


Figura 1. Visualização das marcas epigenéticas do gene *KRTAP6-2*. Imagem customizada no Browser da UCSC por meta-análise de estudos de epigenômica. Na porção superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. A barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição do gene *KRTAP6-2* na região 21q22.11. Na cor azul, está representado o transcrito do gene *KRTAP6-2*. Abaixo em verde, os sítios CpG identificados na região em uma janela de 40kb (sítios CpG-HpaII, CpG-HhaI, e CpG, respectivamente). Abaixo regiões envolvidas na regulação gênica: em azul turquesa sítios ativos de ligação para a proteína CTCF, um regulador transcricional (ativador/repressor), em amarelo regiões de cromatina aberta. Na porção mediana as barras coloridas representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa, a metilação em espermatozoide. Na cor azul, a metilação em oócitos. Na cor vermelha, a metilação em blastocisto e tecido sanguíneo. Na cor amarela, a metilação em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Na porção inferior, histonas modificadas por acetilação e metilação associadas com perfis transcricionais ativo (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac) e reprimido (H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3).

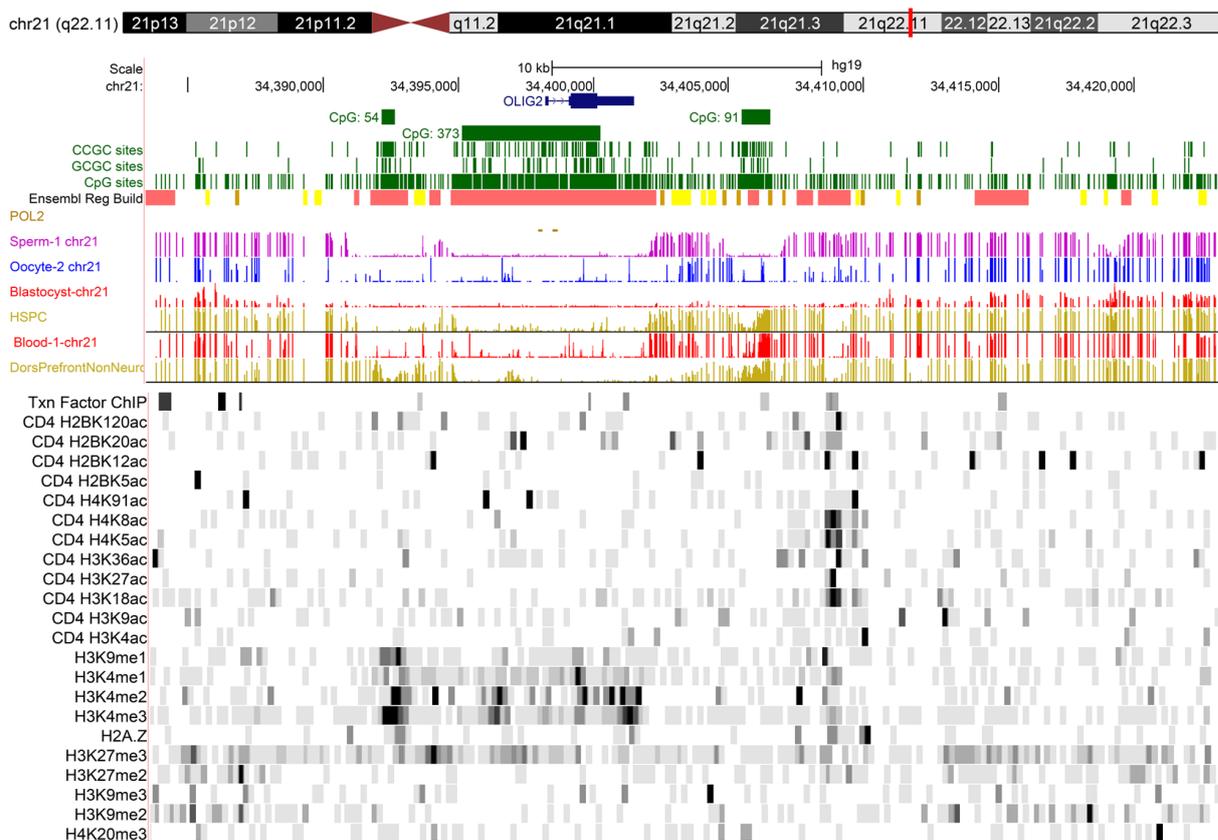


Figura 2. Visualização das marcas epigenéticas do gene *OLIG2*. Imagem customizada no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Na porção superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. A barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição do gene *OLIG2* na região 21q22.11. Na cor azul está representado o transcrito do gene *OLIG2*. A transcrição do gene ocorre na fita positiva do DNA. Abaixo nas cores verdes, estão representadas as ilhas CpGs: 54, 373 e 91, e os sítios CpG identificados na região em uma janela de 40kb (sítios CpG-HpaII, CpG-HhaI, e CpG, respectivamente). Abaixo regiões envolvidas na regulação gênica: em rosa regiões flangeadoras aos promotores preditos, em amarelo escuro sítios de ligação a fatores de transcrição, em amarelo claro regiões de cromatina aberta. Em marrom, coincidindo com a ilha CpG:373 sítios de ligação da RNA polimerase que indicam atividade de transcrição. Na porção mediana as barras coloridas representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa, a metilação em espermatozoide. Na cor azul, a metilação em oócitos. Na cor vermelha, a metilação em blastocisto e tecido sanguíneo. Na cor amarela, a metilação em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Na porção inferior, histonas modificadas por acetilação e metilação associadas com perfis transcricionais ativo (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac) e reprimido (H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3). A região promotora do gene *OLIG2* apresenta-se hipometilada, sem enriquecimento de marcas histonas associadas à repressão transcricional.

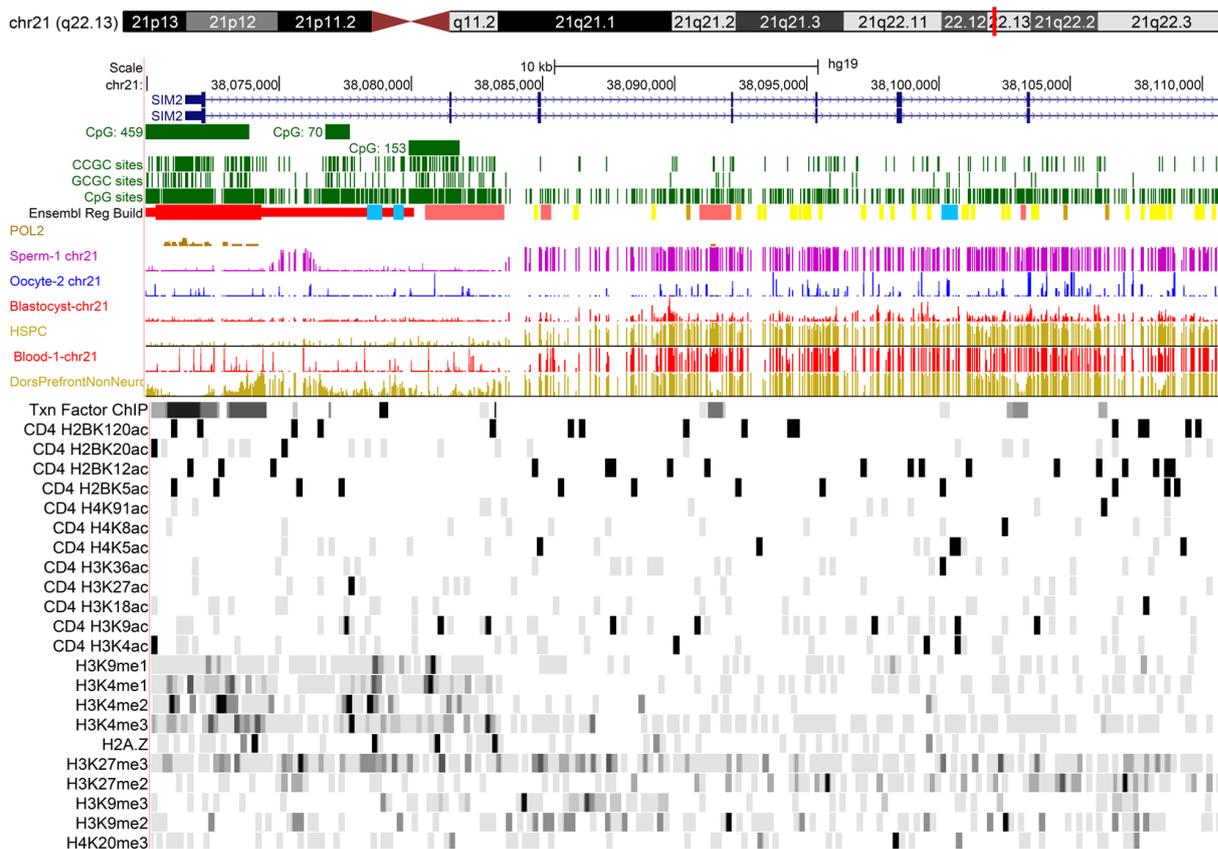


Figura 3. Visualização das marcas epigenéticas do gene *SIM2*. Imagem customizada no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Na porção superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. A barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição do gene *SIM2* na região 21q22.13. Na cor azul estão representados os transcritos variantes do gene *SIM2*. A transcrição do gene ocorre na fita positiva do DNA. Abaixo nas cores verdes, estão representadas as ilhas CpGs: 459, 70 e 153, e os sítios CpG identificados na região em uma janela de 40kb (sítios CpG-HpaII, CpG-HhaI, e CpG, respectivamente). Abaixo regiões envolvidas na regulação gênica: em vermelho região promotora predita, em azul turquesa sítios ativos de ligação para a proteína CTCF, um regulador transcricional (ativador/repressor), em rosa regiões flanqueadores aos promotores preditos, em amarelo escuro sítios de ligação a fatores de transcrição, em amarelo claro regiões de cromatina aberta. Em marrom, coincidindo com a ilha CpG:459 sítios de ligação da RNA polimerase que indicam atividade de transcrição. Na porção mediana as barras coloridas representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa, a metilação em espermatozoide. Na cor azul, a metilação em oócitos. Na cor vermelha, a metilação em blastocisto e tecido sanguíneo. Na cor amarela, a metilação em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Na porção inferior, histonas modificadas por acetilação e metilação associadas com perfis transcricionais ativo (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac) e reprimido (H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3). A região promotora do gene *SIM2* apresenta-se hipometilada, com enriquecimento de marcas histonas associadas à atividade transcricional, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3.

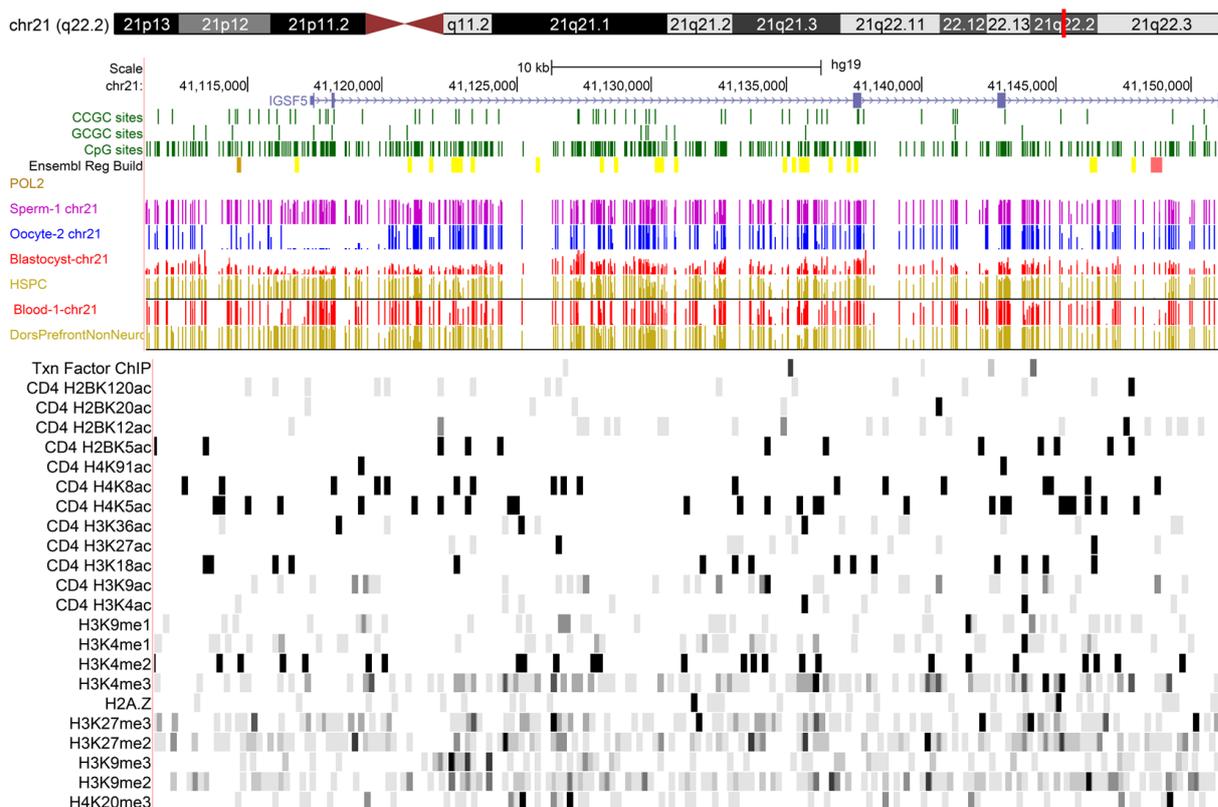


Figura 4. Visualização das marcas epigenéticas do gene *IGSF5*. Imagem customizada no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Na porção superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. A barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição do gene *IGSF5* na região 21q22.2. Na cor azul, está representado o transcrito do gene *IGSF5*. A transcrição do gene ocorre na fita positiva do DNA. Abaixo em verde, os sítios CpG identificados na região em uma janela de 40kb (sítios CpG-HpaII, CpG-HhaI, e CpG, respectivamente). Abaixo regiões envolvidas na regulação gênica: em amarelo escuro sítios de ligação a fatores de transcrição, em amarelo claro regiões de cromatina aberta. Na porção mediana as barras coloridas representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa, a metilação em espermatozoide. Na cor azul, a metilação em oócitos. Na cor vermelha, a metilação em blastocisto e tecido sanguíneo. Na cor amarela, a metilação em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Na porção inferior, histonas modificadas por acetilação e metilação associadas com perfis transcricionais ativo (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac) e reprimido (H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3).

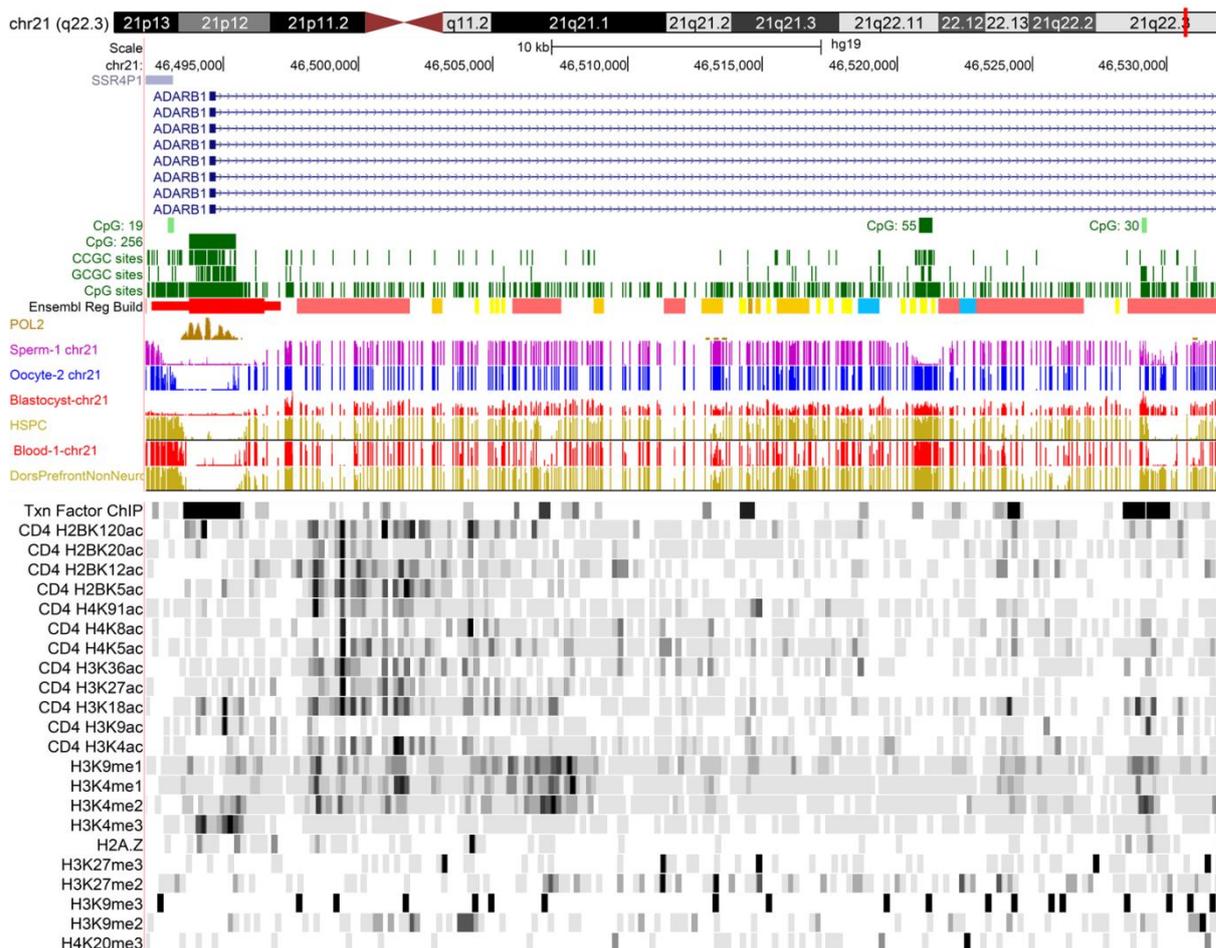


Figura 5. Visualização das marcas epigenéticas do gene *ADARB1*. Imagem customizada no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Na porção superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. A barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição do gene *ADARB1* na região 21q22.3. Na cor azul estão representados os transcritos variantes do gene *ADARB1*. A transcrição do gene ocorre na fita positiva do DNA. Abaixo nas cores verdes, estão representadas as ilhas CpGs: 19, 256, 55 e 30, e os sítios CpG identificados na região em uma janela de 40kb (sítios CpG-HpaII, CpG-HhaI, e CpG, respectivamente). Abaixo regiões envolvidas na regulação gênica: em vermelho região promotora predita, em azul turquesa sítios ativos de ligação para a proteína CTCF, um regulador transcricional (ativador/repressor), em rosa regiões flangeadores aos promotores preditos, em amarelo escuro sítios de ligação a fatores de transcrição, em amarelo claro regiões de cromatina aberta. Em marrom, coincidindo com a ilha CpG:256 sítios de ligação da RNA polimerase que indicam atividade de transcrição. Na porção mediana as barras coloridas representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa, a metilação em espermatozoide. Na cor azul, a metilação em oócitos. Na cor vermelha, a metilação em blastocisto e tecido sanguíneo. Na cor amarela, a metilação em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Na porção inferior, histonas modificadas por acetilação e metilação associadas com perfis transcricionais ativo (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac) e reprimido (H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3). A região promotora do gene *ADARB1* apresenta-se hipometilada, com enriquecimento de marcas histonas associadas à atividade transcricional, H2BK120ac, H3K18ac, H3K9ac e H3K4me3.

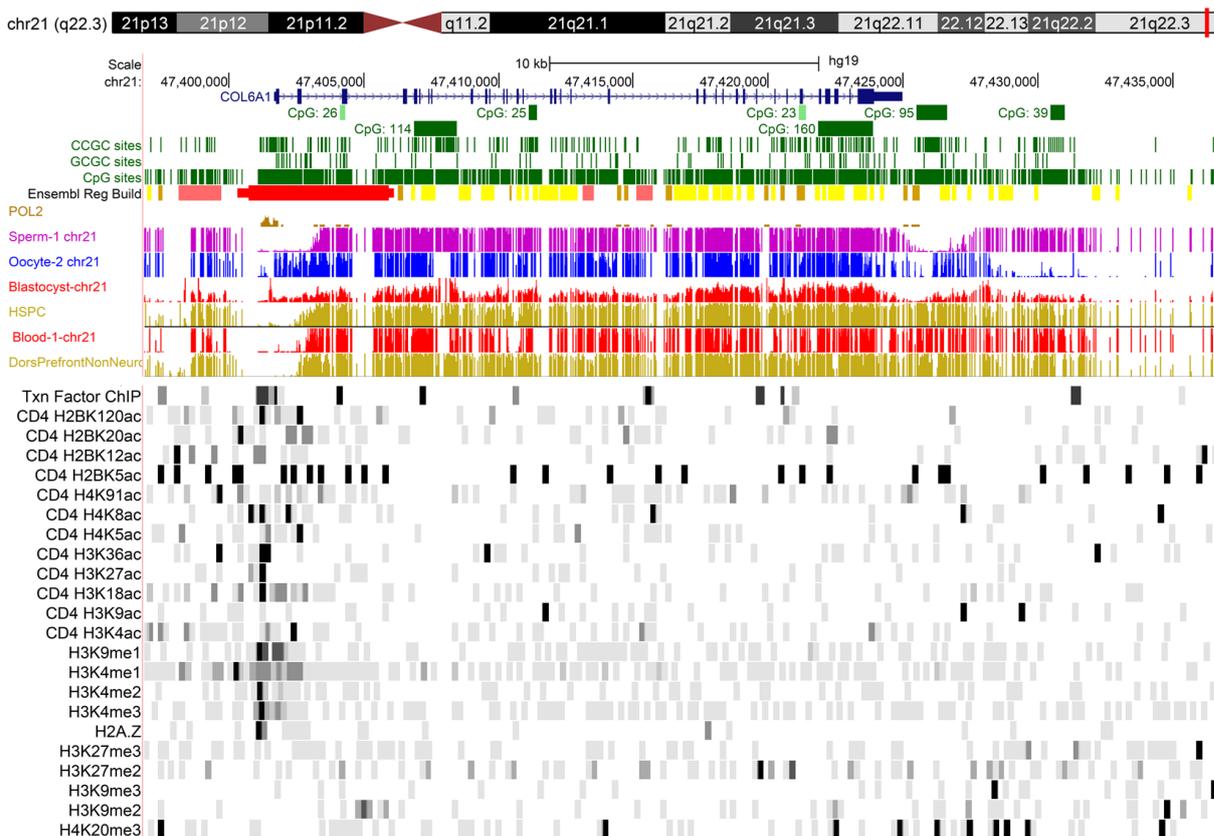


Figura 6. Visualização das marcas epigenéticas do gene *COL6A1*. Imagem customizada no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Na porção superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. A barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição do gene *COL6A1* na região 21q22.3. Na cor azul está representado o transcrito do gene *COL6A1*. A transcrição do gene ocorre na fita de DNA positiva. Abaixo nas cores verdes, estão representadas as ilhas CpGs: 26, 114, 25, 23, 160, 95 e 39, e os sítios CpG identificados na região em uma janela de 40kb (sítios CpG-Hpall, CpG-Hhal, e CpG, respectivamente). Abaixo regiões envolvidas na regulação gênica: em vermelho região promotora predita, em rosa regiões flanqueadoras aos promotores preditos, em amarelo escuro sítios de ligação a fatores de transcrição, em amarelo claro regiões de cromatina aberta. Em marrom, sítios de ligação da RNA polimerase que indicam atividade de transcrição. Na porção mediana as barras coloridas representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa, a metilação em espermatozoide. Na cor azul, a metilação em oócitos. Na cor vermelha, a metilação em blastocisto e tecido sanguíneo. Na cor amarela, a metilação em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Na porção inferior, histonas modificadas por acetilação e metilação associadas com perfis transcricionais ativo (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac) e reprimido (H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3). A região com maior atividade transcricional no gene *COL6A1* encontra-se hipometilada, com marcas histonas à atividade transcricional H2BK120ac, H4K8ac, H3K36ac, H3K27ac, H3K18ac, H3K9me1, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3 e H2A.Z.

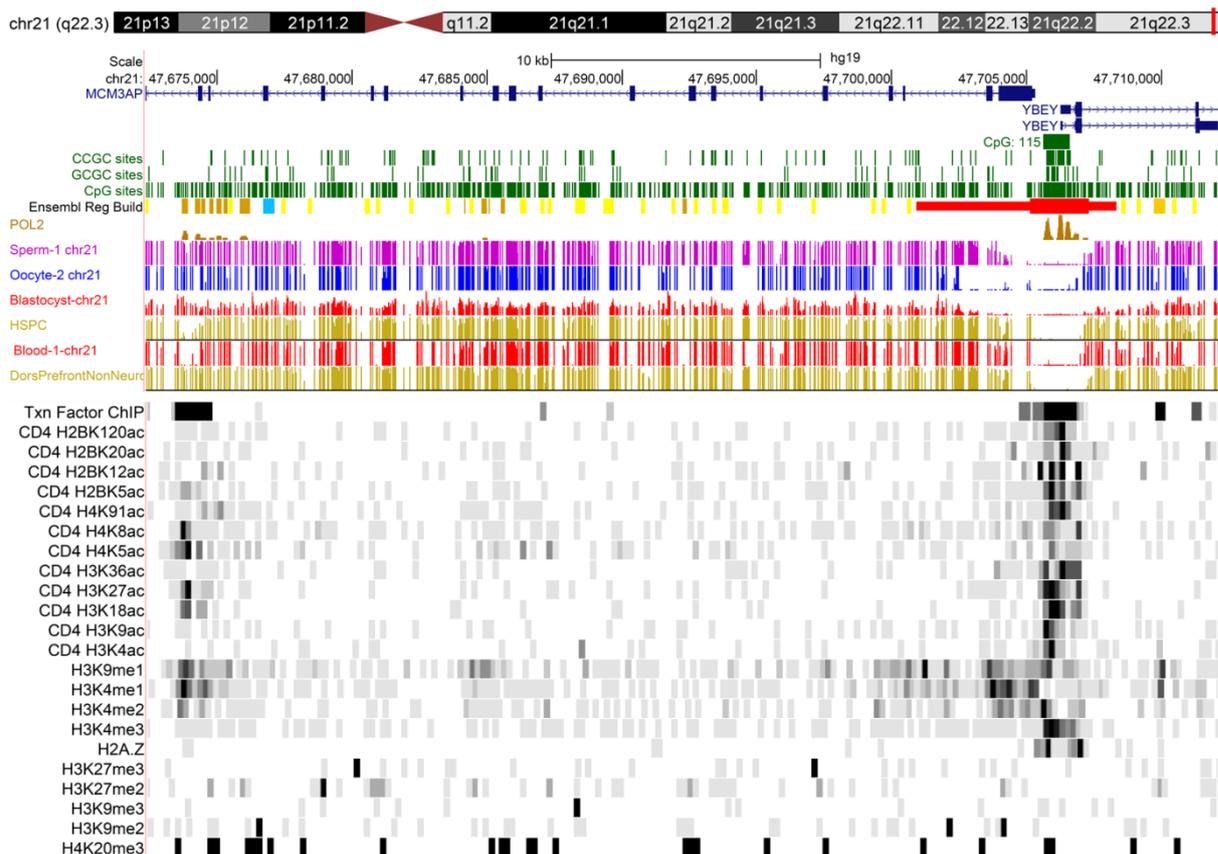


Figura 7. Visualização das marcas epigenéticas do gene *MCM3AP*. Imagem customizada no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Na porção superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. A barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição do gene *MCM3AP* na região 21q22.13. Na cor azul está representado o transcrito do gene *MCM3AP*. A transcrição do gene ocorre na fita de DNA negativa. Abaixo nas cores verdes, está representada a ilha CpG:115, e os sítios CpG identificados na região em uma janela de 40kb (sítios CpG-HpaII, CpG-HhaI, e CpG, respectivamente). Abaixo, regiões envolvidas na regulação gênica: em vermelho região promotora predita, em azul turquesa sítios ativos de ligação para a proteína CTCF, um regulador transcricional (ativador/repressor), em rosa regiões flanqueadores aos promotores preditos, em amarelo escuro sítios de ligação a fatores de transcrição, em amarelo claro regiões de cromatina aberta. Em marrom, coincidindo com a ilha CpG:115 sítios de ligação da RNA polimerase que indicam atividade de transcrição. Na porção mediana as barras coloridas representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa, a metilação em espermatozoide. Na cor azul, a metilação em oócitos. Na cor vermelha, a metilação em blastocisto e tecido sanguíneo. Na cor amarela, a metilação em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Na porção inferior, histonas modificadas por acetilação e metilação associadas com perfis transcricionais ativo (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac) e reprimido (H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3). A região promotora do gene *MCM3AP* apresenta-se hipometilada, com enriquecimento de marcas histonas associadas à atividade transcricional, H2BK120ac, H2BK20ac, H2BK12ac, H2BK5ac, H4K91ac, H3K36ac, H3K27ac, H3K18ac, H3K9ac, H3K4ac, H3K4me3, H2A.Z.

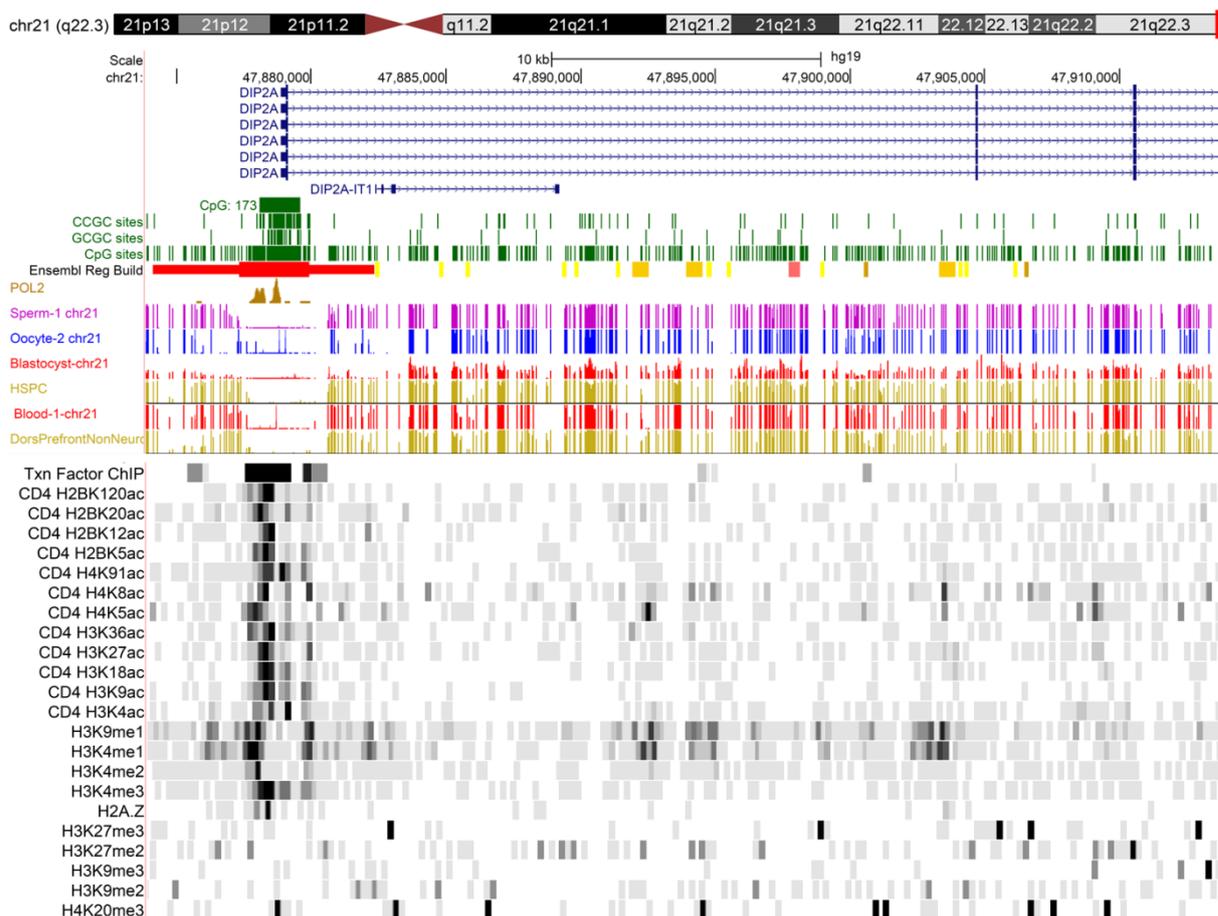


Figura 8. Visualização das marcas epigenéticas do gene *DIP2A*. Imagem customizada no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Na porção superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. A barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição do gene *DIP2A* na região 21q22.3. Na cor azul estão representados os transcritos variantes do gene *DIP2A*. A transcrição do gene ocorre na fita de DNA positiva. Abaixo nas cores verdes, está representada a ilha CpG:173, e os sítios CpG identificados na região em uma janela de 40kb (sítios CpG-Hpall, CpG-Hhal, e CpG, respectivamente). Abaixo regiões envolvidas na regulação gênica: em vermelho região promotora predita, em rosa regiões flanqueadores aos promotores preditos, em amarelo escuro sítios de ligação a fatores de transcrição, em amarelo claro regiões de cromatina aberta. Em marrom, coincidindo com a ilha CpG:173 sítios de ligação da RNA polimerase que indicam atividade de transcrição. Na porção mediana as barras coloridas representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa, a metilação em espermatozoide. Na cor azul, a metilação em oócitos. Na cor vermelha, a metilação em blastocisto e tecido sanguíneo. Na cor amarela, a metilação em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Na porção inferior, histonas modificadas por acetilação e metilação associadas com perfis transcricionais ativo (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac) e reprimido (H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3). A região promotora do gene *DIP2A* apresenta-se hipometilada, com enriquecimento de marcas histonas associadas à atividade transcricional, H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac.

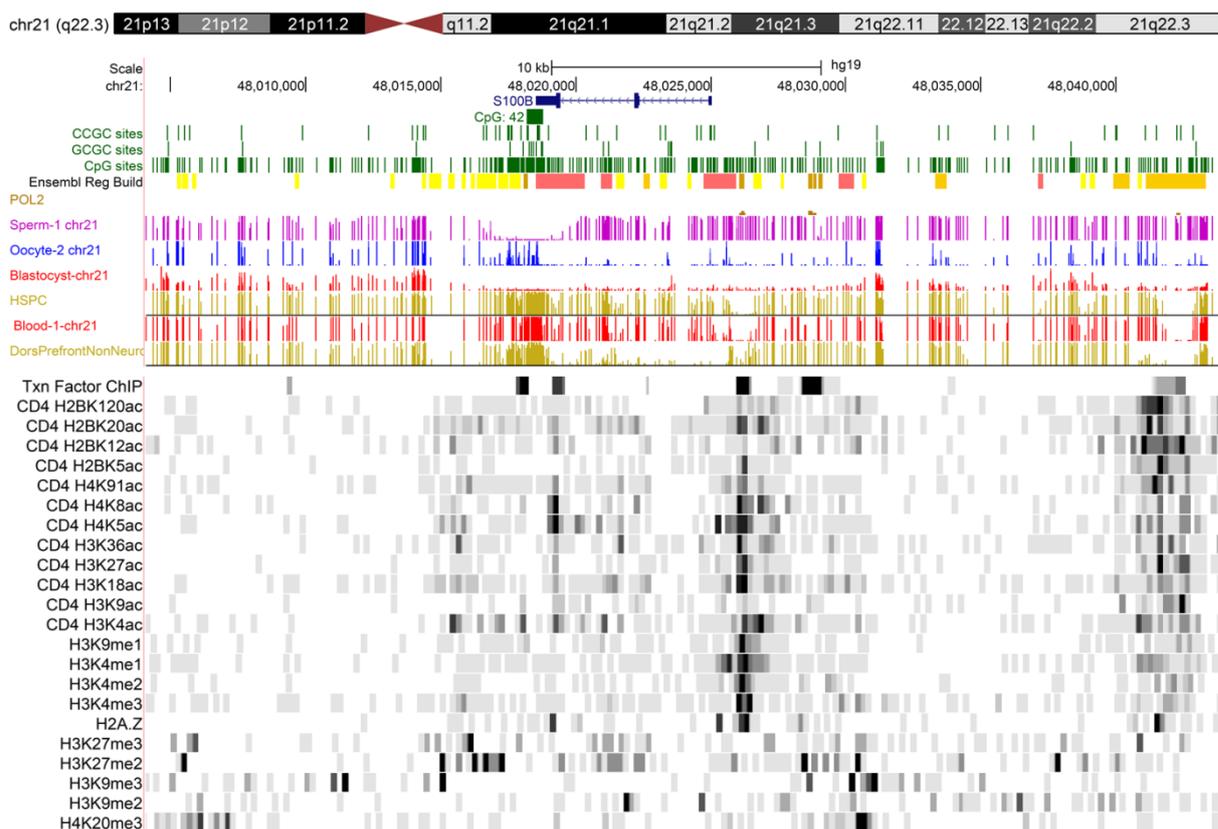


Figura 9. Visualização das marcas epigenéticas do gene *S100B*. Imagem customizada no Browser da UCSC por metanálise de estudos de epigenômica. Na porção superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. A barra em vermelho sobre o ideograma indica a posição do gene *S100b* na região 21q22.3. Na cor azul está representado o transcrito do gene *S100B*. A transcrição do gene ocorre na fita de DNA negativa. Abaixo nas cores verdes, está representada a ilha CpG:42, e os sítios CpG identificados na região em uma janela de 40kb (sítios CpG-HpaII, CpG-HhaI, e CpG, respectivamente). Em marrom, os sítios de ligação da RNA polimerase que indicam atividade de transcrição. Na porção mediana as barras coloridas representam os estados de metilação de cada sítio CpG. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa, a metilação em espermatozoide. Na cor azul, a metilação em oócitos. Na cor vermelha, a metilação em blastocisto e tecido sanguíneo. Na cor amarela, a metilação em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Na porção inferior, histonas modificadas por acetilação e metilação associadas com perfis transcricionais ativo (H2A.Z, H2BK5ac, H2BK12ac, H2BK20ac, H2BK120ac, H3K4ac, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K9ac, H3K9me1, H3K18ac, H3K27ac, H3K36ac, H4K5ac, H4K8ac e H4K91ac) e reprimido (H3K27me3, H3K27me2, H3K9me3, H3K9me2 e H4K20me3). As duas regiões com sítios de ligação de RNA polimerase encontram-se hipermetilada em espermatozoide. Nos demais metilomas a primeira região encontra-se hipometilada, com enriquecimento de marcas histonas associadas à atividade transcricional, H2BK20ac, H2BK5ac, H4K8ac, H4K5ac, H3K36ac, H3K27ac, H3K18ac, H3K4ac, H3K9me1, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3 E H2A.Z.

