

**INTERROGAÇÃO PONTUAL DE MARCAS EPIGENÉTICAS  
DE METILAÇÃO EM TRÊS SISTEMAS MULTIALÉLICOS E  
DETERMINAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE VARIANTES DE  
NUCLEOTÍDEO SIMPLES NO PROMOTOR DO GENE *XIST***

**MILENA AMENDRO FARIA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO DE 2013





**INTERROGAÇÃO PONTUAL DE MARCAS EPIGENÉTICAS DE  
METILAÇÃO EM TRÊS SISTEMAS MULTIALÉLICOS E  
DETERMINAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE VARIANTES DE  
NUCLEOTÍDEO SIMPLES NO PROMOTOR DO GENE *XIST***

**MILENA AMENDRO FARIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, sob a orientação do Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
AGOSTO DE 2013

**INTERROGAÇÃO PONTUAL DE MARCAS EPIGENÉTICAS DE  
METILAÇÃO EM TRÊS SISTEMAS MULTIALÉLICOS E  
DETERMINAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE VARIANTES DE  
NUCLEOTÍDEO SIMPLES NO PROMOTOR DO GENE *XIST***

**MILENA AMENDRO FARIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, sob a orientação do Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta.

Aprovada em 12 de agosto de 2013.

Comissão Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Beatriz dos Santos Ferreira (Doutora em Biociências) - UFRJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Clara Caldas Bussiere (Doutora em Ciências)– UENF

---

Prof. Dr. Newton de Medeiros Vidal (Doutor em Biologia Celular e Molecular) UENF

---

Prof. Dr. Victor Martin Quintana Flores (Doutor em Biociências)– UENF

---

Prof. Dr. Álvaro Fabricio Lopes Rios (Doutor em Ciências Biológicas)– UENF

(Co-orientador)

---

Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta (Doutor em Parasitologia Médica e Molecular)

(Orientador)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, o maior dos cientistas, por me proporcionar a vida para vivê-la e estudá-la e por ter me dado forças para realizar mais este sonho!

Aos meus queridos pais, Helena e Ronaldo, a quem devo o fato de ser aquilo que sou hoje, pelo apoio, carinho e educação.

À minha irmã, Raquel que é, também, uma grande amiga, e por estar sempre presente acompanhando e torcendo por mim!

Agradeço também às minhas tias Lídia e Cláudia por todo incentivo.

Ao Marcel, meu melhor amigo e meu namorado que alegra os meus dias e de alguma forma está comigo mesmo quando distante. Obrigada por toda ajuda e pelo carinho!

Em especial, agradeço ao Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta, pela paciência, pelo exemplo de sabedoria na tomada de decisões e pela confiança que em mim foi depositada. Agradeço também pela oportunidade que me foi dada.

Ao Prof. Dr. Álvaro Fabricio Lopes Rios, por desde o início acreditar na minha capacidade e por todo o conhecimento que me foi passado.

Aos colegas de Laboratório Antônio, Fabricio, Graziela, Katrine, Maria, Thais, Thiago, Viviane pela amizade e por terem me aceitado de braços abertos no grupo. Obrigada por toda a parceria durante a aprendizagem e o trabalho. Tenho um carinho muito especial por cada um de vocês!

À Laís e Sâmella por serem minhas grandes amigas, que escutaram todas as minhas frustrações e alegrias.

Ao meu amigo Vinícius por toda a preocupação, amizade e por nunca se esquecer de mim.

Ao Hospital Álvaro Alvin e ao Laboratório de Biotecnologia e Biotecnologia por me permitirem realizar minha pesquisa e a todos os professores, técnicos e alunos pela colaboração e disponibilidade.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz dos Santos Ferreira por aceitar o convite para ser minha revisora e por ter dedicado o seu tempo na leitura minuciosa deste manuscrito.

À Banca Examinadora por aceitarem o meu convite e dedicarem o seu tempo na avaliação crítica desse trabalho.

À UENF e FAPERJ pela infra-estrutura e auxílio.

*“Deste ponto de vista distante, a Terra não parece ter nenhum interesse particular.  
Mas, para nós, é diferente. Nele, todos os que você ama, todos os que você  
conhece, todos de quem você já ouviu falar, todo ser humano que já existiu, viveram  
suas vidas. O somatório da nossa alegria e do sofrimento, cada uma das inúmeras  
religiões, ideologias e doutrinas econômicas, santos e pecadores na história da  
nossa espécie moraram aqui – num grão de poeira suspenso num raio de sol. (...)  
Para mim, isso ressalta a nossa responsabilidade de nos relacionarmos mais  
bondosamente uns com os outros e de preservarmos e amarmos o pálido ponto azul,  
o único lar que já conheci.”  
(O pálido ponto azul - Carl Sagan)*

*“Milagres acontecem quando a gente vai à luta”  
(O Teatro Mágico)*

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de transcrição do Xic.....	19
Figura 2. Sequência de eventos associados com o processo de inativação do cromossomo X. ....	20
Figura 3. Processo de ICX regulado por <i>XIST</i> . ....	22
Figura 4. Representação esquemática da região de dois domínios da proteína CTCF.....	24
Figura 5. Ensaio de restrição com <i>Hpa</i> II no loco <i>AR</i> .....	30
Figura 6. Ideograma do Cromossomo X humano.....	31
Figura 7. Informações para a interpretação de um eletroferograma. ....	43
Figura 8. Fórmula estatística empregada para calcular a proporção de ICX entre os alelos.....	44
Figura 9. Distribuição das razões de inativação do cromossomo X para o marcador do gene <i>AR</i> . ....	45
Figura 10. Distribuição das razões de inativação do cromossomo X para o marcador do gene <i>SRPX</i> .....	46
Figura 11. Distribuição das razões de inativação do cromossomo X para o marcador do gene <i>RP2</i> . ....	46
Figura 12. Proporção dos padrões de ICX para os marcadores <i>AR</i> , <i>SRPX</i> e <i>RP2</i> ...47	
Figura 13. Eletroforese capilar, digerido pela enzima <i>Hpa</i> II e amplificação por PCR para os marcadores <i>AR</i> , <i>SRPX</i> e <i>RP2</i> .....	48
Figura 14. Eletroferograma representativo do núcleo familiar 238 para o ensaio triplex.....	51
Figura 15. Alinhamento da região promotora do gene <i>XIST</i> . ....	52
Figura 16. Sequência da região promotora do gene <i>XIST</i> . ....	53
Figura 17. Sequência da região promotora do gene <i>XIST</i> . ....	53
Figura 18. Eletroforese representativa do perfil alélico para os marcadores rs187705242 e a rs183361548, utilizando a técnica de SNaPshot. ....	54
Figura 19. Taxas de heterozigose para os marcadores <i>AR</i> , <i>SRPX</i> e <i>RP2</i> .....	54
Figura 20. Distribuição da informatividade para os marcadores <i>AR</i> , <i>SRPX</i> e <i>RP2</i> ...55	



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores do ensaio Triplex.....	41
Tabela 2. Iniciadores do SNaPshot.....	42
Tabela 3. Padrão de herança transgeracional do cromossomo X.....	49
Tabela 4. Frequência de idade das Mães e Filhas.....	50
Tabela 5. Frequência alélica dos marcadores AR, SRPX e RP2.....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AR - do inglês *Androgen Receptor* (Receptor de Andrógeno)
- CTCF - do inglês *CCCTC-binding Factor* (Fator de Ligação CCCTC)
- CpGs - Citosina-fosfato-Guanina
- DMD - Distrofia muscular de Duchenne
- DNMTs - DNA metiltransferases
- EDTA - do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etileno diaminotetracético)
- GAP - GTPase
- GAPDH - do inglês *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (Gene da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase)
- G6PD - do inglês *Glucose-6-phosphate dehydrogenase* (Glicose-6-fosfato desidrogenase)
- H3 - histona H3
- HpaII* - Enzima de restrição sensível à metilação
- HpaII*- - sem digestão com *HpaII*
- HpaII*+ - digestão com *HpaII*
- ICX - Inativação do cromossomo X
- kb - kilobase
- ncRNA - do inglês *non-coding RNA* (RNA não codificador de proteína)
- pb - Pares de bases
- PAR – do inglês *pseudoautosomal region* (Região pseudo-autossômica)
- PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da Polimerase)
- RP2* - do inglês *retinitis pigmentosa* (Gene da retinite pigmentosa 2)
- SNPs - do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de nucleotídeo único)
- SNV - do inglês *single nucleotide variant* (Variante de nucleotídeo simples)
- SRPX* - do inglês *Sushi repeat-containing protein*
- STR - do inglês *short tandem repeats* (Sequências curtas repetidas em tandem)
- TSIX* - Gene antisentido ao *XIST*
- Xa - Cromossomo X ativo
- Xi - Cromossomo X inativo
- Xic - do inglês *X-inactivation center* (Centro de inativação do cromossomo X)

*XIST* - do inglês *X inactivation specific transcript*

XLRP - do inglês *X-linked retinitis pigmentosa* (retinite pigmentar ligada ao cromossomo X)

Xm - Cromossomo X materno

XmI - Cromossomo X materno inativo

Xp - Cromossomo X paterno

XpI - Cromossomo X paterno inativo

# SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. O cromossomo X	16
1.2. Inativação do cromossomo X	16
1.3. Marco histórico sobre o conceito da Inativação do cromossomo X	18
1.4. Mecanismo de Inativação do cromossomo X	19
1.5. Relação entre a Proteína CTCF e a inativação do cromossomo X	23
1.6. Inativação aleatória ou preferencial	26
1.8. Marcas epigenéticas e a inativação do cromossomo X	28
1.9. Métodos de detecção do estado de metilação e de ativação do cromossomo X	29
1.10. O uso dos marcadores microssatélites para o estudo de inativação do cromossomo X	32
1.11. O gene <i>AR</i>	33
1.12. O gene <i>SRPX</i>	35
1.13. O gene <i>RP2</i>	36
2. OBJETIVOS	39
3. METODOLOGIA	40
3.1. Sujeitos da pesquisa	40
3.2. Aspectos éticos da pesquisa	40
3.3. Material biológico	40
3.4. Extração de DNA	40
3.5. Quantificação do DNA genômico	41
3.6. Digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa de fluorescência - DESM-QFPCR	41
3.7. Sequenciamento de nucleotídeo único – SNaPshot	42
3.8. Eletroforese capilar	42
3.9. Frequências alélicas e dados populacionais	43
3.10. Quantificação das proporções de inativação	43
4. RESULTADOS	45
4.1. Padrões de Inativação do Cromossomo X	45
4.2. Padrão de herança transgeracional da inativação do cromossomo X	48

4.3. Relação entre a idade das mulheres e os padrões de inativação do cromossomo X	49
4.4. Expansão alélica do marcador <i>SRPX</i>	50
4.5. Análise <i>in silico</i> da conservação evolutiva do sítio CTCF	51
4.6. Variantes de nucleotídeo simples na região promotora do gene <i>XIST</i>	52
4.7. Dados populacionais	54
4.7.1. Taxas de heterozigose dos marcadores	54
4.7.2. Frequências alélicas para os marcadores <i>AR</i> , <i>SRPX</i> , <i>RP2</i>	55
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	61
7. REFERÊNCIAS	62
8. APÊNDICES	75

## RESUMO

A inativação do cromossomo X (ICX) consiste no silenciamento gênico de um dos dois cromossomos X presentes em células somáticas de mamíferos fêmeas. O processo de ICX garante a compensação de dose dos produtos gênicos do cromossomo X em relação aos autossomos entre fêmeas e machos. A ICX é um processo epigenético natural. A metilação em resíduos citosina no contexto da sequência CpG é uma das principais marcas epigenéticas. A ICX pode ocorrer de duas maneiras: aleatória, na qual a escolha do cromossomo X inativado se dá ao acaso (X paterno e X materno possuem 50% de chances de serem inativados); ou de maneira preferencial onde um dos cromossomos X é inativado com maior frequência que seu par. A dosagem de genes ligados ao cromossomo X em homens, mulheres e indivíduos com aneuploidias do X e translocações autossômicas no X tem demonstrado que 15-20% dos genes localizados em cromossomos X inativos escapam da inativação. Em fêmeas heterozigotas, várias doenças recessivas ligadas ao cromossomo X estão associadas à inativação preferencial (não aleatória) do X. Mutações no promotor do gene *XIST* têm sido associadas à inativação preferencial. Considerando que o processo de ICX é um evento epigenético, podendo ser também influenciado por fatores ambientais, é possível que a inativação varie entre diferentes populações. Este estudo visou determinar os perfis pontuais de metilação em três *loci* polimórficos do cromossomo X: *AR* (receptor de andrógeno; *loco* do microssatélite (CAG)<sub>n</sub>), *SRPX* (do inglês *sushi-repeat containing protein*; (CTG)<sub>n</sub>) e *RP2* (retinite pigmentosa 2; (GAAA)<sub>n</sub>) e as frequências das variantes de nucleotídeo simples (SNV) rs187705242 (-43 C>G/A) e rs183361548 (-6 C>T) na região promotora do gene *XIST* em uma amostra populacional da região do Norte do Estado do Rio de Janeiro, composta de 70 binômios mães e filhas. Os perfis pontuais de metilação foram determinados por Digestão Enzimática Sensível à Metilação associada à PCR quantitativa fluorescente (DESM-QFPCR). As SNV foram interrogadas por SNaPshot. As taxas de heterozigose em mães e filhas para os *loci* *AR*, *SRPX* e *RP2* foram 0,84/0,87, 0,37/0,34 e 0,90/0,81, respectivamente. O padrão de ICX aleatório foi encontrado em 68%, 69% e 76% das mulheres, respectivamente, para os marcadores *AR*, *SRPX* e *RP2*; porém, 29%, 27% e 20% das mulheres exibiram um padrão de inativação levemente preferencial para os marcadores *AR*, *SRPX* e *RP2*, respectivamente. O padrão de inativação altamente preferencial foi observado em 3%, 4% e 4% das amostras para os marcadores *AR*, *SRPX* e *RP2*, respectivamente. O padrão de ICX se mostrou de forma semelhante em todas as faixas etárias. A herança transgeracional do X inativo ocorreu independentemente da sua origem parental. Para as SNV rs187705242 (-43 C>G/A) e rs183361548 (-6 C>T) todas as mulheres testadas apresentaram o alelo ancestral C, sem ocorrência de alelos variantes associados com inativação preferencial (G, A ou T).

**Palavras-chave:** *AR*, HUMARA, Metilação, *RP2*, *SRPX*, SNV, *XIST*.

## ABSTRACT

X chromosome inactivation (XCI) consists in the gene silencing of one of the two X chromosomes present in somatic cells of female mammals. The process of XCI ensures compensation of dosage of gene products of X chromosome in relation to the autosomes between females and males. XCI is a natural epigenetic process. The methylation at cytosine residues in the context of the CpG sequence is one of the main epigenetic marks. XCI can occur in two ways: random, in which the choice of the inactivated X chromosome occurs randomly (paternal and maternal X have a 50% chance of being inactivated) or the preferential (skewed) manner in which one X chromosome is inactivated more frequency that its homologue pair. The dosage of genes linked to the X chromosome in men, women and individuals with aneuploidies of the X and autosomal translocations in X has shown that 15-20% of genes located on inactive X chromosomes do escape inactivation. In heterozygous females several recessive diseases linked to the X chromosome are associated with preferential inactivation (not random) of X. Mutations in the promoter of the *XIST* gene have been associated with preferential inactivation. Considering that XCI is an epigenetic event, likely being affected by environmental factors, it is possible that inactivation varies between different populations. This study was aimed at determining the specific methylation profiles at single nucleotide basis in three polymorphic loci on chromosome X: *AR* (androgen receptor; locus microsatellite (CAG)<sub>n</sub>), *SRPX* (sushi-repeat containing protein; (CTG)<sub>n</sub>) and *RP2* (retinitis pigmentosa 2, (GAAA)<sub>n</sub>) and the frequencies of the Single Nucleotide Variants (SNV) rs187705242 (-43 C>G/A) and rs183361548 (-6 C>T) in the promoter region of the *XIST* gene in a population of the Northern region of State of Rio de Janeiro, composed of 70 mothers and daughters pairs. The methylation profiles were determined by restriction enzyme digestion sensitive to methylation associated to quantitative fluorescence PCR (DESM-QFPCR). The SNV were interrogated by SNaPshot. Rates of heterozygosity in mothers and daughters for the *AR*, *SRPX* and *RP2* loci were 0,84/0,87, 0,37/0,34 and 0,90/0,81, respectively. The ICX random pattern was found in 68%, 69% and 76% of women, respectively, for the markers *AR*, *SRPX* and *RP2*, however, 29%, 27% and 20% of women exhibited a pattern of preferential inactivation slightly markers *AR*, *SRPX* and *RP2*, respectively. The highly preferred inactivation pattern was observed in 3%, 4% and 4% of the samples for the markers *AR*, *SRPX* and *RP2*, respectively. The pattern of XCI proved similarly in all age groups. The transgenerational inheritance of the inactive X chromosome occurred independently of its parental origin. For the rs187705242 (-43 C> G/A) and rs183361548 (-6 C>T) SNV all tested women carry the ancestral C allele, without the occurrence of variant alleles associated with preferential inactivation (G, A or T).

**Keywords:** *AR*, HUMARA, methylation, *RP2*, *SRPX*, SNV, *XIST*.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. O cromossomo X

Aproximadamente 155 megabases (Mb) compõem o cromossomo X humano. O conteúdo de G+C (39%) é mais baixo que a média do genoma humano (41%). Foram anotados 2000 genes, uma das mais baixas densidades gênicas comparada a outros cromossomos. O comprimento médio de um gene no cromossomo X é de 49 kilobases (Kb). Contudo, o cromossomo X possui o maior gene conhecido do genoma humano, o da distrofina localizado em Xp21.1, que se expande por 2.220.223 pb (Ross *et al.*, 2005).

A composição dos cromossomos humanos difere entre homens e mulheres, as mulheres possuem dois cromossomos X e os homens, um cromossomo X e um cromossomo Y. O cromossomo X contém cerca de 2000 genes em comparação com o cromossomo Y contendo 78 genes, dos estimados 20.000 a 25.000 totais genes no genoma humano. Somente 1,7% dos genes localizados no cromossomo X codificam proteínas sendo o restante formado por sequências não codificadoras (íntrons, pseudogenes e ncRNA). São conhecidos 208 fenótipos com base molecular conhecida que apresentam padrão de herança ligado ao cromossomo X (Ross *et al.*, 2005; Pontier e Gribnau, 2012).

O cromossomo X possui muitas características que são únicas no genoma humano. Mulheres herdaram um cromossomo X de cada um dos pais, enquanto os homens herdaram somente o cromossomo X materno. Foram anotados 54 genes no cromossomo X que possuem homólogos funcionais no Y. Embora o cromossomo X contenha somente 4% de todos os genes humanos, quase 10% das doenças com padrão de herança mendeliana têm sido atribuídas ao cromossomo X (Ross *et al.*, 2005).

## 1.2. Inativação do cromossomo X

A inativação do cromossomo X é um mecanismo epigenético de compensação de dose que ocorre no início da embriogênese de mamíferos placentários e marsupiais, cujo efeito é a manutenção da dosagem gênica equivalente entre indivíduos com cariótipo XX e XY (Harper, 2011).



A fim de equilibrar a dosagem gênica ligada ao X entre os sexos, um cromossomo X sofre inativação durante o desenvolvimento de embriões do sexo feminino (Yan e Mccarrey, 2009). Este processo tem sido chamado de inativação do cromossomo X, proposto por Mary Lyon há 52 anos (Lyon, 1961). Em organismos com determinação sexual cromossômica, há um desequilíbrio de produtos gênicos entre os sexos, o que constituiu uma pressão seletiva para um mecanismo de compensação de dosagem (Payer e Lee, 2008).

Embora a maioria dos genes presentes no cromossomo X inativo (Xi) esteja transcricionalmente silenciada, a ICX é heterogênea, não se estendendo por todo o cromossomo (Carrel e Willard, 2005). Há um subconjunto de genes que escapam do silenciamento por inativação e continuam a ser expressos em ambos os cromossomos X (Cooper *et al.*, 1971; Carrel e Willard, 2005; Cooper, 2011; Migeon, 2011). Esses genes estão em uma região pseudo-autossômica (PAR), ou seja, uma região do cromossomo X que é homóloga ao Y e responsável pelo emparelhamento de XY durante a meiose (Ellegren, 2011).

