

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES POLIMÓRFICOS DE DNA  
PARA INTERROGAÇÃO DO ESTADO DE INATIVAÇÃO DO  
CROMOSSOMO X EM HÍBRIDOS DO PRIMATA CALITRIQUÍDEO  
SAGUI**

**FABRICIO BRUM MACHADO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES  
JULHO DE 2013**



**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES POLIMÓRFICOS DE DNA  
PARA INTERROGAÇÃO DO ESTADO DE INATIVAÇÃO DO  
CROMOSSOMO X EM HÍBRIDOS DO PRIMATA CALITRIQUÍDEO  
SAGUI**

**Mestrando:** Fabricio Brum Machado

**Orientador:** Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta

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 orientação do Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO  
CAMPOS DOS GOYTACAZES  
JULHO DE 2013**

**DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES POLIMÓRFICOS DE DNA  
PARA INTERROGAÇÃO DO ESTADO DE INATIVAÇÃO DO  
CROMOSSOMO X EM HÍBRIDOS DO PRIMATA CALITRIQUÍDEO  
SAGUI**

**Mestrando:** Fabricio Brum Machado

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 orientação do Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta

**Aprovada em 30 de julho de 2013.**

**Comissão Examinadora:**

---

Profa. Dra. Regina Célia de Souza Campos Fernandes (Doutora em doenças infecciosas e parasitárias) – HEAA

---

Leonardo Serafim da Silveira (Doutor em Produção Animal) - UENF

---

Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios (Doutor em Genética e Epigenética Animal) - UENF

---

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

“Pesquisar é ver o que outros viram, e pensar o que nenhum outro pensou.”

**Albert Szent-Gyorgyi**

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, aos meus pais Ioni e Celso pelo apoio incondicional para a concretização deste e muitos outros sonhos que almejei e alcancei graças a eles. A minha irmã Carolina, agradeço pela cumplicidade, carinho e motivação nessa caminhada, ao meu irmão Filipe pela grande amizade e pela ajuda intelectual indispensável na realização deste trabalho.

Ao meu professor, orientador Prof. Enrique Medina-Acosta pela oportunidade de fazer o mestrado em uma área nova para mim, por acreditar em minha capacidade e por todos os ensinamentos no tempo de laboratório.

Aos meus amigos de NUDIM: Graziela, Milena, Laís, Thaís, Antônio, Thiago, Viviane, Priscila, Maria e Cláudia, obrigado a todos pelos ensinamentos, ajudas e por todos os momentos inesquecíveis de descontração dentro e fora do laboratório.

Ao professor Fábio Olivares que mesmo não podendo prosseguir no mestrado sob sua orientação, me proporcionou a oportunidade de voltar a UENF e ingressar no meu tão esperado mestrado.

A todos meus parentes e amigos pelo incentivo e apoio não só nesta, mas em todas as etapas da minha vida.

A minha namorada Tatiane pelo carinho, paciência, amor, incentivo e todo apoio para realizar e terminar este trabalho.

Aos colaboradores: Prof. Leonardo Serafim da Silveira, ao amigo, aluno de doutorado, Fábio Queiroz e ao Prof. Carlos Ramon Ruiz-Miranda por gentilmente disponibilizar as amostras dos tecidos dos saguis, que sem estas a realização do presente trabalho não seria possível.

À FAPERJ, CNPq e UENF que financiaram esse projeto de pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
1.1. EPIGENÉTICA.....	3
1.2. METILAÇÃO DO DNA.....	5
1.3. SURGIMENTO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS.....	8
1.3.1 O CROMOSSOMO X HUMANO E O MECANISMO DE COMPENSAÇÃO DE DOSE.....	8
1.4. INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X.....	10
1.5. O SAGUI-DE-TUFOS-BRANCOS <i>CALLITHRIX JACCHUS</i> (LINNAEUS, 1758).....	13
1.5.1. OS CROMOSSOMOS X E Y DO SAGUI.....	16
1.6. MARCADORES MOLECULARES STR.....	16
1.7. MÉTODOS DE DETECÇÃO DO ESTADO DE METILAÇÃO E DE ATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X...	18
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. TIPO DE ESTUDO.....	21
3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	21
3.1.2. EXTRAÇÃO DE DNA.....	21
3.1.3 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	21
3.2. SUJEITOS DA PESQUISA.....	21
3.3. ESTRATÉGIAS DE MINERAÇÃO PARA O CROMOSSOMO X.....	22
3.3.1. MINERAÇÃO DE MICROSSATÉLITES NO CROMOSSOMO Y.....	25
3.3.2. DESENHO DE INICIADORES.....	25
3.4. PADRONIZAÇÃO DA QF-PCR CONVENCIONAL.....	26