6.2 Seleção de SNPs exônicos para a determinação do perfil transcricional dos genes alvos

Para seleção dos SNPs exônicos foram utilizados dois critérios, com base em anotações disponíveis nos bancos de dados Ensembl e dbSNP: 1) SNPs com dados populacionais já validados; 2) pelo menos 1 SNP com MAF >0,4 ou 2 SNPs com MAF>0,2 por gene; 3) mapeado em pelo menos mais de um transcrito anotado. Dentro desses critérios, foram selecionados 18 SNPs exônicos, 11 variações sinônimas e sete variações não sinônimas. A caracterização dos SNPs selecionados está descrita na tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos SNPs exônicos selecionados nos genes alvos.

Gene	SNP	MAF	Localização	Variação	Tipo	Transcritos (n)
<i>KRTAP6-2</i>	rs2832955	0.0002	éxon 1	G/A	sinônima	1/1
	rs113467703	S/A		T/C	não sinônima	
<i>OLIG2</i>	rs762178	0.43	éxon 1	T/C	sinônima	3/3
	rs17854475	S/A		T/C	não sinônima	
<i>SIM2</i>	rs2073416	0.27	éxon 10	C/T	sinônima	1/5
	rs2073601	0.17		C/A	não sinônima	
<i>IGSF5</i>	rs12626544	0.39	éxon 3	G/A	sinônima	1/3
	rs2205204	0.34		G/C	não sinônima	
<i>ADARB1</i>	rs78867942	S/A	éxon 4	G/C	não sinônima	9/14
	rs1051367	0.49	éxon 12	G/A	sinônima	8/14
<i>COL6A1</i>	rs1053315	0.26	éxon 35	G/C/A	sinônima	2/7
	rs13051496	0.10		G/A	não sinônima	
	rs1053312	0.27		G/A	não sinônima	
<i>MCM3AP</i>	rs2839181	0.42	éxon 12	T/C	sinônima	2/10
	rs2839173	0.40	éxon 18	T/C	sinônima	
<i>DIP2A</i>	rs2070435	0.38	éxon 18	G/A	sinônima	5/12
	rs2070427	0.33	éxon 27	G/A	sinônima	2/12
<i>S100B</i>	rs1051169	0.43	éxon 2	G/C/T	sinônima	3/3

6.3 Painel de iniciadores para a determinação do perfil transcricional dos genes alvos

Após seleção dos SNPs nos genes alvos, foram gerados dois painéis de iniciadores para ampliação das regiões flanqueadoras a estes polimorfismos. Foram desenhados 15 pares de iniciadores para amplificação de amostras de gDNA, e 14 pares de iniciadores para amplificação de amostras de cDNA, descritos no apêndice A. O desenho dos iniciadores foi realizado de acordo com os seguintes parâmetros restritivos: (i) iniciadores gerando fragmentos menores que 450 pares de base; (ii) iniciadores únicos, sítios específicos, com validação *in silico* através das ferramentas *online* iPCR – UCSC e BLAST-PCR; (iii) reduzido potencial de auto complementariedade.

Para a realização do minissequenciamento por SNUPE dos polimorfismos presentes nos fragmentos a serem gerados pelos painéis de amplificação de DNA e cDNA, foram desenhados iniciadores, com sequências internas a esses fragmentos, justapostas ao sítio do polimorfismo de interesse, de acordo com anotações disponíveis no dbSNP. O desenho dos iniciadores SNUPE obedeceu aos seguintes parâmetros restritivos: (i) iniciadores com no mínimo 16pb de extensão; (ii) temperatura de melting superior a 52°C; e (iii) iniciadores com reduzido potencial de auto complementariedade. Ao final, foram adicionadas aos iniciadores SNUPE caudas poliT, visando a possibilidade de ensaios em reações multiplex. Para os ensaios de minissequenciamento nos genes alvos foram gerados 20 iniciadores, os quais estão descritos no apêndice A.

6.4 Ensaios SNUPE Multiplex e dados populacionais

Com os painéis de iniciadores gerados, três ensaios em reações multiplex foram padronizados para genotipagem simultânea dos 18 polimorfismos alvos: rs2832955, rs113467703 (*KRTAP6-2*), rs762178, rs17854475 (*OLIG2*), rs2073416, rs2073601 (*SIM2*), rs12626544, rs2205204 (*IGSF5*), rs78867942, rs1051367 (*ADARB1*), rs1053315, rs13051496, rs1053312 (*COL6A1*), rs2839181, rs2839173 (*MCM3AP*), rs2070435, rs2070427 (*DIP2A*), rs1051169 (*S100B*). Aos ensaios 1 e 2 foram adicionados mais dois polimorfismos, rs3816800 e rs2076743 mapeados no gene controle *ATP10A* (figuras 10, 11 e 12). Informações sobre os ensaios padronizados encontram-se na seção material e métodos.

Para o rastreo de indivíduos heterozigotos, informativos, foi realizada a genotipagem de 30 amostras relevantes, pertencentes ao biorrepositório NUDIM. Dados populacionais foram gerados. As frequências alélicas e genotípicas determinadas para os 18 polimorfismos alvos estão descritas na tabela 2.

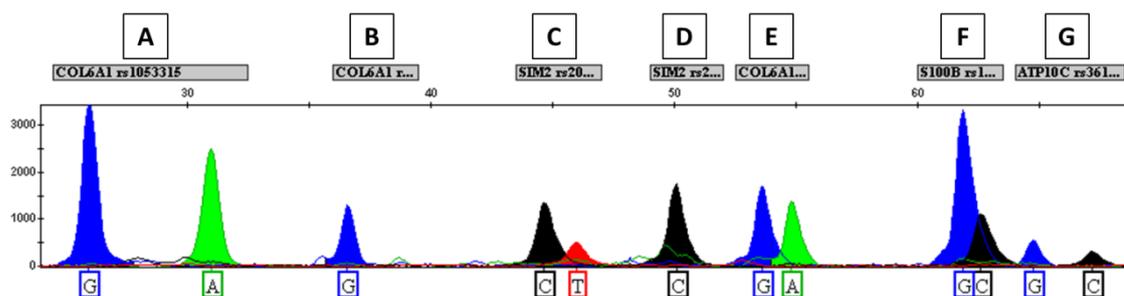


Figura 10. Ensaio 1 SNUPE Multiplex. Reação heptaplex para os polimorfismos mapeados nos genes alvos *COL6A1*, *SIM2*, *S100B* e no gene controle *ATP10A*. Eletoferograma representativo de uma amostra controle (cariótipo 46,XX) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Em (A) perfil heterozigótico caracterizado pelo alelo G/A para o polimorfismo rs1053315 no gene *COL6A1*. Em (B) perfil homozigótico caracterizado pelo alelo G para o polimorfismo rs13051496 no gene *COL6A1*. Em (C) perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs2073416 no gene *SIM2*. Em (D) perfil homozigótico caracterizado pelo alelo C para o polimorfismo rs2073601 no gene *SIM2*. Em (E) perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs1053312 no gene *COL6A1*. Em (F) perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/C para o polimorfismo rs1051169 no gene *S100B*. Em (G) perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/C para o polimorfismo rs3616800 no gene *ATP10A*.

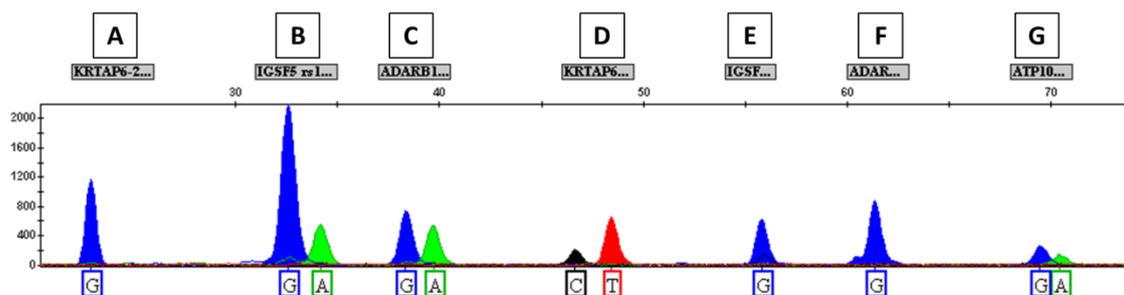


Figura 11. Ensaio 2 SNUPE Multiplex. Reação heptaplex para os polimorfismos mapeados nos genes alvos *KRTAP6-2*, *IGSF5* e *ADARB1* e no gene controle *ATP10A*. Eletroferograma representativo de uma amostra controle (cariótipo 46,XX) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Em (A) perfil homocigótico caracterizado pelo alelo G para o polimorfismo rs2832955 no gene *KRTAP6-2*. Em (B) perfil heterocigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs12626544 no gene *IGSF5*. Em (C) perfil heterocigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs1051367 no gene *ADARB1*. Em (D) perfil heterocigótico caracterizado pelo alelo C/T para o polimorfismo rs113467703 no gene *KRTAP6-2*. Em (E) perfil homocigótico caracterizado pelo alelo G para o polimorfismo rs2205204 no gene *IGSF5*. Em (6) perfil homocigótico caracterizado pelo alelo G para o polimorfismo rs78867942 no gene *ADARB1*. Em (7) perfil heterocigótico caracterizado pelo alelo G/A para o polimorfismo rs2076743 no gene *ATP10A*.

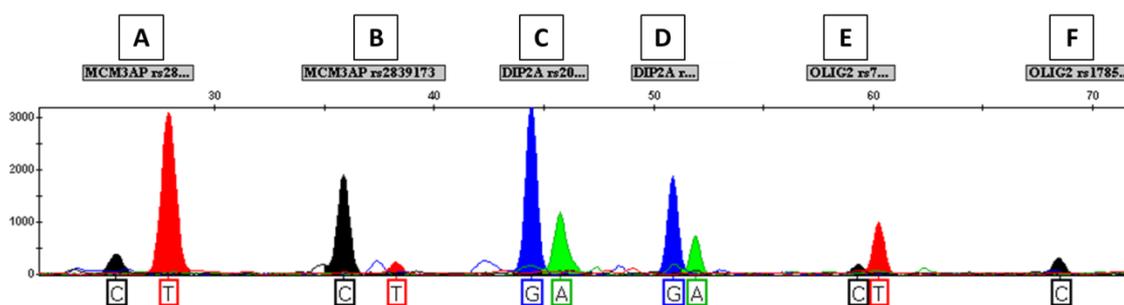


Figura 12. Ensaio 3 SNUPE Multiplex. Reação hexaplex para os polimorfismos mapeados nos genes alvos *MCM3AP*, *DIP2A* e *OLIG2*. Eletroferograma representativo de uma amostra controle (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Em (A) perfil heterocigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs2839181 no gene *MCM3AP*. Em (B) perfil heterocigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs2839173 no gene *MCM3AP*. Em (C) perfil heterocigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs2070435 no gene *DIP2A*. Em (D) perfil heterocigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs2070427 no gene *DIP2A*. Em (E) perfil heterocigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs762178 no gene *OLIG2*. Em (6) perfil homocigótico caracterizado pelo alelo C para o polimorfismo rs17854475 no gene *OLIG2*.

Tabela 2. Frequências alélicas e genotípicas de 18 polimorfismos alvos.

Gene	Polimorfismo	Frequência Genotípica			Frequência Alélica	
<i>KRTAP6-2</i>	rs2832955	Homozigoto GG 0,666	Heterozigoto GA 0,333	Homozigoto AA 0,000	Alelo G 0,833	Alelo A 0,167
	rs113467703	Homozigoto CC 0,000	Heterozigoto CT 0,740	Homozigoto TT 0,259	Alelo C 0,370	Alelo T 0,630
<i>OLIG2</i>	rs762178	Homozigoto CC 0,266	Heterozigoto CT 0,400	Homozigoto TT 0,333	Alelo C 0,467	Alelo T 0,533
	rs17854475	Homozigoto CC 1,000	Heterozigoto CT 0,000	Homozigoto TT 0,000	Alelo C 1,000	Alelo T 0,000
<i>SIM2</i>	rs16994404	Homozigoto GG 1,000	Heterozigoto GA 0,000	Homozigoto AA 0,000	Alelo G 1,000	Alelo A 0,000
	rs2073416	Homozigoto CC 0,169	Heterozigoto CT 0,704	Homozigoto TT 0,126	Alelo C 0,521	Alelo T 0,479
	rs2073601	Homozigoto CC 0,605	Heterozigoto CA 0,352	Homozigoto AA 0,042	Alelo C 0,782	Alelo A 0,218
<i>IGSF5</i>	rs12626544	Homozigoto GG 0,000	Heterozigoto GA 1,000	Homozigoto AA 0,000	Alelo G 0,500	Alelo A 0,500
	rs2205204	Homozigoto GG 0,370	Heterozigoto GC 0,555	Homozigoto CC 0,074	Alelo G 0,648	Alelo C 0,352
<i>ADARB1</i>	rs78867942	Homozigoto GG 1,000	Heterozigoto GC 0,000	Homozigoto CC 0,000	Alelo G 1,000	Alelo C 0,000
	rs1051367	Homozigoto GG 0,222	Heterozigoto GA 0,592	Homozigoto AA 0,185	Alelo G 0,519	Alelo A 0,481
<i>COL6A1</i>	rs1053312	Homozigoto GG 0,338	Heterozigoto GA 0,647	Homozigoto AA 0,014	Alelo G 0,662	Alelo A 0,338
	rs1053315	Homozigoto GG 0,746	Heterozigoto GA 0,253	Homozigoto AA 0,000	Alelo G 0,873	Alelo A 0,127
	rs13051496	Homozigoto GG 0,83	Heterozigoto GA 0,154	Homozigoto AA 0,014	Alelo G 0,908	Alelo A 0,092
<i>MCM3AP</i>	rs2839173	Homozigoto CC 0,473	Heterozigoto CT 0,421	Homozigoto TT 0,105	Alelo C 0,684	Alelo T 0,316
	rs2839181	Homozigoto CC 0,052	Heterozigoto CT 0,578	Homozigoto TT 0,368	Alelo C 0,342	Alelo T 0,658
<i>DIP2A</i>	rs2070427	Homozigoto GG 0,210	Heterozigoto GA 0,368	Homozigoto AA 0,421	Alelo G 0,395	Alelo A 0,605
	rs20704235	Homozigoto GG 0,315	Heterozigoto GA 0,631	Homozigoto AA 0,050	Alelo G 0,632	Alelo A 0,368
<i>S100B</i>	rs1051169	Homozigoto GG 0,000	Heterozigoto GC 0,833	Homozigoto CC 0,166	Alelo G 0,417	Alelo C 0,583

6.5 Determinação do perfil transcricional alélico em células mononucleares do sangue periférico

Com base nos dados das genotipagens referentes a 30 amostras pertencentes ao biorrepositório NUDIM, foram selecionados os sete genótipos mais informativos para os 18 polimorfismos investigados, os quais estão descritos no quadro 1.

Quadro 1. Genótipos determinados para 18 polimorfismos alvos em sete amostras pertencentes ao biorrepositório NUDIM.

		Polimorfismos																	
		<i>KRTAP6-2</i>		<i>OLIG2</i>		<i>SIM2</i>		<i>IGSF5</i>		<i>ADARB1</i>		<i>COL6A1</i>		<i>MCM3AP</i>		<i>DIP2A</i>		<i>S100B</i>	
		rs2832955	rs113467703	rs762178	rs17854475	rs2073416	rs2073601	rs12626544	rs2205204	rs78867942	rs1051367	rs1053312	rs1053315	rs13051496	rs2839173	rs2839181	rs2070427	rs2070435	rs1051169
Biorrepositório NUDIM	301F	G/G	C/T	C/C	C/C	C/T	C/A	G/A	G/G	G/G	A/A	G/A	G/A	G/G	C/C	C/T	A/A	G/A	G/C
	356F	G/G	T/T	C/T	C/C	C/T	C/A	G/A	G/G	G/G	G/G	G/G	G/A	G/A	C/T	C/T	G/A	G/A	G/C
	581F	G/G	T/T	T/T	C/C	C/T	C/A	G/A	G/G	G/G	G/A	G/A	G/A	G/G	C/C	T/T	G/G	G/G	C/C
	902F	G/G	C/T	C/T	C/C	C/T	C/C	G/A	G/G	G/G	A/A	G/A	G/A	G/A	C/C	C/T	A/A	G/A	G/C
	950F	G/G	T/T	C/T	C/C	T/T	C/C	G/A	G/C	G/G	G/G	A/A	G/A	G/G	C/C	T/T	G/A	G/A	G/C
	1046F	G/G	T/T	C/C	C/C	C/T	C/A	A/A	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A	G/G	C/C	C/T	A/A	G/A	G/C
	1104F	G/G	C/T	C/T	C/C	C/T	C/C	G/A	G/C	G/G	G/A	G/A	G/A	G/G	C/T	C/T	A/A	G/G	G/C

Após a seleção das amostras informativas, RNA total isolado de células mononucleares de sangue periférico foram convertidas a cDNA por RT-PCR e submetidas à minissequenciamento. Análises pareadas dos resultados das genotipagens em DNA e cDNA permitiram a determinação do perfil transcricional de cada gene avaliado. Para o gene *KRTAP6-2*, transcrição preferencial de um dos alelos, como indicativo de expressão alélica enviesada foi observada nas três amostras informativas avaliadas.

Para os demais genes alvos, todos os polimorfismos informativos genotipados, o perfil transcricional foi bialélico, porém não em todos os indivíduos genotipados, como descrito na tabela 3. Para os genes *OLIG2*, *IGSF5*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B* foram observados também perfil transcricional monoalélico. O perfil transcricional bialélico pode ser interpretado como sendo resultado da expressão monoalélica em diferentes linhagens celulares e/ou na mesma linhagem celular. No conjunto, os dados sugerem que esses genes não

estão sujeitos ao *imprinting* na linhagem hematopoiética, mas sim à expressão monoalélica diferencial entre indivíduos. Os perfis transcricionais alélicos determinados para cada gene alvo estão representados nas figuras 13-27.

Tabela 3. Perfil transcricional alélico determinado para os 18 polimorfismos alvos em sete amostras pertencentes ao biorrepositório NUDIM.

Gene	Polimorfismo	Alelos de Referência	Genótipos Informativos	Perfil Transcricional
<i>KRTAP6-2</i>	rs2832955	G/A	3/7	3/3 E
	rs113467703	C/T		
<i>OLIG2</i>	rs762178	C/T	4/7	3/4 B; 1/4 M
	rs17854475	C/T		
<i>SIM2</i>	rs2073416	C/T	6/7	5/5 B*
	rs2073601	C/A		
<i>IGSF5</i>	rs12626544	G/A	6/7	3/5 B; 2/5 M*
	rs2205204	G/C		
<i>ADARB1</i>	rs78867942	G/C	2/7	2/2 B
	rs1051367	G/A		
<i>COL6A1</i>	rs1053312	G/A	7/7	4/5 B; 1/5 M*
	rs1053315	G/C/A		
<i>MCM3AP</i>	rs13051496	G/A	5/7	4/5 B; 1/5 M
	rs2839173	C/T		
<i>DIP2A</i>	rs2839181	C/T	5/7	4/5 B; 1/5 M
	rs2070427	G/A		
<i>S100B</i>	rs2070435	G/A	6/7	4/5 B; 1/5 M*
	rs1051169	G/C		

(*) Transcrito não detectado em pelo menos uma amostra com genótipo informativo.

B= perfil bialélico; M= perfil monoalélico; E= perfil alélico enviesado.

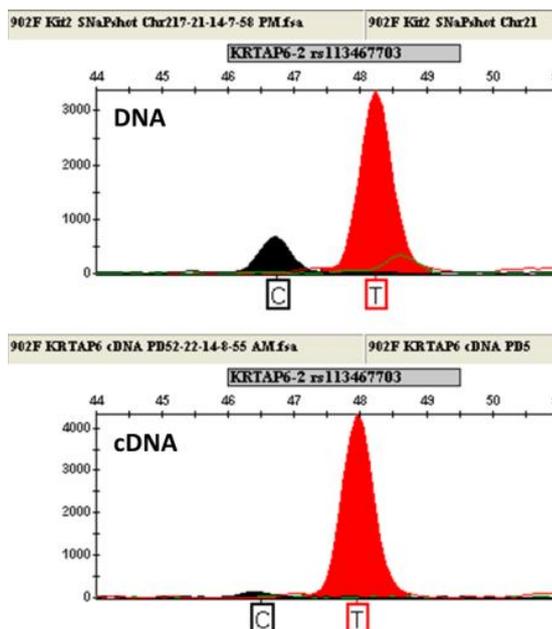


Figura 13. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs113467703 mapeado no gene *KRTAP6-2*. Eletroferograma representativo da amostra 902F (cariótipo 46,XX) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs113467703 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo T para o polimorfismo rs113467703, com escape do alelo C, é indicativa de expressão alélica enviesada do gene *KRTAP6-2* neste indivíduo.

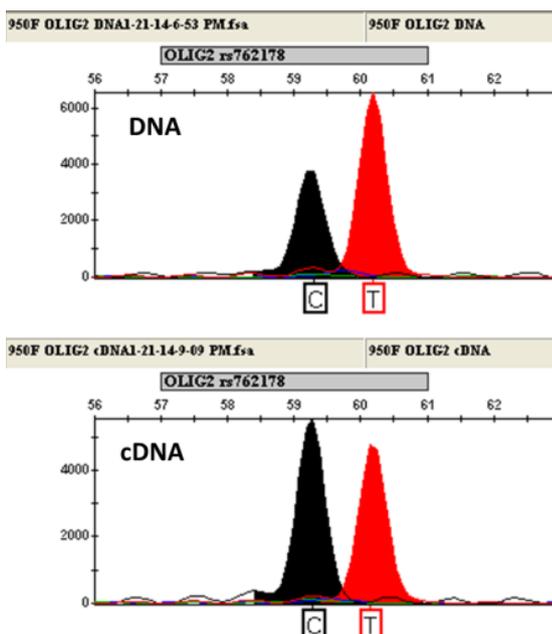


Figura 14. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs762178 mapeado no gene *OLIG2*. Eletroferograma representativo da amostra 950F (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs762178 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos C/T para o polimorfismo rs762178 é indicativo de expressão bialélica do gene *OLIG2* neste indivíduo.

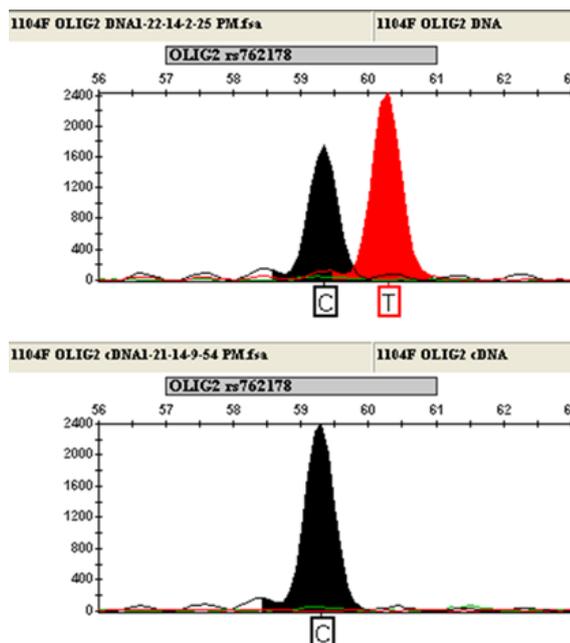


Figura 15. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs762178 mapeado no gene *OLIG2*. Eletroferograma representativo da amostra 1104F (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs762178 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo C para o polimorfismo rs762178 é indicativo de expressão monoalélica do gene *OLIG2* neste indivíduo.

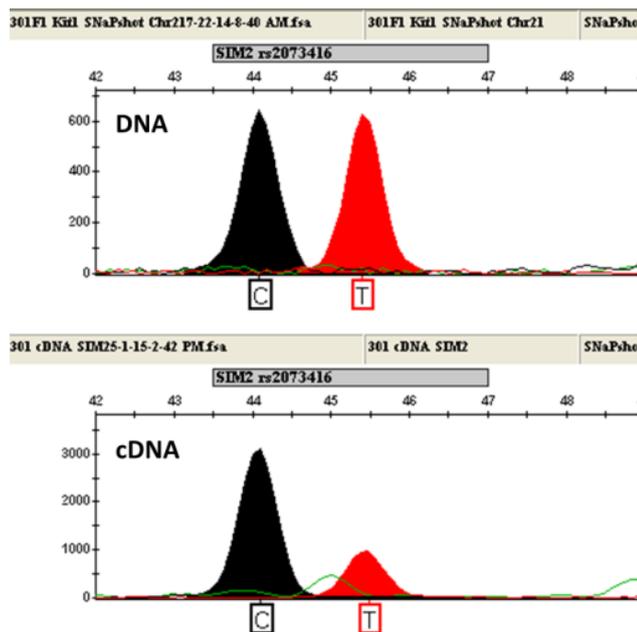


Figura 16. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs2073416 mapeado no gene *SIM2*. Eletroferograma representativo da amostra 301F (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs2073416 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos C/T para o polimorfismo rs2073416 é indicativo de expressão bialélica do gene *SIM2* neste indivíduo.

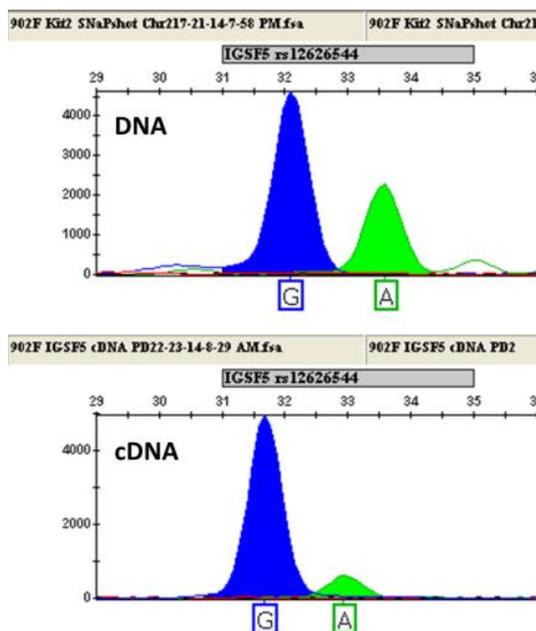


Figura 17. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs12626544 mapeado no gene *IGSF5*. Eletroferograma representativo da amostra 902F (cariótipo 46,XX) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs12626544 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos G/A para o polimorfismo rs12626544 é indicativo de expressão bialélica do gene *IGSF5* neste indivíduo.

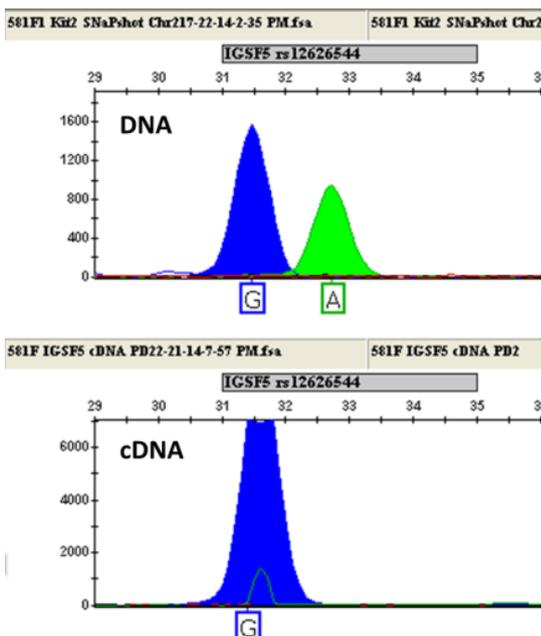


Figura 18. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs12626544 mapeado no gene *IGSF5*. Eletroferograma representativo da amostra 581F (cariótipo 46,XX) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs12626544 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo G para o polimorfismo rs12626544 é indicativo de expressão monoalélica do gene *IGSF5* neste indivíduo.

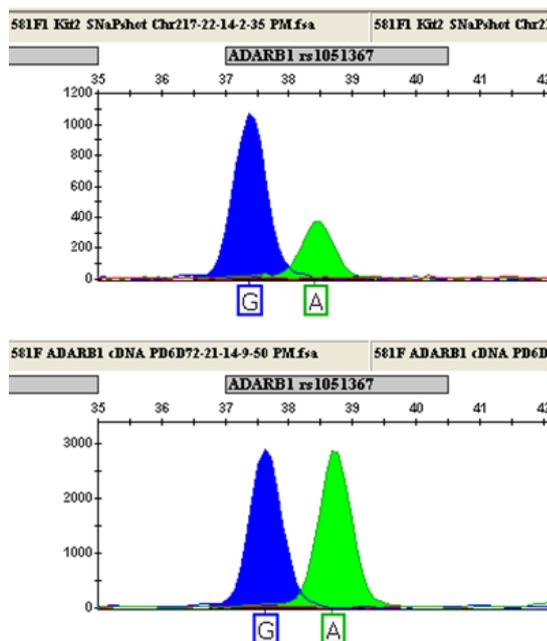


Figura 19. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1051367 mapeado no gene *ADARB1*. Eletroferograma representativo da amostra 581F (cariótipo 46,XX) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs1051367 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos G/A para o polimorfismo rs1051367 é indicativo de expressão bialélica do gene *ADARB1* neste indivíduo.

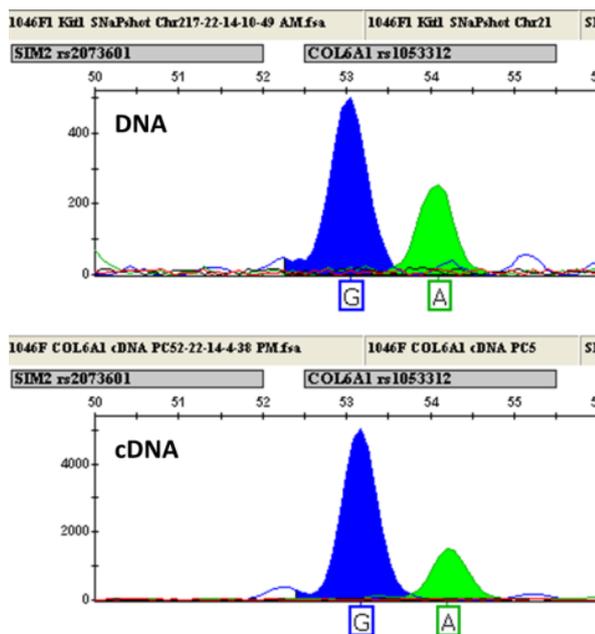


Figura 20. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1053312 mapeado no gene *COL6A1*. Eletroferograma representativo da amostra 1046F (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs1053312 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos G/A para o polimorfismo rs1053312 é indicativo de expressão bialélica do gene *COL6A1* neste indivíduo.

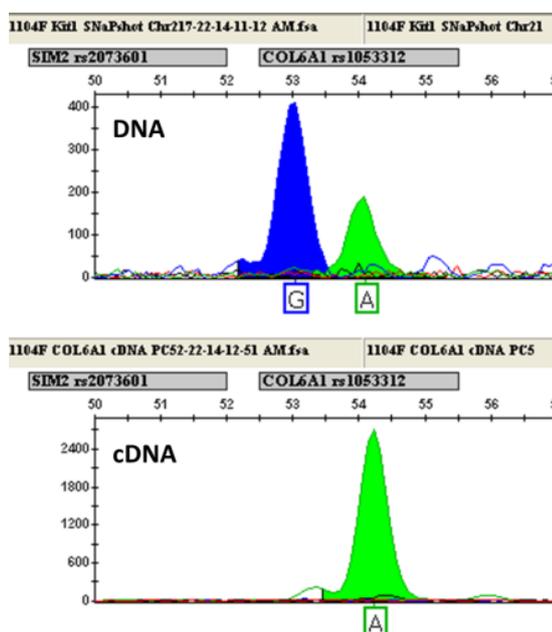


Figura 21. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1053312 mapeado no gene *COL6A1*. Eletroferograma representativo da amostra 1104F (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs1053312 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo A para o polimorfismo rs1053312 é indicativo de expressão monoalélica do gene *COL6A1* neste indivíduo.

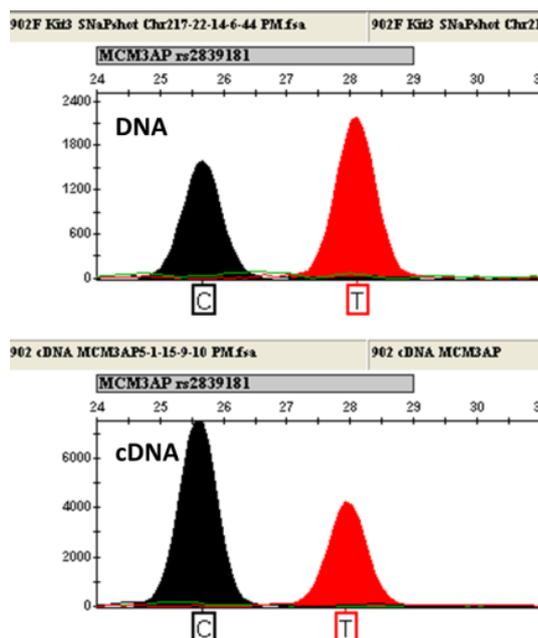


Figura 22. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs2839181 mapeado no gene *MCM3AP*. Eletroferograma representativo da amostra 902F (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs2839181 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior, o perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos C/T para o polimorfismo rs2839181 é indicativo de expressão bialélica do gene *MCM3AP* neste indivíduo.

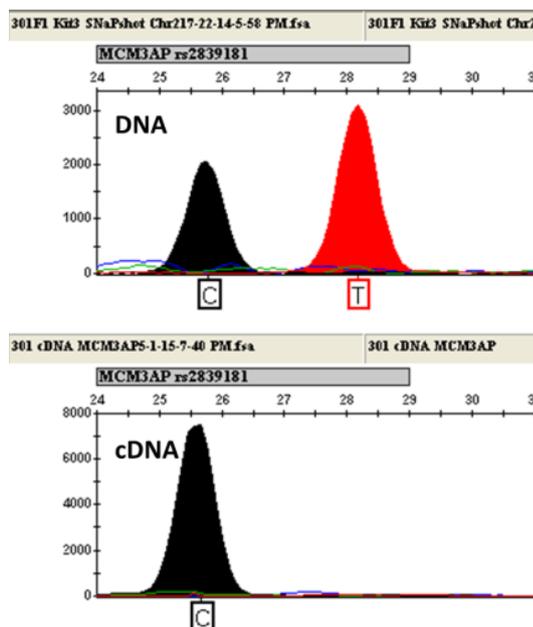


Figura 23. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs2839181 mapeado no gene *MCM3AP*. Eletroferograma representativo da amostra 301F (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs2839181 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior, o perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo C para o polimorfismo rs2839181 é indicativo de expressão monoalélica do gene *MCM3AP* neste indivíduo.

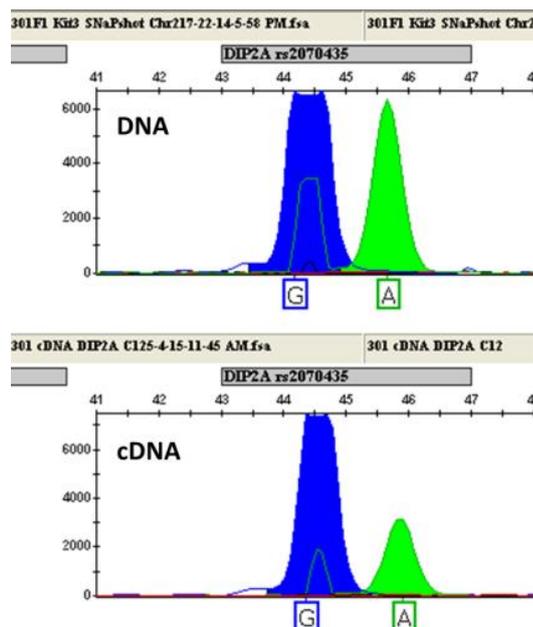


Figura 24. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs2070435 mapeado no gene *DIP2A*. Eletroferograma representativo da amostra 301F (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs2070435 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior, o perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos G/A para o polimorfismo rs2070435 é indicativo de expressão bialélica do gene *DIP2A* neste indivíduo.

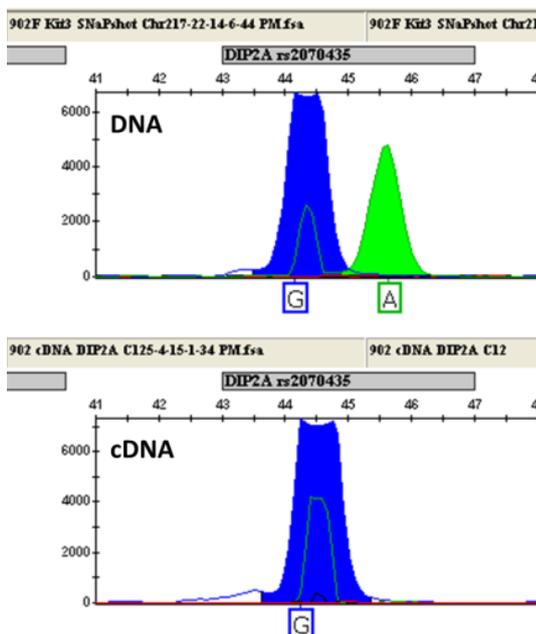


Figura 25. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs2070435 mapeado no gene *DIP2A*. Eletroferograma representativo da amostra 902F (cariótipo 46,XX) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs2070435 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior, o perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo G para o polimorfismo rs2070435 é indicativo de expressão monoalélica do gene *DIP2A* neste indivíduo.

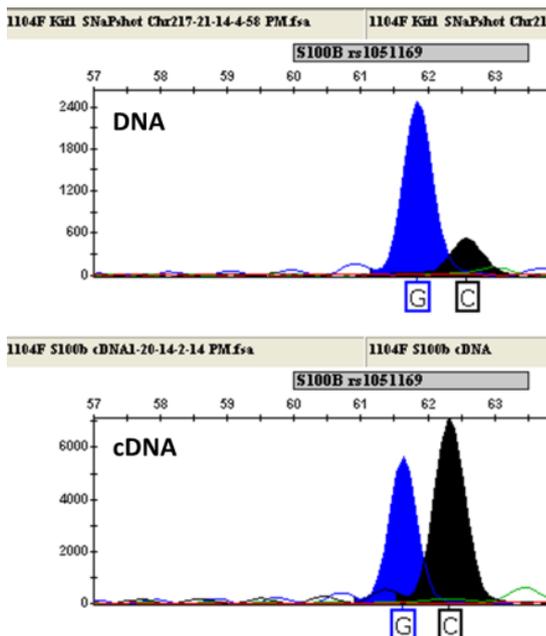


Figura 26. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1051169 mapeado no gene *S100B*. Eletroferograma representativo da amostra 1104F (cariótipo 46,XY) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/C para o polimorfismo rs1051169 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior, o perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos G/C para o polimorfismo rs1051169 é indicativo de expressão bialélica do gene *S100B* neste indivíduo.