Estima-se que durante a ICX 15-20% dos genes ligados ao Xi escapam completamente da inativação, e outros 10% escapam parcialmente, o que gera o perfil bialélico de expressão para genes ligados ao X em mulheres (Anderson e Brown, 1999; Carrel e Willard, 2005; Pontier e Gribnau, 2012). Entretanto, alguns genes que escapam não apresentam cópias, o que pode ser explicado por perda ou diferenciação. A expressão aumentada desses genes pode ser necessária para definir traços fenotípicos que diferem os sexos (Berletch *et al.*, 2011). Esta variação na expressão de genes entre as fêmeas pode explicar a variação fenotípica entre as portadoras de desordens ligadas ao X (Lyon, 2005).

Em camundongos, o fenótipo das fêmeas aneuplóides não é facilmente observado, pois a porcentagem de genes que escapam à ICX é bem menor do que aquela observada em humanos. Assim, as fêmeas murinas com monossomia do cromossomo X apresentam um fenótipo praticamente normal quando comparado às inúmeras características apresentadas pelas mulheres que possuem a síndrome de Turner (anomalia cromossômica cuja origem é a perda parcial ou total de um cromossomo X). Da mesma maneira, os produtos transcricionais dos genes que escapam à ICX devem ter papel nos fenótipos encontrados em indivíduos com a síndrome de Klinefelter (Disteche, 1999; Tsuchiya e Willard, 2000).

### 1.3. Marco histórico sobre o conceito da Inativação do cromossomo X

Desde o final da década de 40, já se sabia que o núcleo das células de fêmeas e machos de mamíferos apresentava uma alteração morfológica que poderia ser considerada uma espécie de dimorfismo sexual. É possível observar no núcleo da célula feminina um corpúsculo periférico que tem a propriedade de se corar mais fortemente, este recebeu, posteriormente, o nome de corpúsculo de Barr, a cromatina sexual (Barr e Bertram, 1949).

Dez anos depois, o grupo de Susumu Ohno publicou dois trabalhos reportando que cada cromossomo X das fêmeas apresentava um comportamento distinto. Foi observado que, nas fêmeas, um dos cromossomos sexuais se comportava como os autossomos, entretanto, o outro se apresentava sempre mais condensado e com propriedades heterocromáticas. Os autores relacionaram o X heterocromático com a cromatina sexual que havia recentemente sido descrita por Barr e Bertram (Ohno *et al.*, 1959; Ohno e Hauschka, 1960).

No ano seguinte, a pesquisadora Mary Francis Lyon publicou um trabalho no qual associava a cromatina sexual com o Xi. Através da observação fenotípica da cor da pelagem de camundongos (uma característica ligada ao X), Lyon sugeriu que, em diferentes células somáticas de um mesmo organismo, a cromatina sexual pode ser tanto o cromossomo X herdado da mãe, como o do pai. Ela salientou ainda que a cromatina sexual é o cromossomo X geneticamente inativo (Lyon, 1961).

A ICX é um complexo exemplo de modificação e regulação epigenética que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, e que pode ser estudada *in vitro* durante a diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongos (Payer e Lee, 2008).

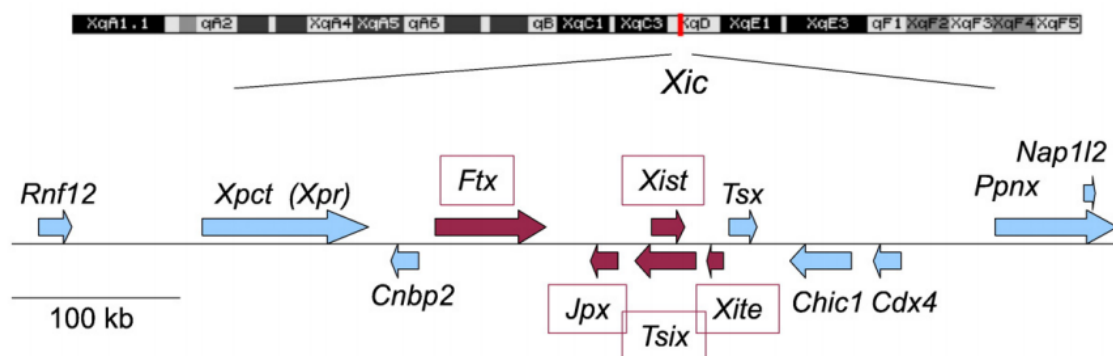
Inicialmente o processo de ICX é casual, ou seja, cada cromossomo X possui 50% de chance de estar inativado em qualquer célula analisada. Em humanos, a primeira constatação de que a ICX ocorre de maneira aleatória foi publicada apenas alguns meses depois do trabalho de Mary Lyon. Ao avaliarem o sangue de mulheres heterozigotas para a deficiência da enzima G6PD (transcrita por um gene presente no cromossomo X), os pesquisadores perceberam que existiam duas populações de células: uma população com atividade normal dessa proteína e outra sem atividade. Os autores propuseram que, por algum período no desenvolvimento, ocorre um

processo aleatório de distribuição de células com atividade do Xp ou Xm, tornando as mulheres, assim, um mosaico em relação à ICX (Beutler *et al.*, 1962).

No mesmo ano, Lyon publicou um extenso trabalho no qual descreveu diversos exemplos fenotípicos derivados do padrão aleatório de ICX, observado em fêmeas de camundongos, gatos e humanos (Lyon, 1962).

#### 1.4. Mecanismo de Inativação do cromossomo X

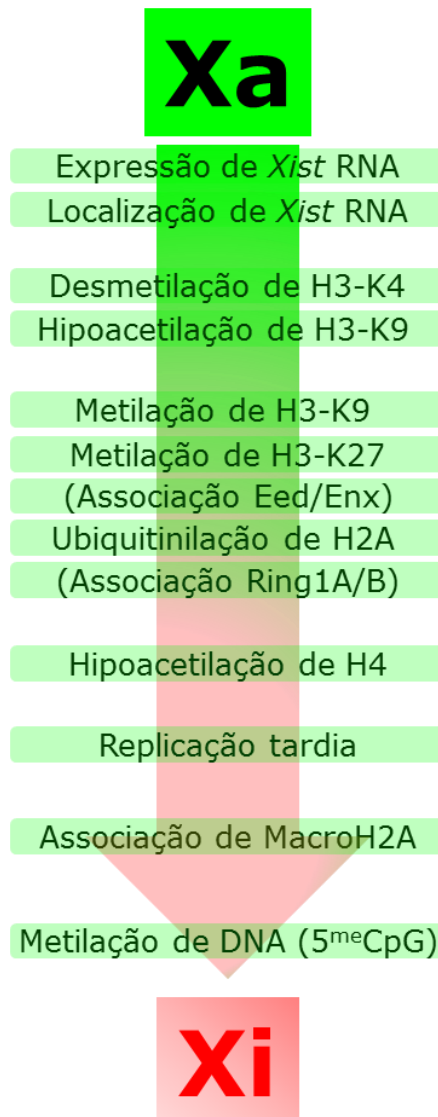
Os primeiros eventos da ICX estão sob o controle de uma “chave reguladora”, o centro de inativação do cromossomo X (Xic) que apresenta vários elementos regulatórios e está localizado na porção Xq13.2 em humanos, como demonstrado na figura 1 (Rastan e Cattanach, 1983; Brown *et al.*, 1991; Avner e Heard, 2001; Heard e Disteche, 2006; Migeon, 2006; Clerc e Avner, 2011).



**Figura 1. Mapa de transcrição do Xic.** No mapa de transcrição do Xic no cromossomo X estão evidenciados em vermelho os genes ncRNA e os genes codificadores de proteínas são mostrados em azul (adaptada de Clerc *et al.*, 2011).

Antes de se estabelecer a inativação, em cada célula do embrião, ocorre uma íntima interação entre os Xic homólogos (Bacher *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). O início do silenciamento depende da expressão, durante a embriogênese, de um gene localizado dentro da região do Xic, o *XIST* (*X inactivation specific transcript*) (Ballabio e Willard, 1992; Penny *et al.*, 1996; Baumann e De La Fuente, 2009; Migeon, 2011). O gene *XIST* é expresso unicamente no cromossomo X inativo sendo composto de 17 Kb. Seu transcrito não codifica nenhuma proteína e atua como ncRNA (molécula de RNA que não é traduzida em proteína) possuindo várias sequências repetitivas em tandem, a maioria localizada na extremidade 5' do gene, que se mostraram conservadas evolutivamente. O transcrito do gene *XIST* é capaz de desencadear uma série de eventos epigenéticos que levam ao silenciamento do

cromossomo X, incluindo a metilação, desmetilação, ubiquitinação e hipoacetilação do DNA e das histonas (Figura 2) (Brockdorff *et al.*, 1992; Migeon, 2011; Tattermusch e Brockdorff, 2011; Fang *et al.*, 2012).



**Figura 2. Sequência de eventos associados com o processo de inativação do cromossomo X.** Ilustração do processo de inativação do X desencadeada pela expressão do gene *XIST* no centro de inativação do X (*Xic*) no cromossomo X que será inativado. (adaptada de Fang *et al.*, 2012).

Recentemente, Jiang *et al.* (2013) fizeram outra descoberta importante sobre os mecanismos de ação do *XIST*. Utilizando o conceito de que o desequilíbrio gênico de um cromossomo extra pode ser corrigido por meio da manipulação do gene *XIST*, eles inseriram o cDNA do gene *XIST* no cromossomo 21 extra em

células estaminais pluripotentes de um paciente portador da síndrome de Down (síndrome caracterizada pela trissomia do cromossomo 21). Isto desencadeou modificações estáveis em todo o cromossomo 21 extra fazendo com que os transcritos do *XIST* cobrissem o cromossomo 21 extra e causando o seu silenciamento (Jiang *et al.*, 2013)

Outro gene importante nesse processo é o *TSIX*, o qual produz um RNA antisentido para o *XIST*, também na região *Xic*, que atua principalmente para preservar a integridade e ativação do cromossomo X que escapa da inativação, reprimindo a expressão de *XIST* (Chao *et al.*, 2002). Este papel crucial do antisentido *TSIX* a partir do promotor de *XIST* foi confirmado por Ohhata *et al.* em 2008.

O *TSIX* é expresso em células não diferenciadas antes da inativação e se opõe à expressão do *XIST* em cis, inibindo fisicamente a transcrição do *XIST* pela interferência no recrutamento de RNA polimerase (Heard *et al.*, 2001; Luikenhuis *et al.*, 2001; Stavropoulos *et al.*, 2001; Ogawa e Lee, 2003).

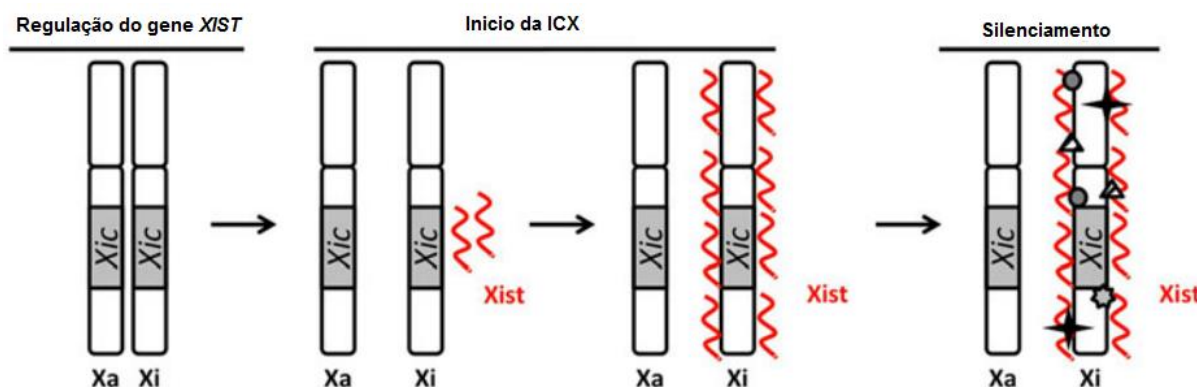
O complexo mecanismo epigenético da ICX pode ser geneticamente dividido em cinco etapas sequenciais: contagem, escolha, início do silenciamento, estabelecimento e manutenção. Todas, com exceção da etapa de manutenção, parecem ser controladas pelo *Xic* (Heard *et al.*, 1999; Kaare *et al.*, 2008).

No início da inativação aleatória do cromossomo X, o número de cromossomos X relativos ao número de autossomos é contado, permitindo que um X permaneça ativo por conjunto de cromossomos diploides (Heard e Disteché, 2006). Evidências genéticas apontam a região 3' do gene *XIST* para este papel (Clerc e Avner, 1998; Avner e Heard, 2001; Clerc e Avner, 2006).

Sequências dentro de *XIST* e *TSIX* têm sido propostas como reguladoras do evento de escolha, onde somente um cromossomo X é selecionado para escapar do processo de silenciamento (Boumil e Lee, 2001; Clerc e Avner, 2006). Alguns estudos atribuem à região rica em CpG localizada 5' de *TSIX* (*locus* DPXas34) a responsabilidade pela escolha (Courtier *et al.*, 1995). Tal região, quando não metilada, apresenta-se acessível à ligação da proteína isoladora denominada CTCF (CCCTC-binding factor), que funciona como uma barreira física, impedindo a expressão de *XIST* e, conseqüentemente, promovendo a expressão de *TSIX* no Xa (Chao *et al.*, 2002; Boumil *et al.*, 2006). Um estudo envolvendo o mecanismo de

ação de *XIST* e *TSIX* sugeriu que o balanço dos transcritos sentido e antissentido é importante para definição de qual cromossomo X seria inativado nas células com dois cromossomos X (Ohhata *et al.*, 2008). Este mecanismo de balanço sugere a participação de RNAs dupla fita e do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) (Senner e Brockdorff, 2009).

Uma vez que a escolha tenha sido feita, a expressão de um longo RNA *XIST* é aumentada no cromossomo X a ser inativado (Chow *et al.*, 2005). Moléculas de *XIST*, então, se acumulam sobre o cromossomo e inicia-se o silenciamento. No entanto, o início do silenciamento pelo *XIST* é restrito aos estágios iniciais da diferenciação. Inicialmente, o silenciamento gênico é reversível e dependente de *XIST*, no entanto, em estágios mais tardios da diferenciação, a inativação do cromossomo X torna-se independente de *XIST* e irreversível (Csankovszki *et al.*, 1999). Portanto, *XIST* é crucial para iniciar o silenciamento, mas tem um papel menor na manutenção do Xi (Figura 3).



**Figura 3. Processo de ICX regulado por *XIST*.** Ilustração do processo de inativação do X regulada por *XIST* (vermelho) do centro de inativação do X (*Xic*) no Xi. Posteriormente, o RNA *XIST* cobre todo o cromossomo Xi em cis facilitando assim o silenciamento gênico através do recrutamento de fatores repressivos (estrelas, triângulos, círculos) que modificam a estrutura da cromatina. (adaptada de Tattermusch *et al.*, 2011).

O início da inativação coincide com a presença de altos níveis de *XIST* no Xi e a expressão de *TSIX* no Xa. Sendo assim, foi estabelecida uma relação entre o início do silenciamento e o acúmulo de RNA *XIST* ao longo do cromossomo X (Boumil e Lee, 2001).

Em 1992, Brockdorff *et al.* propuseram um modelo para propagação da inativação envolvendo o transcrito RNA *XIST* (RNA funcional). Nele o RNA funcional

interage com o cromossomo X de onde o *XIST* é transcrito, possivelmente em associação com proteínas utilizadas na formação de heterocromatina e induzem em *cis* o espalhamento da cromatina inativada.

Para estabelecer o silenciamento é necessária uma região repetitiva conservada, localizada na extremidade 5' do transcrito. A associação do RNA *XIST* com a cromatina é mediada por outras sequências, que são funcionalmente redundantes e espalhadas ao longo do transcrito restante (Heard, 2004).

A presença de *XIST* parece não ser necessária para a manutenção do processo de inativação (Brown e Willard, 1994). Uma vez que o cromossomo X é silenciado, ele é mantido neste estado nas células somáticas durante toda a vida do organismo de maneira estável, mesmo após as sucessivas mitoses. O cromossomo X em que a deleção de *XIST* ocorre posteriormente ao início do período de desenvolvimento permanece inativado (Rack *et al.*, 1994). Em parte, a manutenção da inativação é mediada pela metilação das ilhas CpG da região promotora dos genes. O *locus TSIX* seria o principal responsável pela manutenção do X ativo por competir com o *locus XIST* (Chao *et al.*, 2002).

Autores sugerem que *TSIX* silenciaria *XIST* por meio de modificação da estrutura da cromatina, particularmente a região promotora de *XIST* (Csankovszki *et al.*, 2001; Jenuwein e Allis, 2001; Ohhata *et al.*, 2008; Csankovszki, 2009; Cooper, 2011).

Células que sofreram ICX são caracterizadas por apresentar modificação de histonas na região promotora de *XIST*. Navarro *et al.* (2006) demonstraram a existência de um alto nível de dimetilação de H3K4 no X inativado, mas não observaram nenhum envolvimento direto da trimetilação diferencial em H3K9 ou H3K27 na expressão assimétrica de *XIST*.

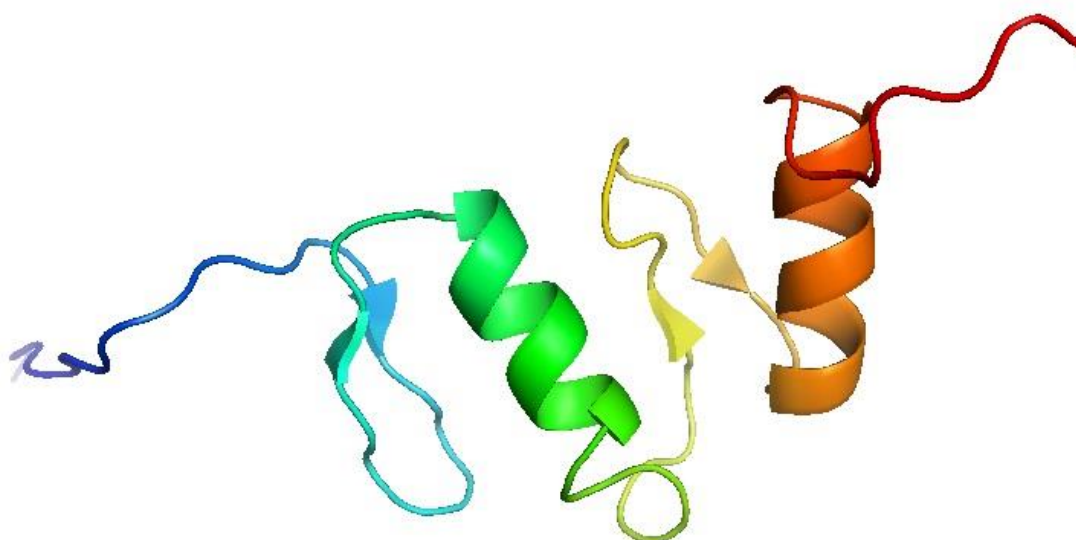
Em humanos a inativação *cis* ocorre durante a fase de blastocisto (segunda semana após a fertilização) quando o embrião é composto de uma massa de células que dará origem aos três folhetos embrionários (Migeon e Kennedy, 1975; Heard *et al.*, 2001; Migeon, 2007).

### **1.5. Relação entre a Proteína CTCF e a inativação do cromossomo X**

O gene *CTCF* humano está localizado na região cromossômica 16q22.1 e supõe-se que ele codifique um supressor tumoral, uma vez que essa região

encontra-se frequentemente ausente em tumores de mama e de próstata (Filippova *et al.*, 1998).

A proteína CTCF é altamente conservada em mamíferos e é expressa ubiquamente nos tecidos, exceto nos espermatozóides primários. Conforme está ilustrado na figura 4, a proteína CTCF pode ser dividida em três regiões distintas: (1) uma porção N-terminal, (2) um domínio central de ligação ao DNA, composto por onze dedos-de-zinco, e (3) uma região C-terminal. Por meio do uso combinatório de suas onze regiões dedos-de-zinco, CTCF pode se ligar a sequências bastante variáveis no DNA e estima-se que 27 de seus sítios-alvo possuam cerca de 11 a 15pb (Filippova *et al.*, 1996; Phillips e Corces, 2009).