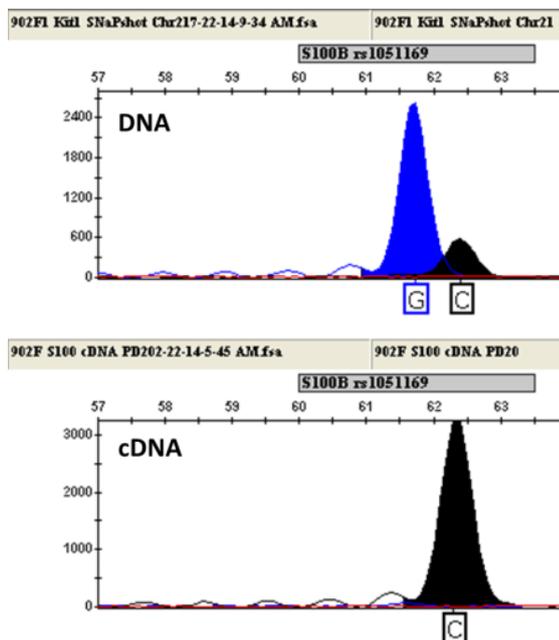


Figura 27. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1051169 mapeado no gene *S100B*. Eletroferograma representativo da amostra 902F (cariótipo 46,XX) pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/C para o polimorfismo rs1051169 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior, o perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo C para o polimorfismo rs1051169 é indicativo de expressão monoalélica do gene *S100B* neste indivíduo.

6.6 Determinação do perfil transcricional alélico em células-tronco embrionárias

Visando determinar o perfil transcricional dos genes alvos em estágios iniciais do desenvolvimento humano, os mesmos 18 polimorfismos foram genotipados em amostras pareadas de DNA e cDNA de cinco linhagens de células-tronco embrionárias humanas, HUES-1 (46,XX), HES3 (46,XX), HUES-5 (46,XX), HUES-7 (46,XY) e HUES-15 (46,XX). O estado indiferenciado dessas linhagens foi confirmado pela presença do transcrito *XACT*, inferida através da genotipagem dos polimorfismos rs5929175 e rs5929410 nas linhagens femininas. Como controle de *imprinting* foram genotipados dois polimorfismos, mapeados nos genes sabidamente *imprimados* *H19* (cromossomo 11) e *ATP10A* (cromossomo 15), figura 28.

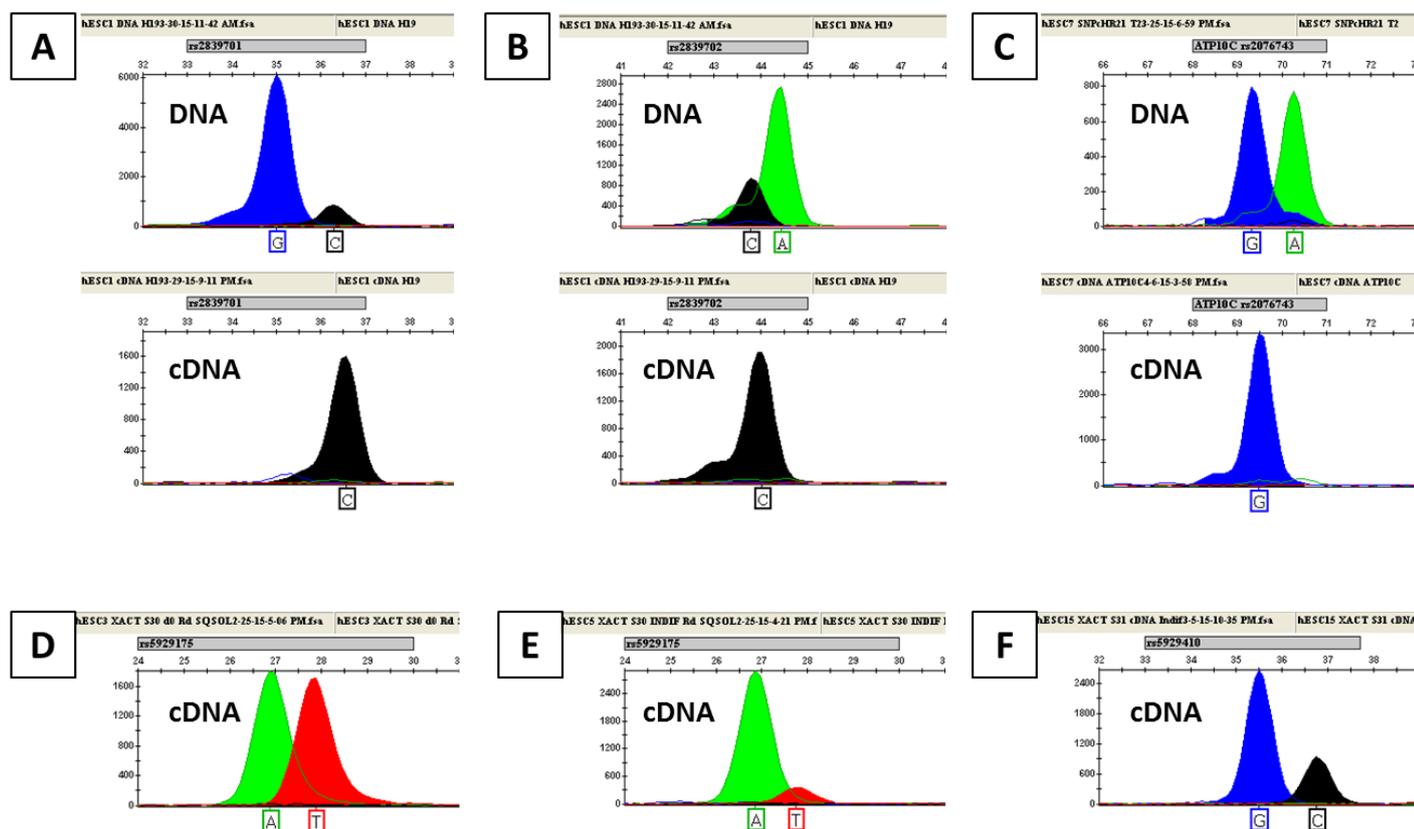


Figura 28. Perfil alélico determinado para os genes controles *H19*, *ATP10A*, e *XACT*. Em (A), (B) e (C) os perfis alélicos determinados para os polimorfismos rs2839701, rs2839702 e rs2076743 mapeados nos genes *H19* e *ATP10A* nas linhagens HUES-1 e HUES-7. O *imprinting* nesses genes é confirmado por perda da heterozigose em amostragem de cDNA. Em (D), (E) e (F) perfis alélicos para o marcador de pluripotência rs5929175 e rs5929410 mapeados no gene *XACT* nas linhagens HUES-1, HES3 e HUES-15.

Análises pareadas dos resultados das genotipagens em DNA e cDNA permitiram a determinação do perfil transcricional de cada gene avaliado, exceto o gene *OLIG2*, para o qual não foram detectados transcritos nas cinco linhagens estudadas. Para os polimorfismos informativos mapeados nos genes *KRTAP6-2*, *SIM2*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B* o perfil transcricional foi bialélico, porém não em todas as linhagens (tabela 8). Para os genes *KRTAP6-2*, *ADARB1* e *COL6A1*, foram observados também perfil transcricional monoalélico. Para o gene *IGSF5*, transcritos foram detectados apenas para a linhagem HUES-1, e o perfil transcricional determinado para este gene foi monoalélico, tabela 4.

Tabela 4. Perfil transcricional alélico determinado para os 18 polimorfismos alvos em cinco linhagens de células-tronco embrionárias.

Gene	Loco	Perfil Transcricional					(n)
		HUES-1	HES3	HUES-5	HUES-7	HUES-15	
<i>KRTAP6-2</i>	rs2832955 rs113467703	Bialélico	Bialélico	Bialélico	N/D	Enviesado	3/4 B; 1/4 E
<i>OLIG2</i>	rs762178 rs17854475	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	0
<i>SIM2</i>	rs2073416 rs2073601	Bialélico	Bialélico	N/D	N/D	N/D	2/2 B
<i>IGSF5</i>	rs12626544 rs2205204	Monoalélico	N/D	N/D	N/D	N/D	1/1 M
<i>ADARB1</i>	rs78867942 rs1051367 rs1053312	Monoalélico	Monoalélico	Bialélico	N/D	Bialélico	2/4 B; 2/4 M
<i>COL6A1</i>	rs1053315 rs13051496	Monoalélico	Bialélico	Monoalélico	Bialélico	Monoalélico	2/5 B; 3/5 M
<i>MCM3AP</i>	rs2839173 rs2839181	N/D	N/D	Bialélico	Bialélico	N/D	2/2 B
<i>DIP2A</i>	rs2070427 rs2070435	N/D	Bialélico	N/D	Bialélico	Bialélico	3/3 B
<i>S100B</i>	rs1051169	Bialélico	N/D	Bialélico	Bialélico	Bialélico	4/4 B

N/D= não determinado (genótipo não informativo ou transcrito não detectado).

n= número de amostras informativas.

B= perfil bialélico; M= perfil monoalélico; E= perfil alélico enviesado.

Os perfis transcricionais alélicos determinados para cada gene alvo estão representados nas figuras 29-39.

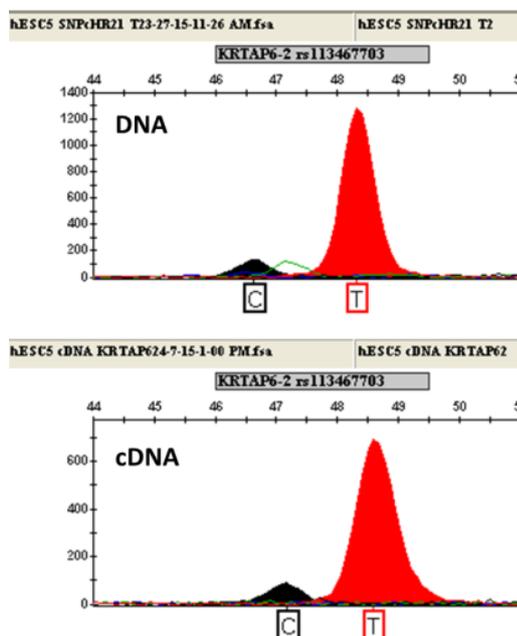


Figura 29. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs113467703 mapeado no gene *KRTAP6-2*. Eletroferograma representativo da linhagem HUES-5 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs113467703 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos C/T para o polimorfismo rs113467703 é indicativo de expressão bialélica do gene *KRTAP6-2* na linhagem HUES-5.

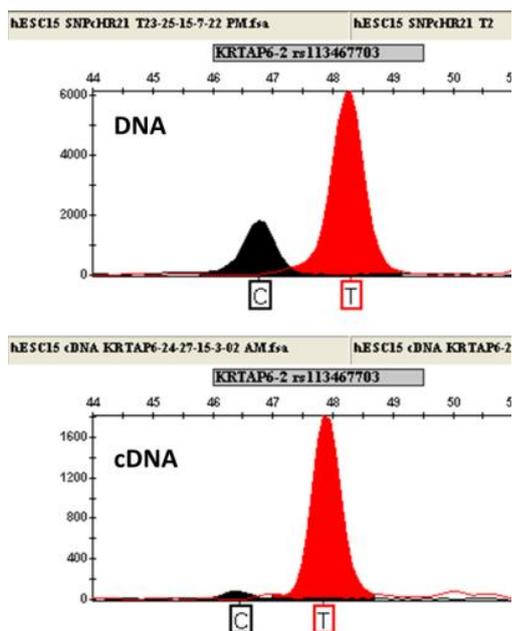


Figura 30. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs113467703 mapeado no gene *KRTAP6-2*. Eletroferograma representativo da linhagem HUES-15 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs113467703 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo T para o polimorfismo rs113467703, é indicativo de expressão alélica enviesada do gene *KRTAP6-2* na linhagem HUES-15.

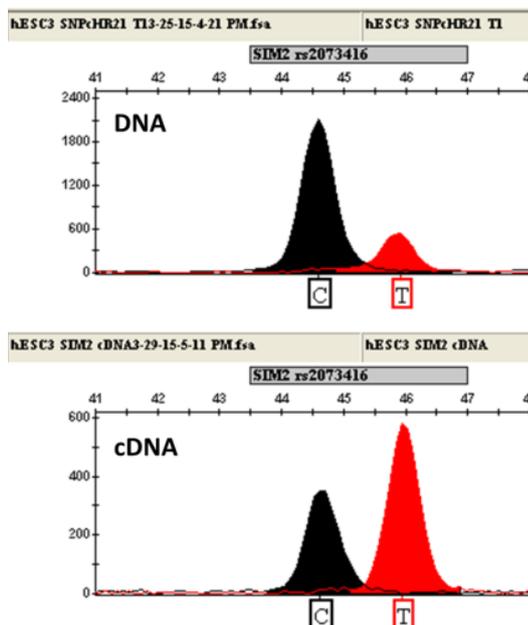


Figura 31. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs2073416 mapeado no gene *SIM2*. Eletroferograma representativo da linhagem HES3 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs2073416 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos C/T para o polimorfismo rs2073416, é indicativo de expressão bialélica do gene *SIM2* na linhagem HES3.

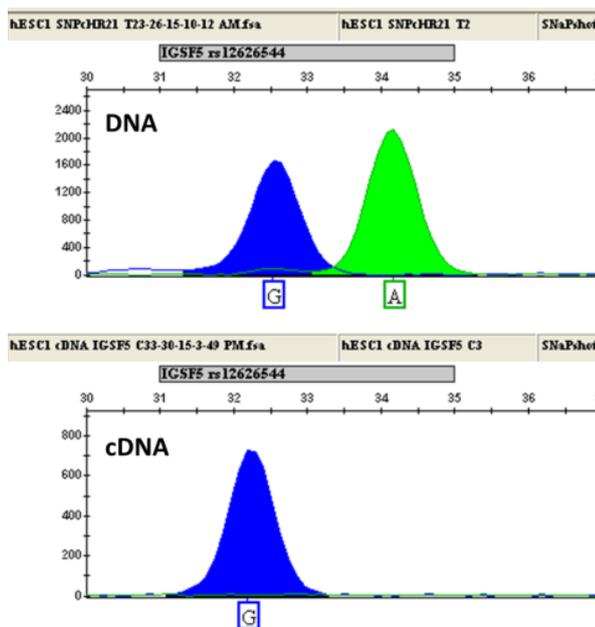


Figura 32. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs12626544 mapeado no gene *IGSF5*. Eletroferograma representativo da linhagem HUES-1 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs12626544 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo G para o polimorfismo rs12626544, é indicativo de expressão monoalélica do gene *IGSF5* na linhagem HUES-1.

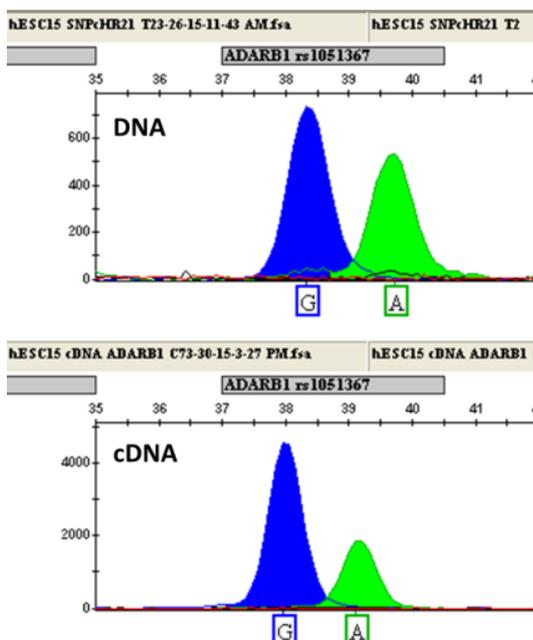


Figura 33. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1051367 mapeado no gene *ADARB1*. Eletroferograma representativo da linhagem HUES-15 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs1051367 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos G/A para o polimorfismo rs1051367, é indicativo de expressão bialélica do gene *ADARB1* na linhagem HUES-15.

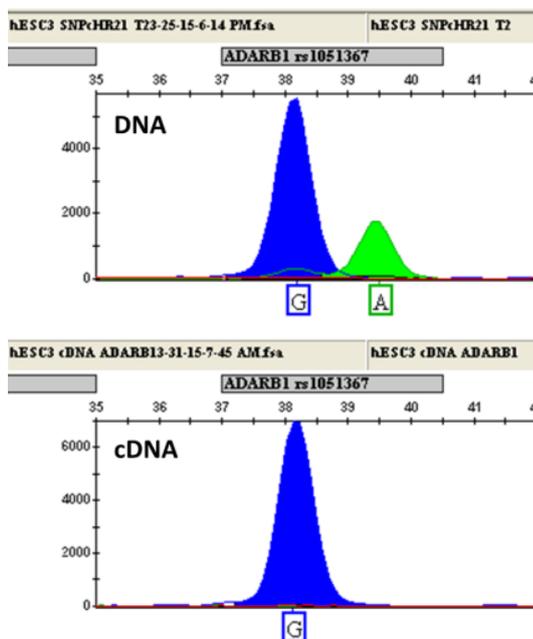


Figura 34. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1051367 mapeado no gene *ADARB1*. Eletroferograma representativo da linhagem HES3 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs1051367 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo G para o polimorfismo rs1051367, é indicativo de expressão monoalélica do gene *ADARB1* na linhagem HES3.

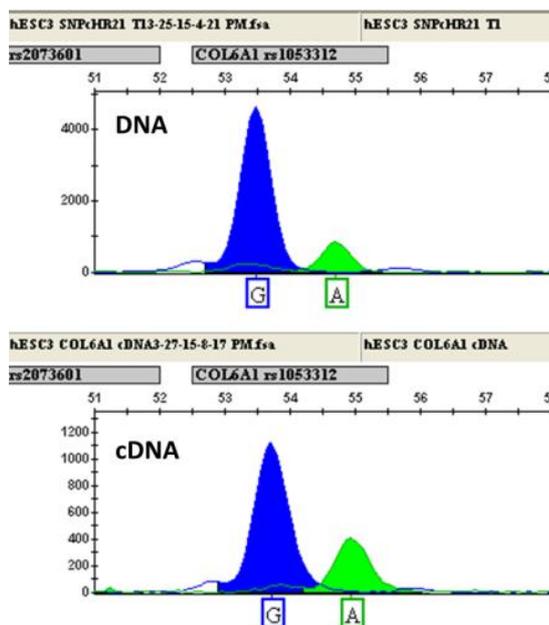


Figura 35. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1053312 mapeado no gene COL6A1. Eletroferograma representativo da linhagem HES3 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs1053312 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos G/A para o polimorfismo rs1053312, é indicativa de expressão bialélica do gene COL6A1 na linhagem HES3.

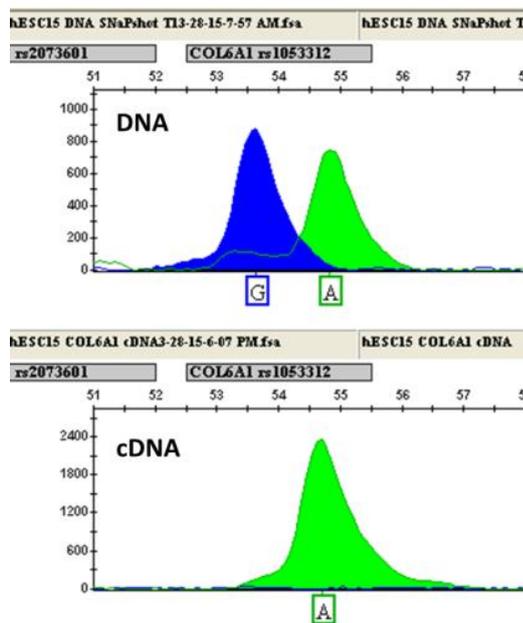


Figura 36. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1053312 mapeado no gene COL6A1. Eletroferograma representativo da linhagem HUES-15 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs1053312 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição preferencial do alelo G para o polimorfismo rs1053312, é indicativa de expressão monoalélica do gene COL6A1 na linhagem HUES-15.

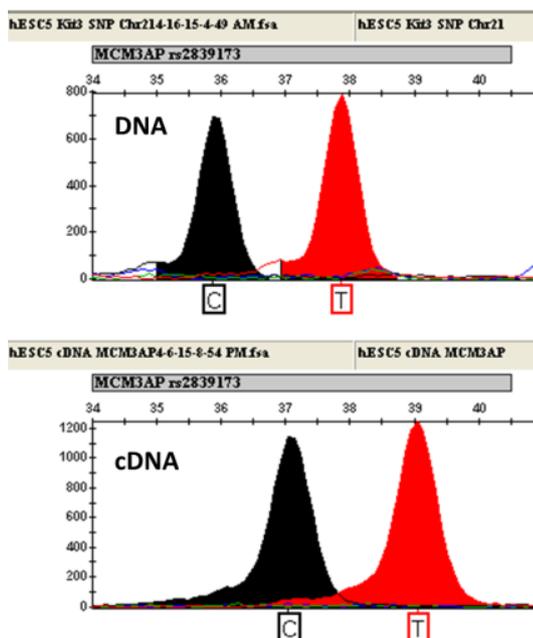


Figura 37. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs2839173 mapeado no gene *MCM3AP*. Eletroferograma representativo da linhagem HUES-5 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/T para o polimorfismo rs2839173 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos C/T para o polimorfismo rs2839173, é indicativa de expressão bialélica do gene *COL6A1* na linhagem HUES-5.

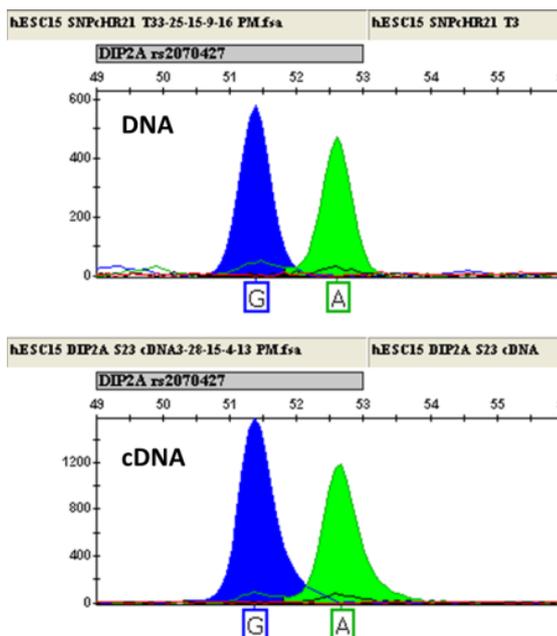


Figura 38. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs2070427 mapeado no gene *DIP2A*. Eletroferograma representativo da linhagem HUES-15 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/A para o polimorfismo rs2070427 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos G/A para o polimorfismo rs2070427, é indicativa de expressão bialélica do gene *DIP2A* na linhagem HUES-15.

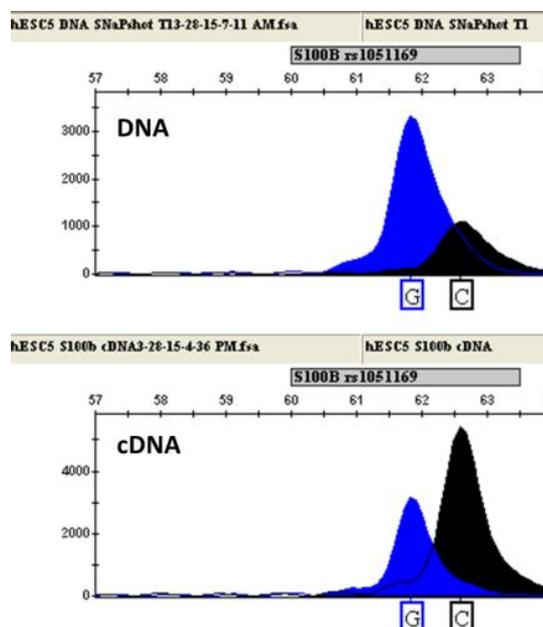


Figura 39. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1051169 mapeado no gene *S100B*. Eletroferograma representativo da linhagem HUES-5 (cariótipo 46,XX). Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos G/C para o polimorfismo rs1051169 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos G/C para o polimorfismo rs1051169, é indicativa de expressão bialélica do gene *S100B* na linhagem HUES-5.

6.7 Identificação de sequências de DNA candidatas a regiões diferencialmente metiladas (cDMRs) no cromossomo 21

Genes sujeitos ao *imprinting*, geralmente estão associados a regiões diferencialmente metiladas, as quais caracterizam marcas epigenéticas que distinguem os alelos paternos e maternos. Em geral, DMRs atuam como elementos regulatórios, que atuam em *cis*, influenciando a expressão de genes adjacentes.

Na plataforma de visualização UCSC Browser, foi criada uma seção customizada, constituídas pelos seguintes parâmetros primários: Identificação de ilhas CpG, estado quantitativo de metilação, mapeamento de sítios de restrição para enzimas com atividade enzimática sensível a metilação; e secundários: assinaturas epigenéticas em histonas associadas à ativação e repressão gênica, sítios para fatores de transcrição, e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP). Nesta seção, utilizando epigenomas de referência de diferentes tecidos e linhagens celulares, foi realizada uma varredura no cromossomo 21, para identificação de regiões de hemimetilação candidatas a regiões diferencialmente metilada (cDMRs). Esta varredura consistiu em uma análise comparada dos epigenomas de referência dentro de uma janela de detecção fixa de 5Mb.

A interseção de perfis de hemimetilação em pelo menos um ponto entre seis epigenomas de referência foram utilizados como indicadores de novas *cDMRs* no cromossomo 21. Sob este critério, em uma análise prévia, 16 *cDMRs* foram identificadas, as quais estão descritas na tabela 5, incluindo a região intrônica do transcrito *W001* do gene *WRB*, recentemente descrita como uma DMR (Docherty *et al.*, 2014).

A tabela 6 traz a caracterização, *in silico*, das 16 *cDMRs* identificadas no presente estudo.

Tabela 5. Identificação de cDMRs no cromossomo 21.

cDMR	Posição Física	Pontos de Interseção	Tipo de Interseção
cDMR-1	15351911-15353036	3	IMR90-Linfócito B; Neutrófilo-IMR90 ; Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-2	15447961-15448669	2	CD133HSC-Neutrófilo; Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-3	15653292-15653524	1	CD133HSC-Neutrófilo
cDMR-4	30449301-30449957	1	CD133HSC-Neutrófilo
cDMR-5	30527728-30528100	2	CD133HSC-Neutrófilo; Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-6	35240062-35240268	1	CD133HSC-Neutrófilo
<i>WRB-DMR</i>	40757536-40759772	4	CD133HSC-Neutrófilo; IMR90-Linfócito B; Neutrófilo-IMR90; Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-7	44864425-44864766	2	CD133HSC-Neutrófilo; Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-8	45558373-45560366	2	CD133HSC-Neutrófilo; Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-9	45904870-45905734	3	IMR90-Linfócito B; Neutrófilo-IMR90; Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-10	46274675-46275085	1	Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-11	46677240-46677554	1	CD133HSC-Neutrófilo
cDMR-12	46697290-46732239	1	Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-13	46902794-46903185	1	Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-14	47294773-47297064	2	CD133HSC-Neutrófilo; Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-15	47716240-47716676	2	CD133HSC-Neutrófilo; Linfócito B-Neutrófilo
cDMR-16	48081116-48081957	2	CD133HSC-Neutrófilo; Linfócito B-Neutrófilo

Tabela 6. Caracterização das cDMRs identificadas no cromossomo 21.

cDMR	Posição Física	Gene	iCpG	Localização gênica das iCpG
cDMR-1	15351911-15353036		CpG:143	
cDMR-2	15447961-15448669			
cDMR-3	15653292-15653524			
cDMR-4	30449301-30449957	<i>MAP3K7CL</i>	CpG:41	promotor
cDMR-5	30527728-30528100	<i>MAP3K7CL</i>		íntron 6
cDMR-6	35240062-35240268	<i>ITSN1</i>		íntron 33
<i>WRB-DMR</i>	40757536-40759772	<i>WRB</i>	CpG:27	íntron 1
cDMR-7	44864425-44864766		CpG:51	
cDMR-8	45558373-45560366	<i>C21orf33</i>		íntron 4
cDMR-9	45904870-45905734		CpG:35	
cDMR-10	46274675-46275085	<i>PTTG1IP</i>		íntron 2
cDMR-11	46677240-46677554			
cDMR-12	46697290-46732239			
cDMR-13	46902794-46903185	<i>COL18A1</i>		íntron 15
cDMR-14	47294773-47297064	<i>PCBP3</i>	CpG:24	íntron 1
cDMR-15	47716240-47716676	<i>YBEY</i>		íntron 4
cDMR-16	48081116-48081957	<i>PRMT2</i>	CpG:89	íntron 9

Em uma análise mais restritiva, dentro de uma janela de detecção de 40Kb uma segunda análise foi realizada por 4 pesquisadores do grupo. Em uma escala de importância foram considerados como critérios de inclusão: 1) distribuição homogênea dos pontos hemimetilados observados; 2) extensão da região hemimetilada; 3) presença de iCpG. Como critérios de exclusão foram utilizados: 1) hemimetilação em linhagem germinativa; 2) variações do perfil de hemimetilação em pelo menos 7/62 metilomas referência avaliados.

A segunda varredura do cromossomo 21, na janela de detecção de 40Kb, convergiu para a seleção de dois alvos, comuns as 4 observações, *WRB-DMR* e *MAP3K7CL-cDMR-4*. Nas figuras 40 e 41 estão representados os mapas físicos para os genes *WRB* e *MAP3K7CL* expandidos em 40Kb, incluindo as regiões *WRB-DMR* e *MAP3K7CL-DMR* visualizadas por meio de seis projetos metilomas na plataforma USCS Browser customizada.

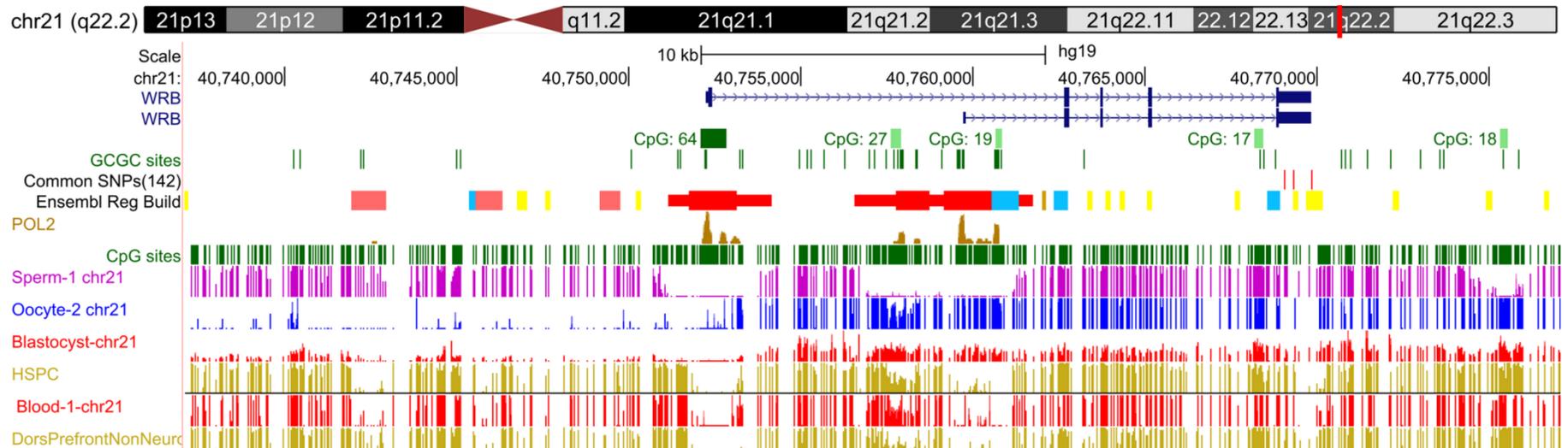


Figura 40. Mapa físico do gene *WRB* na região 21q22.2 expandido 40Kb. Na parte superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. Na porção superior, na cor azul, estão descritos as duas isoformas do gene *WRB*. A transcrição do gene ocorre na fita positiva. Abaixo dos transcritos variantes, na cor verde, estão posicionadas as ilhas CpG com os respectivos números do dinucleotídeo CG indicados. Também estão indicados os sítios de restrição para a enzima HhaI, sensível a metilação, e os SNPs mapeados na região 3'UTR. As regiões promotoras do gene *WRB* estão indicadas em vermelho pelos sítios de ligação a RNA polimerase. Na porção inferior da figura estão os perfis de metilação do gene *WRB*. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa está representada o estado de metilação observado em espermatozoide. Na cor azul está representado o estado de metilação observado em oócitos. Na cor vermelha estão representados os estados de metilação observado em blastocisto e células sanguíneas, respectivamente. Na cor amarela estão representados os estados de metilação observados em células embrionárias humanas e tecido cerebral. As regiões promotoras (contendo as ilhas CpG:64 e CpG:27) do gene do gene *WRB* estão desmetiladas e hemimetiladas, respectivamente, nos 4 tecidos somáticos analisados. Observa-se no loco *WRB-DMR* (mapeado na ilha CpG:27) estados de ausência de metilação e hipermetilação em linhagens germinativas masculinas e femininas respectivamente, caracterizando esta região como uma gDMR. Imagem customizada no Browser da UCSC.

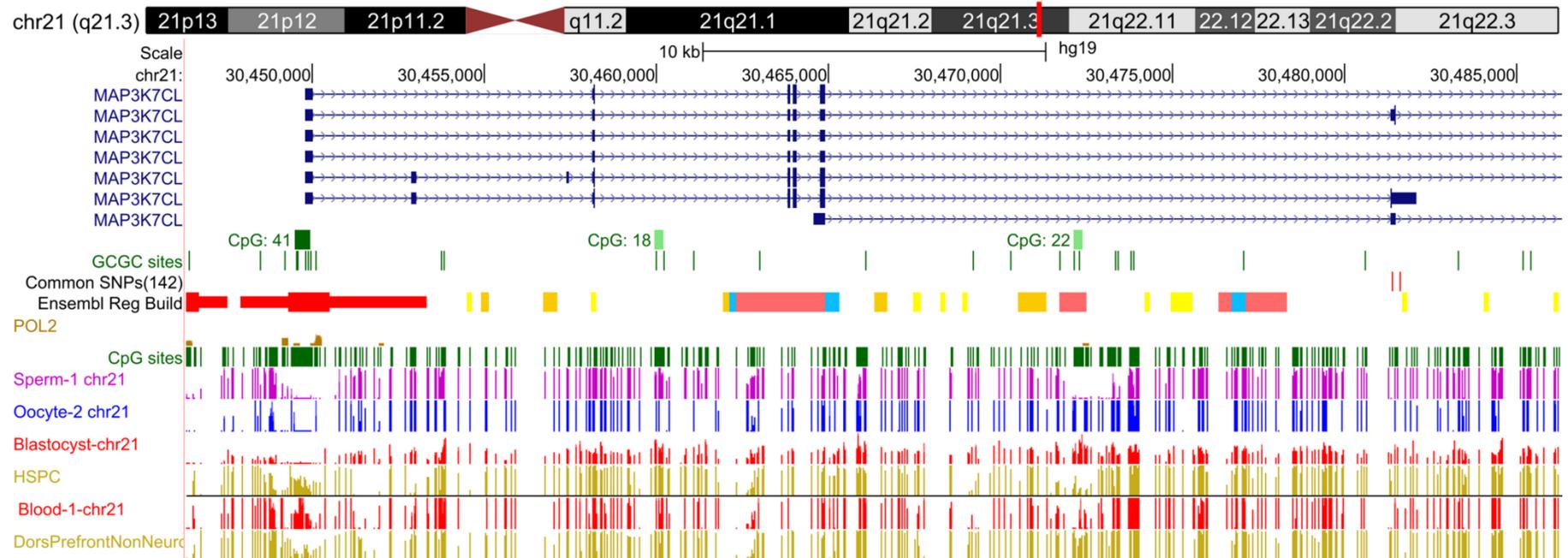


Figura 41. Mapa físico do gene *MAP3K7CL* na região 21q21.3 expandido 40Kb. Na parte superior da figura está representado o ideograma do cromossomo 21. Na porção superior, na cor azul, estão descritos as sete isoformas do gene *MAP3K7CL*. A transcrição do gene ocorre na fita positiva. Abaixo dos transcritos, na cor verde, estão posicionadas as ilhas CpG com os respectivos números do dinucleotídeo CG indicados. Também estão indicados os sítios de restrição para a enzima HhaI, sensível a metilação. As região promotora do gene *MAP3K7CL* está indicada em vermelho pelos sítios de ligação da RNA polimerase. Na porção inferior da figura estão os perfis de metilação. A escala do estado de metilação é de 0 a 100% na vertical. Para efeitos comparativos foram incluídos seis estudos metilomas do banco de dados disponíveis na plataforma da UCSC. Na cor rosa está representada o estado de metilação observado em espermatozoide. Na cor azul está representado o estado de metilação observado em oócitos. Na cor vermelha estão representados os estados de metilação observado em blastocisto e células sanguíneas, respectivamente. Na cor amarela estão representados os estados de metilação observados em células embrionárias humanas e tecido cerebral. Observa-se no loco *MAP3K7CL-cDMR* (mapeado na ilha CpG:41) do gene *MAP3K7CL* estados de ausência de metilação em gametas e, hemimetilação nos 4 tecidos somáticos analisados, caracterizando esta região como uma DMR secundária (pós-zigótica). Imagem customizada no Browser da UCSC.

6.8 Validação dos ensaios DESM-QFPCR para a determinação dos perfis de metilação nas regiões *WRB-DMR* e *MAP3K7CL cDMR-4*

Visando investigar os perfis de metilação nas regiões *WRB-DMR* e *MAP3K7CL-cDMR-4*, foram elaborados dois ensaios de Digestão Enzimática Sensível à Metilação associada (DESM) a PCR quantitativa por fluorescência (QFPCR) para a determinação do estado de metilação destas regiões.