**Figura 4. Representação esquemática da região de dois domínios da proteína CTCF.** A estrutura de CTCF pode ser dividida em três regiões: uma N-terminal, um domínio de ligação ao DNA composto por onze dedos-de-zinco, e uma C-terminal (PyMOL 0.99rc6).

A capacidade de se ligar a uma grande variedade de sítios-alvo no DNA faz com que a CTCF seja uma proteína multifuncional. As funções tradicionalmente atribuídas a CTCF são as de ativador ou repressor de promotores gênicos de forma contexto-dependentes, de bloqueador de *enhancers* e de elemento insulador, podendo participar ainda dos processos de *imprinting* genômico e de silenciamento do cromossomo X (Recillas-Targa *et al.*, 2006; Phillips e Corces, 2009).

Diversos estudos de escala genômica, realizados com diferentes linhagens celulares, revelaram a existência de aproximadamente 26.000 sítios de ligação de CTCF no genoma humano (Barski *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Cuddapah *et al.*,



2009). Com base nesses estudos, Phillips e Corces (2009) sugeriram que CTCF tem uma função primária de mediar as interações do DNA a longas distâncias e de organizar a arquitetura global da cromatina, sendo que todas as funções tradicionalmente atribuídas a CTCF seriam decorrentes desse papel primário.

O silenciamento transcricional de alguns genes por metilação do DNA pode ser mediado por fatores protéicos que se ligam especificamente em sítios metilados ou não. Estudos apontam a proteína ligadora CTCF, com ação insuladora (em trans), na regulação do mecanismo de *imprinting* dos genes H19/Igf2 presentes no cromossomo 11 (Bell e Felsenfeld, 2000; Chao *et al.*, 2002).

Próxima à região promotora do gene *TSIX* foi localizada uma região, de 60 a 70 pb, que apresenta sítios de ligação para a proteína CTCF. A deleção dessa suposta região de ligação resulta na inativação desse cromossomo X mutado e, portanto, a ligação da proteína CTCF designaria o cromossomo X que permaneceria ativo (Chao *et al.*, 2002; Lee, 2003; Navarro *et al.*, 2006).

Em 2002, Chao *et al.* propuseram a existência de um fator bloqueador em zigotos e outro fator protetor materno, os quais atuam através da CTCF para promover a expressão do *TSIX* no Xa. No Xi, a ligação da CTCF é excluída do *TSIX*, possivelmente por metilação, promovendo a expressão do *XIST*.

Em 2003, Lee propôs outro modelo de ligação da CTCF ao futuro Xa, prevenindo a transcrição de *XIST*, bloqueando a comunicação de *XIST* com um proposto *enhancer* localizado *downstream* a este gene. Dada à posição de CTCF na região 5' de *TSIX*, é considerada a possibilidade da atuação de CTCF como um ativador transcricional direto ou como *enhancer* do gene *TSIX*.

Estudos têm identificado múltiplos sítios de ligação de CTCF dentro das ilhas CpG de *TSIX*, região que corresponde às repetições anteriormente chamadas de DXPas34, as quais afetam o silenciamento de maneira dependente de metilação em um dos dois cromossomos X. *In vitro*, a metilação dos sítios *TSIX* previne a ligação de CTCF e seus sítios de ligação podem bloquear a ação do *enhancer* sobre o promotor do gene, sugerindo que os sítios em *TSIX* também tenham atividade de isolar a cromatina (Chao *et al.*, 2002; Latham, 2005; Boumil *et al.*, 2006).

## 1.6. Inativação aleatória ou preferencial

Em mamíferos, a ICX pode ocorrer basicamente de duas maneiras: aleatória, onde cada célula escolhe ao acaso qual será o cromossomo Xi, paterno ou materno; ou de modo preferencial, também referida como marcada (Plenge *et al.*, 1997).

Na maioria dos mamíferos, na linhagem de células embrionárias, a proporção de células contendo o cromossomo X materno inativado [Xmi (X materno inativado) Xpa (X paterno ativo)] em relação às células com o cromossomo X paterno inativado [Xma (X materno ativo) Xpi (X paterno inativo)] possui uma proporção de 1:1 (Monk e Harper, 1979), ficando evidente que a escolha do futuro Xi ocorre aleatoriamente. Entretanto, em marsupiais (Sharman, 1971) e tecidos extra-embrionários de camundongos a ICX ocorre de forma não aleatória e o Xi é o paterno (ICX por *imprinting*) (Takagi e Sasaki, 1975).

Apesar de na maioria das vezes a ICX ser aleatória, em algumas situações específicas, a inativação pode ocorrer de forma preferencial (*Skewed inactivation*) em um dos cromossomos X (Morey e Avner, 2011).

A inativação completa do cromossomo X em mulheres pode produzir abortos espontâneos ou originar indivíduos 45,X “puros” ou mosaicos. A ICX tem como consequências, genética e clínica, a compensação de dose, variabilidade de expressão em mulheres heterozigotas e mosaicismo. Este mosaicismo tem implicações importantes para a expressão fenotípica de doenças ligadas ao cromossomo X (Lyon, 2002; Migeon, 2006; Orstavik, 2009).

Vários mecanismos estão envolvidos no fenômeno da ICX e o fundamental é que ela ocorra por meio de um inibidor da transcrição de alguns genes e que esta inibição seja mantida *locus a locus* (Chao *et al.*, 2002; Latham, 2005; Erwin e Lee, 2008).

A decisão de qual cromossomo X deve ser inativado (materno ou paterno) ocorre no início do desenvolvimento embrionário, próximo ao momento de implantação do embrião (Migeon, 2007). Uma divergência da porcentagem normal de ICX (50% de cada alelo) é conhecida como inativação preferencial e é determinada quando observa a inativação do mesmo alelo em 65%-84% das células (e inativação preferencial “extrema” quando 85-99% das células apresentam o mesmo alelo ativo) (Plenge *et al.*, 1997; Minks *et al.*, 2008).

Em um estudo realizado por Plenge *et al.* (1997) foi demonstrado que um SNV na região promotora do gene *XIST* pode provocar a inativação preferencial do cromossomo X. Esta variação (-43 C>G/A) no promotor do gene *XIST* afeta um sítio de ligação da proteína insuladora CTCF, a qual é associada a processo de escolha do cromossomo a ser inativado.

Pugacheva *et al.* (2005) demonstraram que o cromossomo X carregando o SNV -43 C>G é preferencialmente inativado, já o cromossomo X que possui a -43 C>A é preferencialmente ativado. Esses mesmos autores demonstraram que estes SNVs interferem na ligação de CTCF ao seu sítio no promotor de *XIST*, no entanto, isso não explica todos os casos de inativação preferencial.

A inativação preferencial do cromossomo X pode favorecer a expressão de alelos mutantes no cromossomo que escapa da inativação, onde uma mulher portadora expressaria apenas a cópia mutada de um dado par alélico (Pugacheva *et al.*, 2005). Um desvio significativo do padrão randômico de inativação do X é encontrado em uma variedade de estados clínicos, incluindo doenças ligadas ao X ou alterações citogenéticas associadas a esse cromossomo. Entre as doenças associadas ou influenciadas pelo processo de inativação preferencial do cromossomo X encontram-se distrofia muscular de Duchenne (DMD), a síndrome de Rett, a síndrome de Menkes, a pré-eclâmpsia, as hemofilias A e B, o câncer de mama, o autismo, a artrite reumatoide, falência ovariana precoce, aborto espontâneo recorrente, várias doenças autoimunes e alguns cânceres (Kristiansen *et al.*, 2002; Bretherick *et al.*, 2005; Ozbalkan *et al.*, 2005; Knudsen *et al.*, 2006; Uz *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2008; Gong *et al.*, 2008; Lose *et al.*, 2008; Okumura *et al.*, 2008; Chabchoub *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2009).

Estudos relatam que a frequência do desvio do padrão de ICX aumenta com a idade e os valores podem se situar entre 2%-16% em mulheres com idades a partir de 60 anos (Allen *et al.*, 1992; Busque *et al.*, 1996; Gale *et al.*, 1997; El Kassar *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 2000; Hatakeyama *et al.*, 2004; Sandovici *et al.*, 2004; Bagislar *et al.*, 2006; Bertelsen *et al.*, 2012).

Sandovici *et al.* (2004), com o objetivo de determinar se a taxa de Inativação preferencial do cromossomo X mudavam continuamente em função do tempo ou se as mudanças descontínuas eram mais frequentes de ocorrer em mulheres mais velhas, analisaram 178 amostras, coletadas em um período de vinte anos, de

mulheres normais heterozigotas para região altamente polimórfica de CAG repetitivo no gene HUMARA, neste estudo não foram observadas diferenças significantes.

Várias etiologias têm sido sugeridas para o aumento das taxas de desvio da ICX com o avançar da idade: eventos ao acaso como replicação das células-tronco hematopoiéticas, apoptose e o início da diferenciação e maturação celular; diferenciação randômica das células residuais, perda alelo-específica da metilação nos sítios *HpaII* e seleção das células tronco hematopoéticas que exibiram uma inativação preferencial em um dos cromossomos X (Abkowitz *et al.*, 1996; Busque *et al.*, 1996; Gale *et al.*, 1997; Bittel *et al.*, 2008).

### **1.8. Marcas epigenéticas e a inativação do cromossomo X**

Atualmente, os três mecanismos de alterações epigenéticas mais estudados são: metilação do DNA, modificações de histonas e ação de RNAs não codificadores de proteína (ncRNAs). Estes mecanismos parecem estar interligados na organização estrutural da cromatina tornando-a mais acessível ou não aos fatores de transcrição, funcionando como o "interruptor" de alguns genes (Goldberg *et al.*, 2007).

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais estudado. Nos mamíferos, a ligação de um grupo metil (-CH<sub>3</sub>) ocorre principalmente na citosina de dinucleotídeos CpGs (Citosina-fosfato-Guanina), essa ligação na região regulatória do gene impede que ele seja ativado. Mais de 70% dos genes humanos podem ser ativados ou desativados desta forma (Medvedeva *et al.*, 2012). A metilação é catalisada pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) e pode ser revertida por demetilases ou tratamento com drogas desmetilantes como a 5-aza-C (Wilson *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2007; Turan *et al.*, 2011).

Este mecanismo está correlacionado com a repressão da transcrição e o silenciamento de genes. Ou seja, regiões altamente metiladas estão associadas à heterocromatização causando mudanças súbitas na maneira que a informação genética é processada na célula (Goll e Bestor, 2005; Laird, 2011).

A metilação tem um papel importante no desenvolvimento embrionário de mamíferos, como demonstrado pela mortalidade precoce em camundongos com nocautes para as DNMTs, nestes camundongos foram observados: redução nos níveis de metilação do DNA, aumento da expressão de transcritos derivados de

retrotransposons, defeitos na repressão do cromossomo X e perda de *imprinting* (*Loss of Imprinting* – LOI) (Suzuki e Bird, 2008; Garcia-Gimenez *et al.*, 2012).

A metilação do DNA é essencial para alguns dos processos envolvidos no desenvolvimento, incluindo a manutenção do estado inativado de um dos cromossomos X. Nas regiões *upstream* aos genes dos cromossomos X o padrão de metilação apresenta-se diferente, de modo que no Xa as ilhas CpG encontram-se não metiladas e no Xi as mesmas regiões estão metiladas (Thurston *et al.*, 2007; Diamandis *et al.*, 2012).

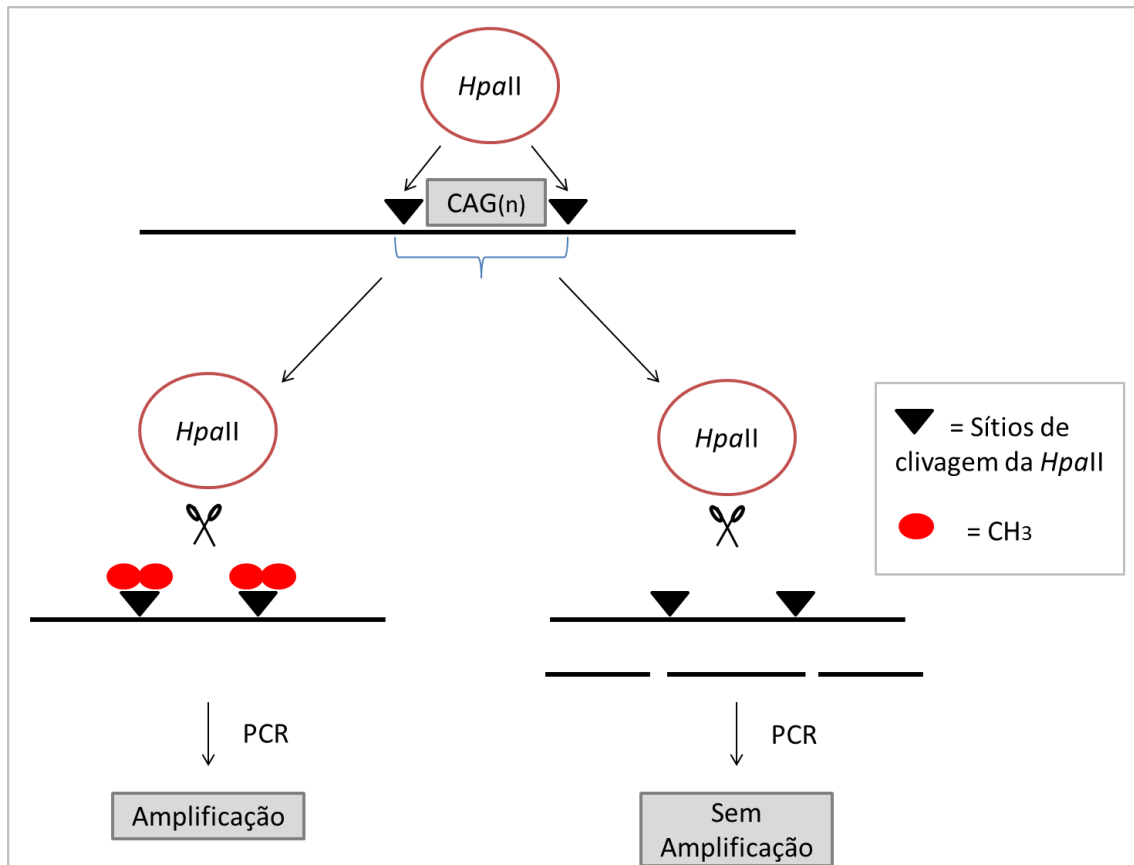
Uma vez metilados, os dinucleotídeos são alvos específicos para ligação pela enzima MeCP2, promovendo o sinal inicial para a repressão da transcrição. A partir de sua ligação às sequências promotoras CpGs metiladas, ocorre o reconhecimento por um complexo composto de um co-repressor de transcrição e uma desacetilase de histona (HATs-histonas acetil-transferases). Esta irá retirar grupamentos acetil dos resíduos de lisina próximos das regiões N-terminais das histonas, modificando, assim, a conformação da molécula de DNA, tornando-a mais compacta e dificultando a transcrição (Lorincz e Groudine, 2001; Jaenisch e Bird, 2003).

### **1.9. Métodos de detecção do estado de metilação e de ativação do cromossomo X**

A análise direta do padrão de metilação consiste no sequenciamento com DNA pré-tratado com bissulfito de sódio. O tratamento com bissulfito converte as citosinas não metiladas em Timina (via Uracila), o que leva à perda da complementaridade entre as fitas de DNA e reduz a complexidade da sequência em cada fita. Os resíduos metilados de citosina não são alterados. Assim sendo, o sequenciamento de DNA tratado com bissulfito permite a identificação dos resíduos metilados (Frommer *et al.*, 1992). O estado de inativação dos cromossomos é determinado diretamente por estudos de expressão gênica (Brown *et al.*, 1991; Rupert *et al.*, 1995; Brown e Robinson, 1997; Carrel e Willard, 1999).

A análise indireta do padrão de metilação pode ser feita utilizando enzimas de restrição sensíveis à metilação. Quando o DNA genômico é metilado nos sítios de reconhecimento destas enzimas, estas não reconhecem o sítio e não cortam o DNA, portanto identificam indiretamente o estado de metilação nesse ponto do cromossomo (Figura 5). Se ao redor do sítio de digestão houver um polimorfismo, a

tipagem deste genoma poderá facilitar a identificação dos cromossomos Xp e Xm; em conjunto esses ensaios permitem identificar qual X está metilado nesse sítio, Xp ou Xm. Esse resultado permite associar o estado de metilação com o estado de ativação dos cromossomos X (Allen *et al.*, 1992).

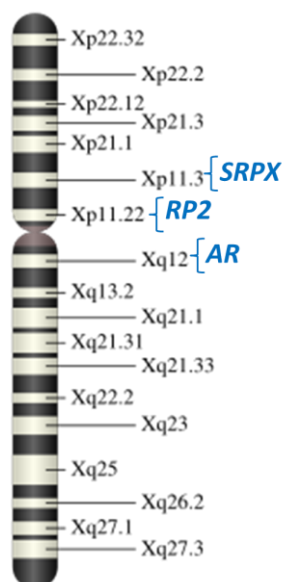


**Figura 5. Ensaio de restrição com *HpaII* no loco *AR*.** Quando o cromossomo X está inativado, os sítios de restrição para *HpaII* estão metilados (círculos vermelhos) e resistentes à digestão e a PCR produz fragmentos do tamanho esperado (lado esquerdo da figura). Porém, quando o cromossomo X está ativado os sítios *HpaII* não estão metilados (triângulos sem círculos) e estão susceptíveis à digestão pela enzima, não ocorrendo assim, a amplificação através da PCR do produto resultante da digestão (lado direito da figura) (adaptado de Araújo & Ramos, 2008).

Atualmente, o marcador utilizado como teste padrão para análise do estado de metilação dos alelos ativos e inativos no cromossomo X está intimamente ligado ao STR trinucleotídico (*CAG*) no exon 1 do gene receptor de andrógeno humano (*AR* ou HUMARA GenBank M21748JO4150) identificado por Allen *et al.* em 1992. Este ensaio é baseado em PCR e depende de dois sítios de restrição da enzima (*HpaII*) sensíveis a metilação e uma repetição polimórfica localizada entre os sítios enzimáticos (Allen *et al.*, 1992; Bertelsen *et al.*, 2011).

A heterozigose do STR trinucleotídico no gene *AR* varia de 85 à 90% quando testado em diferentes populações (Allen *et al.*, 1992; Kaupert *et al.*, 2010; Bertelsen *et al.*, 2012; Gentilini *et al.*, 2012; Jobanputra *et al.*, 2012; Manoukian *et al.*, 2012; Mossner *et al.*, 2013). Embora altamente informativo, esse *loco* não é suficiente para avaliar o estado de inativação do X em uma parcela da população feminina e em distúrbios ligados ao X (Bertelsen *et al.*, 2011). Além disso, recentemente foi demonstrado que o estado de metilação do *loco AR* nem sempre reflete o estado de ICX determinado por Real Time PCR de SNPs (Swierczek *et al.*, 2012). Assim, novas abordagens são necessárias para perfazer esses casos em que o teste do *loco AR* não é informativo e analisar a real correlação entre metilação e expressão.

Neste sentido, nosso grupo identificou *loci* neutros de repetições polimórficas para avaliar com precisão o status de metilação dos alelos ativos e inativos no cromossomo X. Assim, em dados ainda não publicados, relatamos a identificação computacional de uma repetição GAAA como marca da ilha CpG na região Xp11.3 que corresponde ao promotor do gene *RP2* (retinose pigmentosa 2) e de uma repetição CTG na região exônica Xp21.1. do gene *SRPX* (*Sushi repeat-containing protein*) (Dry *et al.*, 1995a). A localização dos genes *AR*, *SRPX* e *RP2* está representada na figura 6.



**Figura 6. Ideograma do Cromossomo X humano.** Cromossomo X identificando as regiões citogenéticas. Em azul a posição dos marcadores utilizados neste estudo.

A análise quantitativa dos níveis de expressão de alelos de um determinado gene pode ser realizada por minissequenciamento usando os polimorfismos de um

único nucleotídeo (SNPs) em amostras de RNA (cDNA). Assim, quando a expressão é vista a partir de um dos dois alelos, pode-se indicar que o gene está sujeito a XCI ou que os níveis de transcritos nascentes estão além do limiar de detecção (Brockdorff, 2011).