O ensaio de DESM-QFPCR consistiu no tratamento de amostras de DNA com enzimas de restrição sensíveis a metilação, seguida da amplificação da região contendo os sítios CpG a serem investigados, mais dois controles, um fragmento totalmente desmetilado contendo sítios de restrição (Controle positivo – CP) e outro fragmento referência sem sítios de restrição (Controle negativo- CN). Na técnica de DESM-QFPCR, o percentual de metilação da região estudada é determinado através da razão entre os fragmentos alvo (cDMR) e referência (CN) pré e pós tratamento enzimático. Neste contexto razões $<0,33$ caracterizam perfis de hipometilação, enquanto razões $>0,66$ caracterizam perfis de hipermetilação. Perfis de hemimetilação são caracterizados por razões $>0,33-0,66<$. Os iniciadores para os ensaios *WRB-DMR* e *MAP3K7CL-cDMR-4* DESM-QFPCR estão descritos no apêndice A.

Para validação do estado de metilação do loco *WRB-DMR*, o ensaio DESM-QFPCR foi realizado em amostras obtidas de 21 indivíduos trissômicos e 12 indivíduos dissômicos (controle). A origem parental da cópia extra do cromossomo 21 foi determinada previamente através da segregação de marcadores de DNA do tipo STR em cada núcleo familiar. Os genótipos observados estão descritos na tabela 7. Dos 21 núcleos familiares pertencentes à coorte de estudo, 15/21 consistem em trissomias maternas enquanto 6/21 em trissomias paternas.

Tabela 7. Origem parental da cópia extra do cromossomo 21 na coorte de estudo.

Marcador STR	GM		GSD			GP		GNDJ
D21S11	12 M		12 SD			12 P		Materno
	235	247	235	243	247	243	251	
D21S11	17 M		17 SD			17 P		Materno
	255	257	253	255	257	247	253	
D21S14507484	30 M		30 SD			30 P		Paterno
	232	245	241	241	245	228	241	
D21S11	36 M		36 SD			36 P		Materno
	243	253	251	253	253	243	251	
IFNAR	43 M		43 SD			43 P		Materno
	383	395	383	395	400	400	404	
D21S11	65 M		65 SD			65 P		Materno
	243	247	243	247	253	253	253	
D21S11	77 M		77 SD			77 P		Materno
	239	247	239	247	247	239	243	
D21S11	78 M		78 SD			78 P		Materno
	251	253	247	251	253	243	247	
D21S1993	79 M		79 SD			79 P		Paterno
	177	177	174	174	177	174	180	
D21S1270	81 M		81 SD			81 P		Materno
	299	325	299	320	325	316	320	
D21S14507484	82 M		82 SD			82 P		Materno
	241	241	232	241	241	232	232	
D21S14618215	83 M		83 SD			83 P		Materno
	180	195	180	195	200	200	204	
D21S35642814	84 M		84 SD			84 P		Materno
	190	240	190	230	240	230	245	
D21S11	242 M		242 SD			242 P		Paterno
	210	220	216	216	220	216	226	
D21S35642814	854 M		854 SD			854 P		Materno
	229	234	229	234	289	254	289	
D21S35642814	865 M		865 SD			865 P		Paterno
	193	299	239	269	299	239	269	
D21S35642814	869 M		869 SD			869 P		Materno
	188	239	188	229	239	229	274	
D21S26583121	884 M		884 SD			884 P		Paterno
	378	380	370	380	386	370	386	
D21S35642814	889 M		889 SD			889 P		Materno
	233	289	218	233	289	218	249	
D21S35642814	901 M		901 SD			901 P		Paterno
	213	264	234	234	264	234	259	

GM: Genótipo materno; GSD: Genótipo probando; GP: Genótipo paterno; GNDJ: Gameta não disjunto.

Metilação diferencial, estatisticamente diferente ($p < 0.0001$) foi observada no loco *WRB-DMR* entre os três grupos avaliados. Entre os casos de trissomia materna o perfil de metilação nesta região foi essencialmente hipermetilado, com uma média de 68,3% entre as replicatas. O percentual de metilação determinado para o grupo T21M está descrito na tabela 8. Entre os casos de trissomia paterna o perfil de metilação da *WRB-DMR* foi essencialmente hipometilado, com uma média de metilação de 33,4% entre as replicatas. O percentual de metilação determinado para o grupo T21P está descrito na tabela 9. Em indivíduos dissômicos, o estado de hemimetilação esperado manteve-se constante nos pontos analisados, com uma média de metilação em torno de 48,3% entre as replicatas. O percentual de metilação determinado para o grupo controle está descrito na tabela 10. O percentual de metilação na *WRB-DMR* entre os grupos avaliados estão plotados no gráfico 1. Nas figuras 42, 43 e 44, estão representados os perfis de hemimetilação, hipermetilação e hipometilação, respectivamente, observados no presente estudo.

Tabela 8. Dados das replicatas das amostras de DNA de leucócitos de indivíduos com trissomia 21 materna.

Casos	NDJ	Rp0 (%)	Rp1 (%)	Rp2 (%)	Média (%)	Estado de Metilação
12	Materna	57,9	70,6	95,7	74,7	Hipermetilado
17	Materna	93,6	75,6	73,9	81,0	Hipermetilado
27	Materna	79,2	46,7	74,4	66,8	Hipermetilado
36	Materna	79,7	58,9	72,1	70,2	Hipermetilado
43	Materna	87,2	62,2	67,6	72,3	Hipermetilado
65	Materna	80,4	48,4	64,3	64,4	Hemimetilado
77	Materna	50,5	69,4	61,7	60,5	Hemimetilado
78	Materna	52,2	55,5	60,8	56,2	Hemimetilado
81	Materna	63,9	70,1	75,8	69,9	Hipermetilado
82	Materna	64,7	69,0	56,6	63,4	Hemimetilado
83	Materna	63,1	58,2	62,8	61,4	Hemimetilado
84	Materna	60,4	56,1	65,3	60,6	Hemimetilado
854	Materna	68,5	84,0	75,8	76,1	Hipermetilado
869	Materna	59,4	77,6	67,3	68,1	Hipermetilado
889	Materna	71,6	92,0	71,4	78,3	Hipermetilado

NDJ: Não disjunção; RP: Replicata.

Tabela 9. Dados das replicatas das amostras de DNA de leucócitos de indivíduos com trissomia 21 paterna.

Casos	NDJ	Rp0 (%)	Rp1 (%)	Rp2 (%)	Média (%)	Estado de Metilação
30	Paterna	35,0	28,1	29,4	30,8	Hipometilado
79	Paterna	37,4	15,7	55,8	36,3	Hemimetilado
242	Paterna	34,4	28,8	40,2	34,5	Hemimetilado
865	Paterna	31,7	33,3	31,5	32,2	Hipometilado
884	Paterna	37	32,3	37,6	35,6	Hemimetilado
901	Paterna	25,7	37,8	30,6	31,4	Hipometilado

NDJ: Não disjunção; RP: Replicata.

Tabela 10. Perfil de metilação das amostras de DNA de leucócitos e epitélio bucal em indivíduos controles.

Casos	Amostra	Metilação (%)	Estado de Metilação
301	Leucócitos	45,0	Hemimetilado
352	Epitélio Bucal	43,2	Hemimetilado
356	Epitélio Bucal	46,0	Hemimetilado
581	Leucócitos	50,2	Hemimetilado
902	Leucócitos	50,6	Hemimetilado
1027	Leucócitos	45,4	Hemimetilado
1046	Leucócitos	44,6	Hemimetilado
1104	Leucócitos	52,7	Hemimetilado
1251	Leucócitos	57,4	Hemimetilado
1270	Leucócitos	50,6	Hemimetilado
1545	Leucócitos	43,6	Hemimetilado
1559	Leucócitos	50,7	Hemimetilado

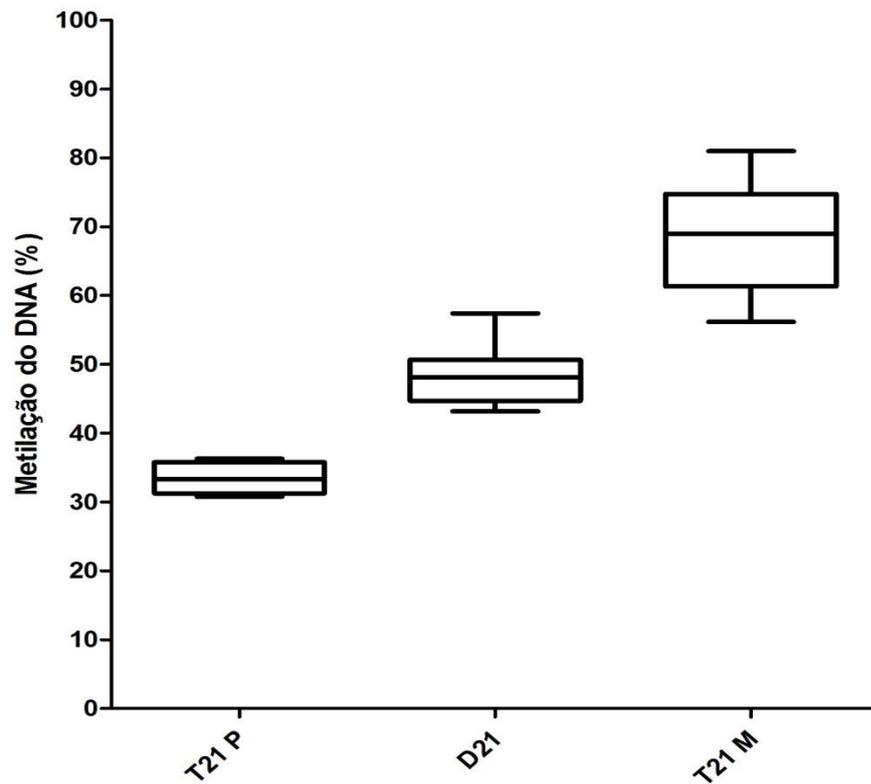


Gráfico 1. Percentual de metilação no loco *WRB-DMR*. Resultado do teste ANOVA significativo ($p < 0.0001$) para o estado de metilação no loco *WRB-DMR* nos três grupos avaliados. T21P: Amostra de DNA de indivíduos com trissomia 21 paterna; D21: Amostra de DNA de indivíduos dissômico; T21M: Amostras de DNA de indivíduos com trissomia 21 materna.

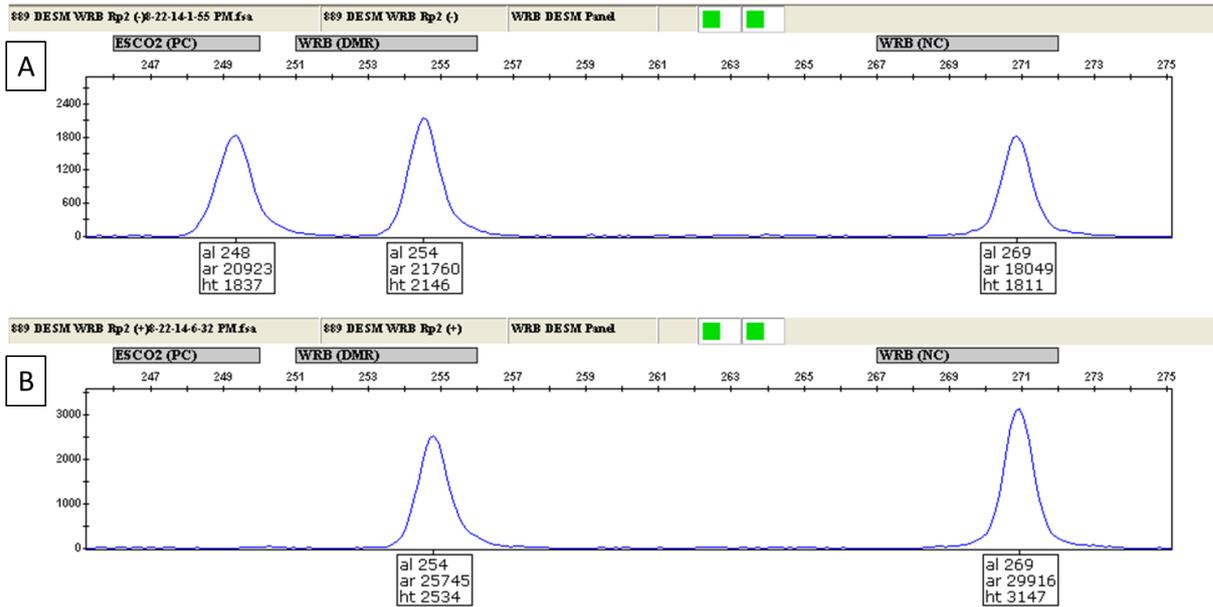


Figura 42. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *WRB-DMR* determinado para a replicata 2 da amostra 869 com trissomia 21 materna. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (248pb), *WRB-DMR* (254pb) e NC (269pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 869 Rp2 a razão observada foi de 1:1,48. Estes resultados indicam um percentual médio de 67,3% de metilação entre os 9 sítios HhaI-CpG investigados na *WRB-DMR*. O estado de metilação apresentada para amostra 869 com trissomia materna é hipermetilado.

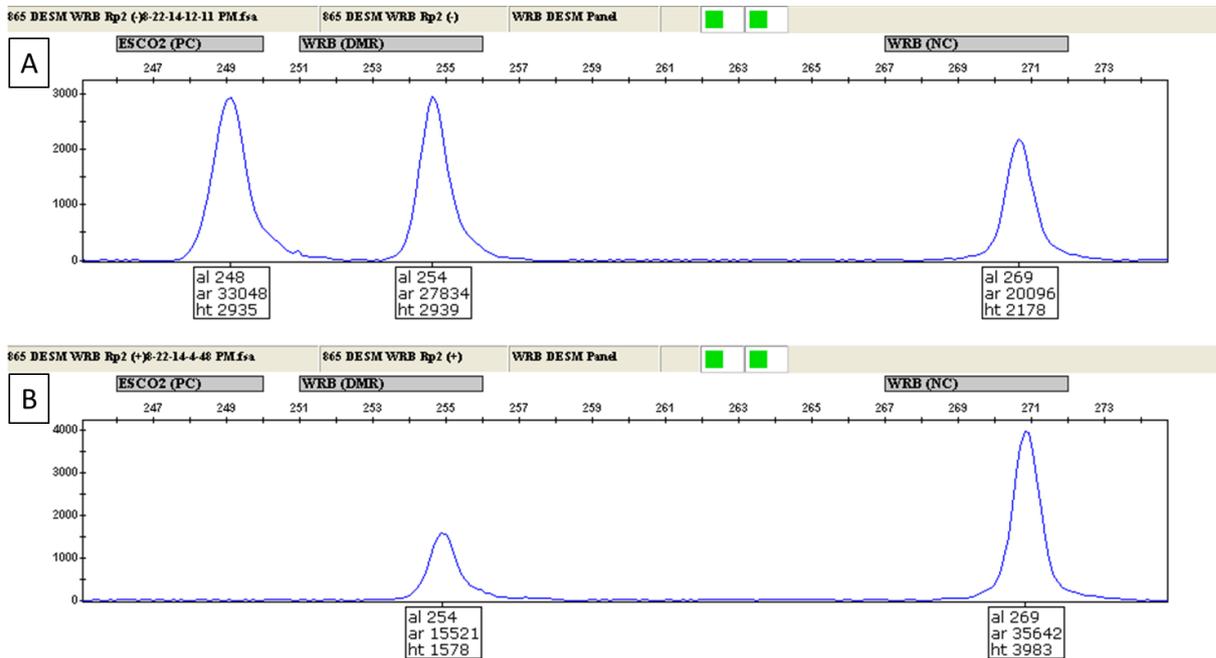


Figura 43. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *WRB-DMR* determinado para a replicata 2 da amostra 865 com trissomia 21 paterna. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (248pb), *WRB-DMR* (254pb) e NC (269pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 865 Rp2 a razão observada foi de 1:3,18. Estes resultados indicam um percentual médio de 31,5% de metilação entre os 9 sítios HhaI-CpG investigados na *WRB-DMR*. O estado de metilação apresentado para amostra 865 com trissomia materna é hipometilado.



Figura 44. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *WRB-DMR* determinado para a amostra dissômica 902. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (248pb), *WRB-DMR* (254pb) e NC (269pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 902 a razão observada foi de 1:1,97. Estes resultados indicam um percentual médio de 50,6% de metilação entre os 9 sítios HhaI-CpG investigados na *WRB-DMR*. O estado de metilação apresentado para amostra dissômica 902 é hemimetilado.

Uma investigação adicional, investigando o estado de metilação da *WRB-DMR* foi realizada em amostra de mola hidatiforme completa (MHC). MHC é um produto da fecundação de um óvulo sem núcleo funcional por um ou dois espermatozoides. Neste contexto, o material genético exibido pela MHC é de origem exclusivamente paterna.

No fragmento 254_ *WRB-DMR* investigado no presente estudo, em pelo menos um dos nove sítios CpG-HhaI investigados exibiu um perfil desmetilado (figura 45), demonstrando que os estados de hipermetilação observados entre os casos de trissomia 21 materna, hipometilação entre os casos de trissomia 21 paterna e hemimetilação em indivíduos dissômicos, são estabelecidos por metilação exclusiva do alelo materno.

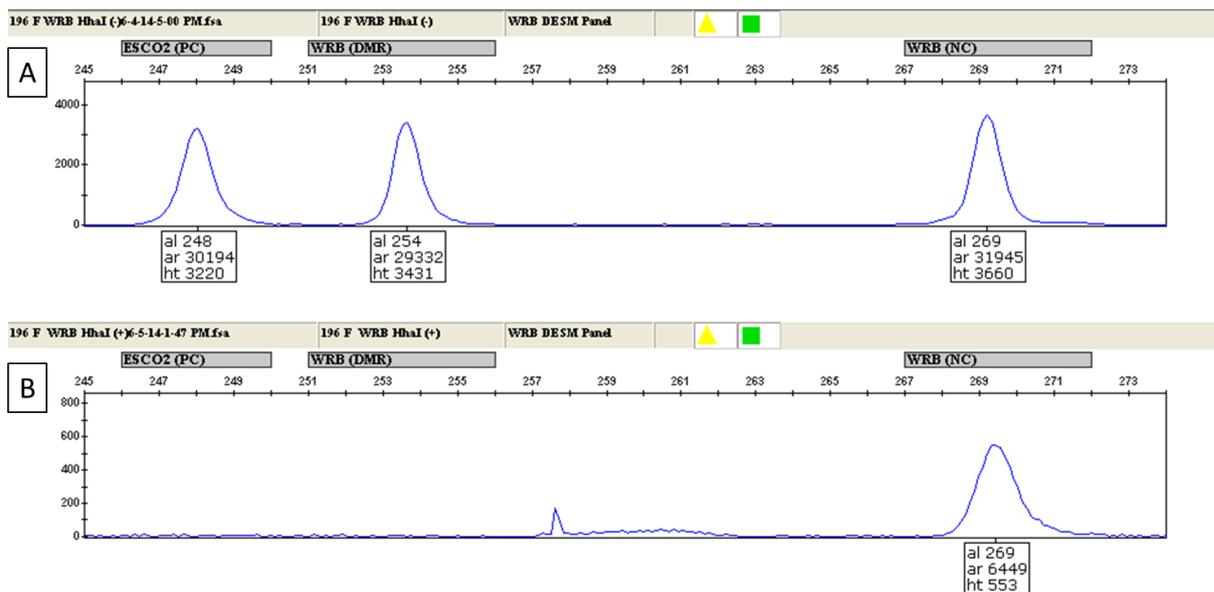


Figura 45. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *WRB-DMR* determinado para a amostra 196 MHC. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (248pb), *WRB-DMR* (254pb) e NC (269pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Na amostra 196 MHC, pelo menos um dos nove sítios HhaI-CpG investigados da *WRB-DMR* estão desmetilados.

Interessantemente, a investigação destes sítios em duas linhagens de células tronco embrionárias humanas, “*human embryonic stem cell 3*” – HES3(46,XX) (figura 46) e “*human embryonic stem cell 7*” – HUES-7 (46,XY), revelou que a maioria dos pontos avaliados no fragmento *254_WRB-DMR* estão totalmente metilados, com um percentual médio >90% no grupo de linhagens embrionárias. Hipermetilação em células-tronco embrionárias (*human embryonic stem cells* – *hESC*) é uma assinatura epigenética comum a 1/3 das 51 DMRs conhecidas, associadas ao *imprinting* genômico.

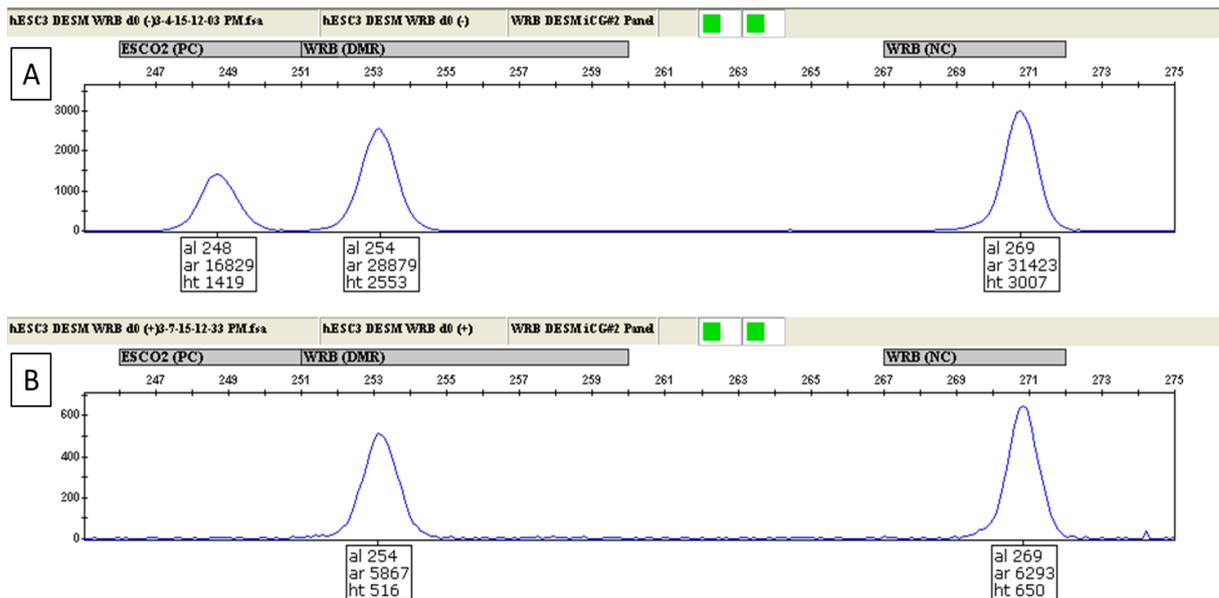


Figura 46. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *WRB-DMR* determinado para a linhagem celular HES3. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (248pb), *WRB-DMR* (254pb) e NC (269pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra HES3 a razão observada foi de 1:1,001. Estes resultados indicam um percentual médio de 99,9% de metilação entre os 9 sítios HhaI-CpG investigados na *WRB-DMR*. O estado de metilação apresentado para amostra HES3 é hipermetilado.

No gráfico 2 plotado o percentual de metilação, estatisticamente diferente ($p < 0.0001$), no loco *WRB-DMR* nos 5 grupos avaliados.

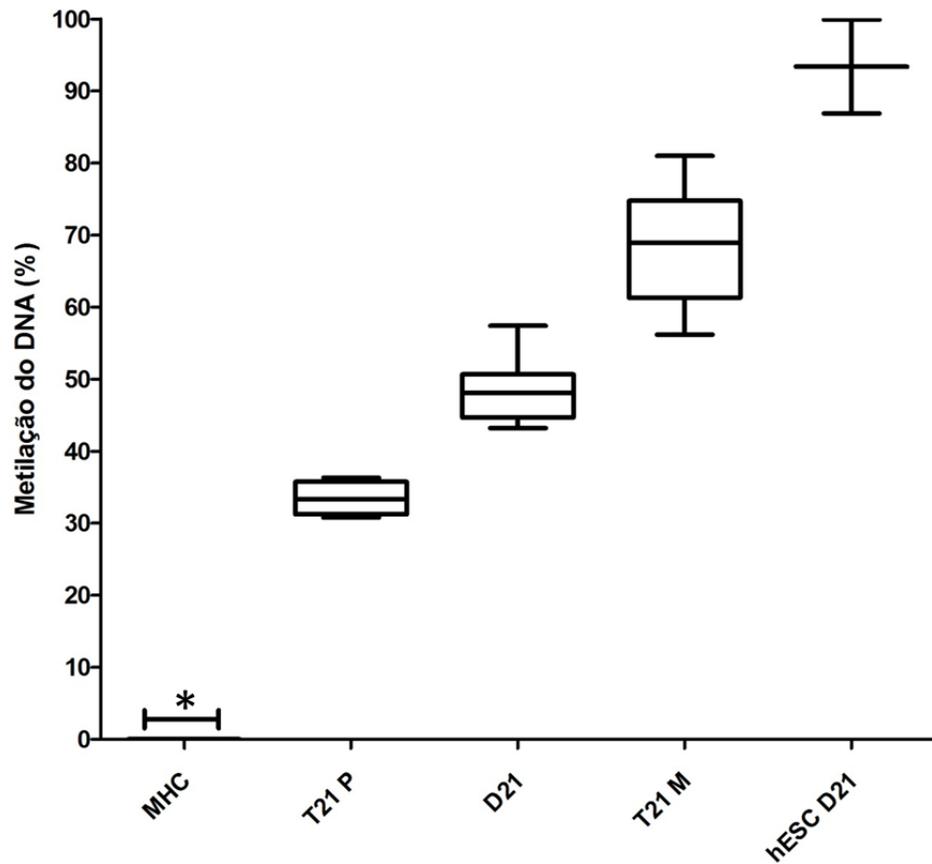


Gráfico 2. Percentual de metilação no loco *WRB-DMR*. Resultado do teste ANOVA significativo ($p < 0.0001$) para o estado de metilação no loco *WRB-DMR* nos cinco grupos avaliados. MHC: Amostra de DNA de Mola Hidatiforme Completa; T21P: Amostra de DNA de indivíduos com trissomia 21 paterna; D21: Amostra de DNA de indivíduos dissômico; T21M: Amostras de DNA de indivíduos com trissomia 21 materna; hESCD21: Amostra de DNA de linhagens embrionárias humanas dissômicas.

O fragmento *254_WRB-DMR* avaliado no presente estudo, delimita uma região genômica onde estão mapeados dois SNPs, rs2299739 e rs2244352. Para confirmar o padrão de metilação alelo-específica na *WRB-DMR*, estes dois SNPs foram genotipados por SNUPE (*single-nucleotide polymorphism primer extension*) em fragmentos gerados por DESM-PCR.

A técnica SNUPE, baseia-se na capacidade da DNA polimerase em inserir um nucleotídeo terminador (dideoxynucleotídeo-ddNTP) e complementar ao polimorfismo de interesse, a um iniciador hibridado adjacente ao SNP a ser investigado na fita molde. Nessa técnica, ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP são marcados com diferentes fluorescências, e cada primer estendido recebe a marcação correspondente ao ddNTP incorporado, que por ser complementar, permite a identificação da variação alélica em cada loco analisado. Os iniciadores para o ensaio *WRB-DMR* SNUPE estão descritos no apêndice A.

Em um núcleo familiar dissômico, com genótipo informativo para o polimorfismo rs2244352, metilação alelo específica foi observada entre os alelos parentais, sendo a metilação no loco *WRB-DMR* exclusivamente de origem materna (figura 47). Estes resultados corroboram com os determinados pelos ensaios de metilação por DESM-QFPCR em MHC e nos núcleos familiares trissômicos.

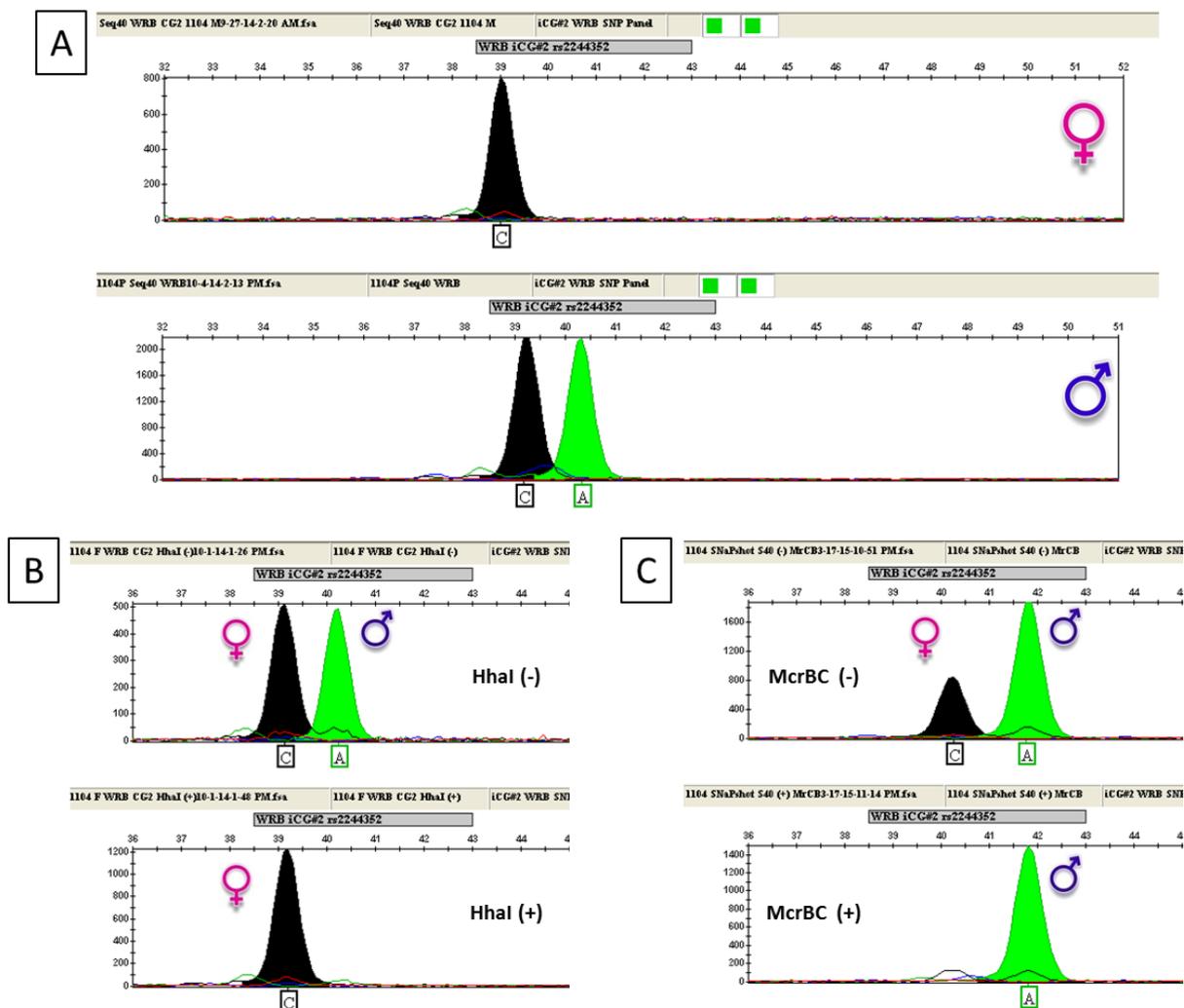


Figura 47. Determinação do estado de metilação alelo-específico na *WRB-DMR* através da investigação do polimorfismo rs2244352 por SNUPE HhaI-McrBC. Em (A) perfil alélico parental determinado para o núcleo familiar dissômico 1104, com homocigose no loco materno caracterizada pelo alelo C_rs2244352 e heterocigose no loco paterno caracterizada pelos alelos C/A_rs2244352. Em (B) na porção superior, perfil alélico determinado para o indivíduo 1104F (filho) caracterizado pelos alelos C_rs2244352 materno e A_rs2244352 paterno. Na porção inferior perfil alélico determinado pelo ensaio SNUPE HhaI. Em condições ótimas a enzima de restrição HhaI cliva apenas gDNA não metilado. A perda do alelo A_rs2244352 em 1104F no ensaio SNUPE HhaI indica ausência de metilação no loco paterno. Em (C) na porção superior, perfil alélico determinado para o indivíduo 1104F caracterizado pelos alelos C_rs2244352 materno e A_rs2244352 paterno. Na porção inferior perfil alélico determinado pelo ensaio SNUPE McrBC. Em condições ótimas a enzima de restrição McrBC cliva apenas gDNA metilado. A perda do alelo C_rs2244352 em 1104F no ensaio SNUPE McrBC indica presença de metilação no loco materno. Os resultados observados nos ensaios SNUPE HhaI-McrBC indicam que o estado de hemimetilação observado na *WRB-DMR* é estabelecido através de metilação alelo-específica no loco materno.

Para a *MAP3K7CL-cDMR* foram investigados sítios CpG em dois fragmentos, ambos mapeados na iCpG:41 do gene *MAP3K7CL*. O fragmento *255_MAP3K7CL cDMR-4pr* abrange uma região de 255pb dentro do promotor de *MAP3K7CL*, onde estão mapeados dois sítios CpG-HhaI hemimetilados *in silico*. O fragmento *253_MAP3K7CL cDMR-4ex* abrange um região de 253pb dentro do éxon1 do gene *MAP3K7CL*, onde estão mapeados três sítios CpG-HhaI hemimetilados *in silico*.

Para a investigação dos sítios CpG-HhaI no fragmento *255_MAP3K7CL cDMR-4pr*, DESM-QFPCR foi realizada em amostras de DNA obtidas de 11 indivíduos, sendo 3 indivíduos com trissomia 21 materna (T21M), 3 com trissomia paterna (T21P), e 5 indivíduos dissômicos (D21). O estado de metilação do fragmento *255_MAP3K7CL cDMR-4pr* variou de 45 a 58% no grupo materno, 43 a 53% no grupo paterno, e 40 a 50% no grupo dissômico. O percentual de metilação determinado para os três grupos estudados estão descritos nas tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Estado de metilação do fragmento *255_MAPK7CL cDMR-4pr* em amostra de DNA de indivíduos trissômicos.

Casos	NDJ	Rp0 (%)	Rp1 (%)	Rp2 (%)	Média (%)	Estado de Metilação
854	Materna	43,1	54,6	38,6	45,4	Hemimetilado
865	Paterna	53,6	47,3	59,5	53,4	Hemimetilado
869	Materna	51,5	56,5	53,6	53,8	Hemimetilado
884	Paterna	47,8	48	43,8	46,5	Hemimetilado
889	Materna	52,8	*	64,1	58,4	Hemimetilado
901	Paterna	41,1	41,4	46,6	43,0	Hemimetilado

NDJ: Não disjunção; RP: Replicata.

(*) Amplificação de baixa qualidade.

Tabela 12. Estado de metilação do fragmento *255_MAPK7CL cDMR-4pr* em amostra de DNA de indivíduos dissômicos.

Casos	Amostra	Metilação (%)	Estado de Metilação
301	Leucócito	40,4	Hemimetilado
352	Leucócito	45,8	Hemimetilado
356	Leucócito	45,8	Hemimetilado
1251	Leucócito	50,5	Hemimetilado
1628	Leucócito	47,6	Hemimetilado

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no estado de metilação do fragmento *255_MAP3K7CL cDMR-4pr* no grupo de trissômicos ($p=0.3733$). Resultado semelhante foi observado quando os três grupos foram comparados ($p=0.2498$), gráfico 3.

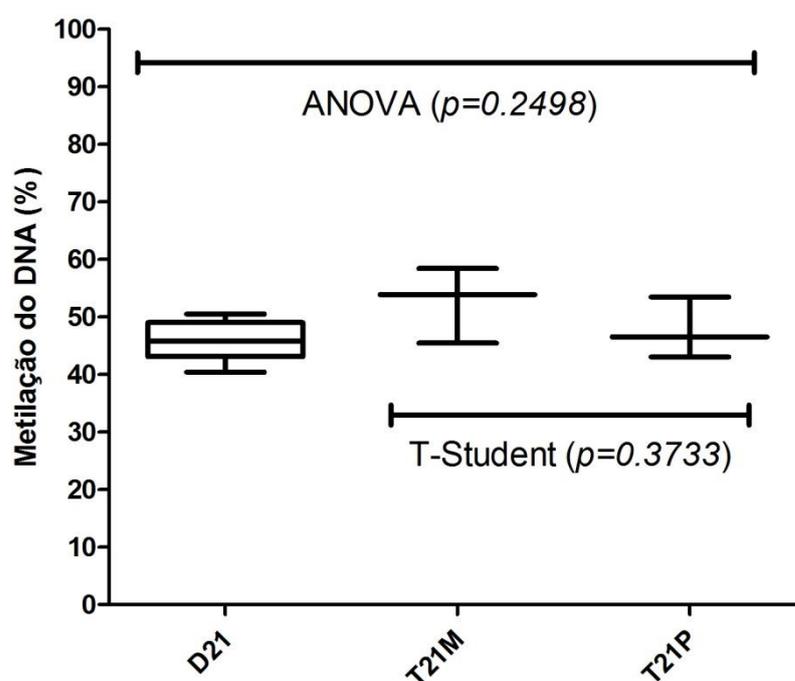


Gráfico 3. Percentual de metilação do loco *MAP3K7CL cDMR-4pr*. D21: Indivíduos dissômicos; T21M: Indivíduos com trissomia 21 materna; T21P: Indivíduos com trissomia 21 paterna. Não houve diferenças significativas no estado de metilação nos grupos avaliados, D21xT21MxT21P (ANOVA: $p=0.2428$) e T21MxT21P (T-student: $p=0.3733$).

Nas figuras 48, 49 e 50 estão representados os perfis de hemimetilação, observados para o loco *MAP3K7CL cDMR-4pr* no presente estudo.

O fragmento *255_MAP3K7CL cDMR-4pr* avaliado no presente estudo, delimita uma região genômica onde está mapeado o SNP rs2853831. Para investigar o padrão de metilação entre os alelos parentais na *MAP3K7cl cDMR-4*, este SNP foi genotipado por SNUPE (*single-nucleotide polymorphism primer extension*) em fragmentos gerados por DESM-PCR. O iniciador para o ensaio *MAP3K7cl cDMR-4* está descrito no apêndice A. Na figura 51, está representado o perfil alélico para o polimorfismo rs2853831, determinado em um indivíduo dissômico e na linhagem embrionária HUES-1.