#### **1.10. O uso dos marcadores microssatélites para o estudo de inativação do cromossomo X**

Nas amostras forenses, o estudo do DNA geralmente é feito através da análise de regiões de repetições consecutivas curtas (em inglês, *short tandem repeats*), ou simplesmente STR, os quais podem ser definidos como regiões hipervariáveis do DNA que apresentam repetições consecutivas de fragmentos que possuem de dois a nove pares de bases, sendo que os STRs de maior valor para a identificação humana são aqueles que apresentam maior polimorfismo (maior número de alelos), possibilitando que a probabilidade de duas pessoas apresentarem um mesmo alelo torne-se menor. Outras características associadas a um bom marcador são: menor tamanho, maior frequência de heterozigotos (maior que 90%) e baixa frequência de mutações (Monk e Harper, 1979; Leclercq *et al.*, 2007).

Os marcadores STR são formados por unidades de repetição constituídas por mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídeos. Tais marcadores de DNA não variam somente no número ou extensão de suas unidades de repetição, mas também no padrão de organização e distribuição destas unidades, assim, são divididos em três categorias: marcadores STR simples (formados por unidades de repetição idênticas); marcadores STR compostos (formados por dois tipos de unidades de repetição); e marcadores STR complexos (formadas por diversos blocos, com comprimento variado entre as unidades de repetição, e variação nas sequências consenso) (Butler, 2005).

Estima-se que os marcadores STR estejam presentes em todos os organismos eucariotos, porém ausentes na maioria dos procariotos. Os diversos marcadores STR variam em extensão devido a inserções ou deleções (*indels*) de uma ou mais unidades de repetição, que são causadas por um fenômeno molecular conhecido como polimerase *slippage*, que consiste no escorregamento da DNA polimerase e que ocorre durante o processo de replicação do DNA. Este fenômeno é responsável



por elevadas taxas de mutação (~0,1% por *loco*) que conduzem a elevados graus de polimorfismos entre este tipo de marcadores (Leclercq *et al.*, 2007).

Os STRs apresentam variabilidade alélica *in loci* muito alta; este grau de variação é o suficiente para estabelecer relações genéticas entre populações intimamente ligadas, subpopulações, raças, assim como paternidade, níveis de endogamia, estudos evolutivos, identificação individual, fluxo gênico e análise forense (Chambers e Macavoy, 2000).

O escorregamento da polimerase perante as repetições de DNA são claramente manifestadas nos produtos da PCR que consistem, além da amplificação do alvo principal, de mutações de inserções ou deleções que diferem da sequência alvo original por múltiplas unidades de repetições (Shinde *et al.*, 2003). Esses produtos com menor representação quantitativa são conhecidos como *stutters*. As taxas de mutações *in vitro* são maiores que as encontradas *in vivo* devido ao sistema de reparo da replicação do DNA.

As taxas de mutações observadas dependem da frequência do escorregamento da polimerase e da eficiência no mecanismo de reparo (Fan e Chu, 2007).

A taxa de formação de *stutter* é inversamente proporcional ao tamanho da unidade de repetição. *Loci* com imperfeições nessas unidades tendem a ser menos mutáveis (Fan e Chu, 2007). Mutações pontuais também estão presentes nos STRs, embora o mecanismo de escorregamento da polimerase exceda o número deste tipo de mutação por uma a duas ordens de grandeza (Pumpernik *et al.*, 2008).

### **1.11. O gene AR**

O gene *AR* está localizado no cromossomo X, na região Xq11-12, possui 75-90 kb, compreendendo 8 exons separados por introns que variam de 0,7 a mais de 26 kb de tamanho (Lubahn *et al.*, 1988). O primeiro éxon codifica o domínio N-terminal, que é a região reguladora da transcrição do gene, que é formada por uma região de aproximadamente 918 aminoácidos, com peso molecular de 110 kDa (Dehm e Tindall, 2007).

O receptor de andrógeno (AR) é membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição ativados por hormônios (Zhou *et al.*, 1994; Callewaert *et al.*, 2003; Robinson-Rechavi *et al.*, 2003). Os esteróides

desempenham um importante papel no controle da expressão gênica, por meio de sua união com receptores específicos. Uma vez ativados, os receptores agem controlando a transcrição, ligando-se em sequências específicas do DNA chamadas elementos de resposta hormonal (Luke e Coffey, 1994).

A ação androgênica da testosterona e da dihidrotestosterona se faz através da ligação de um único receptor, o AR, que regula vários genes necessários ao desenvolvimento e diferenciação do fenótipo masculino e manutenção das funções reprodutivas normais (Luke e Coffey, 1994; Hiort *et al.*, 2000). Nas fêmeas, o AR é expresso em vários tecidos, incluindo órgãos sexuais primários e secundários, principalmente nas células granulosas do ovário, sugerindo seu envolvimento na foliculogênese (Kimura *et al.*, 2007).

Como outros membros da família de receptores nucleares, o AR apresenta três domínios principais. Sua estrutura inclui um domínio N-terminal de transativação, codificado em sua maior parte pelo éxon 1, um domínio central de ligação ao DNA codificado pelos exons 2 e 3, e o domínio C-terminal de ligação ao hormônio codificado pelos exons 4 a 8 (Ferlin *et al.*, 2004; Brooke e Bevan, 2009). Esta região apresenta um subdomínio com função de ativação dependente da ligação do andrógeno, denominada AF2 (Reid *et al.*, 2003; Dehm e Tindall, 2007).

O receptor possui duas regiões de repetições em tandem, caracterizadas como microssatélites, polimórficas no éxon 1, caracterizadas por números diferentes de repetições CAG e GGC resultando em tamanhos variados de poliglutamina e poliglicina, variando em homens normais de 10 a 35 aminoácidos (com uma média de 21-23) e 4 a 24 aminoácidos (com uma média de 16-17), respectivamente. As repetições mais longas de AR resultam em uma atividade transcricional reduzida do mesmo, tanto *in vivo* como *in vitro* (Choong *et al.*, 1996; Beilin *et al.*, 2000; Ding *et al.*, 2004; 2005; Palazzolo *et al.*, 2008).

A função exata das repetições CAG no gene AR ainda não é completamente compreendida, mas tem sido observado que existe uma correlação inversa entre a atividade de transcrição do gene AR e o número de repetições CAG. A expansão desta região está associada com diferentes doenças, atingindo mais de 40 repetições, está associada a uma doença neurodegenerativa ligada ao cromossomo X, conhecida como doença de Kennedy. Um menor número de repetições CAG, mesmo dentro da faixa normal, tem sido associado com a etiologia de várias

doenças andrógeno dependentes, como carcinoma prostático e síndrome dos ovários policísticos. Um número mais elevado, no entanto, tem sido associado com infertilidade masculina. Palazzolo *et al.* (2008) investigando repetições (CAG)<sub>n</sub> sugeriram que o aumento ou a diminuição destas sequências interfeririam na regulação transcricional em tecidos específicos.

O teste padrão de determinação indireta do estado de ativação dos cromossomos X é o ensaio *AR*. Este ensaio foi originalmente descrito por Allen *et al.* (1992) e modificado por Yorifuji *et al.* (1997) e consiste na identificação de citosinas diferencialmente metiladas em sítios de restrição localizados próximos a uma sequência curta repetida em tandem (STR) de CAG no exon 1 do gene *AR*. Antes da Reação em Cadeia da Polimerase os DNAs genômicos são digeridos pela *HpaII*. Quando um cromossomo X está ativado os sítios *HpaII* não estão metilados e são susceptíveis à digestão pela enzima, não ocorrendo assim, a amplificação da PCR, do produto resultante da digestão. Por outro lado, quando um cromossomo X está inativado, esses sítios são metilados e resistem à digestão (Araujo e Ramos, 2008). Este *loco AR* tem uma taxa de heterozigose de ~85% (Edwards *et al.*, 1991; Yorifuji *et al.*, 1997), não sendo informativo em todas as mulheres e podendo variar por influências hormonais e ambientais, não sendo portanto, um marcador neutro (Kaupert *et al.*, 2010).

Nos casos em que a inativação do X é ao acaso, ambos os alelos são metilados casualmente e, por isso, estarão igualmente digeridos e amplificados. Entretanto, quando um dos cromossomos é inativado preferencialmente, o alelo do cromossomo X inativado estará resistente para a enzima *HpaII* e será amplificado seletivamente (Araujo e Ramos, 2008).

### **1.12. O gene *SRPX***

O gene *SRPX* (do inglês *sushi-repeat containing protein, X-linked*), também conhecido como *DRS*, *ETX1* e *SRPX1*, foi primeiramente descrito por dois grupos em 1995 (Dry *et al.*, 1995b; Meindl *et al.*, 1995). Foi caracterizado como um supressor tumoral em linhagens celulares sujeitas à transformação pelo oncogene *v-src* (gene *Rous*, sarcoma vírus transformado) (Pan *et al.*, 1996). O gene contém 10 exons, e tem um tamanho de 71.59 kb, ele está situado na posição física Xp21.1 e

seu maior transcrito contém 1920 pb, com a proteína correspondente contendo 464 aminoácidos (Shimakage *et al.*, 2002).

Análise de homologia da proteína SRPX revelou a presença de um domínio transmembrana (aa, resíduos 376- 413) e três repetições de consenso (resíduos 57-115, 120-174 e 262-317). Essas repetições estão conservadas no domínio extracelular da família das selectinas, como a P-selectina. Baseado nesses resultados foi sugerido que o SRPX provavelmente codifica uma proteína transmembrana (Pan *et al.*, 1996). Outro estudo mais recente demonstrou que a proteína SRPX está presente no citoesqueleto interagindo com a proteína PELO (*Pelota homolog Drosophila*), ambas formam um complexo com outras proteínas que têm como função degradar RNAs mensageiros defeituosos (Burnicka-Turek *et al.*, 2011).

A expressão do gene SRPX é reduzida em diversos tipos de tumores malignos, como câncer de colo, ovário, intestino, próstata, câncer de bexiga entre outros (Tambe *et al.*, 2004). A expressão ectópica de seu transcrito é capaz de induzir apoptose em linhagens celulares humanas de câncer, com via mediada pelo retículo endoplasmático (Tambe *et al.*, 2004; Tambe *et al.*, 2007).

Tambe *et al.* em 2007 encontraram em seu estudo que 30% de ratos *knockout* para o gene SRPX desenvolveram tumores malignos incluindo linfomas, hepatomas e adenocarcinoma do pulmão (Tambe *et al.*, 2007). Níveis elevados de expressão foram encontrados na rede trabecular em olho glaucomatoso (Iragavarapu *et al.*, 2009).

O gene SRPX não escapa da inativação, exibindo assim um perfil monoalélico de expressão por célula (Carrel e Willard, 2005). Apresenta em seu primeiro exon um polimorfismo STR trinucleotídico CTG, que confere uma variação fenotípica com deleção de até 7 resíduos de leucina (17-23LDeI) (Dry *et al.*, 1995b).

### **1.13. O gene RP2**

O gene RP2 está localizado no braço curto do cromossomo X, no intervalo Xp11.3-11.23 (Figura 9). É composto por cinco éxons, que codificam um polipeptídeo de 350 aminoácidos, o qual é expresso ubiquamente nos tecidos humanos. A proteína RP2 localiza-se majoritariamente na membrana plasmática voltada para a face citoplasmática. Na retina humana, a proteína RP2 foi localizada

na membrana plasmática tanto na haste quanto nos cones fotorreceptores, estendendo-se a partir do segmento exterior através do segmento interior para os terminais sinápticos (Schwahn *et al.*, 1998; Chapple *et al.*, 2000).

Acredita-se que a proteína RP2 funcione como ativador de GTPase (GAP) para o fator ribosilação ADP tipo 3 da superfamília Ras das pequenas proteínas G (Veltel *et al.*, 2008; Holopainen *et al.*, 2010). Estudos bioquímicos e celulares revelaram um potencial papel na manutenção do Golgi, na coesão e direcionamento de proteínas para a membrana plasmática (Evans *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2010; Holopainen *et al.*, 2010). Como as células fotorreceptoras são as células neuronais mais ativas metabolicamente e envolvem o transporte de inúmeras proteínas a partir do interior para os segmentos fotosensoriais externos, mesmo ligeiras perturbações na máquina do tráfico de proteína resultam na degeneração dos fotorreceptores e cegueira, dentre elas a retinite pigmentar (Evans *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2010; Holopainen *et al.*, 2010).

Mutações no *RP2* são responsáveis por aproximadamente 20% de todos os casos de retinite pigmentar ligada ao cromossoma X (XLRP) (Jayasundera *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2011; Schwarz *et al.*, 2011). Dentre essas mutações patogênicas se encontram as mutações sem sentido, sentido trocado, *splicing*, variações no quadro de leitura na região codificadora, inserções e deleções (Chapple *et al.*, 2000; Patil *et al.*, 2011). Essas mutações levam a perda das proteínas RP2 e/ou a distribuição intracelular aberrante, que pode ser a base para a degeneração das células fotorreceptoras (Patil *et al.*, 2011).

Essas mutações levam a uma degeneração progressiva das células fotorreceptoras, perda progressiva de bastonetes e cones da retina, resultando em perda progressiva da função visual ou cegueira noturna (Berson, 1996; Jayasundera *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2011). A forma mais grave da XLRP (Berson, 1996; Schwahn *et al.*, 1998; Jayasundera *et al.*, 2010; Schwarz *et al.*, 2011) é caracterizada fenotipicamente pelo aparecimento de cegueira noturna na segunda década de vida, e evolui em geral para cegueira completa (Bird, 1975).

Os marcadores dos três genes apresentados foram escolhidos e desenvolvidos para funcionar em um ensaio no formato tríplex para aumentar a informatividade do teste para caracterizar os padrões de inativação do cromossomo X. Neste trabalho buscou-se uma associação entre os padrões preferenciais de ICX

e SNVs localizadas na região promotora do gene *XIST* anteriormente caracterizada com a ativação e inativação preferencial do cromossomo X em binômios da região Norte Fluminense.

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo a determinação dos perfis pontuais das marcas epigenéticas de metilação no cromossomo X, utilizando três sistemas multialélicos: *AR* (receptor de andrógenos humano; *loco* do microssatélite (CAG)<sub>n</sub>), *SRPX* (do inglês *sushi-repeat containing protein*; (CTG)<sub>n</sub>) e *RP2* (retinite pigmentosa 2; (GAAA)<sub>n</sub>), e, adicionalmente, a determinação das frequências das mutações rs187705242 (-43 C>G/A) e rs183361548 (-6 C>T) na região promotora do gene *XIST* em uma amostra populacional da região Norte Fluminense composta de 70 binômios mães e filhas.

### **Objetivos Específicos:**

- Analisar os perfis pontuais das marcas de metilação do cromossomo X em amostras de mulheres normais e Determinar o padrão de inativação do cromossomo X nas mulheres da região Norte Fluminense;
- Investigar a presença e determinar as frequências das mutações rs187705242 e rs183361548 no promotor do gene *XIST* humano;
- Verificar a possível herança transgeracional da inativação preferencial;
- Determinar a frequência alélica dos marcadores para os genes *AR*, *SRPX* e *RP2* na população da região Norte Fluminense.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Sujeitos da pesquisa**

Para esta pesquisa foram utilizadas amostras de DNA genômico de binômios, mãe e filha (n=140). Esse material foi coletado de indivíduos voluntários, não acometidos, que participam de investigações de parentesco. As amostras foram depositadas no banco de DNA genômico do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular – NUDIM. As frequências alélicas das mães e filhas para cada um dos marcadores foram estimadas de forma separada.

Todas as amostras foram coletadas sob a assinatura de “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos participantes e/ou responsáveis legais” (Apêndice I).

#### **3.2. Aspectos éticos da pesquisa**

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, sob a folha de rosto FR278769. Tal linha de pesquisa é financiada pela FAPERJ e o CNPq.

#### **3.3. Material biológico**

Sangue venoso: amostras de 3-10mL de sangue periférico foram coletadas em tubos estéreis contendo anticoagulante EDTA e mantidas sob refrigeração até o momento da extração de DNA dos leucócitos.

Células do epitélio bucal: Células epiteliais foram coletadas por esfregaço bucal utilizando haste flexível, estéril, com ponta de algodão hidrofílico. Este material foi coletado preferencialmente de crianças menores de dez anos.

#### **3.4. Extração de DNA**

O material biológico (sangue) foi submetido à extração de DNA por meio de um kit de extração comercial *GE Healthcare*®. Segundo o manual do kit *Ilustra™ Blood genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare)*.



### 3.5. Quantificação do DNA genômico

Foi utilizado 1 µL do DNA extraído para quantificação direta utilizando o espectrofotômetro *NanoDrop 2000c™-Thermo Scientific* (US, Canadá) com o comprimento de onda de 260 nm.

### 3.6. Digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa de fluorescência - DESM-QFPCR

Para detecção da presença de inativação preferencial do cromossomo X, foram utilizadas 2U da enzima de restrição sensível à metilação *HpaII* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) que reconhece e cliva o sítio polimórfico de restrição CCGG. Para o ensaio de restrição foram utilizados 500ng de DNA com a enzima *HpaII* a 37 °C por 4 horas.

Para PCR quantitativo fluorescente (QF-PCR), foi utilizado um ensaio em tríplex para os marcadores: *AR*, *SRPX* e *RP2* com 10pmol cada e 50 ng de DNA, os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1.

Na reação de amplificação foi adicionado betaína na concentração final de 2M na reação. Esse agente facilita a separação das fitas de DNA além de aumentar o rendimento e a especificidade dos produtos da PCR por contribuir na amplificação de alvos ricos em CG por aumentar a estabilidade das fitas (Frackman *et al.*, 1998).

A caracterização dos alelos amplificados foi realizada utilizando-se uma plataforma ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer (California, USA). Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando-se o software GeneScan™ (*AppliedBiosystem*).

**Tabela 1. Iniciadores do ensaio Triplex.** Sequência dos *primers AR*, *SRPX* e *RP2*, tamanho dos produtos gerados e temperatura de *melting* em vermelho os *primers* sentido e em azul os *primers* antisentido.

	<i>Primer sentido</i>	<i>Primer Antisentido</i>	Produto	TM
AR	TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC	GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT	288 pb	69
SRPX	CCTCTATCCCGAGCGAAGG	GTGCCGAGGCGAGCTAAG	201 pb	62
RP2	TGACATAGCGAGACCCTGTG	GTGGTGGGTTCTCTAGCTGGT	350 pb	60

### 3.7. Desenho dos iniciadores do SNaPshot

No desenho dos iniciadores de amplificação e de sequenciamento do SNaPshot, foram utilizados os programas livres e online: livre OligoPerfect™

Designer da Invitrogen OligoPerfect™ Designer da Invitrogen™ (<http://www.invitrogen.com/>) e o OligoCalc - Oligonucleotide Properties Calculator. Para avaliar a especificidade de cada par de iniciadores, foi utilizada a ferramenta online iPCR – UCSC (in silico PCR University of California Santa Cruz, USA). Na tabela 2 estão demonstrados os iniciadores de amplificação e de sequenciamento para o SNaPshot.

**Tabela 2. Iniciadores do SNaPshot.** Sequência dos *primers* de amplificação e de sequenciamento, tamanho dos produtos gerados e temperatura de *melting* em vermelho os *primers* sentido e em azul os *primers* antisenso.