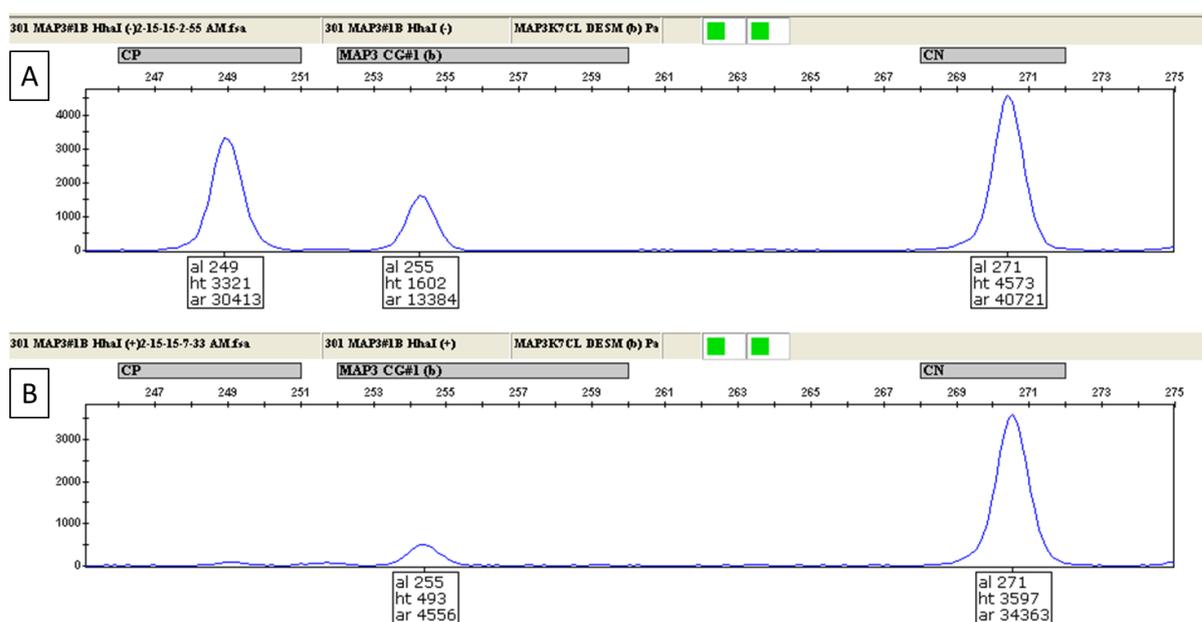


Figura 48. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *MAP3K7CL cDMR-4pr* determinado para o indivíduo dissômico 301F. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (249pb), *MAP3K7CL cDMR-4pr* (255pb) e NC (271pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 301F percentual médio de metilação entre os 2 sítios CpG-HhaI investigados foi de 40,5%. O estado de metilação observado para 301F no loco *MAP3K7CL cDMR-4pr* é hemimetilado.



Figura 49. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *MAP3K7CL cDMR-4pr* determinado para o indivíduo 869 com trissomia 21 materna. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (249pb), *MAP3K7CL cDMR-4pr* (255pb) e NC (271pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 869 percentual médio de metilação entre os 2 sítios CpG-HhaI investigados foi de 51,5%. O estado de metilação observado para 869 no loco *MAP3K7CL cDMR-4pr* é hemimetilado.

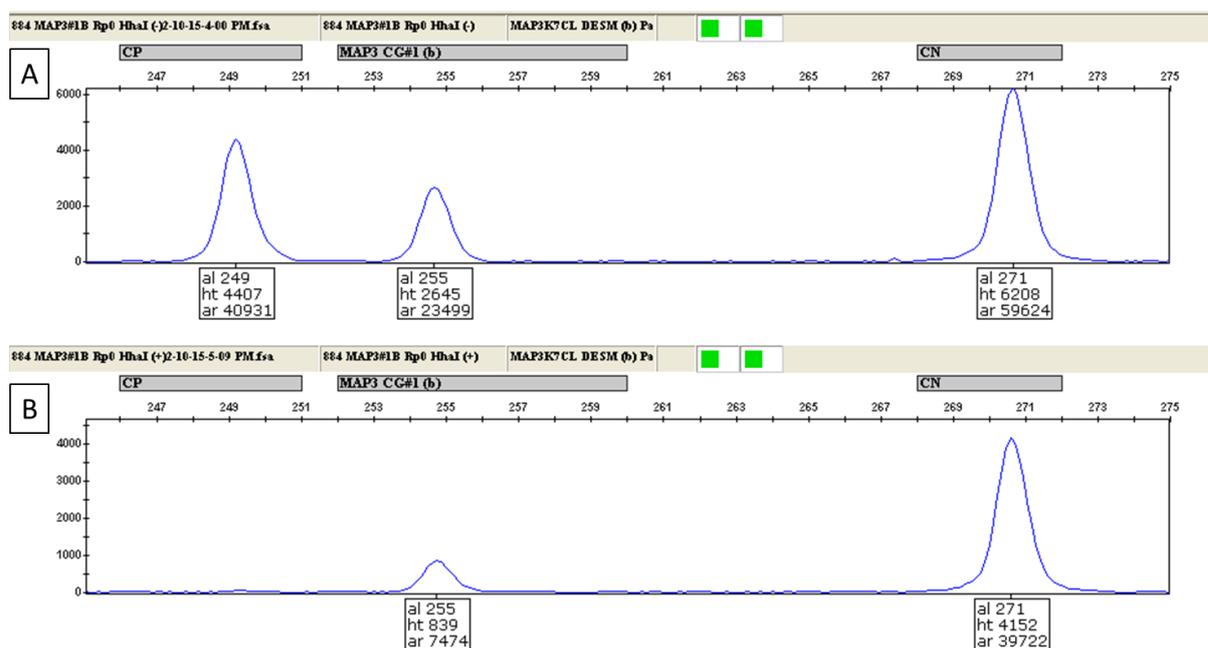


Figura 50. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *MAP3K7CL cDMR-4pr* determinado para o indivíduo 884 com trissomia 21 paterna. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (249pb), *MAP3K7CL cDMR-4pr* (255pb) e NC (271pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 884 percentual médio de metilação entre os 2 sítios CpG-HhaI investigados foi de 47,8%. O estado de metilação observado para 884 no loco *MAP3K7CL cDMR-4pr* é hemimetilado.

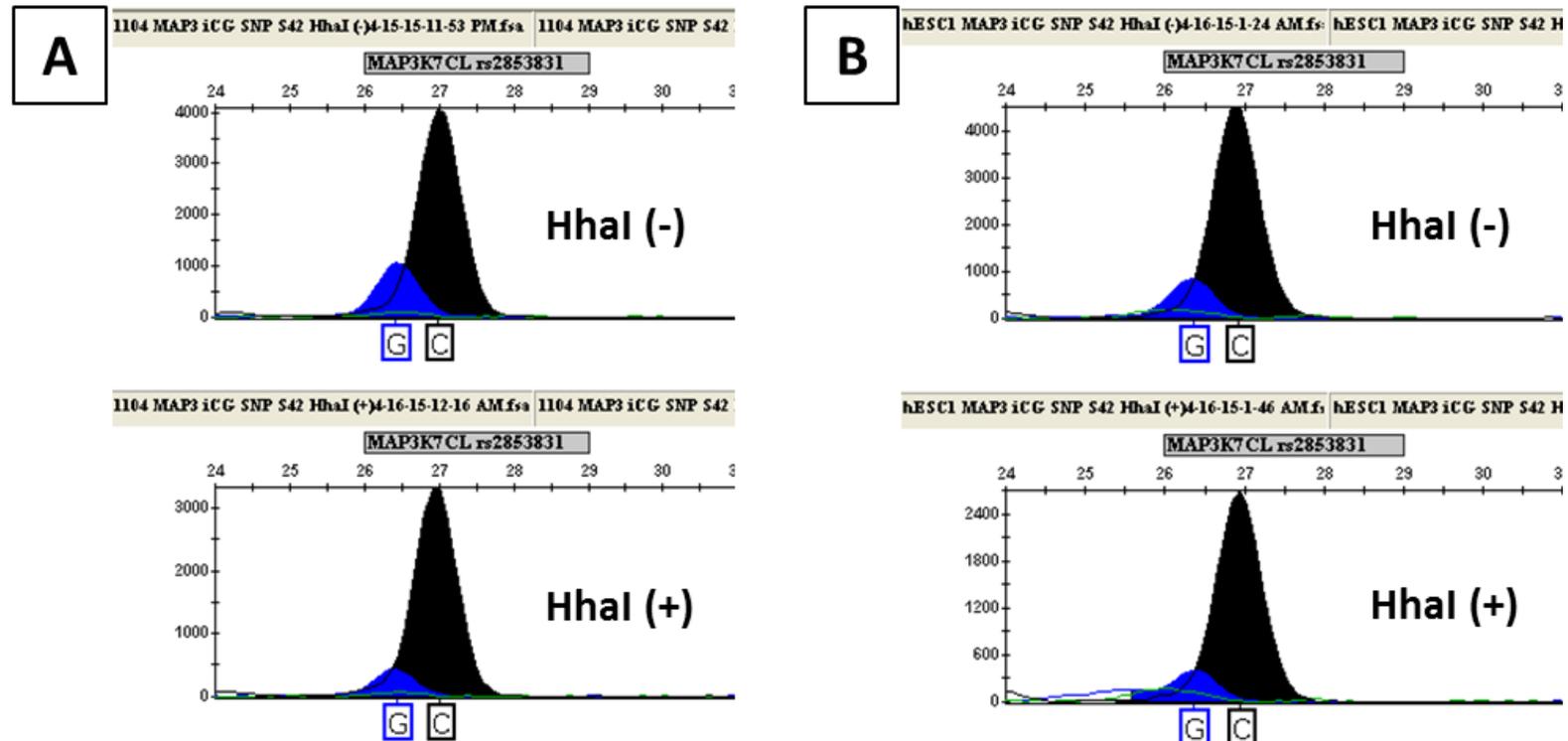


Figura 51. Determinação do padrão de metilação dos alelos parentais na *MAP3K7CL cDMR-4* através da genotipagem do polimorfismo rs2853831 por SNUPE HhaI. Em (A) perfil alélico determinado para a o indivíduo dissômico 301F, em amostras tratadas e não tratadas com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI. Em (B) perfil alélico determinado para a linhagem embrionária HUES-1, em amostras tratadas e não tratadas com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI. Em condições ótimas a enzima de restrição HhaI cliva apenas gDNA não metilado. A manutenção dos alelos parentais após tratamento com HhaI em ambos os ensaios, indicam presença de metilação em ambos os alelos G/C. Este resultado sugere que o estado de hemimetilação observado na *MAP3K7CL cDMR-4* é estabelecido através perda e/ou ganho de metilação em ambos os alelos parentais.

Para a investigação dos sítios CpG-HhaI no fragmento *253_MAP3K7CL cDMR-4ex*, DESM-QFPCR foi realizada em amostras de DNA obtidas de 11 indivíduos, sendo 3 indivíduos com trissomia 21 materna (T21M), 4 com trissomia paterna (T21P), e 4 indivíduos dissômicos (D21). O estado de metilação do fragmento *253_MAP3K7CL cDMR-4pr* nas amostras avaliadas variou de 38 a 66% no grupo materno, 31 a 51% no grupo paterno, e 38 a 51% no grupo dissômico. O percentual de metilação determinados para as replicatas dos três grupos avaliados estão descritos nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Estado de metilação do fragmento *253_MAPK7CL cDMR-4ex* em amostra de DNA de indivíduos trissômicos.

Casos	NDJ	Rp0 (%)	Rp1 (%)	Rp2 (%)	Média (%)	Estado de Metilação
242	Paterna	52,9	50,3	51,8	51,7	Hemimetilado
854	Materna	36,2	41,7	36,0	38,0	Hemimetilado
865	Paterna	*	33,8	42,7	38,2	Hemimetilado
869	Materna	*	62,5	71,2	66,8	Hipermetilado
884	Paterna	54,2	41,4	56,2	50,6	Hemimetilado
889	Materna	49,2	47,5	56,8	51,2	Hemimetilado
901	Paterna	50,3	42,6	38,8	43,9	Hemimetilado

NDJ: Não disjunção; RP: Replicata.
(*) Amplificação de baixa qualidade.

Tabela 14. Estado de metilação do fragmento *253_MAPK7CL cDMR-4ex* em amostra de DNA de indivíduos dissômicos.

Casos	Rp0 (%)	Rp1 (%)	Rp2 (%)	Média (%)	Estado de Metilação
301	49,8	50,4	46,8	49,0	Hemimetilado
352	29,8	24,3	23,6	25,9	Hipometilado
356	51,2	46,9	*	49,0	Hemimetilado
902	69,0	61,8	62,0	64,3	Hemimetilado
1104	41,3	45,4	47,4	44,7	Hemimetilado
1639	57,4	*	68,4	62,9	Hemimetilado

RP: Replicata.
(*) Amplificação de baixa qualidade.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no estado de metilação do fragmento *253_MAP3K7CL cDMR-4ex* no grupo de trissômicos ($p=0.8185$). Resultado semelhante foi observado quando os três grupos foram comparados ($p=0.4886$), gráfico 4.

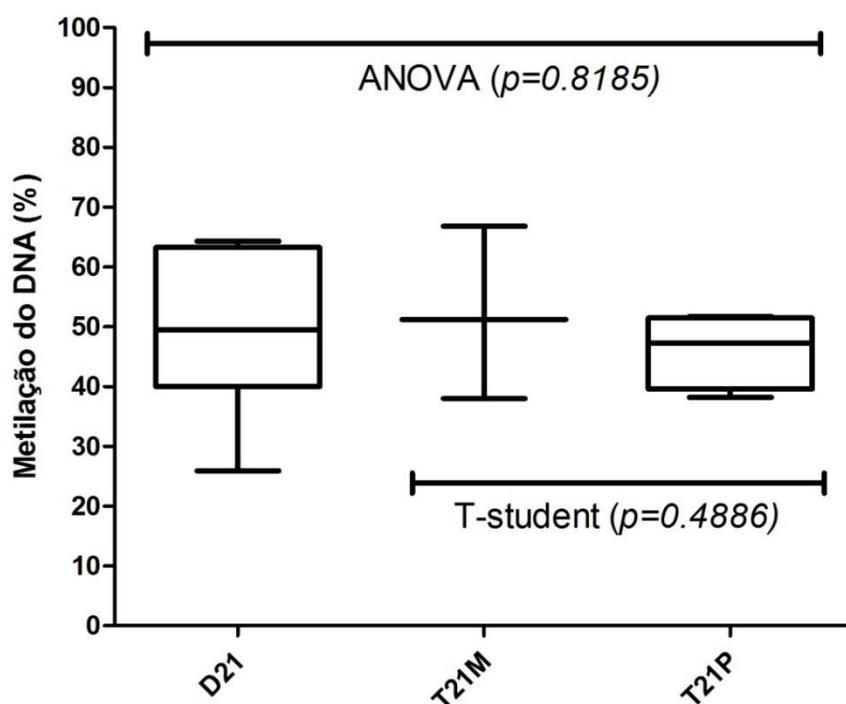


Gráfico 4. Percentual de metilação do loco *MAP3K7CL cDMR-4ex*. D21: Indivíduos dissômicos; T21M: Indivíduos com trissomia 21 materna; T21P: Indivíduos com trissomia 21 paterna. Não houve diferenças significativas no estado de metilação nos grupos avaliados, D21xT21MxT21P (ANOVA: $p=0.8185$) e T21MxT21P (T-student: $p=0.4886$).

Nas figuras 52, 53 e 54 estão representados os perfis de hemimetilação, observados para o loco *MAP3K7CL cDMR-4ex* no presente estudo.

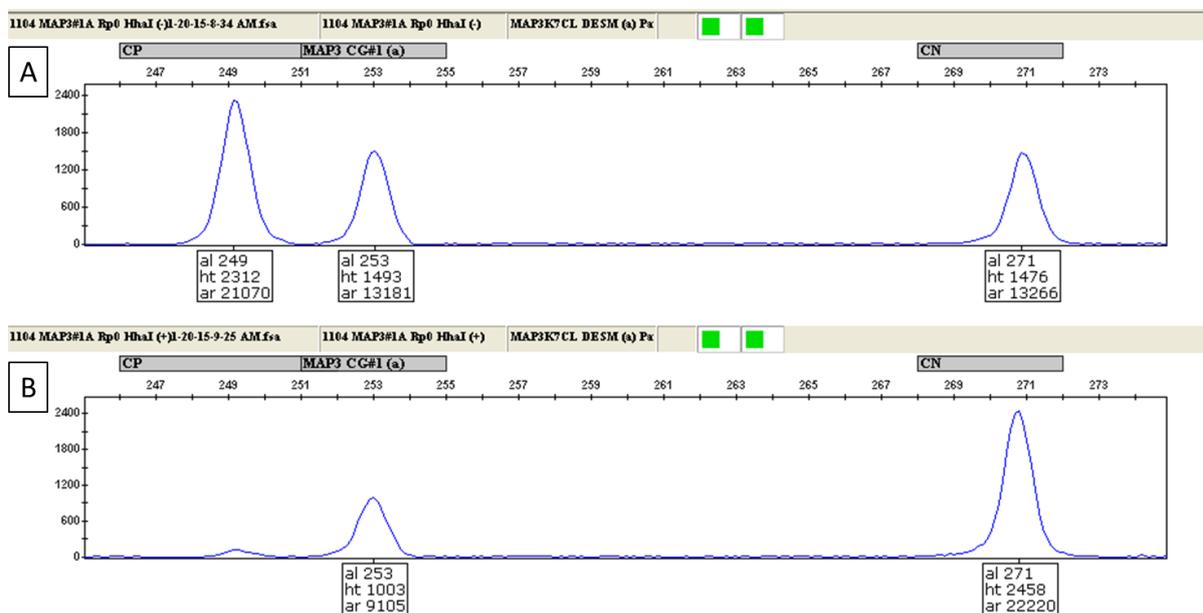


Figura 52. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *MAP3K7CL cDMR-4ex* determinado para o indivíduo dissômico 1104F. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (249pb), *MAP3K7CL cDMR-4ex* (253pb) e NC (271pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 1104F percentual médio de metilação entre os 3 sítios CpG-HhaI investigados foi de 41,3%. O estado de metilação observado para 1104F no loco *MAP3K7CL cDMR-4ex* é hemimetilado.

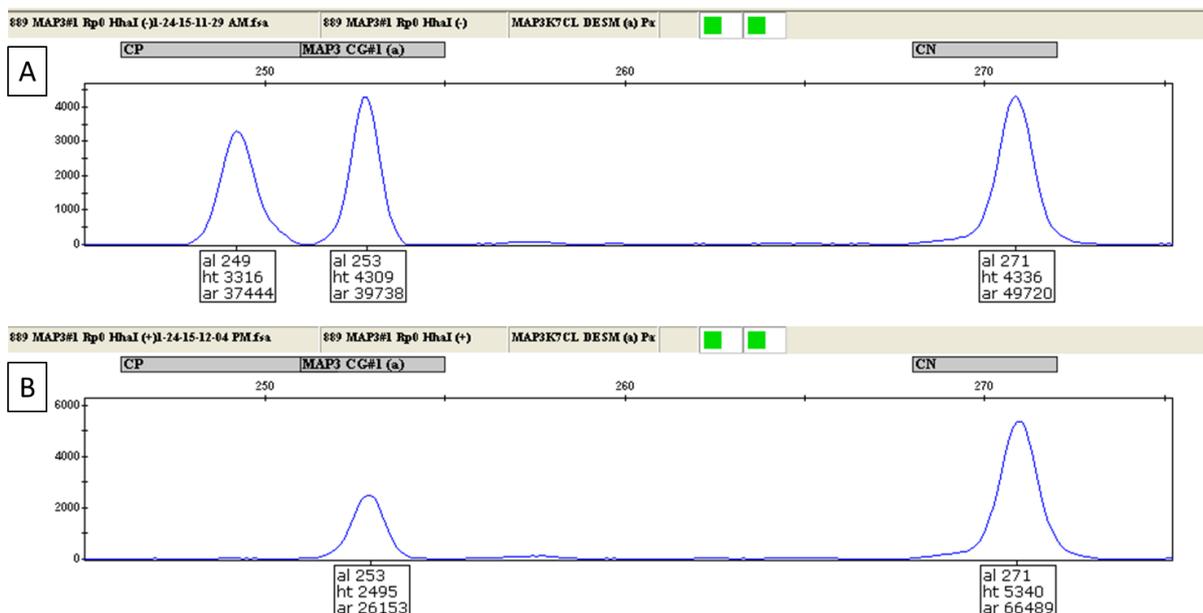


Figura 53. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *MAP3K7CL cDMR-4ex* determinado para o indivíduo 889 com trissomia 21 materna. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (249pb), *MAP3K7CL cDMR-4ex* (253pb) e NC (271pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 889 o percentual médio de metilação entre os 3 sítios CpG-HhaI investigados foi de 49,2%. O estado de metilação observado para 889 no loco *MAP3K7CL cDMR-4ex* é hemimetilado.

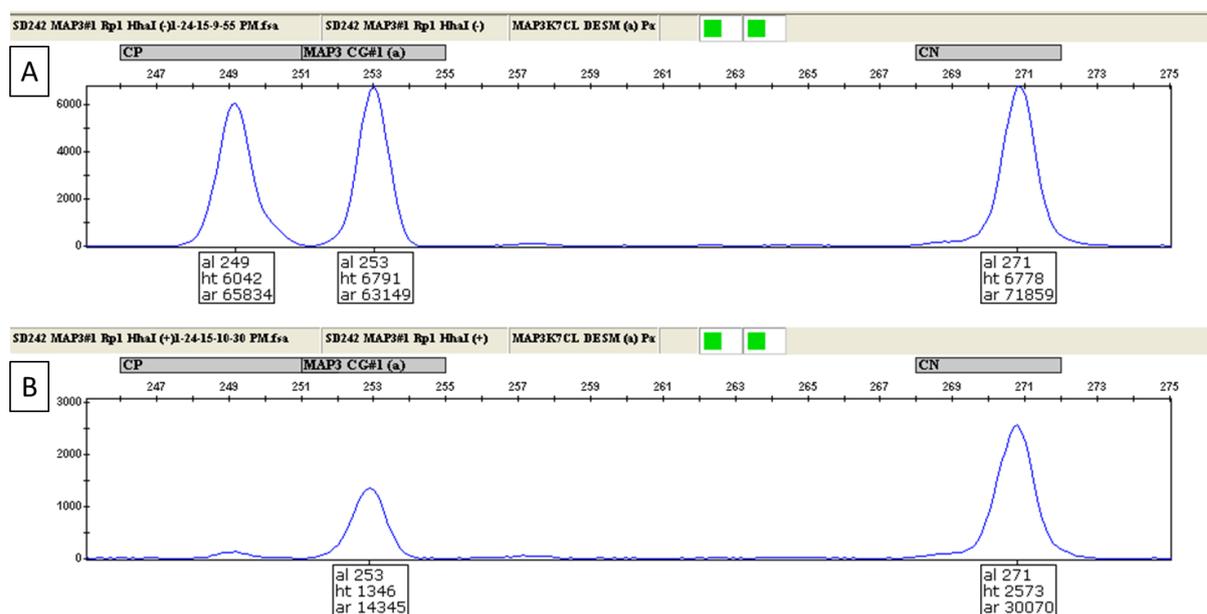


Figura 54. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *MAP3K7CL cDMR-4ex* determinado para o indivíduo 242 com trissomia 21 paterna. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (249pb), *MAP3K7CL cDMR-4ex* (253pb) e NC (271pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 242 o percentual médio de metilação entre os 3 sítios CpG-HhaI investigados foi de 50,3%. O estado de metilação observado para 242 no loco *MAP3K7CL cDMR-4ex* é hemimetilado.

6.9 Investigação da influência da origem parental da cópia extra do cromossomo 21 no estado de metilação dos locos *TMEM131* e *RUNX1*

Visando determinar a influência da origem parental da cópia extra do cromossomo 21 nas alterações do estado de metilação dos genes *TMEM131* e *RUNX1* na condição de trissomia, foram gerados e aplicados na coorte de estudo dois ensaios DESM-QFPCR e SNUPE HhaI/HpaII para a determinação do perfil de metilação e metilação alelo parental-específico.

As sequências dos iniciadores para os ensaios DESM-QFPCR e SNUPE HhaI/HpaII estão descritos no apêndice A.

Para determinação do estado de metilação do loco *TMEM131-DMR*, foi realizado o ensaio DESM-QFPCR, pelo qual foram investigados dois sítios CpG-HpaII em amostras de DNA obtidas de seis indivíduos trissômicos (3 casos de trissomia 21 materna e 3 casos de trissomia 21 paterna) e sete indivíduos dissômicos (controle).

Metilação diferencial do DNA, estatisticamente significativa ($p=0.0001$) foi observada no fragmento 253_*TMEM131-DMR* entre o grupo trissômico (T21) e o grupo dissômico (D21). No grupo trissômico o estado de metilação da região analisada foi hemimetilado, com uma média 40,7% de metilação nos pontos investigados. Entre o grupo dissômico o estado de metilação da região analisada foi hipermetilado, com uma média 85,8% de metilação nos pontos investigados. Entre os grupos de indivíduos com trissomia 21 materna e trissomia 21 paterna não foram observadas diferenças significantes no estado de metilação do fragmento analisado. Na tabela 15 estão descritos as replicatas do ensaio DESM-QFPCR para o fragmento 253_*TMEM131-DMR*.

Tabela 15. Percentual de metilação do fragmento 253_ *TMEM131-DMR*.

Casos	NDJ	Rp0 (%)	Rp1 (%)	Rp2 (%)	Média (%)	Estado de Metilação
301	Controle	*	90,9	80,6	85,7	Hipermetilado
356	Controle	81,6	80,0	78,1	79,9	Hipermetilado
902	Controle	97,9	91,6	90,3	93,3	Hipermetilado
1046	Controle	74,7	89,1	*	81,9	Hipermetilado
1104	Controle	97,4	99,7	*	98,5	Hipermetilado
1251	Controle	82,6	95,6	83,0	87,1	Hipermetilado
1545	Controle	68,4	79,2	75,6	74,4	Hipermetilado
854	Materna	57,5	64,7	62,7	61,6	Hemimetilado
865	Paterna	37,7	39,1	36,2	37,7	Hemimetilado
869	Materna	26,8	29,7	33,4	30,0	Hipometilado
884	Paterna	50,7	40,2	42,5	44,5	Hemimetilado
889	Materna	50,7	42,7	52,7	48,7	Hemimetilado
901	Paterna	22,2	22,8	21,7	22,2	Hipometilado

NDJ: Não disjunção; RP: Replicata.

(*) Amplificação de baixa qualidade.

O percentual de metilação na *TMEM131-DMR* entre os grupos avaliados estão plotados no gráfico 5.

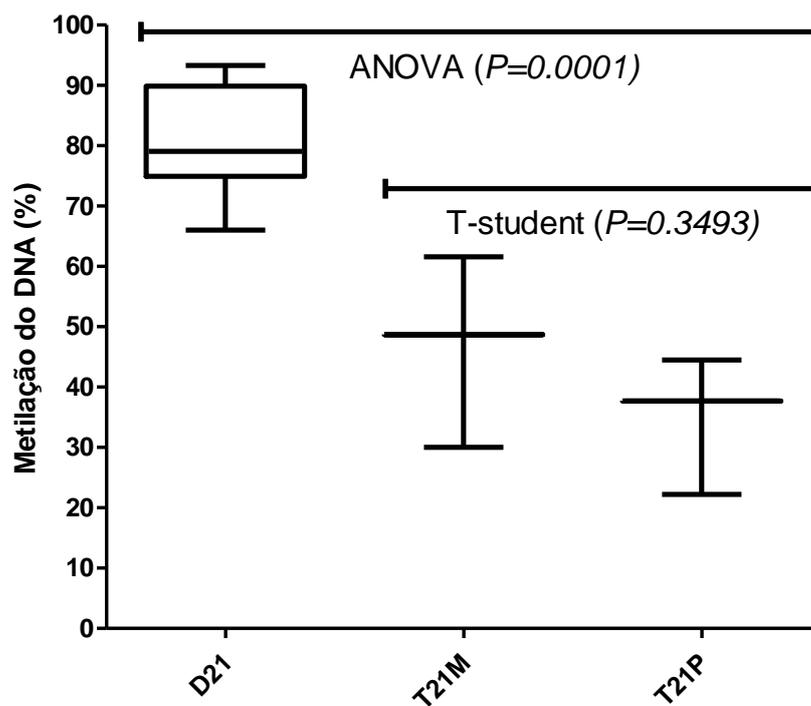


Gráfico 5. Percentual de metilação no loco *TMEM131-DMR*. D21: Indivíduos dissômicos; T21M: Indivíduos com trissomia 21 materna; T21P: Indivíduos com trissomia 21 paterna. Diferenças estatisticamente significante foram observadas entre os grupos avaliados D21xT21MxT21P (ANOVA: $P=0.0001$). Entre os grupos T21MxT21 não houve diferenças estatisticamente significante (T-student: $P=0.3493$) no estado de metilação do loco *TMEM131-DMR*.

Nas figuras 55, 56 e 57 estão representados os perfis de metilação determinados para o fragmento *253_TMEM131-DMR* nos grupos dissômico e trissômicos, respectivamente.

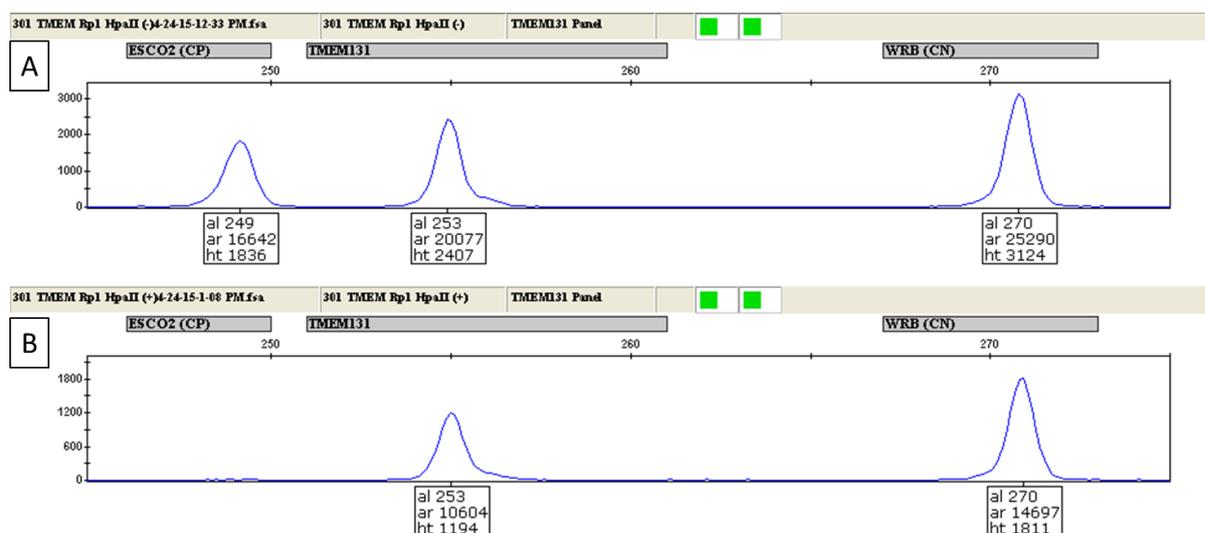


Figura 55. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *TMEM131-DMR* determinado para a amostra dissômica 301. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (248pb), *TMEM131-DMR* (254pb) e NC (269pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HpaII (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 301 a razão observada foi de 1:1,100. Estes resultados indicam um percentual médio de 90,9% de metilação entre os 2 sítios HpaII-CpG investigados na *TMEM131-DMR*. O estado de metilação apresentado para amostra dissômica 301 é hipermetilado.

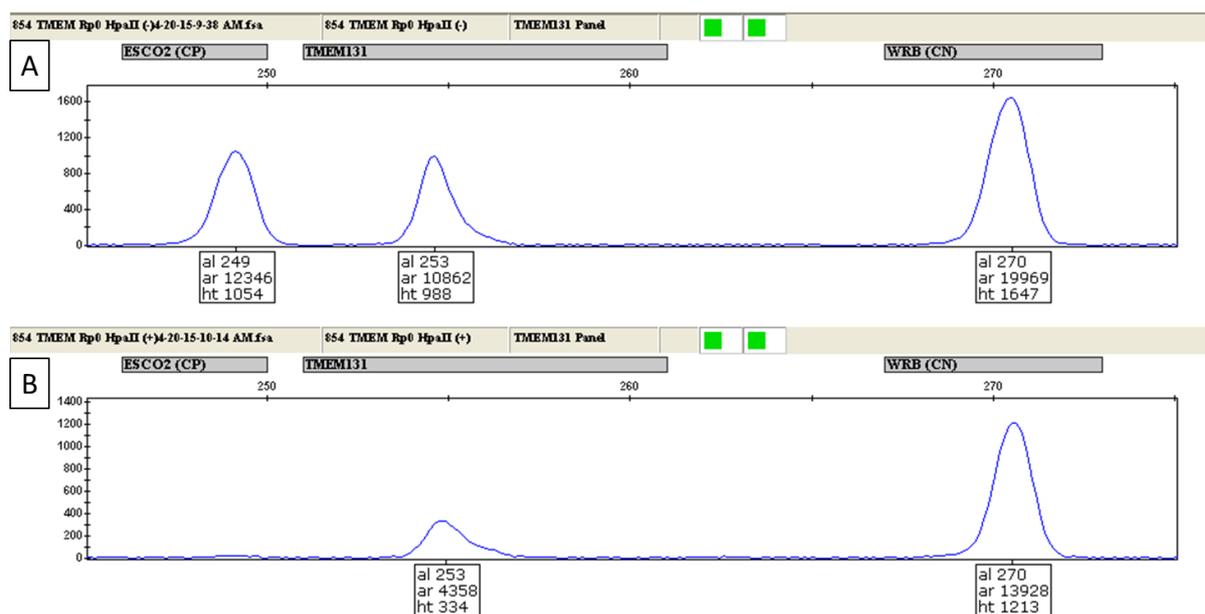


Figura 56. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *TMEM131-DMR* determinado para a replicata 0 da amostra 854 com trissomia 21 materna. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (249pb), *TMEM131-DMR* (253pb) e NC (270pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 854 Rp0 a razão observada foi de 1:1,738. Estes resultados indicam um percentual médio de 57,5% de metilação entre os 2 sítios HpaII-CpG investigados na *TMEM131-DMR*. O estado de metilação apresentado para amostra 854 com trissomia paterna é hemimetilado.

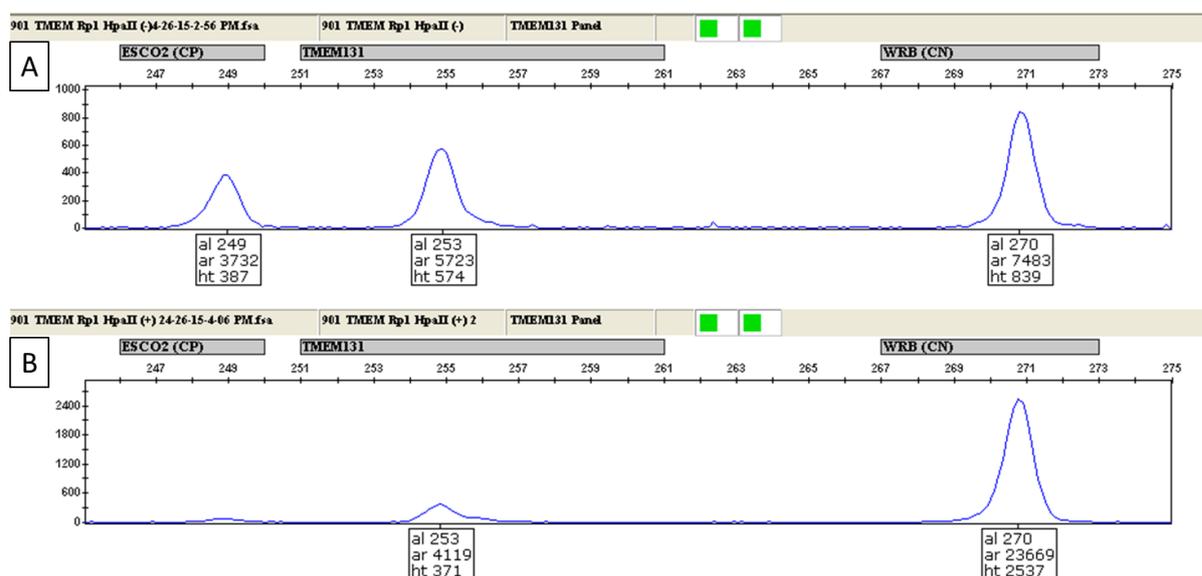


Figura 57. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *TMEM131-DMR* determinado para a replicata 1 da amostra 901 com trissomia 21 paterna. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (249pb), *TMEM131-DMR* (253pb) e NC (270pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 901 Rp1 a razão observada foi de 1:4,394. Estes resultados indicam um percentual médio de 22,8% de metilação entre os 2 sítios HpaII-CpG investigados na *TMEM131-DMR*. O estado de metilação apresentado para amostra 901 com trissomia paterna é hipometilado.

O fragmento *253_TMEM131-DMR*, delimita uma região genômica onde estão mapeados dois SNPs, rs2044458 e rs6760008. Para investigar o padrão de metilação alélica na *TMEM131-DMR*, estes dois SNPs foram genotipados por SNuPE (*single-nucleotide polymorphism primer extension*) em fragmentos gerados por DESM-PCR. Os iniciadores para o ensaio *TMEM131-DMR* SNuPE estão descritos no apêndice A.

A manutenção de ambos os alelos parentais, para os polimorfismos rs2044458 e rs6760008 em um indivíduo com trissomia materna após o tratamento enzimático, revelou a presença de metilação em ambos os alelos parentais, afastando a predição de uma influência sob um padrão de *imprinting* nas alterações dos perfis de metilação, no gene *TMEM131*, observados na condição de trissomia, figura 58.

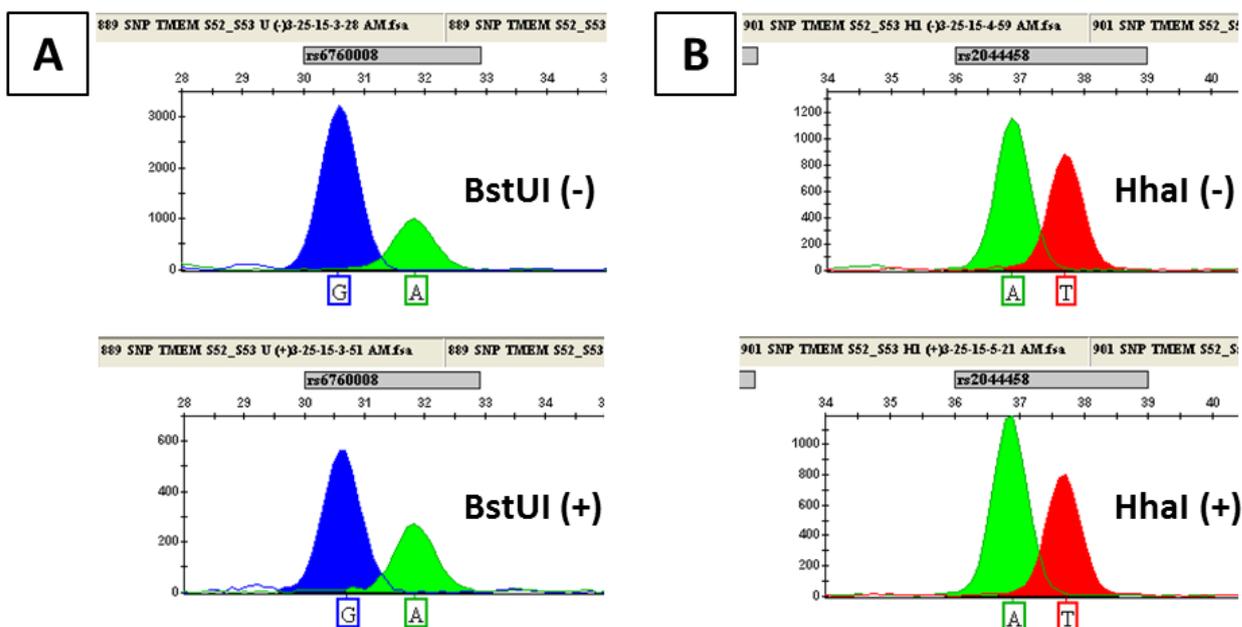


Figura 58. Determinação do padrão de metilação dos alelos parentais na *TMEM131-DMR* através da genotipagem dos polimorfismos rs6760008 e rs2044458 por SNUPE BstUI/HhaI. Em (A) perfil alélico determinado para o indivíduo 889 com trissomia 21 materna, em amostras tratadas e não tratadas com a enzima de restrição sensível a metilação BstUI. Em (B) perfil alélico determinado para o indivíduo 901 com trissomia 21 paterna em amostras tratadas e não tratadas com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI. Em condições ótimas as enzimas de restrição BstUI e HhaI clivam apenas gDNA não metilado. A manutenção dos alelos parentais após tratamento com as enzimas BstUI (A) e HhaI (B) em ambos os ensaios, indicam presença de metilação em ambos os sistemas alélicos G/A_rs6760008 e A/T_rs2044458. Este resultado sugere que o estado de hemimetilação e hipometilação observados nestes indivíduos, são estabelecidos por perda de metilação em ambos os alelos parentais.

Para determinação do estado de metilação do loco *RUNX1-DMR*, foi realizado o ensaio DESM-QFPCR, pelo qual foram investigados quatro sítios CpG-HhaI em amostras de DNA obtidas de seis indivíduos trissômicos (3 casos de trissomia 21 materna e 3 casos de trissomia 21 paterna) e seis indivíduos dissômicos (controle).

Metilação diferencial do DNA, estatisticamente significativa ($p=0.0007$) foi observada no fragmento *253_RUNX1-DMR* entre o grupo trissômico (T21) e o grupo dissômico (D21). No grupo trissômico o estado de metilação da região analisada foi hipermetilado, com uma média 79,2% de metilação nos pontos investigados. Entre o grupo dissômico o estado de metilação da região analisada foi essencialmente hipometilado, com uma média 26,2% de metilação nos pontos investigados.

Entre os grupos de indivíduos com trissomia 21 materna e trissomia 21 paterna não foram observadas diferenças significantes no estado de metilação do fragmento analisado. Na tabela 16 estão descritos as replicatas do ensaio DESM-QFPCR para o fragmento 253_ *RUNX1-DMR*.

Tabela 16. Percentual de metilação do fragmento 253_ *RUNX1-DMR*.

Casos	NDJ	Rp0 (%)	Rp1 (%)	Rp2 (%)	Média (%)	Estado de Metilação
301	Controle	*	28,1	30,8	29,4	Hipometilado
356	Controle	21,0	23,1	25,4	23,2	Hipometilado
902	Controle	23,9	30,4	37,9	30,7	Hipometilado
1104	Controle	7,9	10,5	10,6	9,7	Hipometilado
1251	Controle	15,3	23,4	23,7	20,8	Hipometilado
1639	Controle	41,3	51,5	46,7	46,5	Hemimetilado
854	Materna	85,1	88,9	72,0	82,0	Hipermetilado
865	Paterna	*	50,0	57,3	53,5	Hemimetilado
869	Materna	76,9	72,6	64,5	71,3	Hipermetilado
884	Paterna	99,8	99,9	99,9	99,9	Hipermetilado
889	Materna	91,7	90,2	*	90,9	Hipermetilado
901	Paterna	99,9	*	94,6	97,2	Hipermetilado

**NDJ: Não disjunção; RP: Replicata.
(* Amplificação de baixa qualidade.**

O percentual de metilação na *RUNX1-DMR* entre os grupos avaliados estão plotados no gráfico 6.

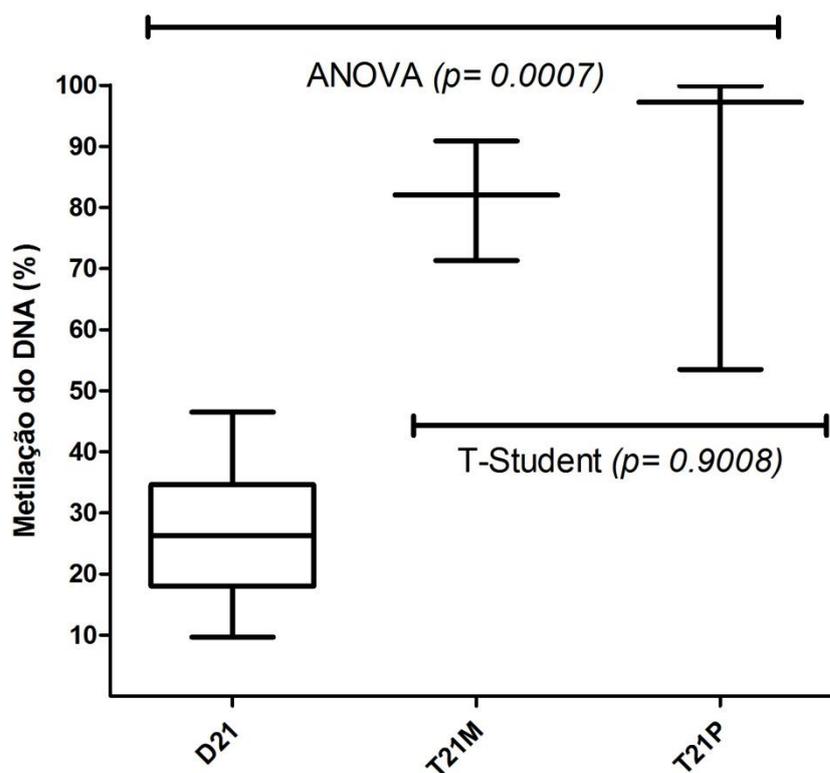


Gráfico 6. Percentual de metilação no loco *RUNX1-DMR*. D21: Indivíduos dissômicos; T21M: Indivíduos com trissomia 21 materna; T21P: Indivíduos com trissomia 21 paterna. Diferenças estatisticamente significante foram observadas entre os grupos avaliados D21xT21MxT21P (ANOVA: $P=0.0007$). Entre os grupos T21MxT21 não houve diferenças estatisticamente significante (T-student: $P=0.9008$) no estado de metilação do loco *RUNX1-DMR*.

Nas figuras 59 e 60, estão representados os perfis de metilação determinados para o fragmento *253_RUNX1-DMR* nos grupos dissômico e trissômicos, respectivamente.

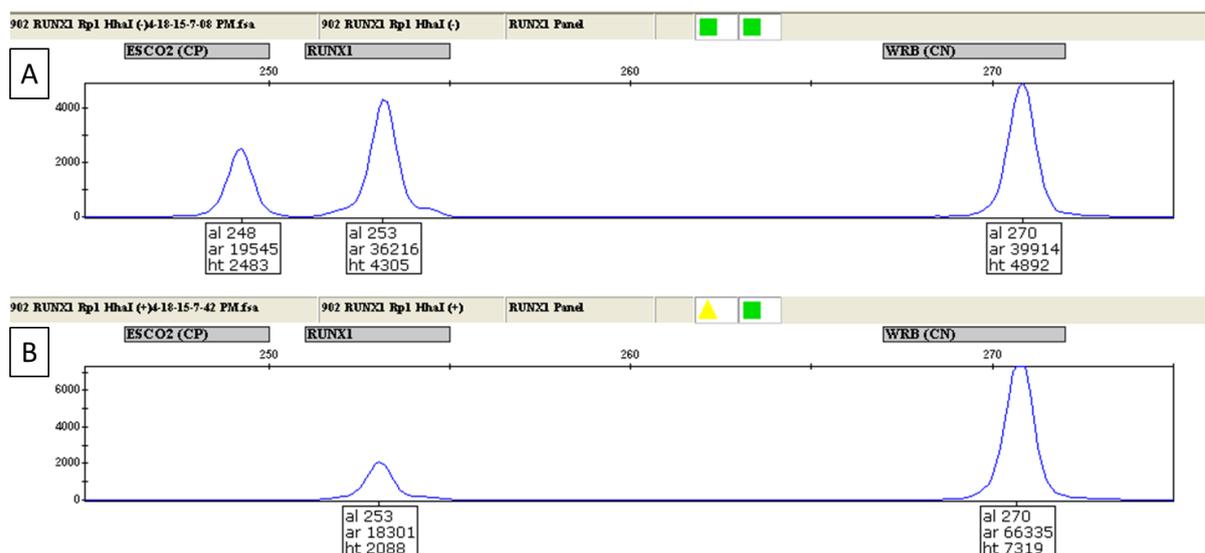


Figura 59. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *RUNX1-DMR* determinado para a replicata 1 da amostra dissômica 902. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (248pb), *RUNX1-DMR* (253pb) e NC (270pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 902 a razão observada foi de 1:3,288. Estes resultados indicam um percentual médio de 30,4% de metilação entre os 4 sítios HhaI-CpG investigados na *RUNX1-DMR*. O estado de metilação apresentado para amostra dissômica 902 é hipometilado.



Figura 60. Eletroferograma do perfil de metilação observado para a *RUNX1-DMR* determinado para a replicata 1 da amostra 854 com trissomia 21 materna. Em (A) perfil alélico determinado para os locos CP (248pb), *RUNX1-DMR* (253pb) e CN (270pb) pré-tratamento enzimático (ensaio referência). Em (B) perfil alélico observado pós-tratamento com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI (ensaio teste). Nas caixas de texto ligadas aos picos de fluorescência, encontram-se as informações sobre os valores em tamanho, área e altura, dos fragmentos analisados. No ensaio DESM-QFPCR o percentual de metilação do fragmento alvo é dado pela razão do somatório da área do fragmento alvo em relação ao fragmento controle entre os ensaios referência e teste. Para a amostra 854 Rp1 a razão observada foi de 1:1,124. Estes resultados indicam um percentual médio de 88,9% de metilação entre os 4 sítios HhaI-CpG investigados na *RUNX1-DMR*. O estado de metilação apresentado para amostra 854 com trissomia materna é hipermetilado.

Para investigar o padrão de metilação alélica na *RUNX1-DMR*, foi gerado um fragmento maior para esta região, *636_ RUNX1-DMR*, o qual delimita uma região genômica onde está mapeado o SNP rs8126699. Este SNP foi genotipado por SNuPE (*single-nucleotide polymorphism primer extension*) em fragmentos gerados por DESM-PCR. Os iniciadores para o ensaio *RUNX1-DMR* SNuPE estão descritos no apêndice A.

A manutenção de ambos os alelos parentais em um indivíduo com trissomia materna após o tratamento enzimático, revelou a presença de metilação em ambos os alelos parentais, afastando a predição de uma influência sob um padrão de *imprinting* nas alterações dos perfis de metilação, no gene *RUNX1*, observados na condição de trissomia, figura 61.

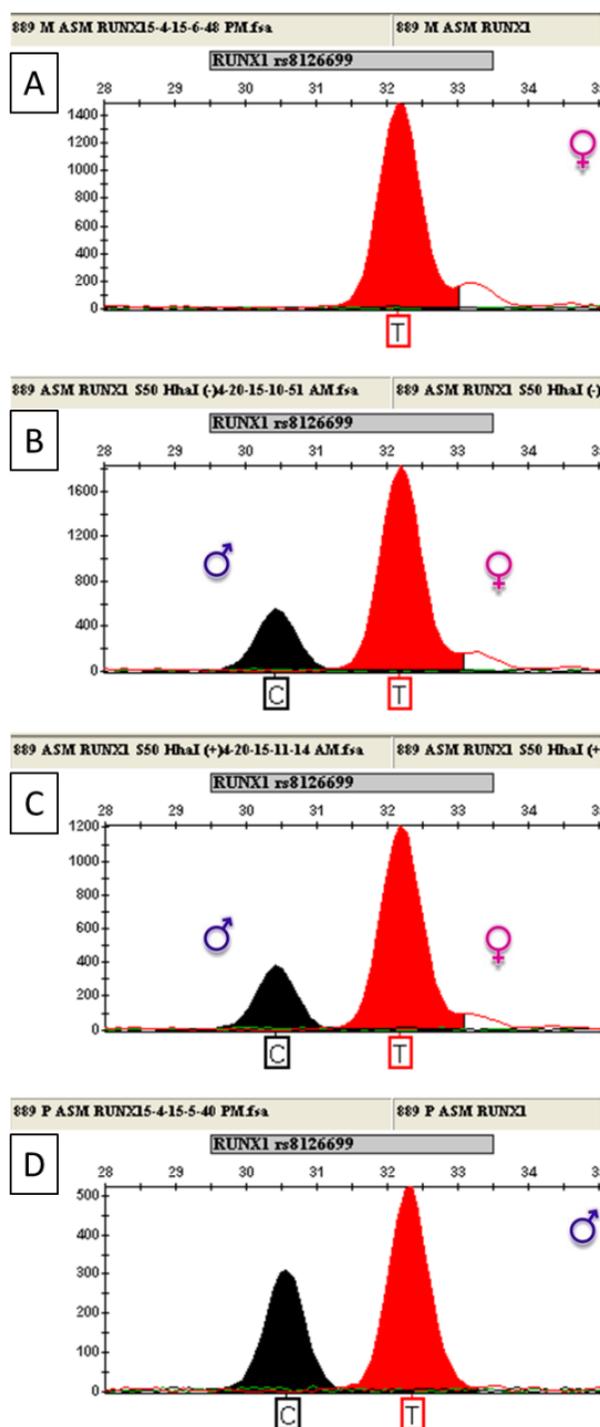


Figura 61. Determinação do padrão de metilação dos alelos parentais na *RUNX1-DMR* através da genotipagem dos polimorfismos rs812669 por SNUPE HhaI na amostra 889 com trissomia materna. Em (A) e (D) perfis alélicos determinados para os genitores materno e paterno, respectivamente. Em (B) e (C) perfil alélico determinado para o indivíduo trissômico 889, em amostras tratadas e não tratadas com a enzima de restrição sensível a metilação HhaI. Em condições ótimas a enzima de restrição HhaI cliva apenas gDNA não metilado. A manutenção dos alelos parentais (C) após tratamento com HhaI, indica presença de metilação em ambos os alelos C/T. Este resultado sugere que o estado de hipermetilação observado neste indivíduo, é estabelecido por ganho de metilação em ambos os alelos parentais.

6.10 Investigação do perfil transcricional do gene *WRB*

Para determinar o perfil transcricional alélico do gene *WRB*, foram selecionados 3 polimorfismos SNPs, rs1060180, rs13230 e rs60490159 mapeados na região 3' UTR do gene. Estes polimorfismos foram genotipados através da técnica de minissequenciamento SNUPE. O painel de iniciadores gerado para a genotipagem dos três polimorfismos estão descritos no apêndice A.

Os polimorfismos rs106180, rs13230, e rs60490159 foram genotipados em amostras pareadas de DNA/cDNA isoladas de células mononucleares de sangue periférico em núcleos familiares informativos. O perfil transcricional para estes polimorfismos foi bialélico nas amostras avaliadas, figuras 62, 63 e 64.

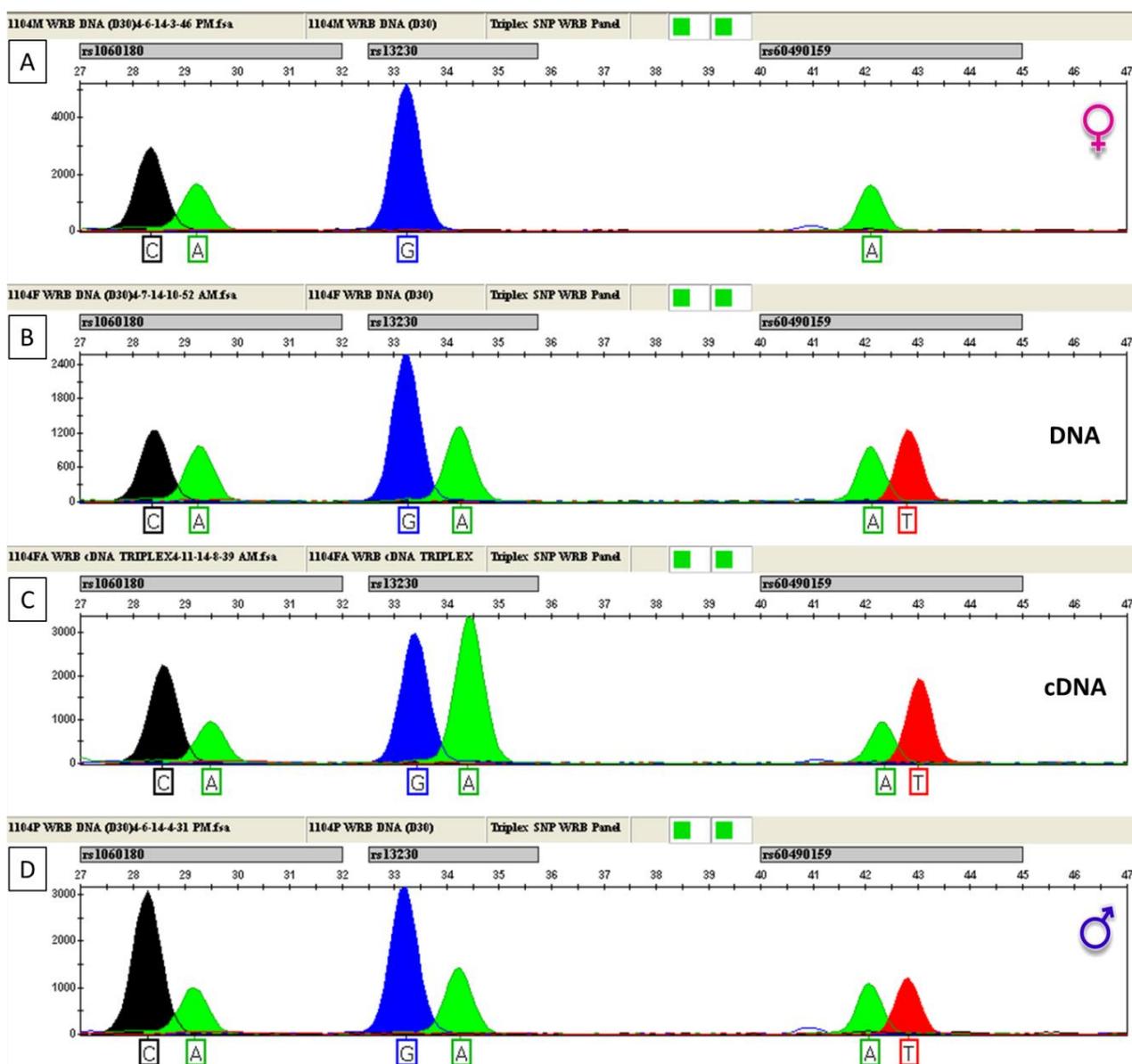


Figura 62. Perfil transcricional dos polimorfismos rs1060180, rs13230 e rs60490159 mapeados na região 3'UTR do gene *WRB* determinado para o núcleo familiar 1104. Em (A) e (D) perfil alélico determinado em amostras de DNA dos genitores materno (1104M) e paterno (1104P), respectivamente. Em (B) perfil alélico determinado para o indivíduo 1104F (filho) em amostra de DNA. Em (B) perfil transcricional alélico determinado para o indivíduo 1104F em amostra de cDNA geradas a partir de amostra de RNA isolado de leucócitos. A manutenção de heterozigose nos três sistemas investigados, C/A_rs1060180, G/A_13220 e A/T_rs60490159 em amostra de cDNA a partir de células mononucleares de sangue periférico indicam expressão de ambos os alelos parentais em tecido sanguíneo para o gene *WRB*.

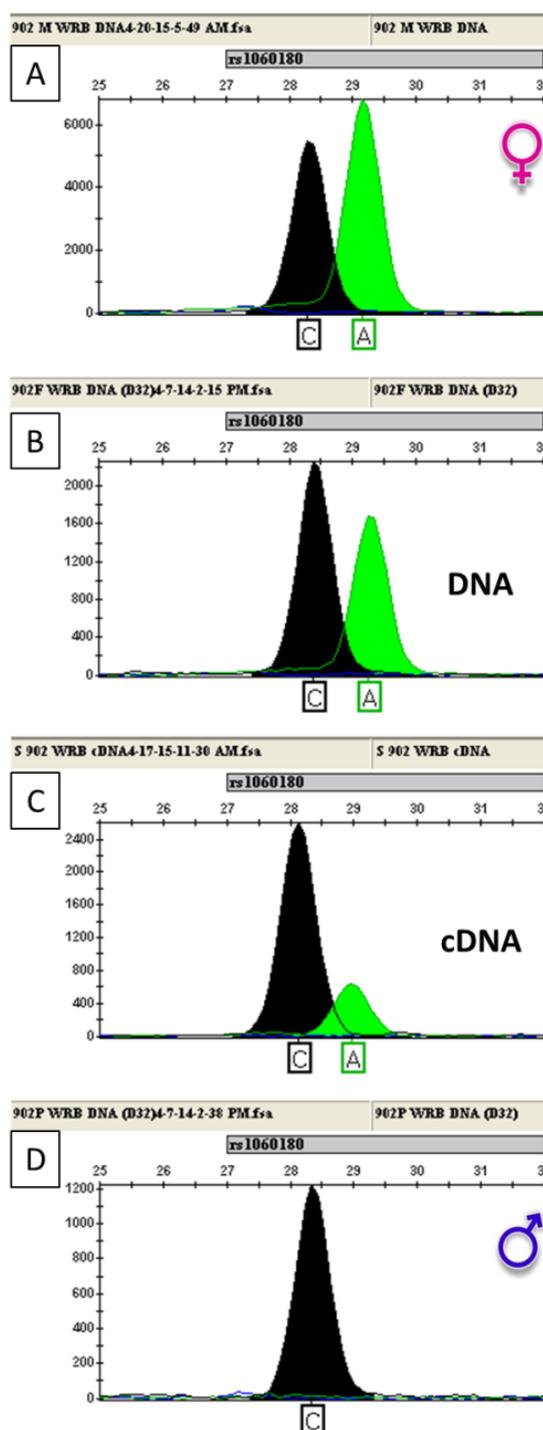


Figura 63. Perfil transcricional do polimorfismo rs1060180 mapeado na região 3'UTR do gene *WRB* determinado para o núcleo familiar 902. Em (A) e (D) perfil alélico determinado em amostras de DNA dos genitores materno (902M) e paterno (902P), respectivamente. Em (B) perfil alélico determinado para o indivíduo 902F (filho) em amostra de DNA. Em (C) perfil transcricional alélico determinado para o indivíduo 902F em amostra de cDNA geradas a partir de amostra de RNA isolado de células mononucleares de sangue periférico. A manutenção da heterozigose C/A_rs1060180 nas análises pareada DNA/cDNA indicam expressão de ambos os alelos parentais em tecido sanguíneo para o gene *WRB*.

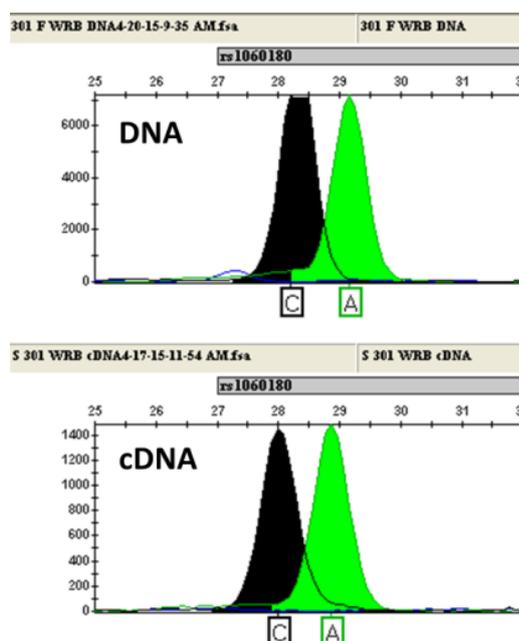


Figura 64. Perfil Transcricional Alélico determinado para o polimorfismo rs1060180 mapeado no gene *WRB*. Eletroferograma representativo da amostra 301F pertencente ao biorrepositório NUDIM. Na porção superior, perfil heterozigótico caracterizado pelos alelos C/A para o polimorfismo rs1060180 determinado em amostra de DNA. Na porção inferior, o perfil transcricional alélico determinado em amostra de cDNA. A transcrição dos alelos C/A para o polimorfismo rs1060180 é indicativo de expressão monoalélica do gene *WRB* neste indivíduo.

Adicionalmente, simulando estágios iniciais do desenvolvimento humano, seguindo o mesmo racional, os mesmos polimorfismos foram genotipados em amostras pareadas de DNA/cDNA de cinco linhagens embrionárias humanas, HUES-1 (46,XX), HES3 (46,XX), HUES-5 (46,XX), HUES-7 (46,XY) e HUES-15 (46,XX).

O gene *WRB* apresenta 7 isoformas, sendo os poucos estudos deste gene voltados para duas importantes isoformas, a isoforma principal *w001*, e a isoforma menor *W004*. A isoforma *W004* não foi detectada por RT-PCR no presente em amostras de RNA isolados de leucócitos periféricos. Contudo, ambas isoformas foram detectadas nas linhagens embrionárias HUES-1 e HUES-15. Perfis transcricionais bialélicos para o polimorfismo rs1060180 foram observadas para ambas as linhagens. Na figura 65 estão representados os perfis alélicos observados para ambas isoformas na linhagem HUES-1. Resultados idênticos, sugestivos de expressão bialélica para o gene *WRB* foram observados para as demais linhagens embrionárias avaliadas, figura 66.

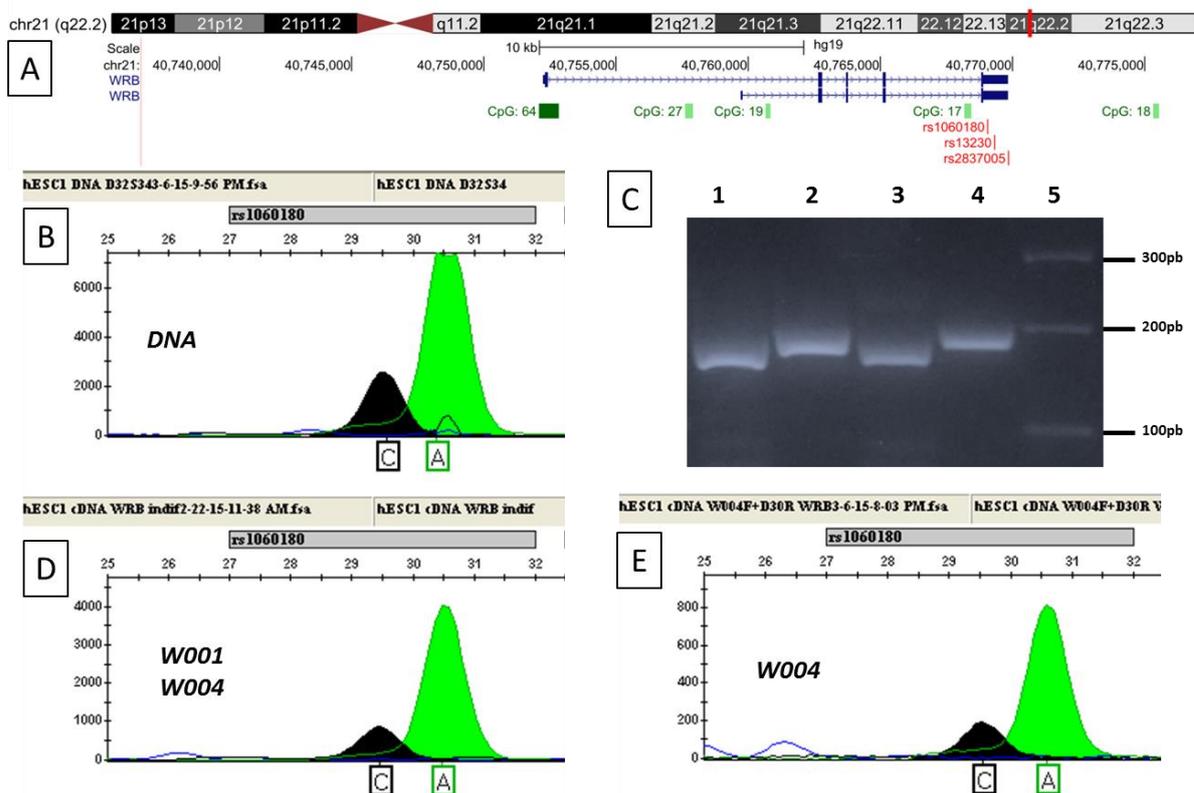


Figura 65. Perfil transcricional alélico determinado para o polimorfismo rs1060180 na linhagem embrionária HUES-1. Em (A) mapa físico do gene *WRB* mapeado na banda cromossômica 21q22.2. Na porção superior o transcrito maior *W001* e na porção inferior o transcrito menor *w004*. Em (B) perfil alélico determinado para o polimorfismo rs1060180 em amostra de DNA da linhagem hESC1. Em (C) duplicata do ensaio RT-PCR para os transcritos variantes *w001* e *w004* do gene *WRB*, nas raias 1 e 3 fragmentos específicos para o transcrito *w001*; nas raias 2 e 4 fragmentos específicos para o transcrito *w004*. Em (D) perfil bialélico determinado para ambos transcritos. Em (E) perfil bialélico determinado para o transcrito variante *w004*. Estes resultados indicam expressão bialélica do gene *WRB* em células-tronco embrionárias.

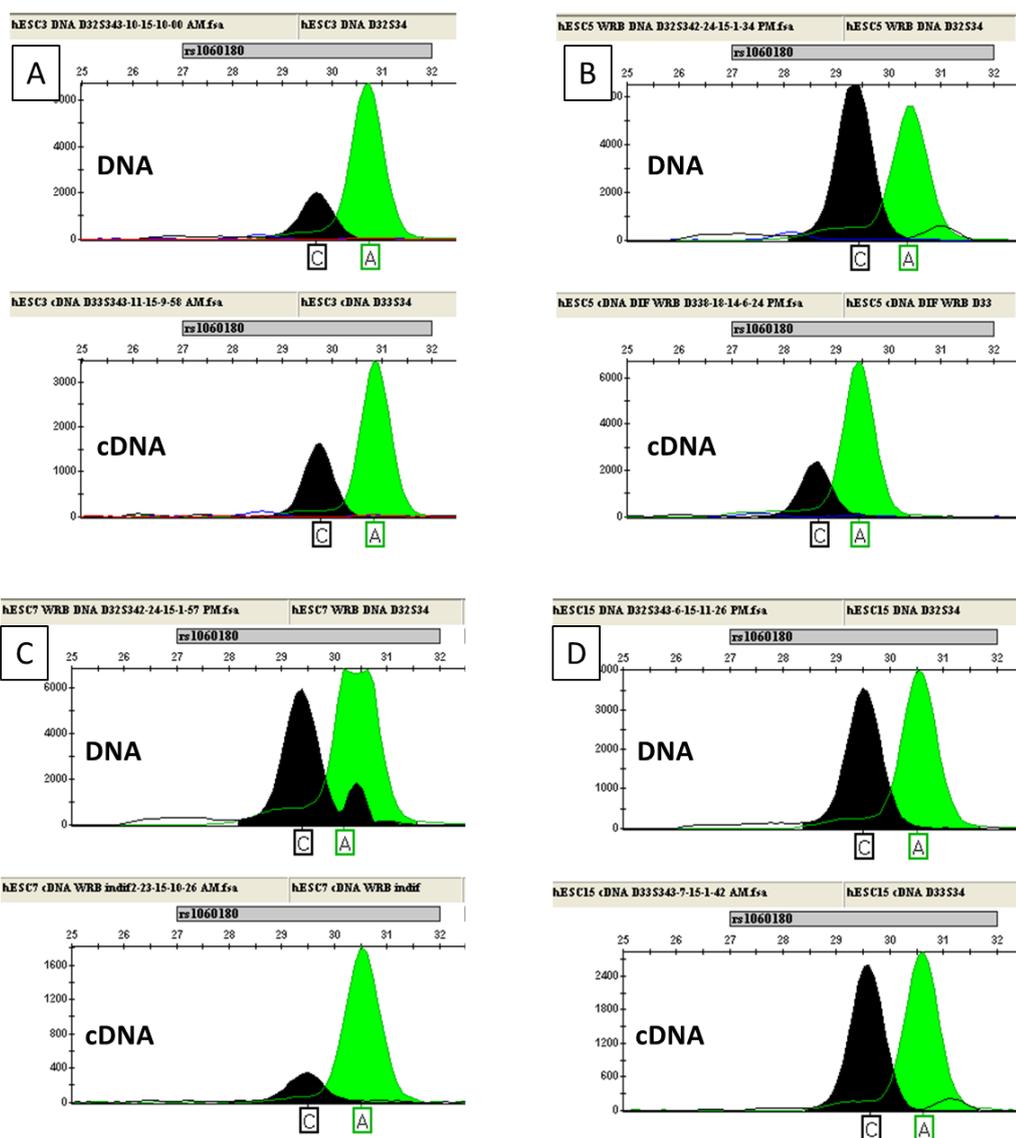


Figura 66. Perfil transcricional alélico determinado para o polimorfismo rs1060180 mapeado nas linhagens HES3, HUES-5, HUES-7 e HUES-15. Em (A) perfil alélico determinado para linhagem HES3. Em (B) perfil alélico determinado para a linhagem HUES-5. Em (C) perfil alélico determinado para a linhagem HUES-7. Em (D) perfil alélico determinado para a linhagem HUES-15. A manutenção da heterozigose C/A_{rs1060180} caracteriza a transcrição de ambos os alelos parentais. Estes resultados indicam expressão em um sistema bialélico do gene *WRB* em linhagens de células-tronco embrionárias humanas.

7. DISCUSSÃO

A presença de um cromossomo extra, influenciando a transcrição global do genoma, faz da trissomia 21 um clássico modelo de alteração da expressão gênica (Letourneau *et al.*, 2014). De acordo com a “hipótese de genes sensíveis à dosagem”, a aquisição de mais um alelo funcional no estado de trissomia atua promovendo uma variação na expressão gênica, sendo essa o fator genético apontado para o estabelecimento das manifestações fenotípicas que caracterizam a síndrome de Down (Lyle *et al.*, 2009; Wiseman *et al.*, 2009).

Em genes sensíveis a dosagem, além dos fatores genéticos, uma variedade de fatores epigenéticos podem influenciar o modo como cada alelo de um gene é independentemente regulado. A expressão monoalélica, ou exclusão alélica, é um mecanismo epigenético encontrado em genes sujeitos ao efeito de dosagem, e consiste em um fenômeno não mendeliano de controle alelo-específico (Nag *et al.*, 2013).

Os genes com expressão monoalélica em humanos correspondem a pouco mais de 10% do genoma funcional. A primeira observação de expressão monoalélica no cromossomo 21 foi realizada em células B-lyfoblastóides por Gimelbrant e colaboradores (2007) envolvendo sete diferentes *loci*, incluindo o gene *APP*, o qual a superexpressão no estado de trissomia está associada com o início precoce da doença de Alzheimer em pacientes SD (Argellati *et al.*, 2006; Nizetic *et al.*, 2015).

Interessantemente, um estudo envolvendo a investigação da heterogeneidade fenotípica em 40 pacientes SD, com não disjunções de diferentes origens, descreveu que enquanto características como hipotonia e anormalidades craniofaciais foram comuns em mais de 90% dos indivíduos estudados, as cardiopatias congênitas foram mais frequentes em pacientes SD com uma cópia extra do cromossomo 21 de origem materna (Muranjan *et al.*, 2010).

Estes resultados sugerem que a heterogeneidade fenotípica observada na trissomia 21 vai além da simples interação gênica, e da presença de genes sensíveis à dosagem, mas também está relacionada a não equivalência (sob *imprinting*) dos genótipos parentais associados à manifestação fenotípica na SD.

A primeira discussão sobre a existência de genes sob *imprinting* no cromossomo 21 foi realizada por Luedi e colaboradores (2007). Estes autores, por análise computacional comparada, desenvolveram dois algoritmos para identificação de novos genes sob *imprinting*. Em um universo de 20770 genes, 723 genes foram preditos como candidatos a genes regulados por *imprinting*, sendo 156 destes com alto valor de predição por dois algoritmos. Somente para o cromossomo 21, 15 genes foram preditos.

Desde a publicação de predição de novos genes sujeitos ao *imprinting* por Luedi e colaboradores (2007), poucos estudos têm focado na validação experimental do padrão de expressão destes genes.

No presente estudo, focou-se no cromossomo 21, um alvo relevante, visto o impacto clínico causado pela trissomia 21, aneuploidia autossômica mais frequente, e principal causa de retardo mental em neonatos (Wiseman *et al.*, 2009). Além do mais, em termo de heterogeneidade fenotípica, a trissomia 21 torna-se um modelo interessante a ser estudado dentro do cenário de *imprinting*, uma vez que a dissomia uniparental gerada pela aquisição de uma cópia cromossômica extra, conduziria a diferentes efeitos fenotípicos no acometido, através do desbalanço de genes regulados por *imprinting*.

Neste trabalho, visando fornecer evidência quanto à predição de *imprinting* no cromossomo 21, foram selecionados nove genes como alvos do estudo, cinco genes preditos ao *imprinting* paterno, *OLIG2*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP* e *DIP2A*, e quatro genes preditos ao *imprinting* materno, *KRTAP6-2*, *SIM2*, *IGSF5* e *S100B* (Luedi *et al.*, 2007).