	<i>Primers</i>	Tm	Produto
<i>XIST</i>	F: CAGCCCCGAGAGAGTAAGAA R: CCATTCTCAAACCAAGCTGA	60	380 bp
<a href="#">rs183361548</a>	AGTAAGAAATATGGCTGCAGCAG	53.5	C>T
<a href="#">rs187705242</a>	CTCTTATGCTCTCTCCGCC	53.2	C>G/A

### 3.7. Sequenciamento de nucleotídeo único – SNaPshot

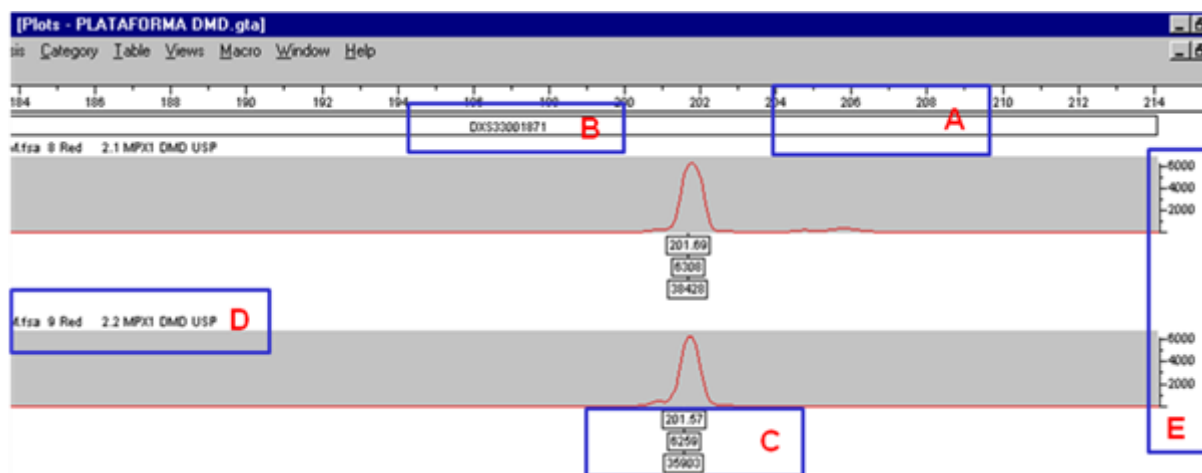
Inicialmente, a região promotora do gene *XIST* humano contendo o polimorfismo foi amplificada por PCR. Foram utilizados 10 ng de DNA e 2 pmol dos *primers*. Em seguida, os segmentos amplificados foram submetidos a uma purificação com o kit ExoSAP-IT (*USB Corporation*) que elimina os dNTPs não incorporados pela reação de PCR. Posteriormente foi realizada a reação de sequenciamento de base única (*Snapshot Multiplex Kit, Applied Biosystems*), utilizando apenas um terceiro oligonucleotídeo iniciador, cuja extremidade 3' era adjacente à base polimórfica, e apenas os dideoxinucleotídeos (ddNTPs), que levavam ao término da elongação logo após a sua inserção, de modo complementar à base polimórfica. Antes dos fragmentos serem injetados no sequenciador foi realizado uma etapa de digestão com a enzima Fosfatase Alcalina (*Biotécnica*) para remoção dos grupos fosfato das extremidades 5'.

### 3.8. Eletroforese capilar

Os produtos de amplificação foram conservados congelados e posteriormente foram adicionados 9 µL de formamida (*Hi-Di Formamida, Applied Biosystems*) e 0,15 µL do padrão de massa molecular *GeneScan LIZ 500*, para o ensaio em triplex e do *GeneScan LIZ 120* para a análise dos fragmentos do SNaPshot, marcados com o fluorocromo LIZ™ (fluorescência laranja) (*Applied Biosystems*). Os produtos de

amplificação foram separados por eletroforese capilar com o polímero *POP 4* (contendo 4% de acrilamida), utilizando a plataforma *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer*.

Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando os programas *GeneScan™* e *Genotyper™* (*Applied Biosystems*). Os alelos foram nomeados com o valor em pares de nucleotídeos, dos produtos da PCR. Na figura 7, está esquematizado o método padrão de interpretação de um eletroferograma.



**Figura 7. Informações para a interpretação de um eletroferograma.** No eixo X, representado em A, escala em número de pares de nucleotídeos (nt). Em B, identificação do marcador utilizado. Em C, informações alélicas representadas, caracterização dos alelos em pares de nucleotídeos, dosagem da proporção alélica em área e intensidade de fluorescência do alelo. Em D, identificação da amostra analisada. No eixo Y, representado em E, escala da atividade de fluorescência em unidades arbitrárias. A intensidade de fluorescência está diretamente relacionada com a quantidade de DNA amplificado. Figura reproduzida com permissão do autor (Alves Da Silva, 2007).

### 3.9. Frequências alélicas e dados populacionais

As frequências alélicas dos marcadores deste estudo foram determinadas utilizando o software *PowerStatsV12* distribuído pela *Promega Corp* (*Promega, Madison, WI*) (<http://www.promega.com/geneticidtools/powerstats/>) que se baseia em um arquivo do Excel que gera automaticamente a frequência alélica dos marcadores.

### 3.10. Quantificação das proporções de inativação

A proporção da ICX de todas as amostras foi calculada a partir da estatística baseada em Busque *et al.* (2009). A interpretação do resultado da equação é: % de células com o alelo maior (B) ativo (Figura 8).

$$B = 1 - \frac{\left( \frac{\frac{B}{B+A}}{\frac{B'}{B'+A'}} \right)}{\left( \frac{\frac{B}{B+A}}{\frac{B'}{B'+A'}} + \frac{\frac{A}{B+A}}{\frac{A'}{B'+A'}} \right)}$$

**Figura 8. Fórmula estatística empregada para calcular a proporção de ICX entre os alelos.** Onde A corresponde ao alelo de menor área não digerido, B ao alelo de maior área não digerido, A' ao alelo de menor área digerido e B' ao alelo de maior área digerido (Adaptado de Busque *et al.* 2009).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Padrões de Inativação do Cromossomo X

Os perfis pontuais das marcas de metilação para os marcadores *AR*, *SRPX* e *RP2* foram analisados através da técnica de DESM-QFPCR e a partir das amostras heterozigotas foi possível elaborar um gráfico traçando o perfil de inativação das amostras para cada marcador.

Nas figuras 9, 10 e 11 estão demonstradas as distribuições dos perfis de ICX para os marcadores *AR*, *SRPX* e *RP2*. Foi encontrada uma predominância das amostras com o padrão de ICX aleatórios nos alelos, variando entre 50:50 e 5:95 e entre 50:50 e 95:5. Os marcadores *AR* e *RP2* possuem maiores taxas de heterozigose quando comparados com o marcador *SRPX* (Figura 10), portanto, é observado um maior número de amostras nos seus gráficos de distribuição com proporções mais evidentes (Figuras 9 e 11).

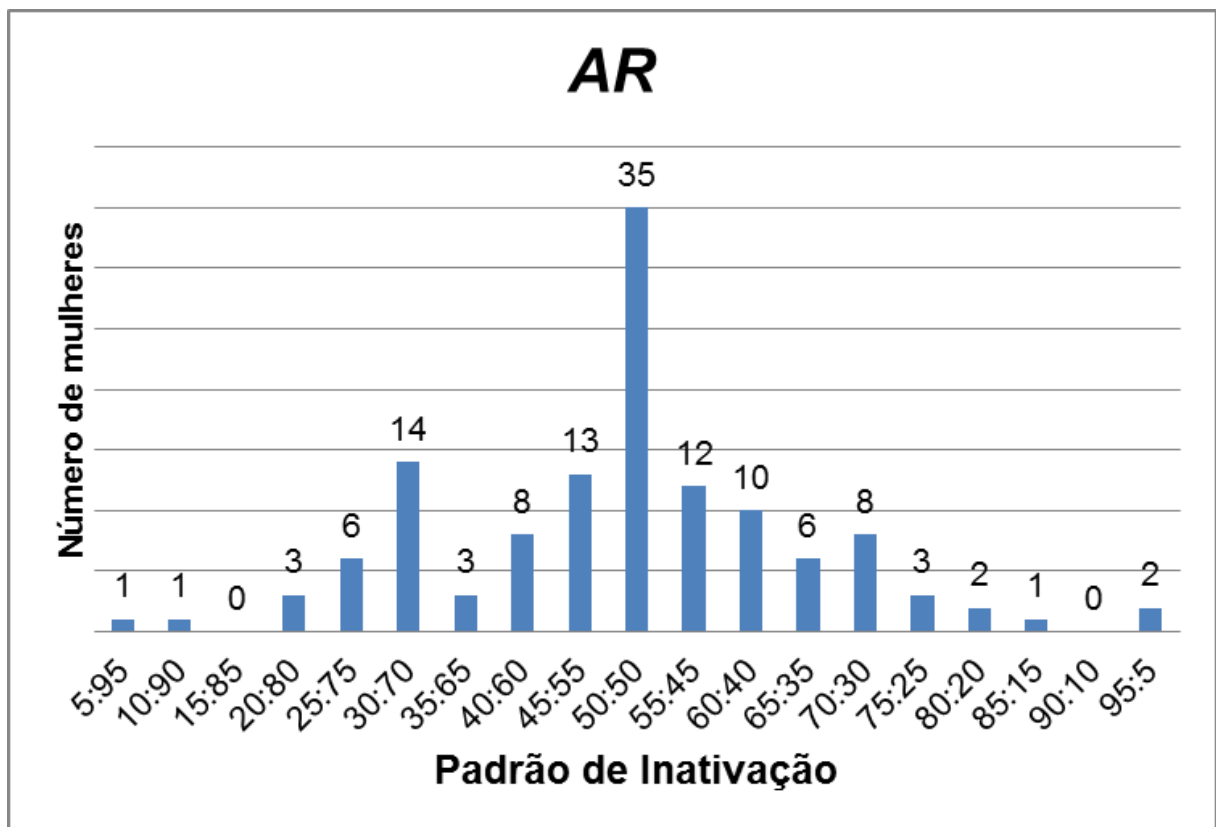


Figura 9. Distribuição das razões de inativação do cromossomo X para o marcador do gene *AR*. Gráfico demonstrando os padrões de ICX entre o alelo A e o alelo B em 128 mulheres heterozigotas para o marcador *AR*.

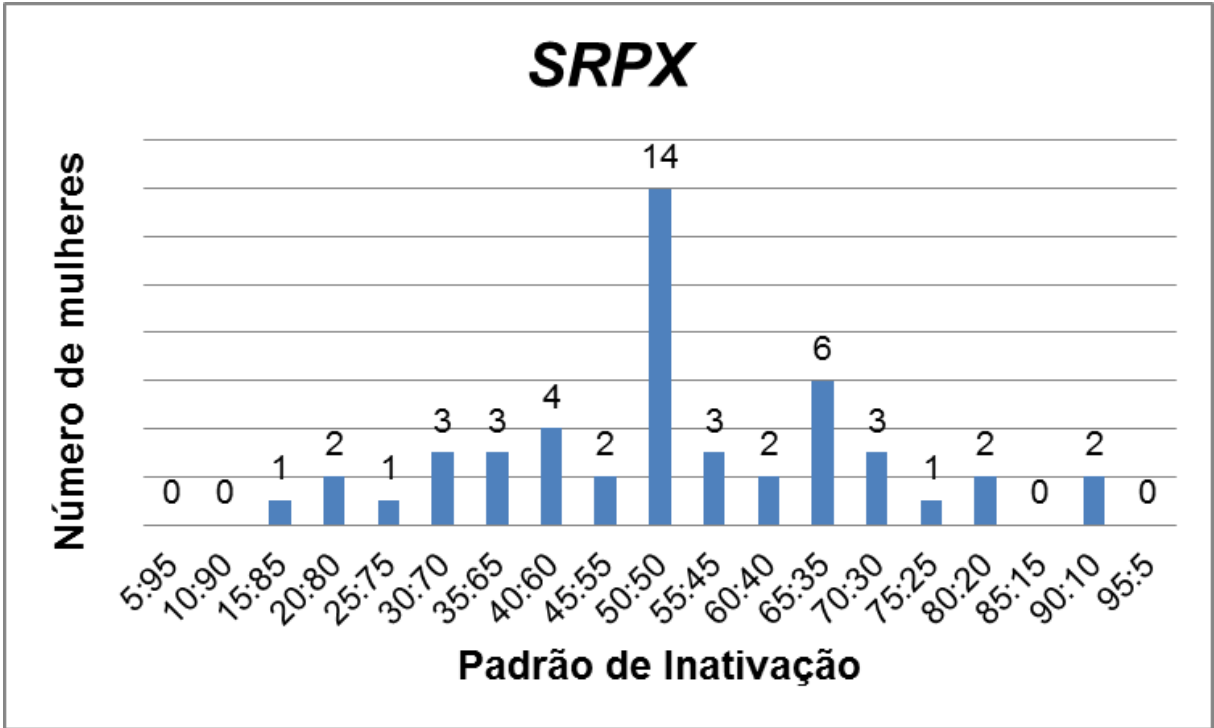


Figura 10. Distribuição das razões de inativação do cromossomo X para o marcador do gene *SRPX*. Gráfico demonstrando os padrões de ICX entre o alelo A e o alelo B em 49 mulheres heterozigotas para o marcador *SRPX*.

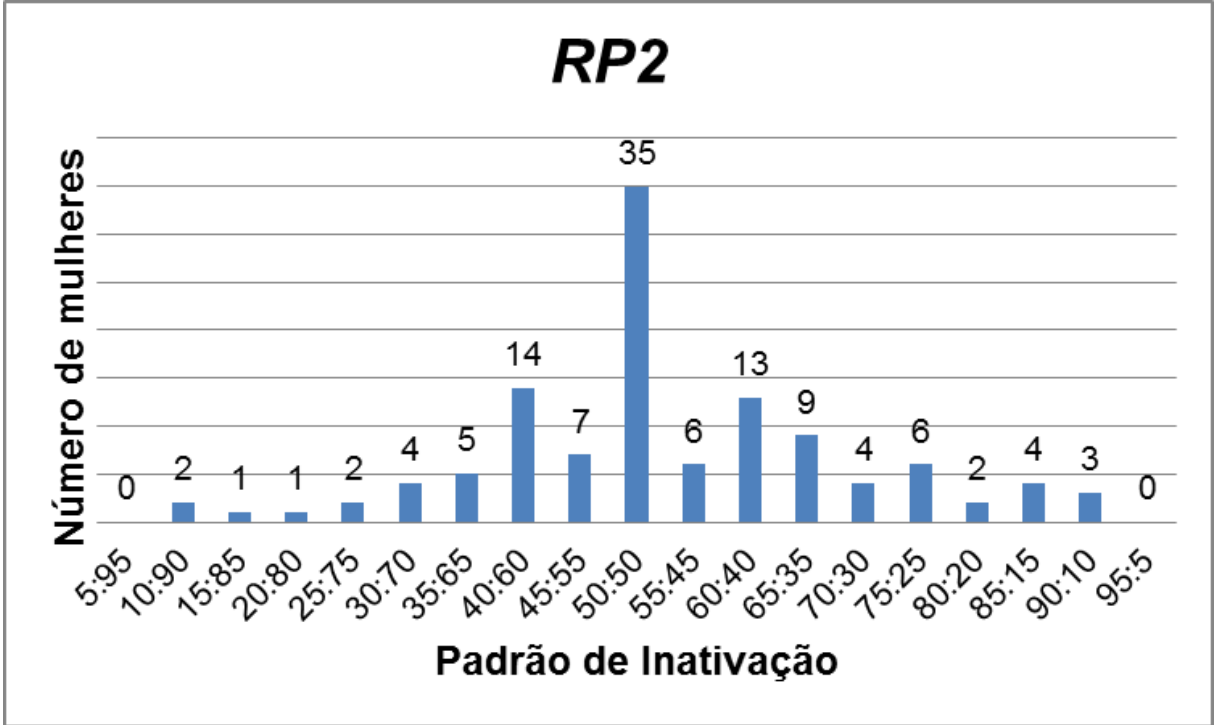
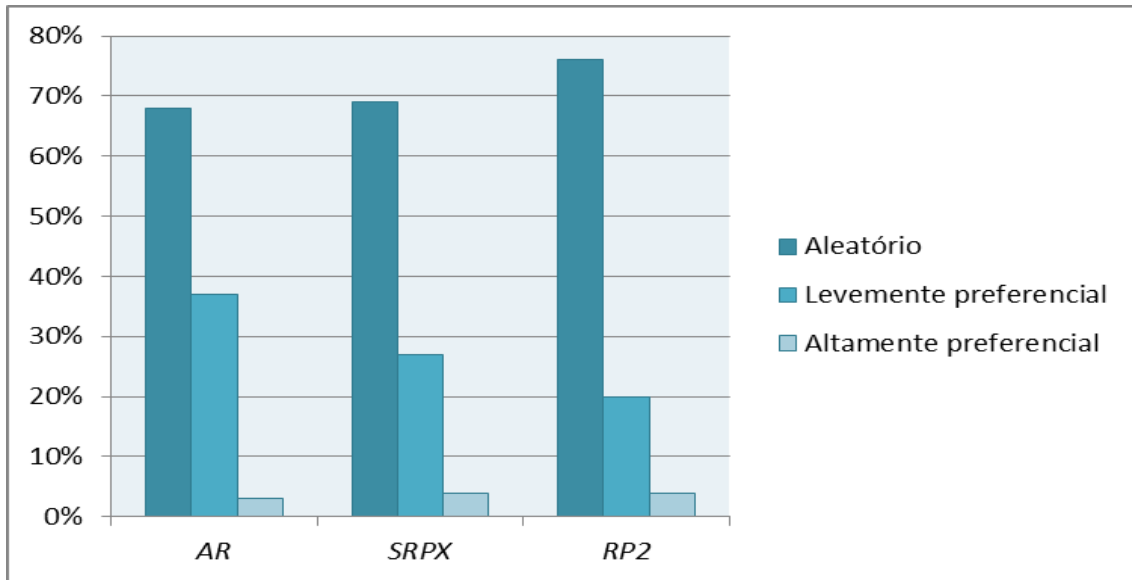


Figura 11. Distribuição das razões de inativação do cromossomo X para o marcador do gene *RP2*. Gráfico demonstrando os padrões de ICX entre o alelo A e o alelo B em 117 mulheres heterozigotas para o marcador *RP2*.

Na Figura 12 estão exemplificadas as proporções dos padrões de ICX para os três marcadores estudados.



**Figura 12. Proporção dos padrões de ICX para os marcadores AR, SRPX e RP2.** Proporção dos padrões de ICX (aleatório, levemente preferencial e altamente preferencial) nas amostras analisadas.

Na Figura 13 estão exemplificados os padrões de inativação preferenciais para os três marcadores antes e depois da digestão com a enzima *Hpa*II. Os marcadores AR, SRPX e RP2 apresentaram as seguintes proporções entre os alelos A e B nestas amostras: 19:81, 24:76 e 73:27, respectivamente.

Os valores apresentados abaixo dos picos correspondem à caracterização dos perfis alélicos em pares de nucleotídeos e à dosagem da proporção alélica em área. O padrão de ICX destas amostras é classificado como levemente preferencial (65:35-84:16). Para calcular as proporções da ICX nesta e nas demais amostras foi utilizada a estatística de Busque *et al.*, (2009) demonstrado na figura 8.

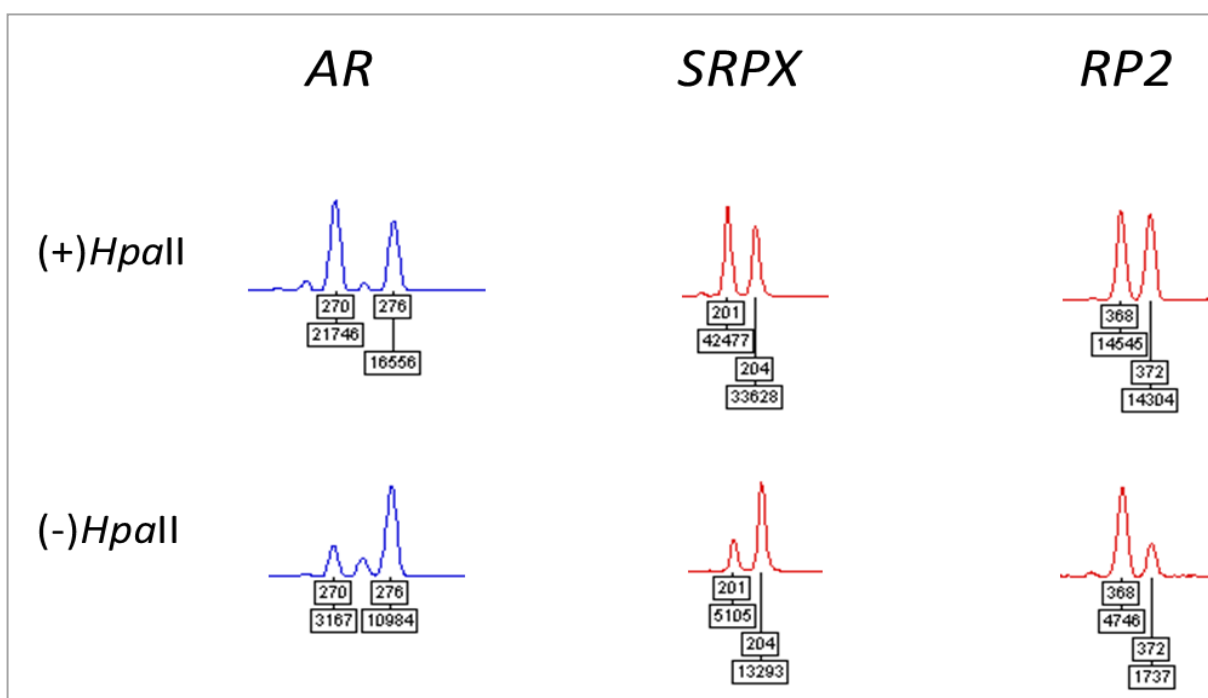


Figura 13. Eletroforese capilar, digerido pela enzima *HpaII* e amplificação por PCR para os marcadores *AR*, *SRPX* e *RP2*. Resultado de eletroforese capilar de DNA demonstrando um padrão levemente preferencial de inativação.

#### 4.2. Padrão de herança transgeracional da inativação do cromossomo X

Para se investigar o padrão de herança transgeracional do Xi foi observada a origem do Xi (Xi de origem materna ou Xi de origem paterna). Nas amostras analisadas, 31 filhas possuíam inativação preferencial (levemente ou altamente preferencial).

Destas amostras 17 (55%) apresentaram inativação preferencialmente materna (o X de origem materna estava inativo) e 14 amostras (45%) com inativação preferencialmente paterna (o X de origem paterna estava inativo).

Conforme apresentado na tabela 3, foi observado o comportamento do Xm herdado pelas filhas, 7 filhas herdaram o Xa da mãe e este continuou ativo ( $X_a > X_a$ ), 4 herdaram o Xa e ele se tornou inativo ( $X_a > X_i$ ), 8 herdaram o Xi da mãe que continuou inativo ( $X_i > X_i$ ) e 6 herdaram o Xi que ficou ativo ( $X_i > X_a$ ).

Em 6 amostras não foi possível determinar esses perfis pois as mães possuem padrões de ICX aleatórios.



**Tabela 3. Padrão de herança transgeracional do cromossomo X.** Análise do Xi das filhas, padrão de inativação, origem da herança do Xi e comportamento do Xm herdado pelas filhas.

Amostras	Padrão de inativação	Xi	Comportamento do Xm
02F	Altamente Preferencial	Xp	Xa>Xa
08F	Levemente Preferencial	Xp	-
18F	Levemente Preferencial	Xm	Xa>Xi
27F	Levemente Preferencial	Xp	Xa>Xa
46F	Altamente Preferencial	Xm	Xi>Xi
80F	Levemente Preferencial	Xm	Xi>Xi
131F	Levemente Preferencial	Xp	Xi>Xa
165F	Levemente Preferencial	Xm	-
174F	Levemente Preferencial	Xp	Xa>Xa
193F	Levemente Preferencial	Xm	Xi>Xi
217F	Levemente Preferencial	Xp	Xa>Xa
238F	Levemente Preferencial	Xm	Xi>Xi
248F	Levemente Preferencial	Xm	Xa>Xi
261F	Levemente Preferencial	Xp	-
274F	Levemente Preferencial	Xp	Xi>Xa
309F	Levemente Preferencial	Xm	Xa>Xi
312F	Levemente Preferencial	Xp	Xi>Xa
399F	Levemente Preferencial	Xp	Xa>Xa
401F	Altamente Preferencial	Xm	-
609F	Altamente Preferencial	Xp	Xa>Xa
619F	Levemente Preferencial	Xm	Xa>Xi
623F	Levemente Preferencial	Xp	Xi>Xa
668F	Levemente Preferencial	Xp	Xa>Xa
682F	Levemente Preferencial	Xm	Xi>Xi
685F	Altamente Preferencial	Xm	Xi>Xi
689F	Levemente Preferencial	Xp	-
716F	Levemente Preferencial	Xp	Xi>Xa
746F	Levemente Preferencial	Xm	Xi>Xi
916F	Levemente Preferencial	Xm	Xi>Xi
1035F	Levemente Preferencial	Xp	-
1067F	Altamente Preferencial	Xp	Xi>Xa

#### 4.3. Relação entre a idade das mulheres e os padrões de inativação do cromossomo X

Considerando que as diferenças do padrão entre XCI nos tecidos pode ser um efeito do processo de envelhecimento, foi feita uma avaliação da idade das mulheres para verificar esta possibilidade.

A média de idade entre as mães foi de 35 anos, variando de 17 a 60 anos e a média da idade das filhas foi de 14 anos, variando de 0 a 40 anos. Somente 1 mulher possuía 60 anos de idade e esta apresentou padrões XCI levemente

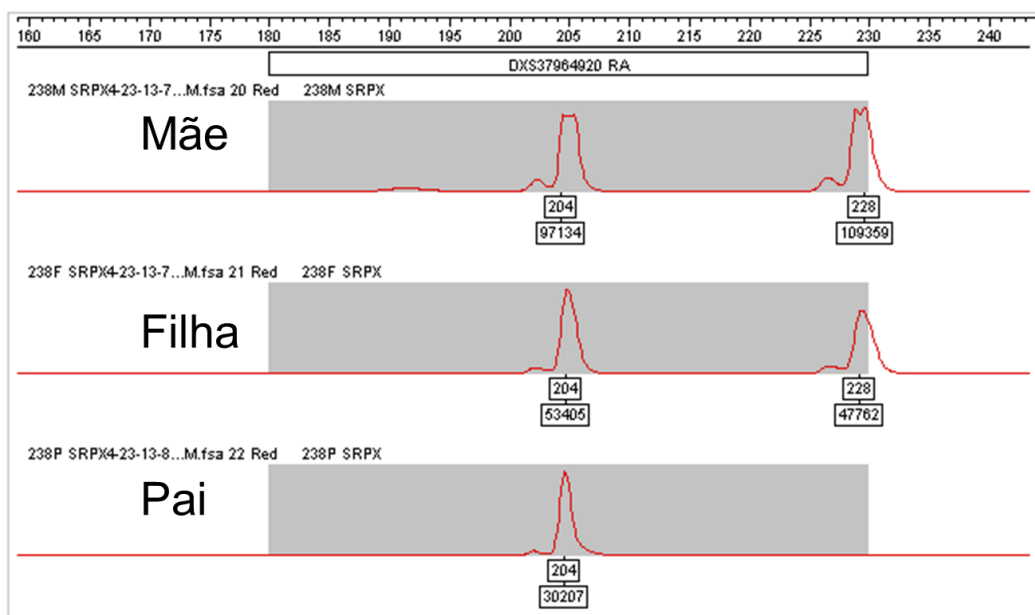
preferenciais. O padrão de ICX para as demais mulheres analisadas se mostrou de forma semelhante em todas as faixas etárias (Tabela 4).

**Tabela 4. Frequência de idade das Mães e Filhas.** A variação da idade das mães foi de 17 a 60 anos e das filhas de 0 a 40.

Idade Mães	Frequência das idades	Idade Filhas	Frequência das idades
17	0,15%	0	3,07%
19	0,30%	1	1,70%
20	0,15%	2	0,57%
21	0,91%	3	0,63%
22	0,30%	4	0,28%
23	0,30%	6	0,57%
24	0,45%	7	0,34%
25	0,61%	9	0,11%
27	0,15%	11	0,45%
28	0,45%	12	0,11%
29	0,61%	14	0,23%
30	0,45%	15	0,34%
31	0,45%	16	0,11%
32	0,91%	17	0,11%
34	0,45%	18	0,11%
35	0,45%	20	0,34%
36	0,30%	21	0,11%
37	0,15%	25	0,34%
38	0,15%	26	0,11%
39	0,45%	30	0,17%
40	0,30%	40	0,17%
41	0,30%		
43	0,15%		
44	0,15%		
47	0,15%		
48	0,15%		
49	0,15%		
52	0,15%		
57	0,15%		
60	0,15%		

#### 4.4. Expansão alélica do marcador *SRPX*

Neste estudo uma única família apresentou expansão no *locus SRPX*. Este núcleo familiar apresentou expansão de oito repetições CTG, transmitida de mãe para filha, passando de 201/204 para 204/228. Para confirmar a herança transgeracional foi genotipado a amostra do pai confirmando a expansão alélica herdada transgeracionalmente da mãe. No eletroferograma da figura 14 estão demonstrados os perfis alélicos da mãe, da filha e do pai, respectivamente.



**Figura 14. Eletoferograma representativo do núcleo familiar 238 para o ensaio triplex.** Para o marcador *SRPX* o genótipo da mãe é 204/228 e essa expansão transgeracional foi transmitida para a filha.

#### 4.5. Análise *in silico* da conservação evolutiva do sítio CTCF

Foram realizadas análises *in silico* para avaliar a importância evolutiva do sítio de ligação da proteína CTCF, que está associada ao processo de escolha do cromossomo X a ser inativado.

As sequências promotoras (800 pb *upstream* ao gene *XIST*) utilizadas para o alinhamento foram obtidas pelo banco de dados do UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>). As espécies *Homo sapiens*, *Oryctolagus cuniculus*, *Microtus arvalis* e *Mus musculus* foram escolhidas por possuírem a estrutura do gene *XIST* com um ancestral evolutivo próximo segundo análises comparativas da estrutura do *Xic* em primatas (Horvath *et al.*, 2011).

Neste alinhamento foi encontrado alguns pontos com grau de conservação moderado (50%), porém na sequência do sítio de ligação da CTCF foi encontrado um alto grau de conservação entre as espécies (90%), demonstrado na figura 15.



>gi|224589822:73072525-73072857 Homo sapiens chromosome X, GRCh37.p10  
 Primary Assembly

CCAGCCCCGAGAGAGTAAGAAATATGGCTGCAGCAG[C<T]GAATTGCAGCGCT	rs183361548
TTAAGAACTGAAGGGGG[C<G/A]GCTGA[G<A]GGCGGAGAGAGCATAAGAG	cr020388
GCGTGGCCTAGAAGATTGAAAGCCGGACATCTTTGTGATTGGTTGTTCAAAT	rs187705242
TTACCCAGTAAGGACAAAAAGGGAAATTTCAAGAAAGCAAAGACATACCAGAA	
AGAACATTAAGTGAAGTAGACTTCATTCTAGACCAGGAGTCACAACCTCAATG	
GGTTTTCCAGTTCTCATCTATAACATGGGGACATTGAG[G<A]TAATCAAGCAATA	rs192366030

**Figura 16. Sequência da região promotora do gene *XIST*.** Destacado em azul a mutação -43 C>G/A (rs187705242) encontrado no *The Human Gene Mutation Database*, destacado de vermelho o SNP rs183361548, em verde o SNP CR020388 e em roxo o SNP rs192366030, encontrados no banco de dados Ensembl.

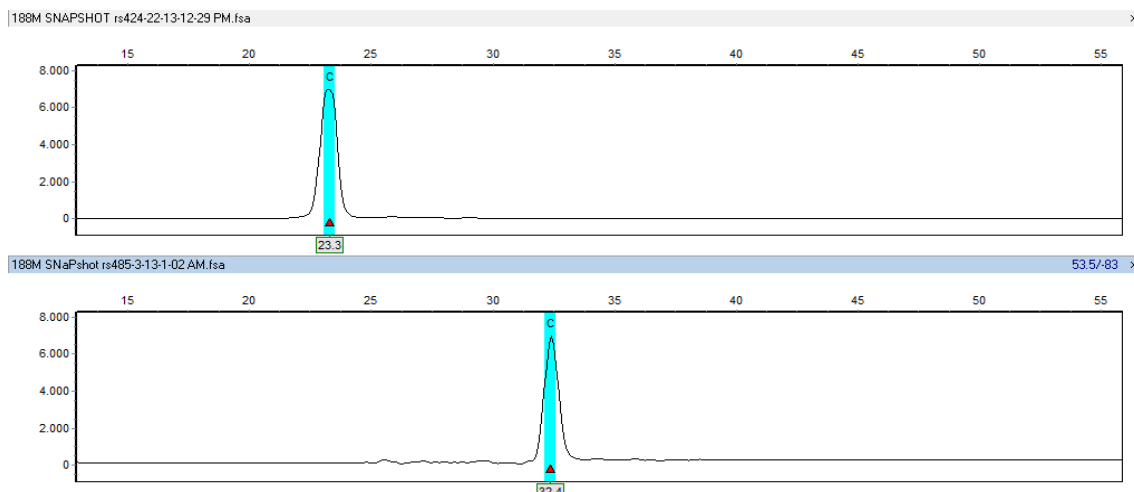
Foram escolhidas duas das quatro mutações encontradas *in silico* para pesquisas *in vitro*, as mutações -43 C>G/A (rs187705242) e a -6 C>G (rs183361548). Foram desenhados *primers* para amplificação da região promotora do *XIST* SNaPshot e *primers* de sequenciamento para as duas mutações.

A figura 17 esta demonstrado a sequência do produto de amplificação *in silico* dos iniciadores de amplificação utilizando o *iPCR* do *browser* da UCSC. Este programa mostra as regiões de amplificação com o par de iniciadores submetidos para análise.

>[chrX:73072526+73072905](#) 380 bp  
**CAGCCCCGAGAGAGTAAGAA**atattggctgcagcagcgaattgcagcgccttaagaactg  
 aagggggggctgagggcggagagagcataagagggcgtggcctagaagattgaaagccggacat  
 ctttgtgattggttggttcaaaatttaccagtaaggacaaaaaagggaaatttcaagaaagcaaaga  
 cataccagaaagaacattaactggaagtagacttcatttctagaccaggagtcacaacttcaatgggtt  
 ttccagttctcatctataacatggggacattgagtaaatcaagcaataattaatgctaaaatcctccataa  
 actgcataataaatgtaaagatgtaat**TCAGCTTGTTTTGAGAATGG**

**Figura 17. Sequência da região promotora do gene *XIST*.** Em azul, a localização física do marcador no genoma de referência NC\_000012. Em vermelho e verde, as sequências dos iniciadores sentido e antissentido, respectivamente. O *amplicon* possui um tamanho de 380pb. O programa utilizado foi o *iPCR* do *browser* da UCSC.

O resultado dos SNaPshots das 140 amostras foram analisados pelo programa GeneMarker 1,97, para as mutações rs187705242 e a rs183361548 todas as mulheres testadas apresentaram o alelo ancestral C, sem ocorrência de alelos variantes associados com inativação preferencial (G, A ou T), como demonstrado na figura 18.

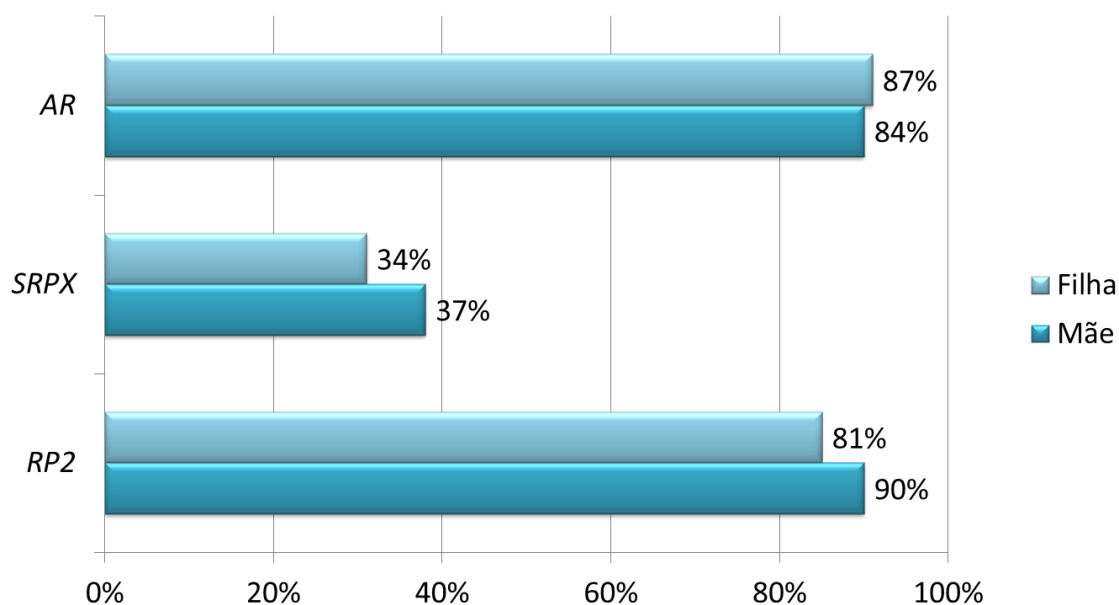


**Figura 18.** Eletroforese representativa do perfil alélico para os marcadores rs187705242 e a rs183361548, utilizando a técnica de SNaPshot. Em azul, o tamanho em pares de bases dos marcadores e o nucleotídeo esperado como normal na população.

## 4.7. Dados populacionais

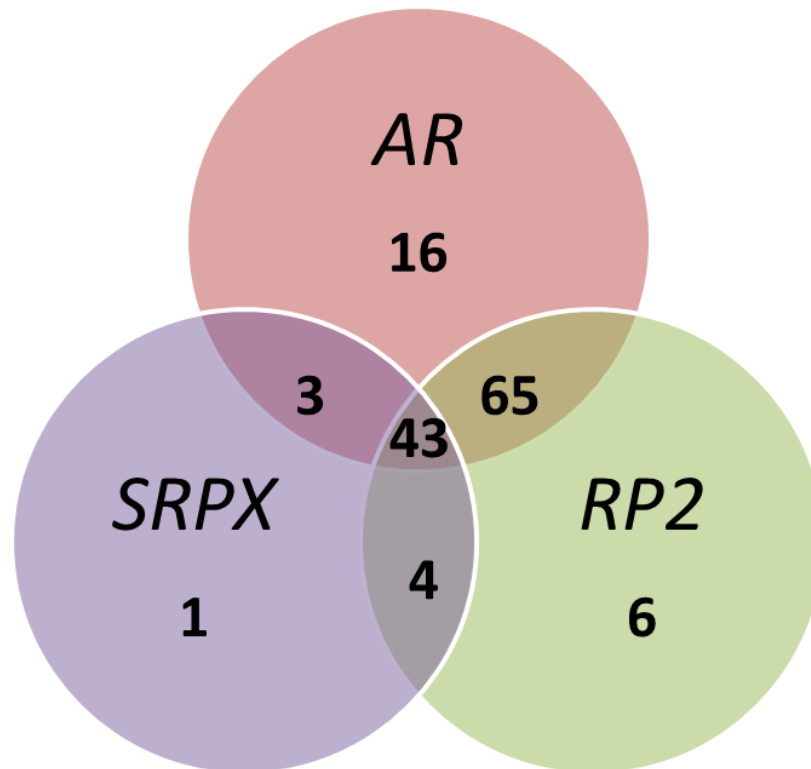
### 4.7.1. Taxas de heterozigose dos marcadores

Em um total de 140 amostras, o marcador para o polimorfismo  $(CAG)_n$  do gene *AR* apresentou taxa de heterozigose de 84% nas mães e 87% nas filhas. O marcador para o polimorfismo  $(CTG)_n$  do gene *SRPX*, apresentou taxa de heterozigose de 37% nas mães e 34% nas filhas. E o marcador para o polimorfismo  $(GAAA)_n$  do gene *RP2*, apresentou taxa de heterozigose de 90% nas mães e de 81% nas filhas (Figura 19).



**Figura 19.** Taxas de heterozigose para os marcadores *AR*, *SRPX* e *RP2*. Em azul claro as taxas de heterozigose das filhas e em azul escuro as taxas de heterozigose das mães.

Somente 2 (1.4%) das 140 amostras testadas foram homocigotas para os três marcadores. Das demais amostras, 43 se mostraram heterocigotas para os três marcadores (31%), 72 amostras heterocigotas para dois marcadores (51%) e 22 heterocigotas para um dos marcadores (16%), como esquematizado na Figura 20.



**Figura 20. Distribuição da informatividade para os marcadores AR, SRPX e RP2.** Em rosa o número de amostras heterocigotas para o marcador AR, em roxo as amostras heterocigotas para o marcador SRPX e em verde as amostras heterocigotas para o marcador RP2. Os pontos de interseção no conjuntos representam as amostras heterocigotas para dois ou três marcadores.

#### 4.7.2. Frequências alélicas para os marcadores AR, SRPX, RP2

Para o marcador AR foram observados 15 alelos nas mães e 14 nas filhas. A expansão alélica para o AR foi de 45 nt. E suas frequências alélicas variaram entre 0,07%-1,71%. Para o marcador do gene SRPX foram observados 3 alelos nas mães e nas filhas. A expansão alélica para o SRPX foi de 27 nt. Suas frequências alélicas variaram entre 0,07%-8,00%. E para o marcador do gene RP2 foram observados 13 alelos nas mães e nas filhas. A expansão alélica foi de 44 nt nas mães e nas filhas. As frequências alélicas do RP2 variaram entre 0,07%-2,14% (Tabela 5).