Os perfis de expressão dos genes alvos foram determinados por genotipagem de 18 polimorfismos por SNUPE multiplex em amostras pareadas de DNA, e cDNA geradas a partir de RNA isolado de células mononucleares de sangue periférico (linfócitos T, linfócitos B, células NK e monócitos) de sete indivíduos adultos, saudáveis, na faixa etária de 24-52 anos.

Em todos os polimorfismos informativos genotipados, o perfil transcricional foi sugestivo de expressão bialélica, porém não em todos os indivíduos estudados. Para os genes *OLIG2*, *IGSF5*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B* foram observados também perfil transcricional monoalélico. Interessantemente, para os

três indivíduos com genótipos informativos para o polimorfismo rs113467703, mapeado no gene *KRTAP6-2*, foi observado transcrição bialélica, contudo com transcrição preferencial de um (alelo T) dos dois alelos parentais identificados, sugerindo uma expressão alélica enviesada.

O perfil transcricional bialélico pode ser interpretado como um resultado da expressão monoalélica aleatória em diferentes linhagens celulares e/ou na mesma linhagem celular por um processo de regulação dinâmica. Um bom exemplo de expressão monoalélica dinâmica é o gene *Nanog* murino, essencial para aquisição do estado de pluripotência no período embrionário. Em estágios iniciais (2-8 células) a expressão de *Nanog* é essencialmente monoalélica, seguindo uma transição para o estado de expressão bialélica até o momento da implantação, quando a expressão monoalélica é retomada (Miyanari e Torres-Padilla, 2012)

No conjunto, os dados sugerem que esses genes não estão sujeitos ao *imprinting* genômico na linhagem hematopoiética, mas sim à expressão monoalélica diferencial entre indivíduos.

Visando inferir o perfil transcricional dos genes alvos em estágios iniciais do desenvolvimento, os mesmos 18 polimorfismos foram genotipados em amostras pareadas de DNA, e cDNA de cinco linhagens de células-tronco embrionárias humanas, HUES-1 (46,XX), HES3 (46,XX), HUES-5 (46,XX), HUES-7 (46,XY) e HUES-15 (46,XX). O estado indiferenciado dessas linhagens foi confirmado pela presença do transcrito *XACT* através da genotipagem dos polimorfismos rs5929175 e rs5929410 nas linhagens femininas. O gene *XACT*, mapeado no cromossomo X, transcreve um longo RNA intergênico não codificador (lincRNA *XACT*), o qual foi recentemente descrito como diferencialmente expresso em células embrionárias, relacionado com o estado de pluripotência (Vallot *et al.*, 2013).

A genotipagem dos polimorfismos alvos permitiu a determinação do perfil transcricional de cada gene avaliado, exceto para o gene *OLIG2* não foram detectados transcritos nas cinco linhagens estudadas. Para os polimorfismos informativos mapeados nos genes *KRTAP6-2*, *SIM2*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B* o perfil transcricional foi bialélico, porém não em todas as linhagens. Para os genes *ADARB1* e *COL6A1*, foi observado também perfil transcricional monoalélico.

Para o gene *IGSF5*, foi detectado o transcrito apenas na linhagem HUES-1, e o perfil transcricional determinado para este gene foi monoalélico. Contudo, por falta de informações sobre as outras linhagens, e ausência do genótipo parental, o resultado encontrado para o gene *IGSF5* nesta linhagem não é conclusivo dentro do contexto de predição de *imprinting* para este gene.

Interessantemente, assim como observado nas células mononucleares de sangue periférico, transcrição bialélica do polimorfismo rs113467703 do gene *KRTAP6-2*, com transcrição preferencial de um de dois alelos parentais, sugestivo de expressão bialélica enviesada, foi observada na linhagem HUES-15.

Os resultados obtidos em linhagens HUES-1, HES3, HUES-5, HUES-7 e HUES-15 corroboram com os achados em células mononucleares de sangue periférico. Pressuposto que a regulação gênica por *imprinting* segue um padrão constitutivo de expressão monoalélica, o qual é propagado clonalmente de modo estável (Proudhon e Bourc'his, 2010), estes resultados indicam que os genes *KRTAP6-2*, *SIM2*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B* não são regulados por *imprinting* em linhagens de células-tronco embrionárias e, portanto, em fases iniciais do desenvolvimento.

Em busca de novos candidatos a genes sujeitos ao *imprinting*, no presente estudo foi realizada uma varredura no cromossomo 21 para a identificação de assinaturas comuns a genes com expressão alelo-parental específica. Em termos gerais, a expressão monoalélica dependente da origem parental, isto é sob *imprinting*, está correlacionada com o estado hemizigótico de metilação nas regiões promotoras ou controladoras de *imprinting* (ICRs) (Hackett e Surani, 2013).

Neste contexto, através da análise de 62 projetos metilomas, plotados em uma plataforma customizada do UCSC Browser, tendo como parâmetro de pré-seleção a interseção de perfis de hemimetilação em pelo menos um ponto para quatro projetos metilomas (CD133HSC-Neutrófilo; IMR90-Linfócito B; Neutrófilo-IMR90; Linfócito B-Neutrófilo), foram identificadas 16 sequências candidatas a regiões diferencialmente metiladas (cDMRs), incluindo iCG:41 do gene *MAP3K7CL*, região que se estende do promotor ao exon 1 deste gene, e a iCG:27 localizada na região intrônica do transcrito *w001* e região promotora da isoforma *w004* do gene

WRB, a qual foi recentemente validada como uma *DMR* no cromossomo 21 (Docherty *et al.*, 2014).

A investigação *in silico* da *MAP3K7CL cDMR-4* revelou para esta região assinaturas sugestivas de uma *DMR* secundária (originada após a fertilização), visto a hipometilação em gametas e hemimetilação em tecidos somáticos, informações estas, obtidas através da análise comparada dos projetos metilomas plotados na plataforma de estudo.

Utilizando um ensaio rápido de digestão enzimática associada a PCR quantitativa por fluorescência (DESM-QFPCR), onde a conversão do DNA por bissulfito não é necessária, o estado de metilação em dois fragmentos localizados na *MAP3K7CL cDMR-4*, *255_MAP3K7CL cDMR-4pr* e *253_MAP3K7CL cDMR-4ex*, foram determinados como sendo essencialmente hemimetilado em amostras de DNA de indivíduos dissômicos e indivíduos trissômicos com não disjunção de origem materna ou paterna.

Entre os grupos analisados, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes no estado de metilação de ambos os fragmentos analisados, *255_MAP3K7CL cDMR-4pr* (ANOVA: $p=0.2498$) e *253_MAP3K7CL cDMR-4ex* (ANOVA: $p=0.8185$). Adicionalmente, a genotipagem do polimorfismo rs2853831 no fragmento *255_MAP3K7CL cDMR-4pr*, permitiu confirmar a presença de metilação nos alelos maternos e paternos.

Portanto o perfil hemimetilado observado *in silico* e experimentalmente nos três grupos estudados deve ser interpretado como perdas e/ou ganhos de metilação em ambos os alelos parentais. Este mecanismo é estável e não influenciado pela cópia extra do cromossomo 21, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos perfis de metilação entre os grupos dissômicos e trissômicos.

Contudo, mesmo com a exclusão da *MAP3K7CL cDMR-4* como uma verdadeira *DMR*, o método de predição aplicado no presente estudo mostrou-se eficaz na identificação de regiões hemimetiladas candidatas a regiões diferencialmente metiladas no cromossomo 21, haja visto, que a *WRB-DMR*, também foi detectada pelos nossos critérios de predição.

A *WRB-DMR* foi primeiramente descrita por Docherty e colaboradores (2014). Em seu trabalho, os autores determinaram para essa região o estado de hemimetilação em indivíduos dissômicos. Adicionalmente, hipermetilação e hipometilação foram observados em 31/33 e 2/33 pacientes com trissomia 21, respectivamente. Em um cenário onde a origem parental da cópia extra do cromossomo 21 era desconhecida, os autores atribuíram o estado de hipermetilação observado na *WRB-DMR* à metilação exclusiva dos alelos maternos, dado a maior prevalência de casos de trissomia 21 materna (95%).

No presente estudo, utilizando um ensaio rápido, específico para a *WRB-DMR* (*WRB-DESM-QFPCR*), o perfil de metilação desta região foi determinado através da análise do fragmento *254_WRB-DMR* em uma coorte de 33 indivíduos, sendo 15 indivíduos com trissomia materna, seis com trissomia paterna, e 12 indivíduos dissômicos. A origem parental da não disjunção na coorte estudada foi previamente determinada através da análise de segregação de marcadores STRs nos núcleos familiares.

Diferenças estatisticamente significantes no estado de metilação do fragmento *254_WRB-DMR* (*ANOVA*, $p < 0.0001$) foi observado entre os três grupos avaliados. O estado de hemimetilação foi determinado para o grupo dissômico, enquanto o estado de hipometilação e hipermetilação foram observados nos grupos com trissomia 21 paterna e materna, respectivamente.

As alterações epigenéticas dependente da origem parental como efeito da cópia extra do cromossomo 21, encontradas na *WRB-DMR* na coorte estudada, estão de acordo com a descrição do perfil de metilação sob *imprinting* nesta região por Docherty e colaboradores em 2014.

Adicionalmente, a genotipagem do polimorfismo rs2244352 no fragmento *254_WRB-DMR*, permitiu comprovar experimentalmente a metilação exclusiva do alelo materno na *WRB-DMR*.

A presença de uma cópia extra do cromossomo 21, por si só, pode afetar diferencialmente, de maneira global, os perfis de metilação em diversos sítios CpGs. Estudos recentes têm demonstrado o surgimento de novas DMRs no genoma humano na condição de trissomia 21 (Kerkel *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2013; Bacalini *et al.*, 2015). Contudo, sem qualquer investigação mais aprofundada sobre o modelo

envolvido no estabelecimento dessas regiões, se estes efeitos ocorrem de modo dependente (sob *imprinting*) ou independente da origem parental do cromossomo 21 não disjunto.

No presente estudo, investigamos duas principais DMRs estabelecidas na trissomia 21, a *TMEM131-DMR* originada por um efeito em *trans*, a qual está localizada no promotor do gene *TMEM131* no cromossomo 2 (Kerkel *et al.*, 2010), e a *RUNX1-DMR* originada por um efeito em *cis*, a qual está localizada no éxon 1 do gene *RUNX1* no cromossomo 21 (Jones *et al.*, 2013; Bacalini *et al.*, 2015).

Diferenças, estatisticamente significantes, no estado de metilação da *TMEM131-DMR* foram observadas entre os subgrupos da coorte estudada. Análise do percentual de metilação do fragmento *253_TMEM131-DMR* revelou um estado de hemimetilação em indivíduos trissômicos ($\%_{me}=0,407$), e hipermetilação em indivíduos dissômicos ($\%_{me}=0,858$).

Dentro do grupo de trissômicos, o perfil de metilação nos pontos analisados na *TMEM131-DMR* não exibiram diferenças significativas entre os indivíduos com não disjunção de origem materna e paterna (T-student: $p=0.3493$). A genotipagem dos polimorfismos rs2044458 e rs6760008 na *TMEM131-DMR*, permitiu confirmar a presença de metilação em ambos os alelos parentais, afastando assim, a hipótese de um padrão de metilação sob *imprinting* nesta região.

Diferenças estatisticamente significantes no estado de metilação também foram observadas na *RUNX1-DMR* entre os subgrupos da coorte estudada. Análise do percentual de metilação do fragmento *253_RUNX1-DMR* revelou um estado de hipermetilação em indivíduos trissômicos ($\%_{me}=0,729$), e hipometilação em indivíduos dissômicos ($\%_{me}=0,262$).

Dentro do grupo de trissômicos, o perfil de metilação nos pontos analisados na *RUNX1-DMR* não exibiram diferenças significativas entre os indivíduos com não disjunção de origem materna e paterna (T-student: $p=0.9008$). A genotipagem do polimorfismo rs8126699 na *RUNX1-DMR*, permitiu confirmar a presença de metilação em ambos os alelos parentais, afastando, assim como para a *TMEM131-DMR*, a hipótese de um padrão de metilação sob *imprinting* nesta região.

Contudo, a metilação específica ao alelo materna observada para a *WRB-DMR* caracteriza essa região como uma verdadeira DMR no contexto de *imprinting*. A existência de uma DMR no gene *WRB*, faz deste gene um potencial candidato ao primeiro gene regulado por *imprinting* no cromossomo 21.

A primeira correlação do estado metilação alelo específica de origem materna na *WRB-DMR* com perfil transcricional monoalélico, foi também descrita por Docherty e colaboradores em 2014. Contudo, com a genotipagem do polimorfismo rs1060180 em tecidos embrionários, esses autores encontraram em um mesmo embrião permutações das possibilidades de transcrição alélica para o sistema analisado. Transcrição bialélica foi observada em medula espinhal, enquanto transcrição monoalélica enviesada quanto à origem parental foi observada em músculo esquelético e aorta. Esses resultados contrapõem ao conceito clássico de *imprinting*, pelo qual, apenas um de dois alelos parentais é expresso em um sistema monoalélico origem parental dependente (Koerner e Barlow, 2010).

Os resultados obtidos por Docherty e colaboradores (2014), não invalidam a predição de *imprinting* para o gene *WRB*, e poderiam ser interpretados como expressão de diferentes transcritos com diferentes perfis de expressão monoalélica. Perfis monoalélicos por expressão aleatória, e perfis monoalélicos governados por *imprinting*.

O gene *WRB* possui duas isoformas importantes, uma isoforma maior *w001* e uma isoforma menor *w004*. Dado a localização da *WRB-DMR*, co-localizada com o íntron 1 da isoforma *w001* e a região promotora da isoforma menor *w004*, inicialmente foi especulado que a *WRB-DMR* atuasse na isoforma menor, na manutenção ou regulação do *imprinting* de modo isoforma específica, assim como descrito para o gene, sob *imprinting* materno, *MEST* (Kamei *et al.*, 2007).

Interessantemente, fortalecendo esta hipótese, a caracterização *in silico* do gene *WRB*, revelou uma assinatura em proteínas histonas comum ao gene *MEST* (figura 67), consistente com um enriquecimento de 17 modificações associadas à ativação transcricional (H2BK120ac, H2BK20ac, H2BK12ac, H2BK5ac, H4K91ac, H4K8ac, H4K5ac, H3K36ac, H3K27ac, H3K18ac, H3K9ac, H3K4ac, H3K9me1, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3 e H2A.Z) no promotor hipometilado da isoforma maior, a qual no gene *MEST*, apresenta expressão bialélica, e ausência dessas

modificações no promotor hemimetilado da isoforma menor, a qual no gene *MEST*,
exibe um perfil de expressão monoalélica.

No presente estudo, o perfil transcricional do gene *WRB* foi investigado através da genotipagem dos polimorfismos rs1060180, 13220 e rs60490159 em amostras de cDNA geradas a partir de células mononucleares de sangue periférico e linhagens de células tronco embrionárias. Em células mononucleares a isoforma *w004* não foi expressa ou não detectada por RT-PCR. Para a isoforma *w001*, em células mononucleares, o perfil transcricional foi bialélico.

Em células-tronco embrionárias a presença de ambos os transcritos foi confirmada por RT-PCR. Em ensaio específico para a isoforma *w004* o perfil transcricional foi igualmente bialélico, afastando assim a predição de *imprinting* isoforma específico para o gene *WRB*. Esses resultados afastam a predição de *imprinting* para o gene *WRB* nas linhagens celulares avaliadas, e sugerem que a *WRB-DMR* atue de modo tecido-específico, ou na regulação de outros genes que não o próprio gene *WRB*.

O estudo de *imprinting* é desafiador dado à complexidade deste fenômeno. Particularidades sobre a expressão monoalélica em genes sob *imprinting* são reconhecidas e estas englobam desde a expressão monoalélica restrita a um determinado transcrito entre uma série de variantes (Kosaki *et al.*, 2000; Kamei *et al.*, 2007), à tecidos-específicos (Baran *et al.*, 2015) ou estágios do desenvolvimento (Babak *et al.*, 2015; Baran *et al.*, 2015).

Contudo, esta classe de genes é de grande importância clínica, dado que alterações genéticas e epigenéticas nestes genes são a causa de diversas síndromes humanas (Uyar e Seli, 2014), além de estar associada com algumas neoplasias (Joyce e Schofield, 1998; Schofield *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2009; Ozaki *et al.*, 2014; Barrow *et al.*, 2015), as quais só podem ser completamente compreendidas através do correto mapeamento genético e epigenético destes genes e seus elementos regulatórios. No cromossomo 21, a *WRB-DMR* pode ser a porta de entrada para um maior entendimento deste fenômeno.

Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que, com exceção da *WRB-DMR*, as alterações epigenéticas estudadas ocorrem de maneira independente da origem parental da cópia extra do cromossomo 21, uma vez que,

efeitos idênticos no estabelecimento de padrões alterados de metilação do DNA foram encontrados em genes arranjados em *cis* e *trans*.

Adicionalmente, os resultados alcançados neste estudo consistem na primeira investigação experimental da predição de *imprinting* genômico no cromossomo 21. Embora a hipótese de *imprinting* para os genes *KRTAP6-2*, *OLIG2*, *SIM2*, *IGSF5*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B* tenha sido afastada, o padrão de expressão monoalélica randômica demonstrado para os genes *OLIG2*, *IGSF5*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B* em tecido somático, abre um novo campo de estudo em SD, visto que, assim como os perfis alterados de expressão gênica na trissomia 21, a expressão monoalélica em um modelo estocástico pode ser um fator fortemente associado à heterogeneidade fenotípica apresentada na síndrome.

8. CONCLUSÕES

- ✓ A seção customizada da plataforma UCSC elaborada nesse estudo, mostrou-se altamente eficiente no rastreamento de regiões diferencialmente metiladas uma vez que permitiu a identificação de 100% das gDMRs descritas, bem como 80% de todas DMRs já conhecidas.
- ✓ A *MAP3K7CL-cDMR* não é uma verdadeira *DMR*, sendo seu perfil de hemimetilação estabelecido por perdas e ganhos de metilação em ambos os alelos parentais.
- ✓ O estado de hemimetilação observado na *MAP3K7CL-cDMR4* é um mecanismo estável e não influenciado pela cópia extra do cromossomo 21, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos perfis de metilação entre os grupos dissômicos e trissômicos.
- ✓ As alterações epigenéticas nos genes *TMEM131* e *RUNX1*, associadas com o perfil de metilação diferencial, como efeito da cópia extra do cromossomo 21 em pacientes SD, são estabelecidas independentemente da origem parental.
- ✓ A confirmação da *WRB-DMR* é uma forte evidência da existência de genes *imprinting* no cromossomo 21 ainda não descrito.
- ✓ A metilação alelo específica de origem materna na *WRB-DMR* não está relacionada com expressão alelo específica no gene *WRB*.
- ✓ O estado de metilação na *WRB-DMR* pode ser aplicado para o diagnóstico da trissomia 21 e origem parental da não disjunção mesmo na ausência de amostras biológicas dos genitores.
- ✓ O gene *WRB* não é regulado por *imprinting* em células da linhagem hematopoiética e linhagens de células-tronco embrionárias.
- ✓ Os genes *OLIG2*, *IGSF5*, *ADARB1*, *COL6A1*, *MCM3AP*, *DIP2A* e *S100B* apresentam um perfil de expressão monoalélica estocástica.

- ✓ Dado a relevância de uma DMR no cromossomo 21, e o impacto clínico da alteração de *imprinting*, novos genes preditos devem ser estudados.

- ✓ O estudo de *imprinting* é desafiador dado a complexidade deste fenômeno, que englobam desde expressão monoalélica restrita a um determinado transcrito, à tecidos-específicos ou estágios do desenvolvimento. Neste contexto, outros tecidos devem ser avaliados para os genes alvos.

9. APÊNDICE A

<i>Loco/gene</i>	<i>dbSNP#</i>	<i>Alelo</i>	<i>Primers</i>	<i>Cód.</i>	<i>Amplimer</i>	<i>Sítio de restrição</i>	<i>Experimento</i>
<i>D21S369</i>			6-FAM-ggtggaaatgaggcatgtt- <i>Foward</i> gtgaaagaaaatggccttg- <i>Reverse</i>	Q1	205 pb		QF-PCR
<i>D21S1993</i>			PET-aaggacagaggcgtgtt- <i>Foward</i> gccgagattgcaccattact- <i>Reverse</i>	Q2	173 pb		QF-PCR
<i>D21S14446264</i>			VIC-tggttaggaaaactccaatg- <i>Foward</i> ttgaaccaggaggtgga- <i>Reverse</i>	C1	205 pb		QF-PCR
<i>D21S14507484</i>			6-FAM-ttgccaacctcttct- <i>Foward</i> ttcagtacctaagacaattcttgaca- <i>Reverse</i>	C2	235 pb		QF-PCR
<i>D21S14591269</i>			NED-gacctggctaatttctattga- <i>Foward</i> ggaggaaaaatgtgattcagg- <i>Reverse</i>	C3	308 pb		QF-PCR
<i>D21S1461821</i>			NED-ggagctgaagaacctgccta- <i>Foward</i> ttcctgtctctcccctt- <i>Reverse</i>	C4	210 pb		QF-PCR
<i>D21S15368162</i>			PET-tcccaggaggactaatccag- <i>Foward</i> attgcctgagccccagag- <i>Reverse</i>	C5	362 pb		QF-PCR
<i>D21S11</i>			PET/FAM-cccaagtgaattgccttct- <i>Foward</i> gtcaatgttctccagacagac- <i>Reverse</i>	Q3	200 pb		QF-PCR
<i>D21S26583121</i>			NED-ttcttggaaaattgttaggc- <i>Foward</i> ctccacagcaagaagcttg- <i>Reverse</i>	Q4	399 pb		QF-PCR
<i>D21S226</i>			6-FAM-gatcaaggaaaccttaagaca- <i>Foward</i> gtttgtctgtttctttgc- <i>Reverse</i>	Q5	240 pb		QF-PCR

<i>Loco/gene</i>	<i>dbSNP#</i>	<i>Alelo</i>	<i>Primers</i>	<i>Cód.</i>	<i>Amplimer</i>	<i>Sítio de restrição</i>	<i>Experimento</i>
<i>D21S1270</i>			VIC-ctatcccactgtattattcagggc- <i>Foward</i> tgagtttccaggttcaggtgaca- <i>Reverse</i>	Q9	319 pb		QF-PCR
<i>IFNARI</i>			NED/PET-ccagtggttggggatattcta- <i>Foward</i> gagccgagattgagccac- <i>Reverse</i>	Q6	188 pb		QF-PCR
<i>D21S35642814</i>			VIC-ttctaaaaaccgccacttgc- <i>Foward</i> aatggagggattgccttag- <i>Reverse</i>	Q7	228 pb		QF-PCR
<i>D21S1411</i>			NED-atgatgaatgcatagatggatg- <i>Foward</i> aatgtgtccttccaggc- <i>Reverse</i>	Q8	298 pb		QF-PCR
<i>KRTAP6-2</i>	rs2832955 rs113467703	G/A T/C	ggaaactactacggcgacca- <i>Foward</i> gtagtagccagagccgcatc- <i>Reverse</i> ccacagccacagaagaagcgggagcc ttttttttttttttttttttggctatagctcctgctgtggc	D5 S6 b S7 b	165 pb 23 pb 48 pb		SNuPE e RT-PCR
<i>OLIG2</i>	rs762178 rs17854475	T/C T/C	gacaagctaggaggcagtg- <i>Foward</i> agttggtgagcatgaggatg- <i>Reverse</i> tttttttttttttttttttttttagacgacgaggtgctggacgagga tttttttttttttttttttttttagtgcgccagcagcagcgtgg aaatcgcacccagatttgc- <i>Foward</i> caccagtcgcttcctcct- <i>Reverse</i>	D17 S12 b S13 b C8	292 pb 56 pb 62 pb 595 pb		SNuPE RT-PCR e SNuPE
<i>SIM2</i>	rs2073416 rs2073601	T/C C/A	atccatcttcttgccatgc- <i>Foward</i> tttttagctggagacgagctg- <i>Reverse</i> tttttttttttttgcattccagttgtccatttggaa tttttttttttttttaggtggcagcgttttctctgagcaca aaccttaccceccacag- <i>Foward</i> ggtggctctggaggattt- <i>Reverse</i>	D1 S1 c S19 b C2 c	375 pb 43 pb 49 pb 386 pb		SNuPE RT-PCR e SNuPE
	rs2073416 rs2073601	T/C C/A	tttttttttttttgcattccagttgtccatttggaa tttttttttttttttaggtggcagcgttttctctgagcaca	S1 c S19 b	43 pb 49 pb		

<i>Loco/gene</i>	dbSNP#	Alelo	<i>Primers</i>	Cód.	<i>Amplimer</i>	Sítio de restrição	Experimento
<i>WRB</i>	rs1060180	G/T	tttgtgaatatgtttgttcttggaa- <i>Foward</i>	D30	659 pb		SNuPE e RT-PCR
			ggccacacaggttattgggtt- <i>Reverse</i>	S34	26 pb		
	rs13230	G/A	aatcgtgattcttataagact	S35	30 pb		
	rs60490159	G/T	tttttagaaagtaacttaatttaataacc	S36	36 pb		
	rs1060180	G/T	ttttttttaacaaccttataagtctctgattaa gagtagcaggtggtgttggaa- <i>Foward</i> tcttggctcaatgacaggtg- <i>Reverse</i> aatcgtgattcttataagact	C23 S34	281 pb 26 pb		
<i>WRB-004</i>	rs1060180	G/T	cggaggagacctatgtccag- <i>Foward</i>	C16 F	1210 pb		RT-PCR e SNuPE
			ggccacacaggttattgggtt- <i>Reverse</i>	D30 R			
			aatcgtgattcttataagact	S34	26 pb		
			tttttagaaagtaacttaatttaataacc	S35	30 pb		
rs60490159	G/T	ttttttttaacaaccttataagtctctgattaa	S36	36 pb			
<i>WRB-001</i>			gtagcggaccagcacag- <i>Foward</i> ccgctctcatctgtgactcc- <i>Reverse</i>	C15	187 pb		RT-PCR
<i>WRB-004</i>			cggaggagacctatgtccag- <i>Foward</i> aattgagctgtccgagcttt- <i>Reverse</i>	C16	200 pb		RT-PCR
<i>IGSF5</i>	rs12626544	G/A	ggttctgggtctgtaataa- <i>Foward</i>	D2	204 pb		SNuPE
			gccctggtcgtacctctga- <i>Reverse</i>	S2 b	33 pb		
	rs2205204	G/C	tttttttttgaagtcataagaagccccc ttttttttttttttttttttttttttttctgggagcccttcaggact	S3 b	55 pb		
	ctggaggaatggaagtcagc- <i>Foward</i>	C3	146 pb				
	gagacggtgcagttgaagc- <i>Reverse</i>	S2 b	33 pb				
rs12626544	G/A	tttttttttgaagtcataagaagccccc	S3 b	55 pb			
rs2205204	G/C	ttttttttttttttttttttttttttttctgggagcccttcaggact					
<i>ADARB1</i>	rs78867942	G/C	caagcctggttgcagtaca- <i>Foward</i>	D6	118 pb		SNuPE
			tttcttggggaccagagc- <i>Reverse</i>	S10 b	60 pb		
	ttttttttttttttttttttttttttttctctgtgcatgtctgtggag	C6	411 pb				
	agtctccgccagtcaga- <i>Foward</i> accagagccctcaaaaacct- <i>Reverse</i>	S10 b	60 pb				
rs78867942	G/C	ttttttttttttttttttttttttttttctctgtgcatgtctgtggag					

<i>Loco/gene</i>	dbSNP#	Alelo	<i>Primers</i>	Cód.	<i>Amplimer</i>	Sítio de restrição	Experimento
<i>ADARB1</i>	rs1051367	G/A	tccctcccacttactacgc- <i>Foward</i>	D7	152 pb		SNuPE
			ctcgggggcttctccac- <i>Reverse</i>	S11 b	39 pb		
	rs1051367	G/A	tttttttctactactacgtccaagattaccaa	C7	302 pb		RT-PCR e SNuPE
			aggccccaacttcagtgt- <i>Foward</i>	S11 b	39 pb		
<i>COL6A1</i>	rs1053315	G/C/A	ggctgacatcaccatcctg- <i>Foward</i>	D16	267 pb		SNuPE
			ggtggcgtcgttgataaagt- <i>Reverse</i>	S8 b	26-29 pb		
	rs13051496	G/A	tttttgccagcagcgcccagagcgggc	S9 b	38 pb		SNuPE
	rs1053312	G/A	ttttttttttttttttttttttcagccacaacttgacaccaccaagc	S20 b	53 pb		
<i>COL6A1</i>	rs1053315	G/C/A	ctcgtggtcaaggagaact- <i>Foward</i>	C5	385 pb		RT-PCR e SNuPE
			ggtggcgtcgttgataaagt- <i>Reverse</i>	S8 b	26-29 pb		
	rs13051496	G/A	tttttgccagcagcgcccagagcgggc	S9 b	38 pb		SNuPE
	rs1053312	G/A	ttttttttttttttttttttttcagccacaacttgacaccaccaagc	S20 b	53 pb		
<i>MCM3AP</i>	rs2839173	T/C	aagaaactgaggcgccaaat- <i>Foward</i>	D18	186 pb		SNuPE
			agctgatgctgacctggtg- <i>Reverse</i>	S22	26 pb		
	rs2839173	T/C	tttttgcaggagattgggcatctc	C13	139 pb		RT-PCR e SNuPE
			cccattgctgaagagaacct- <i>Foward</i>	S22	26 pb		
<i>MCM3AP</i>	rs2839181	T/C	caagaccaggaagtcggtgt- <i>Foward</i>	D11	117 pb		SNuPE
			gagttgaagctgcacacagg- <i>Reverse</i>	S15 b	19 pb		
	rs2839181	T/C	tgcccccgctccctcgtca	C10	189 pb		RT-PCR e SNuPE
			gtgtcagtcgggaaattgt- <i>Foward</i>	S15 b	19 pb		
			cggtctacaccactcct- <i>Reverse</i>				
			tgcccccgctccctcgtca				

<i>Loco/gene</i>	<i>dbSNP#</i>	<i>Alelo</i>	<i>Primers</i>	<i>Cód.</i>	<i>Amplimer</i>	<i>Sítio de restrição</i>	<i>Experimento</i>
<i>XACT</i>	rs5929175	A/T	<i>gctattgccccaaacatga-Foward</i>	D25	100 pb		SNuPE e RT-PCR
			<i>ttttgttagcttcattttcc-Reverse</i>	S30	25 pb		
<i>XACT</i>	rs5929410	G/C	<i>tcccaaactgaatgtttc-Foward</i>	D26	157 pb		SNuPE e RT-PCR
			<i>cctttgcagaacgtaggact-Reverse</i>	S31	33 pb		
<i>ESCO2</i>			<i>FAM-cagcgcttcctcctagc-Foward</i>	CP	248-249 pb	[02] BstUI; [04] HhaI;	DESM-QFPCR
			<i>ggagaacgagtcagtggcttc-Reverse</i>			[01] HpaII	
<i>WRB</i>			<i>FAM-ttcagggtctggagcttct-Foward</i>	CN	269-271 pb	[0] BstUI; [0] HhaI;	DESM-QFPCR
			<i>aatgtaatccaagaccacgta-Reverse</i>			[0] HpaII	
<i>WRB-DMR</i>	rs2299739	A/G	<i>FAM-gcataccgcacacactgc-Foward</i>	D35	254 pb	[01] BstUI; [09] HhaI;	DESM-QFPCR
			<i>gtaagcccagaaggcaacac-Reverse</i>	S37	25 pb		
			rs2244352	C/A	<i>tttttgggtccctgcgagctgcac</i>	S40	36 pb

(*) **Metilação alelo-parental específica.**

<i>Loco/gene</i>	dbSNP#	Alelo	<i>Primers</i>	Cód.	<i>Amplimer</i>	Sítio de restrição	Experimento
<i>MAP3K7CL-cDMR</i>	rs2853831	C/G	FAM-agctagacgtaaaggttctcca- <i>Foward</i>	D38	255 pb	[01] BstUI; [02] HhaI;	DESM-QFPCR
			aatttctcgcctggccttag- <i>Reverse</i>	S42	25 pb		MAE (*)
<i>MAP3K7CL-cDMR</i>			FAM-cacctctccctccacacctc- <i>Foward</i>	D37	253 pb	[02] HpaII; [03] HhaI;	DESM-QFPCR
			tcacatacgtctggatggaagaa- <i>Reverse</i>				
<i>TMEM131-DMR</i>	rs6760008 rs2044458	A/G A/T	FAM-tggcagaggcttcgatcac- <i>Foward</i>	D48	253 pb	[01] BstUI; [02] HpaII	DESM-QFPCR
			gtggcgtgggttctgtg- <i>Reverse</i>				
			aggactgagccctgagtg- <i>Foward</i>	D49	499 pb	[01] BstUI; [02] HpaII	DESM-PCR
			cagtgtaccgcaagcctgac- <i>Reverse</i>	S52	26 pb		e MAE (*)
			gaggcttcgatcacactttgtgaa	S53	33 pb		
<i>RUNX1-DMR</i>	rs8126699	C/T	FAM-agcacggagcagaggaagt- <i>Foward</i>	D43	253 pb	[01] BstUI; [04] HhaI;	DESM-QFPCR
			agctgtttgcagggtcctaa- <i>Reverse</i>			[04] HpaII	
			ccgggctgggtataacttt- <i>Foward</i>	D44	636 pb	[02] BstUI; [05] HhaI;	DESM-PCR
			agctgtttgcagggtcctaa- <i>Reverse</i>			[11] HpaII	e MAE (*)
			gggctgggtataactttcctact	S50	26 pb		

(*) Metilação alelo-parental específica.

10. REFERÊNCIAS

- Algar, E., Dagar, V., Sebjaj, M. e Pachter, N. 2011. An 11p15 imprinting centre region 2 deletion in a family with Beckwith Wiedemann syndrome provides insights into imprinting control at CDKN1C. *PLoS One*, v.6, p.e29034
- Allen, R.C., Zoghbi, H.Y., Moseley, A.B., Rosenblatt, H.M. e Belmont, J.W. 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet*, v.51, p.1229-1239
- Alves Da Silva, A.F., Machado, F.B., Fernandes, R.C.S.C. e Medina-Acosta, E. 2008. Implementação da citogenética molecular para o diagnóstico rápido da trissomia 21 e a incidência da Síndrome de Down no município de Campos dos Goytacazes, Brasil, no período de 2006-2008. *Revista Científica da Faculdade de Medicina de Campos*, v.3, p.02-10
- Argellati, F., Massone, S., D'abramo, C., Marinari, U.M., Pronzato, M.A., Domenicotti, C. e Ricciarelli, R. 2006. Evidence against the overexpression of APP in Down syndrome. *IUBMB Life*, v.58, p.103-106
- Babak, T., Deveale, B., Tsang, E.K., Zhou, Y., Li, X., Smith, K.S., Kukurba, K.R., Zhang, R., Li, J.B., Van Der Kooy, D., Montgomery, S.B. e Fraser, H.B. 2015. Genetic conflict reflected in tissue-specific maps of genomic imprinting in human and mouse. *Nat Genet*, v.47, p.544-549
- Bacalini, M.G., Gentilini, D., Boattini, A., Giampieri, E., Pirazzini, C., Giuliani, C., Fontanesi, E., Scurti, M., Remondini, D., Capri, M., Cocchi, G., Ghezzi, A., Del Rio, A., Luiselli, D., Vitale, G., Mari, D., Castellani, G., Fraga, M., Di Blasio, A.M., Salvioli, S., Franceschi, C. e Garagnani, P. 2015. Identification of a DNA methylation signature in blood cells from persons with Down Syndrome. *Aging (Albany NY)*, v.7, p.82-96
- Baran, Y., Subramaniam, M., Biton, A., Tukiainen, T., Tsang, E.K., Rivas, M.A., Pirinen, M., Gutierrez-Arcelus, M., Smith, K.S., Kukurba, K.R., Zhang, R., Eng, C., Torgerson, D.G., Urbanek, C., Li, J.B., Rodriguez-Santana, J.R., Burchard, E.G., Seibold, M.A., Macarthur, D.G., Montgomery, S.B., Zaitlen, N.A. e Lappalainen, T. 2015. The landscape of genomic imprinting across diverse adult human tissues. *Genome Res*
- Barrow, T.M., Barault, L., Ellsworth, R.E., Harris, H.R., Binder, A.M., Valente, A.L., Shriver, C.D. e Michels, K.B. 2015. Aberrant methylation of imprinted genes is associated with negative hormone receptor status in invasive breast cancer. *Int J Cancer*, v.137, p.537-547
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I. e Zhao, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, v.129, p.823-837

- Bartolomei, M.S., Zemel, S. e Tilghman, S.M. 1991. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature*, v.351, p.153-155
- Bell, A.C. e Felsenfeld, G. 2000. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*, v.405, p.482-485
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B. e Bestor, T.H. 2001. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, v.294, p.2536-2539
- Brettingham-Moore, K.H., Taberlay, P.C. e Holloway, A.F. 2015. Interplay between Transcription Factors and the Epigenome: Insight from the Role of RUNX1 in Leukemia. *Front Immunol*, v.6, p.499
- Buckland, P.R., Coleman, S.L., Hoogendoorn, B., Guy, C., Smith, S.K. e O'donovan, M.C. 2004. A high proportion of chromosome 21 promoter polymorphisms influence transcriptional activity. *Gene Expr*, v.11, p.233-239
- Bullman, H., Lever, M., Robinson, D.O., Mackay, D.J., Holder, S.E. e Wakeling, E.L. 2008. Mosaic maternal uniparental disomy of chromosome 11 in a patient with Silver-Russell syndrome. *J Med Genet*, v.45, p.396-399
- Cerrato, F., Sparago, A., Verde, G., De Crescenzo, A., Citro, V., Cubellis, M.V., Rinaldi, M.M., Boccuto, L., Neri, G., Magnani, C., D'angelo, P., Collini, P., Perotti, D., Sebastio, G., Maher, E.R. e Riccio, A. 2008. Different mechanisms cause imprinting defects at the IGF2/H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumour. *Hum Mol Genet*, v.17, p.1427-1435
- Chess, A. 2013. Random and non-random monoallelic expression. *Neuropsychopharmacology*, v.38, p.55-61
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H. e Axel, R. 1994. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell*, v.78, p.823-834
- Choufani, S., Shapiro, J.S., Susiarjo, M., Butcher, D.T., Grafodatskaya, D., Lou, Y., Ferreira, J.C., Pinto, D., Scherer, S.W., Shaffer, L.G., Coullin, P., Caniggia, I., Beyene, J., Slim, R., Bartolomei, M.S. e Weksberg, R. 2011. A novel approach identifies new differentially methylated regions (DMRs) associated with imprinted genes. *Genome Res*, v.21, p.465-476
- Chureau, C., Chantalat, S., Romito, A., Galvani, A., Duret, L., Avner, P. e Rougeulle, C. 2011. Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. *Hum Mol Genet*, v.20, p.705-718
- Chureau, C., Prissette, M., Bourdet, A., Barbe, V., Cattolico, L., Jones, L., Eggen, A., Avner, P. e Duret, L. 2002. Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine. *Genome Res*, v.12, p.894-908

- Cicccone, D.N. e Chen, T. 2009. Histone lysine methylation in genomic imprinting. *Epigenetics*, v.4, p.216-220
- Cicccone, D.N., Su, H., Hevi, S., Gay, F., Lei, H., Bajko, J., Xu, G., Li, E. e Chen, T. 2009. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature*, v.461, p.415-418
- Cooper, W.N., Luharia, A., Evans, G.A., Raza, H., Haire, A.C., Grundy, R., Bowdin, S.C., Riccio, A., Sebastio, G., Blik, J., Schofield, P.N., Reik, W., Macdonald, F. e Maher, E.R. 2005. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet*, v.13, p.1025-1032
- Cotton, A.M., Price, E.M., Jones, M.J., Balaton, B.P., Kobor, M.S. e Brown, C.J. 2015. Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet*, v.24, p.1528-1539
- Court, F., Tayama, C., Romanelli, V., Martin-Trujillo, A., Iglesias-Platas, I., Okamura, K., Sugahara, N., Simon, C., Moore, H., Harness, J.V., Keirstead, H., Sanchez-Mut, J.V., Kaneki, E., Lapunzina, P., Soejima, H., Wake, N., Esteller, M., Ogata, T., Hata, K., Nakabayashi, K. e Monk, D. 2014. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. *Genome Res*, v.24, p.554-569
- Davies, G.E., Howard, C.M., Farrer, M.J., Coleman, M.M., Bennett, L.B., Cullen, L.M., Wyse, R.K., Burn, J., Williamson, R. e Kessling, A.M. 1995. Genetic variation in the COL6A1 region is associated with congenital heart defects in trisomy 21 (Down's syndrome). *Ann Hum Genet*, v.59, p.253-269
- Davies, G.E., Howard, C.M., Farrer, M.J., Coleman, M.M., Cullen, L.M., Williamson, R., Wyse, R.K. e Kessling, A.M. 1994. Unusual genotypes in the COL6A1 gene in parents of children with trisomy 21 and major congenital heart defects. *Hum Genet*, v.93, p.443-446
- De Jager, P.L., Srivastava, G., Lunnon, K., Burgess, J., Schalkwyk, L.C., Yu, L., Eaton, M.L., Keenan, B.T., Ernst, J., McCabe, C., Tang, A., Raj, T., Replogle, J., Brodeur, W., Gabriel, S., Chai, H.S., Younkin, C., Younkin, S.G., Zou, F., Szyf, M., Epstein, C.B., Schneider, J.A., Bernstein, B.E., Meissner, A., Ertekin-Taner, N., Chibnik, L.B., Kellis, M., Mill, J. e Bennett, D.A. 2014. Alzheimer's disease: early alterations in brain DNA methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and other loci. *Nat Neurosci*, v.17, p.1156-1163
- De Pagter-Holthuizen, P., Jansen, M., Van Schaik, F.M., Van Der Kammen, R., Oosterwijk, C., Van Den Brande, J.L. e Sussenbach, J.S. 1987. The human insulin-like growth factor II gene contains two development-specific promoters. *FEBS Lett*, v.214, p.259-264
- Dechiara, T.M., Robertson, E.J. e Efstratiadis, A. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, v.64, p.849-859

- Dindot, S.V., Person, R., Strivens, M., Garcia, R. e Beaudet, A.L. 2009. Epigenetic profiling at mouse imprinted gene clusters reveals novel epigenetic and genetic features at differentially methylated regions. *Genome Res*, v.19, p.1374-1383
- Docherty, L.E., Rezwan, F.I., Poole, R.L., Jagoe, H., Lake, H., Lockett, G.A., Arshad, H., Wilson, D.I., Holloway, J.W., Temple, I.K. e Mackay, D.J. 2014. Genome-wide DNA methylation analysis of patients with imprinting disorders identifies differentially methylated regions associated with novel candidate imprinted genes. *J Med Genet*, v.51, p.229-238
- Dockery, L., Gerfen, J., Harview, C., Rahn-Lee, C., Horton, R., Park, Y. e Davis, T.L. 2009. Differential methylation persists at the mouse Rasgrf1 DMR in tissues displaying monoallelic and biallelic expression. *Epigenetics*, v.4, p.241-247
- Du, M., Beatty, L.G., Zhou, W., Lew, J., Schoenherr, C., Weksberg, R. e Sadowski, P.D. 2003. Insulator and silencer sequences in the imprinted region of human chromosome 11p15.5. *Hum Mol Genet*, v.12, p.1927-1939
- Eckersley-Maslin, M.A., Thybert, D., Bergmann, J.H., Marioni, J.C., Flicek, P. e Spector, D.L. 2014. Random monoallelic gene expression increases upon embryonic stem cell differentiation. *Dev Cell*, v.28, p.351-365
- Edwards, C.A. e Ferguson-Smith, A.C. 2007. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol*, v.19, p.281-289
- Ensminger, A.W. e Chess, A. 2004. Coordinated replication timing of monoallelically expressed genes along human autosomes. *Hum Mol Genet*, v.13, p.651-658
- Feil, R., Walter, J., Allen, N.D. e Reik, W. 1994. Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse Igf2 and H19 genes. *Development*, v.120, p.2933-2943
- Feng, W., Marquez, R.T., Lu, Z., Liu, J., Lu, K.H., Issa, J.P., Fishman, D.M., Yu, Y. e Bast, R.C., Jr. 2008. Imprinted tumor suppressor genes ARHI and PEG3 are the most frequently down-regulated in human ovarian cancers by loss of heterozygosity and promoter methylation. *Cancer*, v.112, p.1489-1502
- Ferguson-Smith, A.C. 2011. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat Rev Genet*, v.12, p.565-575
- Ferguson-Smith, A.C. e Surani, M.A. 2001. Imprinting and the epigenetic asymmetry between parental genomes. *Science*, v.293, p.1086-1089
- Fitzpatrick, G.V., Pugacheva, E.M., Shin, J.Y., Abdullaev, Z., Yang, Y., Khatod, K., Lobanenkova, V.V. e Higgins, M.J. 2007. Allele-specific binding of CTCF to the multipartite imprinting control region KvDMR1. *Mol Cell Biol*, v.27, p.2636-2647

- Fitzpatrick, G.V., Soloway, P.D. e Higgins, M.J. 2002. Regional loss of imprinting and growth deficiency in mice with a targeted deletion of KvDMR1. *Nat Genet*, v.32, p.426-431
- Frost, J.M., Monk, D., Stojilkovic-Mikic, T., Woodfine, K., Chitty, L.S., Murrell, A., Stanier, P. e Moore, G.E. 2010. Evaluation of allelic expression of imprinted genes in adult human blood. *PLoS One*, v.5, p.e13556
- Fukuda, A., Tomikawa, J., Miura, T., Hata, K., Nakabayashi, K., Eggen, K., Akutsu, H. e Umezawa, A. 2014. The role of maternal-specific H3K9me3 modification in establishing imprinted X-chromosome inactivation and embryogenesis in mice. *Nat Commun*, v.5, p.5464
- Gabory, A., Ripoche, M.A., Yoshimizu, T. e Dandolo, L. 2006. The H19 gene: regulation and function of a non-coding RNA. *Cytogenet Genome Res*, v.113, p.188-193
- Garfield, A.S., Cowley, M., Smith, F.M., Moorwood, K., Stewart-Cox, J.E., Gilroy, K., Baker, S., Xia, J., Dalley, J.W., Hurst, L.D., Wilkinson, L.S., Isles, A.R. e Ward, A. 2011. Distinct physiological and behavioural functions for parental alleles of imprinted Grb10. *Nature*, v.469, p.534-538
- Gendrel, A.V., Attia, M., Chen, C.J., Diabangouaya, P., Servant, N., Barillot, E. e Heard, E. 2014. Developmental dynamics and disease potential of random monoallelic gene expression. *Dev Cell*, v.28, p.366-380
- Gimelbrant, A., Hutchinson, J.N., Thompson, B.R. e Chess, A. 2007. Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science*, v.318, p.1136-1140
- Gimelbrant, A.A. e Chess, A. 2006. An epigenetic state associated with areas of gene duplication. *Genome Res*, v.16, p.723-729
- Gittenberger-De Groot, A.C., Bartram, U., Oosthoek, P.W., Bartelings, M.M., Hogers, B., Poelmann, R.E., Jongewaard, I.N. e Klewer, S.E. 2003. Collagen type VI expression during cardiac development and in human fetuses with trisomy 21. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, v.275, p.1109-1116
- Gong, H., Zhou, H., Mckenzie, G.W., Yu, Z., Clerens, S., Dyer, J.M., Plowman, J.E., Wright, M.W., Arora, R., Bawden, C.S., Chen, Y., Li, J. e Hickford, J.G. 2012. An updated nomenclature for keratin-associated proteins (KAPs). *Int J Biol Sci*, v.8, p.258-264
- Gregg, C. 2014. Known unknowns for allele-specific expression and genomic imprinting effects. *F1000Prime Rep*, v.6, p.75
- Griffin, W.S., Stanley, L.C., Ling, C., White, L., Macleod, V., Perrot, L.J., White, C.L., 3rd e Araoz, C. 1989. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.86, p.7611-7615

- Guidi, S., Bonasoni, P., Ceccarelli, C., Santini, D., Gualtieri, F., Ciani, E. e Bartesaghi, R. 2008. Neurogenesis impairment and increased cell death reduce total neuron number in the hippocampal region of fetuses with Down syndrome. *Brain Pathol*, v.18, p.180-197
- Hackett, J.A. e Surani, M.A. 2013. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.368, p.20110328
- Haig, D. 1993. Genetic conflicts in human pregnancy. *Q Rev Biol*, v.68, p.495-532
- Hannula-Jouppi, K., Muurinen, M., Lipsanen-Nyman, M., Reinius, L.E., Ezer, S., Greco, D. e Kere, J. 2014. Differentially methylated regions in maternal and paternal uniparental disomy for chromosome 7. *Epigenetics*, v.9, p.351-365
- Hata, K., Okano, M., Lei, H. e Li, E. 2002. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, v.129, p.1983-1993
- Henckel, A., Nakabayashi, K., Sanz, L.A., Feil, R., Hata, K. e Arnaud, P. 2009. Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals. *Hum Mol Genet*, v.18, p.3375-3383
- Hirabayashi, S., Tajima, M., Yao, I., Nishimura, W., Mori, H. e Hata, Y. 2003. JAM4, a junctional cell adhesion molecule interacting with a tight junction protein, MAGI-1. *Mol Cell Biol*, v.23, p.4267-4282
- Horike, S., Mitsuya, K., Meguro, M., Kotobuki, N., Kashiwagi, A., Notsu, T., Schulz, T.C., Shirayoshi, Y. e Oshimura, M. 2000. Targeted disruption of the human LIT1 locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet*, v.9, p.2075-2083
- Huang, R.C., Galati, J.C., Burrows, S., Beilin, L.J., Li, X., Pennell, C.E., Van Eekelen, J., Mori, T.A., Adams, L.A. e Craig, J.M. 2012. DNA methylation of the IGF2/H19 imprinting control region and adiposity distribution in young adults. *Clin Epigenetics*, v.4, p.21
- Irving, C.A. e Chaudhari, M.P. 2012. Cardiovascular abnormalities in Down's syndrome: spectrum, management and survival over 22 years. *Arch Dis Child*, v.97, p.326-330
- Izraeli, S., Rainis, L., Hertzberg, L., Smooha, G. e Birger, Y. 2007. Trisomy of chromosome 21 in leukemogenesis. *Blood Cells Mol Dis*, v.39, p.156-159
- Izu, Y., Ezura, Y., Mizoguchi, F., Kawamata, A., Nakamoto, T., Nakashima, K., Hayata, T., Hemmi, H., Bonaldo, P. e Noda, M. 2012. Type VI collagen deficiency induces osteopenia with distortion of osteoblastic cell morphology. *Tissue Cell*, v.44, p.1-6

- Jacob, K.J., Robinson, W.P. e Lefebvre, L. 2013. Beckwith-Wiedemann and Silver-Russell syndromes: opposite developmental imbalances in imprinted regulators of placental function and embryonic growth. *Clin Genet*, v.84, p.326-334
- Jeffries, A.R., Collier, D.A., Vassos, E., Curran, S., Ogilvie, C.M. e Price, J. 2013. Random or stochastic monoallelic expressed genes are enriched for neurodevelopmental disorder candidate genes. *PLoS One*, v.8, p.e85093
- Jeffries, A.R., Perfect, L.W., Ledderose, J., Schalkwyk, L.C., Bray, N.J., Mill, J. e Price, J. 2012. Stochastic choice of allelic expression in human neural stem cells. *Stem Cells*, v.30, p.1938-1947
- Jia, D., Jurkowska, R.Z., Zhang, X., Jeltsch, A. e Cheng, X. 2007. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature*, v.449, p.248-251
- Jones, M.J., Farre, P., Mcewen, L.M., Macisaac, J.L., Watt, K., Neumann, S.M., Emberly, E., Cynader, M.S., Virji-Babul, N. e Kobor, M.S. 2013. Distinct DNA methylation patterns of cognitive impairment and trisomy 21 in Down syndrome. *BMC Med Genomics*, v.6, p.58
- Jones, P.A. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, v.13, p.484-492
- Joyce, J.A. e Schofield, P.N. 1998. Genomic imprinting and cancer. *Mol Pathol*, v.51, p.185-190
- Kamei, Y., Suganami, T., Kohda, T., Ishino, F., Yasuda, K., Miura, S., Ezaki, O. e Ogawa, Y. 2007. Peg1/Mest in obese adipose tissue is expressed from the paternal allele in an isoform-specific manner. *FEBS Lett*, v.581, p.91-96
- Karasawa, M., Tsukamoto, N., Yamane, A., Okamoto, K., Maehara, T., Yokohama, A., Nojima, Y. e Omine, M. 2001. Analysis of the distribution of CAG repeats and X-chromosome inactivation status of HUMARA gene in healthy female subjects using improved fluorescence-based assay. *Int J Hematol*, v.74, p.281-286
- Keniry, A., Oxley, D., Monnier, P., Kyba, M., Dandolo, L., Smits, G. e Reik, W. 2012. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nat Cell Biol*, v.14, p.659-665
- Kerkel, K., Schupf, N., Hatta, K., Pang, D., Salas, M., Kratz, A., Minden, M., Murty, V., Zigman, W.B., Mayeux, R.P., Jenkins, E.C., Torkamani, A., Schork, N.J., Silverman, W., Croy, B.A. e Tycko, B. 2010. Altered DNA methylation in leukocytes with trisomy 21. *PLoS Genet*, v.6, p.e1001212
- Keverne, E.B. 2014. Genomic imprinting, action, and interaction of maternal and fetal genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- Khatib, H. 2007. Is it genomic imprinting or preferential expression? *Bioessays*, v.29, p.1022-1028
- Koerner, M.V. e Barlow, D.P. 2010. Genomic imprinting-an epigenetic gene-regulatory model. *Curr Opin Genet Dev*, v.20, p.164-170
- Korenberg, J.R., Chen, X.N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Disteché, C. e Et Al. 1994. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.91, p.4997-5001
- Kosaki, K., Kosaki, R., Craigen, W.J. e Matsuo, N. 2000. Isoform-specific imprinting of the human PEG1/MEST gene. *Am J Hum Genet*, v.66, p.309-312
- Krueger, C. e Morison, I.M. 2008. Random monoallelic expression: making a choice. *Trends Genet*, v.24, p.257-259
- Kurukuti, S., Tiwari, V.K., Tavoosidana, G., Pugacheva, E., Murrell, A., Zhao, Z., Lobanenkov, V., Reik, W. e Ohlsson, R. 2006. CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.103, p.10684-10689
- Lana-Elola, E., Watson-Scales, S., Fisher, E. e Tybulewicz, V. 2011. Down syndrome: searching for the genetic culprits. *Disease Models & Mechanisms*, v.4, p.586-595
- Lau, M.M., Stewart, C.E., Liu, Z., Bhatt, H., Rotwein, P. e Stewart, C.L. 1994. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. *Genes Dev*, v.8, p.2953-2963
- Letourneau, A., Santoni, F.A., Bonilla, X., Sailani, M.R., Gonzalez, D., Kind, J., Chevalier, C., Thurman, R., Sandstrom, R.S., Hibaoui, Y., Garieri, M., Popadin, K., Falconnet, E., Gagnebin, M., Gehrig, C., Vannier, A., Guipponi, M., Farinelli, L., Robyr, D., Migliavacca, E., Borel, C., Deutsch, S., Feki, A., Stamatoyannopoulos, J.A., Herault, Y., Van Steensel, B., Guigo, R. e Antonarakis, S.E. 2014. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature*, v.508, p.345-350
- Levin-Klein, R. e Bergman, Y. 2014. Epigenetic regulation of monoallelic rearrangement (allelic exclusion) of antigen receptor genes. *Front Immunol*, v.5, p.625
- Li, E., Bestor, T.H. e Jaenisch, R. 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, v.69, p.915-926
- Li, Y. e Sasaki, H. 2011. Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. *Cell Res*, v.21, p.466-473

- Liang, G., Chan, M.F., Tomigahara, Y., Tsai, Y.C., Gonzales, F.A., Li, E., Laird, P.W. e Jones, P.A. 2002. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol*, v.22, p.480-491
- Liao, J., Karnik, R., Gu, H., Ziller, M.J., Clement, K., Tsankov, A.M., Akopian, V., Gifford, C.A., Donaghey, J., Galonska, C., Pop, R., Reyon, D., Tsai, S.Q., Mallard, W., Joung, J.K., Rinn, J.L., Gnirke, A. e Meissner, A. 2015. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat Genet*, v.47, p.469-478
- Ligon, K.L., Huillard, E., Mehta, S., Kesari, S., Liu, H., Alberta, J.A., Bachoo, R.M., Kane, M., Louis, D.N., Depinho, R.A., Anderson, D.J., Stiles, C.D. e Rowitch, D.H. 2007. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron*, v.53, p.503-517
- Ling, J.Q., Li, T., Hu, J.F., Vu, T.H., Chen, H.L., Qiu, X.W., Cherry, A.M. e Hoffman, A.R. 2006. CTCF mediates interchromosomal colocalization between Igf2/H19 and Wsb1/Nf1. *Science*, v.312, p.269-272
- Liu, X., Zhang, Q., Zhang, D.E., Zhou, C., Xing, H., Tian, Z., Rao, Q., Wang, M. e Wang, J. 2009. Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia*, v.23, p.739-745
- Lopes, S., Lewis, A., Hajkova, P., Dean, W., Oswald, J., Forne, T., Murrell, A., Constancia, M., Bartolomei, M., Walter, J. e Reik, W. 2003. Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum Mol Genet*, v.12, p.295-305
- Lu, J., Esposito, G., Scuderi, C., Steardo, L., Delli-Bovi, L.C., Hecht, J.L., Dickinson, B.C., Chang, C.J., Mori, T. e Sheen, V. 2011. S100B and APP promote a gliocentric shift and impaired neurogenesis in Down syndrome neural progenitors. *PLoS One*, v.6, p.e22126
- Lu, J., Lian, G., Zhou, H., Esposito, G., Steardo, L., Delli-Bovi, L.C., Hecht, J.L., Lu, Q.R. e Sheen, V. 2012. OLIG2 over-expression impairs proliferation of human Down syndrome neural progenitors. *Hum Mol Genet*, v.21, p.2330-2340
- Luedi, P.P., Dietrich, F.S., Weidman, J.R., Bosko, J.M., Jirtle, R.L. e Hartemink, A.J. 2007. Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Res*, v.17, p.1723-1730
- Lyle, R., Bena, F., Gagos, S., Gehrig, C., Lopez, G., Schinzel, A., Lespinasse, J., Bottani, A., Dahoun, S., Taine, L., Doco-Fenzy, M., Cornillet-Lefebvre, P., Pelet, A., Lyonnet, S., Toutain, A., Colleaux, L., Horst, J., Kennerknecht, I., Wakamatsu, N., Descartes, M., Franklin, J.C., Florentin-Arar, L., Kitsiou, S., Ait Yahya-Graison, E., Costantine, M., Sinet, P.M., Delabar, J.M. e Antonarakis, S.E. 2009. Genotype-phenotype correlations in Down syndrome

- identified by array CGH in 30 cases of partial trisomy and partial monosomy chromosome 21. *Eur J Hum Genet*, v.17, p.454-466
- Lyon, M.F. 1961. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, v.190, p.372-373
- Lyon, M.F. 1962. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet*, v.14, p.135-148
- Machado, F.B., Faria, M.A., Lovatel, V.L., Alves Da Silva, A.F., Radic, C.P., De Brasi, C.D., Rios, A.F., De Sousa Lopes, S.M., Da Silveira, L.S., Ruiz-Miranda, C.R., Ramos, E.S. e Medina-Acosta, E. 2014. 5meCpG epigenetic marks neighboring a primate-conserved core promoter short tandem repeat indicate X-chromosome inactivation. *PLoS One*, v.9, p.e103714
- Malini, S.S. e Ramachandra, N.B. 2006. Influence of advanced age of maternal grandmothers on Down syndrome. *BMC Med Genet*, v.7, p.4
- Mancini-Dinardo, D., Steele, S.J., Ingram, R.S. e Tilghman, S.M. 2003. A differentially methylated region within the gene *Kcnq1* functions as an imprinted promoter and silencer. *Hum Mol Genet*, v.12, p.283-294
- Mccormick, M.K., Schinzel, A., Petersen, M.B., Stetten, G., Driscoll, D.J., Cantu, E.S., Tranebjaerg, L., Mikkelsen, M., Watkins, P.C. e Antonarakis, S.E. 1989. Molecular genetic approach to the characterization of the "Down syndrome region" of chromosome 21. *Genomics*, v.5, p.325-331
- Mcgrath, J. e Solter, D. 1984. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, v.37, p.179-183
- Miyanari, Y. e Torres-Padilla, M.E. 2012. Control of ground-state pluripotency by allelic regulation of *Nanog*. *Nature*, v.483, p.470-473
- Moreira De Mello, J.C., De Araujo, E.S., Stabellini, R., Fraga, A.M., De Souza, J.E., Sumita, D.R., Camargo, A.A. e Pereira, L.V. 2010. Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. *PLoS One*, v.5, p.e10947
- Mostoslavsky, R., Singh, N., Tenzen, T., Goldmit, M., Gabay, C., Elizur, S., Qi, P., Reubinoff, B.E., Chess, A., Cedar, H. e Bergman, Y. 2001. Asynchronous replication and allelic exclusion in the immune system. *Nature*, v.414, p.221-225
- Mrak, R.E., Sheng, J.G. e Griffin, W.S. 1996. Correlation of astrocytic S100 beta expression with dystrophic neurites in amyloid plaques of Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, v.55, p.273-279
- Muranjan, M., Chaudhari, T. e Vundinti, B.R. 2010. Phenotypic heterogeneity and parental origin of extra chromosome 21 in Down syndrome. *Indian Pediatr*, v.47, p.429-432

- Murrell, A., Heeson, S. e Reik, W. 2004. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. *Nat Genet*, v.36, p.889-893
- Musalkova, D., Minks, J., Storkanova, G., Dvorakova, L. e Hrebicek, M. 2015. Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. *Blood Cells Mol Dis*, v.54, p.210-216
- Nag, A., Savova, V., Fung, H.L., Miron, A., Yuan, G.C., Zhang, K. e Gimelbrant, A.A. 2013. Chromatin signature of widespread monoallelic expression. *Elife*, v.2, p.e01256
- Nakabayashi, K., Trujillo, A.M., Tayama, C., Camprubi, C., Yoshida, W., Lapunzina, P., Sanchez, A., Soejima, H., Aburatani, H., Nagae, G., Ogata, T., Hata, K. e Monk, D. 2011. Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. *Hum Mol Genet*, v.20, p.3188-3197
- Netchine, I., Rossignol, S., Dufourg, M.N., Azzi, S., Rousseau, A., Perin, L., Houang, M., Steunou, V., Esteva, B., Thibaud, N., Demay, M.C., Danton, F., Petriczko, E., Bertrand, A.M., Heinrichs, C., Carel, J.C., Loeuille, G.A., Pinto, G., Jacquemont, M.L., Gicquel, C., Cabrol, S. e Le Bouc, Y. 2007. 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab*, v.92, p.3148-3154
- Nishikura, K. 2010. Functions and regulation of RNA editing by ADAR deaminases. *Annu Rev Biochem*, v.79, p.321-349
- Nizetic, D., Chen, C.L., Hong, W. e Koo, E.H. 2015. Inter-Dependent Mechanisms Behind Cognitive Dysfunction, Vascular Biology and Alzheimer's Dementia in Down Syndrome: Multi-Faceted Roles of APP. *Front Behav Neurosci*, v.9, p.299
- Ohlsson, R., Nystrom, A., Pfeifer-Ohlsson, S., Tohonen, V., Hedborg, F., Schofield, P., Flam, F. e Ekstrom, T.J. 1993. *IGF2* is parentally imprinted during human embryogenesis and in the Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet*, v.4, p.94-97
- Okada, H., Chiba, H., Hiura, H., Hamada, H., Sato, A., Utsunomiya, T., Kikuchi, H., Yoshida, H., Tanaka, A., Suyama, M. e Arima, T. 2014. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *PLoS Genet*, v.10, p.e1004868
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. e Li, E. 1999. DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, v.99, p.247-257
- Oliver, T.R., Bhise, A., Feingold, E., Tinker, S., Masse, N. e Sherman, S.L. 2009. Investigation of factors associated with paternal nondisjunction of chromosome 21. *Am J Med Genet A*, v.149A, p.1685-1690

- Ooi, S.K., Qiu, C., Bernstein, E., Li, K., Jia, D., Yang, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Lin, S.P., Allis, C.D., Cheng, X. e Bestor, T.H. 2007. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, v.448, p.714-717
- Ozaki, S., Kawahara, E., Maenaka, S., Hoang, N.V., Oyama, T., Imai, M., Oda, M. e Yano, S. 2014. Distinct allelic expression patterns of imprinted in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung. *Oncol Lett*, v.8, p.2561-2564
- Paz, N., Levanon, E.Y., Amariglio, N., Heimberger, A.B., Ram, Z., Constantini, S., Barbash, Z.S., Adamsky, K., Safran, M., Hirschberg, A., Krupsky, M., Bendov, I., Cazacu, S., Mikkelsen, T., Brodie, C., Eisenberg, E. e Rechavi, G. 2007. Altered adenosine-to-inosine RNA editing in human cancer. *Genome Res*, v.17, p.1586-1595
- Pernis, B., Chiappino, G., Kelus, A.S. e Gell, P.G. 1965. Cellular localization of immunoglobulins with different allotypic specificities in rabbit lymphoid tissues. *J Exp Med*, v.122, p.853-876
- Peters, J. 2014. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet*, v.15, p.517-530
- Proudhon, C. e Bourc'his, D. 2010. Identification and resolution of artifacts in the interpretation of imprinted gene expression. *Brief Funct Genomics*, v.9, p.374-384
- Proudhon, C., Duffie, R., Ajjan, S., Cowley, M., Iranzo, J., Carbajosa, G., Saadeh, H., Holland, M.L., Oakey, R.J., Rakyan, V.K., Schulz, R. e Bourc'his, D. 2012. Protection against de novo methylation is instrumental in maintaining parent-of-origin methylation inherited from the gametes. *Mol Cell*, v.47, p.909-920
- Purvey, S., Hanna, M., Shaib, W. e Saif, M.W. 2010. A case of Down syndrome who developed pancreatic cancer: a case report and review of literature. *Jop*, v.11, p.285-287
- Rachidi, M., Lopes, C., Charron, G., Delezoide, A.L., Paly, E., Bloch, B. e Delabar, J.M. 2005. Spatial and temporal localization during embryonic and fetal human development of the transcription factor SIM2 in brain regions altered in Down syndrome. *Int J Dev Neurosci*, v.23, p.475-484
- Rahmani, Z., Blouin, J.L., Creau-Goldberg, N., Watkins, P.C., Mattei, J.F., Poissonnier, M., Prieur, M., Chettouh, Z., Nicole, A., Aurias, A. e Et Al. 1989. Critical role of the D21S55 region on chromosome 21 in the pathogenesis of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.86, p.5958-5962
- Rainier, S., Johnson, L.A., Dobry, C.J., Ping, A.J., Grundy, P.E. e Feinberg, A.P. 1993. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*, v.362, p.747-749

- Redrup, L., Branco, M.R., Perdeaux, E.R., Krueger, C., Lewis, A., Santos, F., Nagano, T., Cobb, B.S., Fraser, P. e Reik, W. 2009. The long noncoding RNA *Kcnq1ot1* organises a lineage-specific nuclear domain for epigenetic gene silencing. *Development*, v.136, p.525-530
- Reik, W.W., J. 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature Reviews Genetics*, v.2, p.21-32
- Reinius, B. e Sandberg, R. 2015. Random monoallelic expression of autosomal genes: stochastic transcription and allele-level regulation. *Nat Rev Genet*, v.16, p.653-664
- Rouhi, A., Gagnier, L., Takei, F. e Mager, D.L. 2006. Evidence for epigenetic maintenance of *Ly49a* monoallelic gene expression. *J Immunol*, v.176, p.2991-2999
- Sado, T., Hoki, Y. e Sasaki, H. 2005. *Tsix* silences *Xist* through modification of chromatin structure. *Dev Cell*, v.9, p.159-165
- Sado, T., Wang, Z., Sasaki, H. e Li, E. 2001. Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by *Tsix*. *Development*, v.128, p.1275-1286
- Sailani, M.R., Santoni, F.A., Letourneau, A., Borel, C., Makrythanasis, P., Hibaoui, Y., Popadin, K., Bonilla, X., Guipponi, M., Gehrig, C., Vannier, A., Carre-Pigeon, F., Feki, A., Nizetic, D. e Antonarakis, S.E. 2015. DNA-Methylation Patterns in Trisomy 21 Using Cells from Monozygotic Twins. *PLoS One*, v.10, p.e0135555
- Schoenherr, C.J., Levorse, J.M. e Tilghman, S.M. 2003. CTCF maintains differential methylation at the *Igf2/H19* locus. *Nat Genet*, v.33, p.66-69
- Schofield, P.N., Joyce, J.A., Lam, W.K., Grandjean, V., Ferguson-Smith, A., Reik, W. e Maher, E.R. 2001. Genomic imprinting and cancer; new paradigms in the genetics of neoplasia. *Toxicol Lett*, v.120, p.151-160
- Schuurs-Hoeijmakers, J.H., Vulto-Van Silfhout, A.T., Vissers, L.E., Van De, V., Li, Van Bon, B.W., De Ligt, J., Gilissen, C., Hehir-Kwa, J.Y., Neveling, K., Del Rosario, M., Hira, G., Reitano, S., Vitello, A., Failla, P., Greco, D., Fichera, M., Galesi, O., Kleefstra, T., Grealley, M.T., Ockeloen, C.W., Willemsen, M.H., Bongers, E.M., Janssen, I.M., Pfundt, R., Veltman, J.A., Romano, C., Willemsen, M.A., Van Bokhoven, H., Brunner, H.G., De Vries, B.B. e De Brouwer, A.P. 2013. Identification of pathogenic gene variants in small families with intellectually disabled siblings by exome sequencing. *J Med Genet*, v.50, p.802-811
- Shapiro, L.A., Bialowas-Mcgoey, L.A. e Whitaker-Azmitia, P.M. 2010. Effects of S100B on Serotonergic Plasticity and Neuroinflammation in the Hippocampus in Down Syndrome and Alzheimer's Disease: Studies in an S100B Overexpressing Mouse Model. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, v.2010

- Sharp, A.J., Migliavacca, E., Dupre, Y., Stathaki, E., Sailani, M.R., Baumer, A., Schinzel, A., Mackay, D.J., Robinson, D.O., Cobellis, G., Cobellis, L., Brunner, H.G., Steiner, B. e Antonarakis, S.E. 2010. Methylation profiling in individuals with uniparental disomy identifies novel differentially methylated regions on chromosome 15. *Genome Res*, v.20, p.1271-1278
- Shin, J.Y., Fitzpatrick, G.V. e Higgins, M.J. 2008. Two distinct mechanisms of silencing by the KvDMR1 imprinting control region. *Embo J*, v.27, p.168-178
- Sinet, P.M., Theophile, D., Rahmani, Z., Chettouh, Z., Blouin, J.L., Prieur, M., Noel, B. e Delabar, J.M. 1994. Mapping of the Down syndrome phenotype on chromosome 21 at the molecular level. *Biomed Pharmacother*, v.48, p.247-252
- Soma, M., Fujihara, Y., Okabe, M., Ishino, F. e Kobayashi, S. 2014. Ftx is dispensable for imprinted X-chromosome inactivation in preimplantation mouse embryos. *Sci Rep*, v.4, p.5181
- Sun, B.K., Deaton, A.M. e Lee, J.T. 2006. A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Mol Cell*, v.21, p.617-628
- Sun, S., Del Rosario, B.C., Szanto, A., Ogawa, Y., Jeon, Y. e Lee, J.T. Jpx RNA activates Xist by evicting CTCF. *Cell*, v.153, p.1537-1551
- Surani, M.A., Barton, S.C. e Norris, M.L. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, v.308, p.548-550
- Szabo, P.E., Tang, S.H., Silva, F.J., Tsark, W.M. e Mann, J.R. 2004. Role of CTCF binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region. *Mol Cell Biol*, v.24, p.4791-4800
- Takagi, N. e Sasaki, M. 1975. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, v.256, p.640-642
- Takei, Y., Swietlik, M., Tanoue, A., Tsujimoto, G., Kouzarides, T. e Laskey, R. 2001. MCM3AP, a novel acetyltransferase that acetylates replication protein MCM3. *EMBO Rep*, v.2, p.119-123
- Thorvaldsen, J.L. e Bartolomei, M.S. 2007. SnapShot: imprinted gene clusters. *Cell*, v.130, p.958
- Thorvaldsen, J.L., Duran, K.L. e Bartolomei, M.S. 1998. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev*, v.12, p.3693-3702
- Tian, D., Sun, S. e Lee, J.T. 2010. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell*, v.143, p.390-403

- Ulaner, G.A., Yang, Y., Hu, J.F., Li, T., Vu, T.H. e Hoffman, A.R. 2003. CTCF binding at the insulin-like growth factor-II (IGF2)/H19 imprinting control region is insufficient to regulate IGF2/H19 expression in human tissues. *Endocrinology*, v.144, p.4420-4426
- Uyar, A. e Seli, E. 2014. The impact of assisted reproductive technologies on genomic imprinting and imprinting disorders. *Curr Opin Obstet Gynecol*, v.26, p.210-221
- Vallot, C., Huret, C., Leseque, Y., Resch, A., Oudrhiri, N., Bennaceur-Griscelli, A., Duret, L. e Rougeulle, C. 2013. XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. *Nat Genet*, v.45, p.239-241
- Van Den Berg, I.M., Laven, J.S., Stevens, M., Jonkers, I., Galjaard, R.J., Gribnau, J. e Van Doorninck, J.H. 2009. X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos. *Am J Hum Genet*, v.84, p.771-779
- Vilardi, F., Lorenz, H. e Dobberstein, B. 2011. WRB is the receptor for TRC40/Asna1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *J Cell Sci*, v.124, p.1301-1307
- Vranekovic, J., Bozovic, I.B., Grubic, Z., Wagner, J., Pavlinic, D., Dahoun, S., Bena, F., Culic, V. e Brajenovic-Milic, B. 2012. Down syndrome: parental origin, recombination, and maternal age. *Genet Test Mol Biomarkers*, v.16, p.70-73
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Peng, W., Zhang, M.Q. e Zhao, K. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet*, v.40, p.897-903
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M.B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M. e Schubeler, D. 2007. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*, v.39, p.457-466
- Williamson, C.M., Turner, M.D., Ball, S.T., Nottingham, W.T., Glenister, P., Fray, M., Tymowska-Lalanne, Z., Plagge, A., Powles-Glover, N., Kelsey, G., Maconochie, M. e Peters, J. 2006. Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the Gnas cluster. *Nat Genet*, v.38, p.350-355
- 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.R75-83
- Yamada, Y., Watanabe, H., Miura, F., Soejima, H., Uchiyama, M., Iwasaka, T., Mukai, T., Sakaki, Y. e Ito, T. 2004. A comprehensive analysis of allelic methylation status of CpG islands on human chromosome 21q. *Genome Res*, v.14, p.247-266

- Yang, Q., Rasmussen, S.A. e Friedman, J.M. 2002. Mortality associated with Down's syndrome in the USA from 1983 to 1997: a population-based study. *Lancet*, v.359, p.1019-1025
- Young, J.M., Friedman, C., Williams, E.M., Ross, J.A., Tonnes-Priddy, L. e Trask, B.J. 2002. Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. *Hum Mol Genet*, v.11, p.535-546
- Zhao, R., Decoteau, J.F., Geyer, C.R., Gao, M., Cui, H. e Casson, A.G. 2009. Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II (IGF2) gene in esophageal normal and adenocarcinoma tissues. *Carcinogenesis*, v.30, p.2117-2122
- Zwemer, L.M., Zak, A., Thompson, B.R., Kirby, A., Daly, M.J., Chess, A. e Gimelbrant, A.A. 2012. Autosomal monoallelic expression in the mouse. *Genome Biol*, v.13, p.R10

Web Sites

OMIM #158810

<http://omim.org/entry/158810?search=OMIM%20%23158810&highlight=omim%20158810>, acessado em maio de 2015.

OMIM #180860

<http://www.omim.org/entry/180860>, acessado em maio de 2015.

OMIM #130650

<http://www.omim.org/entry/194070?search=OMIM%20%23130650&highlight=omim%20130650>, acessado em maio de 2015.

OMIM #176270

<http://www.omim.org/entry/176270?search=prader%20willi&highlight=willi%20prader>, acessado em maio de 2015.

OMIM #105830

<http://www.omim.org/entry/105830?search=OMIM%20%23105830&highlight=omim%20105830>, acessado em maio de 2015.

<http://www.ensembl.org/index.html>, acessado em março de 2012.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, acessado em março de 2012.

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>, acessado em março de 2012.

<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>, acessado em março de 2012.

<http://www.genome.ucsc.edu>, acessado em março de 2012).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, acessado em março de 2012.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, acessado em março de 2012.