**Tabela 5. Frequência alélica dos marcadores AR, SRPX e RP2.** Frequência dos alelos das mães e filhas para os marcadores AR, SRPX e RP2.

<b>AR</b>			<b>AR</b>		
	Alelos			Alelos	
Mães	252	0,29	Filhas	252	0,21
	255	0,21		255	0,21
	258	0,43		258	0,36
	261	0,64		261	0,93
	264	0,79		264	0,50
	267	1,71		267	1,93
	270	1,64		270	1,43
	273	0,86		273	1,21
	276	1,29		276	0,71
	279	0,86		279	1,07
	282	0,57		282	0,50
	285	0,50		285	0,57
	288	0,07		288	0,21
	291	0,07		297	0,14
	297	0,07			
<b>SRPX</b>			<b>SRPX</b>		
	Alelos			Alelos	
Mães	201	1,93	Filhas	201	2,07
	204	8,00		204	7,86
	228	0,07		228	0,07
<b>RP2</b>			<b>RP2</b>		
	Alelos			Alelos	
Mães	350	0,21	Filhas	350	0,21
	354	0,07		354	0,21
	357	0,43		357	0,07
	361	0,93		361	0,71
	364	1,43		364	1,64
	368	1,79		368	1,29
	372	1,43		372	2,14
	376	2,14		376	1,71
	379	1,07		379	1,14
	383	0,14		383	0,29
	387	0,21		387	0,43
	391	0,07		391	0,07
	394	0,07		394	0,07



## 5. DISCUSSÃO

Os testes de ICX têm sido amplamente utilizados como ferramentas para identificar doenças genéticas ou como testes diagnósticos para detectar mulheres portadoras de doenças ligadas ao cromossomo X (Van Den Veyver, 2001).

Atualmente, o ensaio amplamente usado para avaliar a metilação diferencial entre o Xa e o Xi é o ensaio de HUMARA (Amos-Landgraf *et al.*, 2006). Porém, este teste não é informativo para todas as mulheres, além de ser um marcador com influência hormonal, sendo aconselhável o seu ensaio combinado com a utilização de outros marcadores que possam suplantar esse tipo de falha.

Neste trabalho foram interrogados os perfis pontuais de marcas epigenéticas de metilação utilizando 3 sistemas multialélicos: *AR*, *SRPX* e *RP2*, o que tornou possível determinar que o padrão de ICX nas mulheres da região de Campos dos Goytacazes é preferencialmente aleatório (51,4%). Foi possível determinar também que a ICX nessas mulheres ocorre independente da origem parental do Xi. Das 31 filhas com inativação preferencial do cromossomo X 17 apresentaram inativação preferencialmente materna e 14 filhas apresentaram inativação preferencialmente paterna.

Sabe-se que a inativação preferencial do cromossomo X paterno acontece em marsupiais. Em humanos, a ICX se dá de modo aleatório, como demonstrado neste e em outros estudos (Plenge *et al.*, 1997; Minks *et al.*, 2008; Morey e Avner, 2011).

Além da caracterização sobre o padrão de ICX nas mulheres da região, os resultados aqui apresentados revelam que o padrão de herança transgeracional no cromossomo X é heterogêneo, isto é, o cromossomo materno transmitido para a filha pode ou não manter o padrão materno de inativação.

A causa da Inativação preferencial do cromossomo X em mulheres normais não é conhecida. Acredita-se que o padrão extremo de inativação preferencial seja reflexo da influência genética no processo de inativação ou de uma seleção secundária contra um cromossomo X em particular (Migeon, 2007; Sullivan *et al.*, 2013).

Os padrões de inativação preferencial do cromossomo X, em que mais de 75% ou mais de 90% das células apresentam o mesmo cromossomo X ativo, são observados com maior frequência em mulheres idosas do que em jovens. Isto levou

muitos autores a concluírem que a inativação preferencial do cromossomo X pode ser adquirida com a idade avançada e que este fenômeno ocorreria principalmente após os 60 anos de idade (Busque *et al.*, 1996; Gale *et al.*, 1997; El Kassar *et al.*, 1998; Sharp *et al.*, 2000). Uma provável explicação para isto é a perda alelo-específica da metilação nos sítios *HpaII* associada à idade (Allen *et al.*, 1992). No presente trabalho, o padrão de ICX nas mulheres analisadas se mostrou de forma semelhante em todas as faixas etárias, o que concorda com o extensivo trabalho de Sandovici *et al.* (2004).

Dentre os resultados de inativação foram observados alguns valores discordantes para os três marcadores utilizados. Houve diferença entre as proporções de ICX esperada entre os marcadores. Os *loci* deveriam apresentar os mesmos padrões de inativação, entretanto os resultados observados mostram que em alguns casos ao menos um marcador apresenta um resultado discordante.

Diante dessas observações, levantou-se a hipótese de que a discordância dos resultados entre os marcadores se deveria ao formato do ensaio tríplex, pois nos formatos uniplex e biplex destes marcadores com poucas amostras não foi constatada tal discordância. Para saber se o formato tríplex poderia influenciar no resultado foi elaborado um ensaio uniplex com duas amostras que em triplex tinham apresentado essa diferença entre os marcadores. Neste ensaio foi observada uma leve inclinação do ensaio em uniplex para um perfil mais aleatório, isto é, mais próximo da razão 50:50. Isto significa que o ensaio em tríplex teria um desvio para perfis mais próximos do preferencial, isso explicaria o número elevado de mulheres com inativação levemente preferencial neste estudo.

Na primeira amostra o perfil de inativação em tríplex para os marcadores *AR*, *SRPX* e *RP2*, respectivamente, eram de: 48%, 37% e 35%, já os perfis em uniplex foram: 51%, 40% e 44%. Na segunda amostra os perfis em triplex foram: 31%, 55% e 22%, e em uniplex foram: 35%, 57% e 30%. Portanto, não pode ser descartada a hipótese de que estes resultados controversos possam ser devido ao fato de que a análise foi realizada utilizando o ensaio no formato triplex.

Também não podem ser descartadas as influências do ambiente genômico onde esses marcadores se encontram, como por exemplo: o tamanho da repetição, polimorfismos em sítios de ligação de fatores de transcrição e mesmo as

combinações em *cluster* com outros genes inativados, que poderiam contribuir para essa discordância intracromossômica.

A mutação -43C>G/A na região promotora do *XIST* foi originalmente associada com a inativação preferencial do cromossomo X em duas famílias não relacionadas (Plenge *et al.*, 1997). Nesse estudo, os cromossomos X que carregavam o alelo G estavam preferencialmente inativos enquanto àqueles com o alelo A estavam preferencialmente ativos. Em uma tentativa de confirmar esta associação, no presente estudo foram interrogadas as mutações -43 C>G/A (rs187705242) e a -6 C>T (rs183361548) nas amostras de mulheres já caracterizadas com o seu padrão de ICX. Nenhuma das 140 mulheres analisadas apresentou o alelo associado com inativação preferencial. Esses dados estão de acordo com os estudos publicados por Pereira e Zatz, (1999) que também investigaram a mutação -43 C>G/A no gene *XIST* em mulheres brasileiras, mas também não encontram essas variantes.

A taxa de informatividade combinada dos marcadores *AR*, *SRPX* e *RP2* foi 98,6% (n=140), sendo que 2 amostras foram homocigotas para os 3 marcadores. Das demais amostras, 43 se mostraram heterocigotas para os três marcadores (31%), 70 amostras heterocigotas para dois marcadores (50%) e 23 heterocigotas para um dos marcadores (17%).

As taxas de heterocigose em mães e filhas para os *loci AR*, *SRPX* e *RP2* foram 0,84/0,87, 0,37/0,34 e 0,90/0,81, respectivamente. Esses dados concordam com as taxas de heterocigoses esperadas e com as taxas de heterocigoses para o *AR* em outros estudos (Allen *et al.*, 1992; Kaupert *et al.*, 2010; Bertelsen *et al.*, 2012; Gentilini *et al.*, 2012; Jobanputra *et al.*, 2012; Manoukian *et al.*, 2012; Mossner *et al.*, 2013).

Para o *locus AR* foram observados 15 alelos nas mães e 14 nas filhas suas frequências alélicas variaram de 0,07%-2,03%. Para o *locus SRPX* foram observados 3 alelos nas mães e nas filhas e suas frequências alélicas variaram de 0,09%-0,82%. No *locus RP2*, foram observados 13 alelos nas mães e nas filhas e suas frequências alélicas variaram de 0,08%-2,27%.

Ainda sobre o *locus SRPX*, um dos alelos é raro. Esse corresponde a uma expansão de 27nt pela primeira vez observada, conferindo o genótipo 204/228 para mãe e filha de uma das famílias genotipadas. Por que esse *locus* tem poucos

alelos? Este fato pode estar associado ao papel de supressor tumoral do gene *SRPX*, no sentido que outras expansões teriam um efeito na sua expressão. O alelo 228 é uma expansão alélica transgeracional, pois após a tipagem do trio foi constatado que esse alelo 228 foi transmitido da mãe para a filha mantendo o padrão levemente preferencial do Xi materno. O possível efeito das expansões do *locus* (CTG)<sub>n</sub> na expressão do gene *SRPX* e na susceptibilidade genética a tumores merece um estudo separado.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que:

- O padrão de inativação do cromossomo X nas mulheres da região de Campos dos Goytacazes é, em sua maioria, aleatório;
- Os padrões de inativação do cromossomo X (aleatório ou preferencial) em mulheres da região de campos dos Goytacazes são semelhantes à relatada em outros estudos da literatura científica;
- O uso do ensaio de DESM-QFPCR em tríplex pode influenciar nos resultados de análise da porcentagem de metilação do DNA entre os marcadores;
- O padrão de herança transgeracional no cromossomo X nas mulheres analisadas ocorre independente da origem parental (herança do Xm ou Xp);
- O padrão de ICX nas mulheres analisadas se mostrou de forma semelhante em todas as faixas etárias;
- Não foram identificadas mutações (rs187705242 e rs183361548) associadas ao promotor do gene *XIST* humano na população estudada, o que nos casos de inativação preferencial apontam para uma causa possivelmente não associada às mutações.

## 7. REFERÊNCIAS

Abkowitz, J. L., Hume, H., *et al.* Stem cell factor serum levels may not be clinically relevant. Blood, v.87, n.9, May 1, p.4017-8. 1996.

Allen, R. C., Zoghbi, H. Y., *et al.* 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, n.6, p.1229-39. 1992.

Alves Da Silva, A. F. Recombinação em 21q dificulta a determinação da origem meiótica da não disjunção em portadores da Síndrome de Down. (Monografia de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia)). Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2007. 63 p.

Amos-Landgraf, J. M., Cottle, A., *et al.* X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. Am J Hum Genet, v.79, n.3, p.493-9. 2006.

Anderson, C. L. e Brown, C. J. Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. Am J Hum Genet, v.65, n.3, p.699-708. 1999.

Araujo, A. e Ramos, E. S. Cryptic mosaicism involving a second chromosome X in patients with Turner syndrome. Braz J Med Biol Res, v.41, n.5, p.368-72. 2008.

Avner, P. e Heard, E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. Nat Rev Genet, v.2, n.1, p.59-67. 2001.

Bacher, C. P., Guggiari, M., *et al.* Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. Nat Cell Biol, v.8, n.3, p.293-9. 2006.

Bagislar, S., Ustuner, I., *et al.* Extremely skewed X-chromosome inactivation patterns in women with recurrent spontaneous abortion. Aust N Z J Obstet Gynaecol, v.46, n.5, p.384-7. 2006.

Ballabio, A. e Willard, H. F. Mammalian X-chromosome inactivation and the XIST gene. Curr Opin Genet Dev, v.2, n.3, p.439-47. 1992.

Barr, M. L. e Bertram, E. G. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. Nature, v.163, n.4148, 30, p.676. 1949.

Barski, A., Cuddapah, S., *et al.* High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell, v.129, n.4, 18, p.823-37. 2007.

Baumann, C. e De La Fuente, R. ATRX marks the inactive X chromosome (Xi) in somatic cells and during imprinted X chromosome inactivation in trophoblast stem cells. Chromosoma, v.118, n.2, p.209-22. 2009.

Beilin, J., Ball, E. M., *et al.* Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. J Mol Endocrinol, v.25, n.1, p.85-96. 2000.

Bell, A. C. e Felsenfeld, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. Nature, v.405, n.6785, 25, p.482-5. 2000.

Berletch, J. B., Yang, F., *et al.* Genes that escape from X inactivation. Hum Genet, v.130, n.2, p.237-45. 2011.

Berson, E. L. Retinitis pigmentosa: unfolding its mystery. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.10, 14, p.4526-8. 1996.

Bertelsen, B., Tumer, Z., *et al.* Three new loci for determining x chromosome inactivation patterns. J Mol Diagn, v.13, n.5, p.537-40. 2011.

Bertelsen, B., Tumer, Z., *et al.* Three new loci for determining x chromosome inactivation patterns. J Mol Diagn, v.13, n.5, p.537-40. 2012.

Beutler, E., Yeh, M., *et al.* The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: studies using the gene for C-6-PD-deficiency as a marker. Proc Natl Acad Sci U S A, v.48, 15, p.9-16. 1962.

Bird, A. C. X-linked retinitis pigmentosa. Br J Ophthalmol, v.59, n.4, p.177-99. 1975.

Bittel, D. C., Theodoro, M. F., *et al.* Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. J Med Genet, v.45, n.5, p.309-13. 2008.

Boumil, R. M. e Lee, J. T. Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. Hum Mol Genet, v.10, n.20, 1, p.2225-32. 2001.

Boumil, R. M., Ogawa, Y., *et al.* Differential methylation of Xite and CTCF sites in Tsix mirrors the pattern of X-inactivation choice in mice. Mol Cell Biol, v.26, n.6, p.2109-17. 2006.

Bretherick, K., Gair, J., *et al.* The association of skewed X chromosome inactivation with aneuploidy in humans. Cytogenet Genome Res, v.111, n.3-4, p.260-5. 2005.

Brockdorff, N. Chromosome silencing mechanisms in X-chromosome inactivation: unknown unknowns. Development, v.138, n.23, p.5057-65. 2011.

Brockdorff, N., Ashworth, A., *et al.* The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. Cell, v.71, n.3, 30, p.515-26. 1992.

Brooke, G. N. e Bevan, C. L. The role of androgen receptor mutations in prostate cancer progression. Curr Genomics, v.10, n.1, p.18-25. 2009.

Brown, C. J., Lafreniere, R. G., *et al.* Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. Nature, v.349, n.6304, 3, p.82-4. 1991.

Brown, C. J. e Robinson, W. P. XIST expression and X-chromosome inactivation in human preimplantation embryos. Am J Hum Genet, v.61, n.1, p.5-8. 1997.

Brown, C. J. e Willard, H. F. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. Nature, v.368, n.6467, 10, p.154-6. 1994.

Burnicka-Turek, O., Kata, A., *et al.* Pelota interacts with HAX1, EIF3G and SRPX and the resulting protein complexes are associated with the actin cytoskeleton. BMC Cell Biol, v.11, p.28. 2011.

Busque, L., Mio, R., *et al.* Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. Blood, v.88, n.1, 1, p.59-65. 1996.

Busque, L., Paquette, Y., *et al.* Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. Blood, v.113, n.15, 9, p.3472-4. 2009.

Butler, J. M. Constructing STR multiplex assays. Methods Mol Biol, v.297, p.53-66. 2005.

Callewaert, L., Christiaens, V., *et al.* Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. Biochem Biophys Res Commun, v.306, n.1, 20, p.46-52. 2003.

Carrel, L. e Willard, H. F. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.13, 22, p.7364-9. 1999.

Carrel, L. e Willard, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. Nature, v.434, n.7031, 17, p.400-4. 2005.

Chabchoub, G., Uz, E., *et al.* Analysis of skewed X-chromosome inactivation in females with rheumatoid arthritis and autoimmune thyroid diseases. Arthritis Res Ther, v.11, n.4, p.R106. 2009.

Chambers, G. K. e Macavoy, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, v.126, n.4, p.455-76. 2000.

Chao, W., Huynh, K. D., *et al.* CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. Science, v.295, n.5553, 11, p.345-7. 2002.

Chapple, J. P., Hardcastle, A. J., *et al.* Mutations in the N-terminus of the X-linked retinitis pigmentosa protein RP2 interfere with the normal targeting of the protein to the plasma membrane. Hum Mol Genet, v.9, n.13, 12, p.1919-26. 2000.



Choong, C. S., Kemppainen, J. A., *et al.* Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. Mol Endocrinol, v.10, n.12, p.1527-35. 1996.

Chow, J. C., Yen, Z., *et al.* Silencing of the mammalian X chromosome. Annu Rev Genomics Hum Genet, v.6, p.69-92. 2005.

Clerc, P. e Avner, P. Role of the region 3' to Xist exon 6 in the counting process of X-chromosome inactivation. Nat Genet, v.19, n.3, p.249-53. 1998.

Clerc, P. e Avner, P. Random X-chromosome inactivation: skewing lessons for mice and men. Curr Opin Genet Dev, v.16, n.3, p.246-53. 2006.

Clerc, P. e Avner, P. New lessons from random X-chromosome inactivation in the mouse. J Mol Biol, v.409, n.1, 27, p.62-9. 2011.

Cooper, D. N. Lionizing lyonization 50 years on. Hum Genet, v.130, n.2, p.167-8. 2011.

Cooper, D. W., Vandenberg, J. L., *et al.* Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. Nat New Biol, v.230, n.13, 31, p.155-7. 1971.

Courtier, B., Heard, E., *et al.* Xce haplotypes show modified methylation in a region of the active X chromosome lying 3' to Xist. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.8, 11, p.3531-5. 1995.

Csankovszki, G. Condensin function in dosage compensation. Epigenetics, v.4, n.4, 16, p.212-5. 2009.

Csankovszki, G., Nagy, A., *et al.* Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. J Cell Biol, v.153, n.4, 14, p.773-84. 2001.

Csankovszki, G., Panning, B., *et al.* Conditional deletion of Xist disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation. Nat Genet, v.22, n.4, p.323-4. 1999.

Cuddapah, S., Jothi, R., *et al.* Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. Genome Res, v.19, n.1, p.24-32. 2009.

Dehm, S. M. e Tindall, D. J. Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. Mol Endocrinol, v.21, n.12, p.2855-63. 2007.

Desai, V., Donsante, A., *et al.* Favorably skewed X-inactivation accounts for neurological sparing in female carriers of Menkes disease. Clin Genet, v.79, n.2, p.176-82. 2008.

Diamandis, E. P., Sidransky, D., *et al.* Epigenomics-based diagnostics. Clin Chem, v.56, n.8, p.1216-9. 2012.

Ding, D., Xu, L., *et al.* Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. Prostate, v.58, n.1, 1, p.23-32. 2004.

Ding, D., Xu, L., *et al.* Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. Prostate, v.62, n.2, 1, p.133-9. 2005.

Disteche, C. M. Escapees on the X chromosome. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.25, 7, p.14180-2. 1999.

Dry, K. L., Aldred, M. A., *et al.* Identification of a novel gene, ETX1 from Xp21.1, a candidate gene for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). Hum Mol Genet, v.4, n.12, p.2347-53. 1995a.

Dry, K. L., Aldred, M. A., *et al.* Identification of a novel gene, ETX1 from Xp21.1, a candidate gene for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). Hum Mol Genet, v.4, n.12, p.2347-53. 1995b.

Edwards, A., Civitello, A., *et al.* DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet, v.49, n.4, p.746-56. 1991.

El Kassar, N., Hetet, G., *et al.* X-chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms. Clin Chem, v.44, n.1, p.61-7. 1998.

Ellegren, H. Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. Nat Rev Genet, v.12, n.3, p.157-66. 2011.

Erwin, J. A. e Lee, J. T. New twists in X-chromosome inactivation. Curr Opin Cell Biol, v.20, n.3, p.349-55. 2008.

Evans, R. J., Hardcastle, A. J., *et al.* Focus on molecules: X-linked Retinitis Pigmentosa 2 protein, RP2. Exp Eye Res, v.82, n.4, p.543-4. 2006.

Evans, R. J., Schwarz, N., *et al.* The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. Hum Mol Genet, v.19, n.7, 1, p.1358-67. 2010.

Fan, H. e Chu, J. Y. A brief review of short tandem repeat mutation. Genomics Proteomics Bioinformatics, v.5, n.1, p.7-14. 2007.

Fang, F., Hodges, E., *et al.* Genomic landscape of human allele-specific DNA methylation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.109, n.19, 8, p.7332-7. 2012.

Ferlin, A., Bartoloni, L., *et al.* Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility. Mol Hum Reprod, v.10, n.6, p.417-21. 2004.

Filippova, G. N., Fagerlie, S., *et al.* An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. Mol Cell Biol, v.16, n.6, p.2802-13. 1996.

Filippova, G. N., Lindblom, A., *et al.* A widely expressed transcription factor with multiple DNA sequence specificity, CTCF, is localized at chromosome segment 16q22.1 within one of the smallest regions of overlap for common deletions in breast and prostate cancers. Genes Chromosomes Cancer, v.22, n.1, p.26-36. 1998.

Frackman, S., Kobs, G., *et al.* Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. Promega Notes. Promega Corporation., v.65, p.27-30. 1998.

Frommer, M., McDonald, L. E., *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.5, 1, p.1827-31. 1992.

Gale, R. E., Fielding, A. K., *et al.* Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. Br J Haematol, v.98, n.3, p.512-9. 1997.

Garcia-Gimenez, J. L., Sanchis-Gomar, F., *et al.* Epigenetic biomarkers: A new perspective in laboratory diagnostics. Clin Chim Acta, v.413, n.19-20, 9, p.1576-82. 2012.

Gentilini, D., Castaldi, D., *et al.* Age dependent Skewing of X Chromosome Inactivation appears delayed in Centenarians' offspring. Is there a role for allelic imbalance in Healthy Aging and Longevity? Aging Cell, 31. 2012.

Goldberg, A. D., Allis, C. D., *et al.* Epigenetics: a landscape takes shape. Cell, v.128, n.4, 23, p.635-8. 2007.

Goll, M. G. e Bestor, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. Annu Rev Biochem, v.74, p.481-514. 2005.

Gong, X., Bacchelli, E., *et al.* Analysis of X chromosome inactivation in autism spectrum disorders. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, v.147B, n.6, 5, p.830-5. 2008.

Harper, P. S. Mary Lyon and the hypothesis of random X chromosome inactivation. Hum Genet, v.130, n.2, p.169-74. 2011.

Hatakeyama, C., Anderson, C. L., *et al.* The dynamics of X-inactivation skewing as women age. Clin Genet, v.66, n.4, p.327-32. 2004.

Heard, E. Recent advances in X-chromosome inactivation. Curr Opin Cell Biol, v.16, n.3, p.247-55. 2004.

Heard, E. e Disteche, C. M. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. Genes Dev, v.20, n.14, 15, p.1848-67. 2006.

Heard, E., Mongelard, F., *et al.* Human XIST yeast artificial chromosome transgenes show partial X inactivation center function in mouse embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.12, 8, p.6841-6. 1999.

Heard, E., Rougeulle, C., *et al.* Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. Cell, v.107, n.6, 14, p.727-38. 2001.

Hiort, O., Holterhus, P. M., *et al.* Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. J Clin Endocrinol Metab, v.85, n.8, p.2810-5. 2000.

Holopainen, J. M., Cheng, C. L., *et al.* Interaction and localization of the retinitis pigmentosa protein RP2 and NSF in retinal photoreceptor cells. Biochemistry, v.49, n.35, 7, p.7439-47. 2010.

Horvath, J. E., Sheedy, C. B., *et al.* Comparative analysis of the primate X-inactivation center region and reconstruction of the ancestral primate XIST locus. Genome Res, v.21, n.6, p.850-62. 2011.

Iragavarapu, S., Algeciras, M. E., *et al.* ETX1 is over-expressed in the glaucomatous trabecular meshwork. Mol Vis, v.15, p.2061-7. 2009.

Jaenisch, R. e Bird, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet, v.33 Suppl, p.245-54. 2003.

Jayasundera, T., Branham, K. E., *et al.* RP2 phenotype and pathogenetic correlations in X-linked retinitis pigmentosa. Arch Ophthalmol, v.128, n.7, p.915-23. 2010.

Jenuwein, T. e Allis, C. D. Translating the histone code. Science, v.293, n.5532, 10, p.1074-80. 2001.

Jiang, J., Jing, Y., *et al.* Translating dosage compensation to trisomy 21. Nature, 17. 2013.

Jiang, Y. H., Fang, P., *et al.* Molecular characterization of co-occurring Duchenne muscular dystrophy and X-linked oculo-facio-cardio-dental syndrome in a girl. Am J Med Genet A, v.149A, n.6, p.1249-52. 2009.

Jobanputra, V., Levy, B., *et al.* Copy number changes on the X chromosome in women with and without highly skewed X-chromosome inactivation. Cytogenet Genome Res, v.136, n.4, p.264-9. 2012.

Kaare, M., Painter, J. N., *et al.* Sex chromosome characteristics and recurrent miscarriage. Fertil Steril, v.90, n.6, p.2328-33. 2008.

Kaupert, L. C., Billerbeck, A. E., *et al.* Could the leukocyte x chromosome inactivation pattern be extrapolated to hair bulbs? Horm Res Paediatr, v.73, n.4, p.238-43. 2010.

Kim, T. H., Abdullaev, Z. K., *et al.* Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. Cell, v.128, n.6, 23, p.1231-45. 2007.

Kimura, S., Matsumoto, T., *et al.* Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. Trends Endocrinol Metab, v.18, n.5, p.183-9. 2007.

Knudsen, G. P., Neilson, T. C., *et al.* Increased skewing of X chromosome inactivation in Rett syndrome patients and their mothers. Eur J Hum Genet, v.14, n.11, p.1189-94. 2006.

Kristiansen, M., Langerod, A., *et al.* High frequency of skewed X inactivation in young breast cancer patients. J Med Genet, v.39, n.1, p.30-3. 2002.

Laird, P. W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. Nat Rev Genet, v.11, n.3, p.191-203. 2011.

Latham, K. E. X chromosome imprinting and inactivation in preimplantation mammalian embryos. Trends Genet, v.21, n.2, p.120-7. 2005.

Leclercq, S., Rivals, E., *et al.* Detecting microsatellites within genomes: significant variation among algorithms. BMC Bioinformatics, v.8, p.125. 2007.

Lee, J. T. Molecular links between X-inactivation and autosomal imprinting: X-inactivation as a driving force for the evolution of imprinting? Curr Biol, v.13, n.6, 18, p.R242-54. 2003.

Lorincz, M. C. e Groudine, M. C(m)C(a/t)GG methylation: a new epigenetic mark in mammalian DNA? Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.18, 28, p.10034-6. 2001.

Lose, F., Duffy, D. L., *et al.* Skewed X chromosome inactivation and breast and ovarian cancer status: evidence for X-linked modifiers of BRCA1. J Natl Cancer Inst, v.100, n.21, 5, p.1519-29. 2008.

Lubahn, D. B., Joseph, D. R., *et al.* The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. Mol Endocrinol, v.2, n.12, p.1265-75. 1988.

Luikenhuis, S., Wutz, A., *et al.* Antisense transcription through the Xist locus mediates Tsix function in embryonic stem cells. Mol Cell Biol, v.21, n.24, p.8512-20. 2001.

Luke, M. C. e Coffey, D. S. Human androgen receptor binding to the androgen response element of prostate specific antigen. J Androl, v.15, n.1, p.41-51. 1994.

Lyon, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). Nature, v.190, 22, p.372-3. 1961.

Lyon, M. F. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. Am J Hum Genet, v.14, p.135-48. 1962.

Lyon, M. F. X-chromosome inactivation and human genetic disease. Acta Paediatr Suppl, v.91, n.439, p.107-12. 2002.

Lyon, M. F. No longer 'all-or-none'. Eur J Hum Genet, v.13, n.7, p.796-7. 2005.

Manoukian, S., Verderio, P., *et al.* X chromosome inactivation pattern in BRCA gene mutation carriers. Eur J Cancer, v.49, n.5, p.1136-41. 2012.

Medvedeva, Y. A., Fridman, M. V., *et al.* Intergenic, gene terminal, and intragenic CpG islands in the human genome. BMC Genomics, v.11, p.48. 2012.

Meindl, A., Carvalho, M. R., *et al.* A gene (SRPX) encoding a sushi-repeat-containing protein is deleted in patients with X-linked retinitis pigmentosa. Hum Mol Genet, v.4, n.12, p.2339-46. 1995.

Migeon, B. R. The role of X inactivation and cellular mosaicism in women's health and sex-specific diseases. Jama, v.295, n.12, 22, p.1428-33. 2006.

Migeon, B. R. Why females are mosaics, X-chromosome inactivation, and sex differences in disease. Gend Med, v.4, n.2, p.97-105. 2007.

Migeon, B. R. The single active X in human cells: evolutionary tinkering personified. Hum Genet, v.130, n.2, p.281-93. 2011.

Migeon, B. R. e Kennedy, J. F. Evidence for the inactivation of an X chromosome early in the development of the human female. Am J Hum Genet, v.27, n.2, p.233-9. 1975.

Minks, J., Robinson, W. P., *et al.* A skewed view of X chromosome inactivation. J Clin Invest, v.118, n.1, p.20-3. 2008.

Monk, M. e Harper, M. I. Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. Nature, v.281, n.5729, 27, p.311-3. 1979.

Morey, C. e Avner, P. The demoiselle of X-inactivation: 50 years old and as trendy and mesmerising as ever. PLoS Genet, v.7, n.7, p.e1002212. 2011.

Mossner, M., Nolte, F., *et al.* Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay. J Med Genet, v.50, n.2, p.108-17. 2013.

Navarro, P., Page, D. R., *et al.* Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program. Genes Dev, v.20, n.20, 15, p.2787-92. 2006.

Nelson, W. G., Yegnasubramanian, S., *et al.* Abnormal DNA methylation, epigenetics, and prostate cancer. Front Biosci, v.12, p.4254-66. 2007.

Ogawa, Y. e Lee, J. T. Xite, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. Mol Cell, v.11, n.3, p.731-43. 2003.

Ohhata, T., Hoki, Y., *et al.* Crucial role of antisense transcription across the Xist promoter in Tsix-mediated Xist chromatin modification. Development, v.135, n.2, p.227-35. 2008.

Ohno, S. e Hauschka, T. S. Allocycl of the X-chromosome in tumors and normal tissues. Cancer Res, v.20, p.541-5. 1960.

Ohno, S., Kaplan, W. D., *et al.* Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. Exp Cell Res, v.18, p.415-8. 1959.

Okumura, K., Fujimori, Y., *et al.* Skewed X chromosome inactivation in fraternal female twins results in moderately severe and mild haemophilia B. Haemophilia, v.14, n.5, p.1088-93. 2008.

Orstavik, K. H. X chromosome inactivation in clinical practice. Hum Genet, v.126, n.3, p.363-73. 2009.

Ozbalkan, Z., Bagislar, S., *et al.* Skewed X chromosome inactivation in blood cells of women with scleroderma. Arthritis Rheum, v.52, n.5, p.1564-70. 2005.

Palazzolo, I., Gliozzi, A., *et al.* The role of the polyglutamine tract in androgen receptor. J Steroid Biochem Mol Biol, v.108, n.3-5, p.245-53. 2008.

Pan, J., Nakanishi, K., *et al.* Isolation of a novel gene down-regulated by v-src. FEBS Lett, v.383, n.1-2, 25, p.21-5. 1996.

Patil, S. B., Hurd, T. W., *et al.* Functional analysis of retinitis pigmentosa 2 (RP2) protein reveals variable pathogenic potential of disease-associated missense variants. PLoS One, v.6, n.6, p.e21379. 2011.

Payer, B. e Lee, J. T. X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. Annu Rev Genet, v.42, p.733-72. 2008.

Penny, G. D., Kay, G. F., *et al.* Requirement for Xist in X chromosome inactivation. Nature, v.379, n.6561, 11, p.131-7. 1996.

Pereira, L. V. e Zatz, M. Screening of the C43G mutation in the promoter region of the XIST gene in females with highly skewed X-chromosome inactivation. Am J Med Genet, v.87, n.1, 5, p.86-7. 1999.

Phillips, J. E. e Corces, V. G. CTCF: master weaver of the genome. Cell, v.137, n.7, 26, p.1194-211. 2009.

Plenge, R. M., Hendrich, B. D., *et al.* A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. Nat Genet, v.17, n.3, p.353-6. 1997.

Pontier, D. B. e Gribnau, J. Xist regulation and function explored. Hum Genet, v.130, n.2, p.223-36. 2012.

Pugacheva, E. M., Tiwari, V. K., *et al.* Familial cases of point mutations in the XIST promoter reveal a correlation between CTCF binding and pre-emptive choices of X chromosome inactivation. Hum Mol Genet, v.14, n.7, 1, p.953-65. 2005.

Pumpernik, D., Oblak, B., *et al.* Replication slippage versus point mutation rates in short tandem repeats of the human genome. Mol Genet Genomics, v.279, n.1, p.53-61. 2008.

Rack, K. A., Chelly, J., *et al.* Absence of the XIST gene from late-replicating isodicentric X chromosomes in leukaemia. Hum Mol Genet, v.3, n.7, p.1053-9. 1994.

Rastan, S. e Cattanach, B. M. Interaction between the Xce locus and imprinting of the paternal X chromosome in mouse yolk-sac endoderm. Nature, v.303, n.5918, 16-22, p.635-7. 1983.

Recillas-Targa, F., De La Rosa-Velazquez, I. A., *et al.* Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. J Cell Mol Med, v.10, n.3, p.554-68. 2006.

Reid, J., Betney, R., *et al.* The androgen receptor transactivation domain: the interplay between protein conformation and protein-protein interactions. Biochem Soc Trans, v.31, n.Pt 5, p.1042-6. 2003.

Robinson-Rechavi, M., Escriva Garcia, H., *et al.* The nuclear receptor superfamily. J Cell Sci, v.116, n.Pt 4, 15, p.585-6. 2003.

Ross, M. T., Grafham, D. V., *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. Nature, v.434, n.7031, 17, p.325-37. 2005.

Rupert, J. L., Brown, C. J., *et al.* Direct detection of non-random X chromosome inactivation by use of a transcribed polymorphism in the XIST gene. Eur J Hum Genet, v.3, n.6, p.333-43. 1995.

Sandovici, I., Naumova, A. K., *et al.* A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females. Hum Genet, v.115, n.5, p.387-92. 2004.

Schwahn, U., Lenzner, S., *et al.* Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. Nat Genet, v.19, n.4, p.327-32. 1998.



Schwarz, N., Novoselova, T. V., *et al.* The X-linked retinitis pigmentosa protein RP2 facilitates G protein traffic. Hum Mol Genet, v.21, n.4, 15, p.863-73. 2011.

Senner, C. E. e Brockdorff, N. Xist gene regulation at the onset of X inactivation. Curr Opin Genet Dev, v.19, n.2, p.122-6. 2009.

Sharman, G. B. Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. Nature, v.230, n.5291, 26, p.231-2. 1971.

Sharp, A., Robinson, D., *et al.* Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. Hum Genet, v.107, n.4, p.343-9. 2000.

Shimakage, M., Takami, K., *et al.* Expression of drs mRNA in human lung adenocarcinomas. Hum Pathol, v.33, n.6, p.615-9. 2002.

Shinde, D., Lai, Y., *et al.* Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)<sub>n</sub> and (A/T)<sub>n</sub> microsatellites. Nucleic Acids Res, v.31, n.3, 1, p.974-80. 2003.

Stavropoulos, N., Lu, N., *et al.* A functional role for Tsix transcription in blocking Xist RNA accumulation but not in X-chromosome choice. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.18, 28, p.10232-7. 2001.

Sullivan, C. T., Christian, S. L., *et al.* X Chromosome-Inactivation Patterns in 31 Individuals with PHACE Syndrome. Mol Syndromol, v.4, n.3, p.114-8. 2013.

Suzuki, M. M. e Bird, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. Nat Rev Genet, v.9, n.6, p.465-76. 2008.

Swierczek, S. I., Piterkova, L., *et al.* Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. Blood, v.119, n.13, 29, p.e100-9. 2012.

Takagi, N. e Sasaki, M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. Nature, v.256, n.5519, 21, p.640-2. 1975.

Tambe, Y., Isono, T., *et al.* A novel apoptotic pathway induced by the drs tumor suppressor gene. Oncogene, v.23, n.17, 15, p.2977-87. 2004.

Tambe, Y., Yoshioka-Yamashita, A., *et al.* Tumor prone phenotype of mice deficient in a novel apoptosis-inducing gene, drs. Carcinogenesis, v.28, n.4, p.777-84. 2007.

Tattermusch, A. e Brockdorff, N. A scaffold for X chromosome inactivation. Hum Genet, v.130, n.2, p.247-53. 2011.

Thurston, A., Lucas, E. S., *et al.* Region-specific DNA methylation in the preimplantation embryo as a target for genomic plasticity. Theriogenology, v.68 Suppl 1, 1, p.S98-106. 2007.

Tsuchiya, K. D. e Willard, H. F. Chromosomal domains and escape from X inactivation: comparative X inactivation analysis in mouse and human. Mamm Genome, v.11, n.10, p.849-54. 2000.

Turan, N., Katari, S., *et al.* Explaining inter-individual variability in phenotype: is epigenetics up to the challenge? Epigenetics, v.5, n.1, 1, p.16-9. 2011.

Uz, E., Dolen, I., *et al.* Extremely skewed X-chromosome inactivation is increased in pre-eclampsia. Hum Genet, v.121, n.1, p.101-5. 2007.

Van Den Veyver, I. B. Skewed X inactivation in X-linked disorders. Semin Reprod Med, v.19, n.2, p.183-91. 2001.

Veltel, S., Gasper, R., *et al.* The retinitis pigmentosa 2 gene product is a GTPase-activating protein for Arf-like 3. Nat Struct Mol Biol, v.15, n.4, p.373-80. 2008.

Wilson, I. M., Davies, J. J., *et al.* Epigenomics: mapping the methylome. Cell Cycle, v.5, n.2, p.155-8. 2006.

Xu, N., Tsai, C. L., *et al.* Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. Science, v.311, n.5764, 24, p.1149-52. 2006.

Yan, W. e Mccarrey, J. R. Sex chromosome inactivation in the male. Epigenetics, v.4, n.7, 1, p.452-6. 2009.

Yorifuji, T., Muroi, J., *et al.* PCR-based detection of mosaicism in Turner syndrome patients. Hum Genet, v.99, n.1, p.62-5. 1997.

Zhou, Z. X., Sar, M., *et al.* A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. J Biol Chem, v.269, n.18, 6, p.13115-23. 1994.

## 8. APÊNDICES

Termo de consentimento livre:

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu \_\_\_\_\_, tendo sido satisfatoriamente informado(a) sobre o estudo supracitado, e seus objetivos gerais, declaro por livre e espontânea vontade que concordo em participar do mesmo. Autorizo a utilização da amostra biológica de mim coletada apenas para este projeto, podendo o DNA extraído dessa amostra ser armazenado para utilização em novo projeto de pesquisa, para o qual deverei ser contatado(a) a fim de conceder ou não autorização para seu uso. Declaro estar ciente das seguintes medidas de proteção contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização individual ou coletiva, que serão utilizadas durante a pesquisa: a minha identidade será mantida sob sigilo absoluto; todas as dúvidas que porventura ocorram durante o processo desta pesquisa serão devidamente esclarecidas; não haverá nenhum tipo de constrangimento ou ação em contra, caso decida por revogar a autorização aqui concedida para utilização das informações obtidas a partir dos estudos da amostra biológica e dos dados, de mim coletados, a qualquer momento. Declaro estar ciente que terei a opção de tomar ou não conhecimento dos resultados da pesquisa na forma de parecer técnico individual quanto ao meu perfil genético determinado para os marcadores supracitados. Declaro ainda não ter nenhum tipo de interesse econômico, em qualquer época, sobre os possíveis resultados alcançados durante as etapas subsequentes do andamento deste estudo, deixando claro ser o meu interesse particular somente o de colaborador (a) anônimo (a).

Campos dos Goytacazes, RJ, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

---

Assinatura do voluntário (ou mãe, pai e/ou responsável legal)

---

Enrique Medina-Acosta, MSc., PhD.  
Coordenador do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular – NUDIM  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro  
Matrícula funcional nº. 0000549-6  
Responsável pela pesquisa laboratorial