3.4.1. ELETROFORESE EM CAPILAR.....	26
3.4.2. FREQUÊNCIAS ALÉLICAS PARA OS MARCADORES <i>STRs</i> SELECIONADOS.....	27
3.4.3. DIGESTÃO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO SENSÍVEIS A METILAÇÃO .....	27
3.4.4. CÁLCULO DA PORCENTAGEM DE INATIVAÇÃO DOS CROMOSSOMOS X.....	27
4. RESULTADOS.....	29
4.1. MINERAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE LOCOS STR NO CROMOSSOMO X.....	29
4.2. TESTE DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X .....	35
4.3. MINERAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE LOCOS STR NO CROMOSSOMO Y.....	36
5. DISCUSSÃO .....	45
6. CONCLUSÕES.....	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49

## RESUMO

A inativação do cromossomo X (ICX) é um mecanismo epigenético de compensação de dose gênica que visa ao silenciamento de um dos dois cromossomos X presentes nas fêmeas de mamíferos e a um aumento da expressão de genes localizados no cromossomo X ativo em níveis comparáveis aos dos genes localizados em autossomos. Em fêmeas marsupiais a ICX é por *imprinting* com a inativação do X paterno. Em fêmeas de mamíferos eutérios, a ICX é aleatória e assim afeta quantitativamente tanto o X materno quanto o X paterno em diferentes células. Contudo, em humanos, 10% das mulheres exibem padrões não aleatórios de ICX, em que um dos cromossomos X é preferencialmente inativado. Uma das marcas epigenéticas mais estudadas na ICX é a metilação em resíduos citosinas no contexto do dinucleotídeo CpG. As regiões promotoras dos genes localizados em cromossomos ativos estão geralmente desmetilados ou hipometilados. Embora existam modelos mamíferos para o entendimento do mecanismo de ICX, ainda não se tem um modelo primata. Nesse sentido, o sagui (*Callithrix jacchus*), pelo seu tamanho pequeno, desenvolvimento rápido, procriação rápida e genoma mais próximo ao humano poderia ser um modelo.

**Objetivos:** Identificar locos polimórficos do tipo microssatélite (*short tandem repeats*, STR) próximos a ilhas CpG no cromossomo X de *Callithrix jacchus* visando ao desenvolvimento de marcadores que exibam elevadas taxas de heterozigose e que sejam informativos quanto ao estado de metilação dos cromossomos X. **Métodos:** A estratégia de mineração de locos STR consistiu da varredura *in silico* da sequência de referência do DNA do cromossomo X em sagui, comparação e conferência dos alvos homólogos em humanos e seleção dos locos conservados quanto à informatividade conhecida ou predita em humanos. Para averiguação do polimorfismo em sagui, DNA genômico extraído de diferentes tecidos de 22 saguis (14 fêmeas e 8 machos) foi genotipado por PCR quantificava por fluorescência (QFPCR). O estado de metilação pontual foi determinado por Digestão Enzimática Sensível à Metilação associada à PCR quantitativa fluorescente e análise dos produtos de amplificação por eletroforese capilar de alta resolução. Visando desenvolver um marcador de DNA para sexagem genética

foram investigados locos polimórficos no gene da amelogenina (*Amgx/Amgy*) e no cromossomo Y. **Resultados:** Um loco STR candidato contendo a repetição perfeita tetranucleotídica (GAAA), à montante da região promotora predita para o gene *RP2* foi identificado, com as características de predição desejadas. Em saguis fêmeas foram observados dois alelos (317pb e 328pb) enquanto em machos apenas o alelo maior. Nas fêmeas heterozigotas o perfil de ICX foi aleatório em todos os tecidos analisados. Um loco contendo três INDELS no gene *Amg* se mostrou monomórfico em ambos os sexos. Dois locos STR (DYS389478 e DYS990506), selecionados da sequência de referência do cromossomo Y, renderam perfis dialélicos, inclusive em fêmeas. **Conclusões:** O loco STR contendo a repetição (GAAA)<sub>n</sub> perto do gene *RP2* foi utilizado para desenvolver um ensaio de digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa fluorescente para a interrogação pontual do estado de metilação dos cromossomos X em saguis. O marcador contendo INDELS no gene *Amg* não discriminou saguis machos de fêmeas. Os dados sugerem que o *Callithrix jacchus* seja um bom candidato à modelo primata de estudo da ICX.

**Palavras-chave:** *Callithrix jacchus*, *Callithrix penicillata*, Ensaio AR, Enzima de restrição sensível a metilação, Gene *RP2*, Híbridos, Ilha CpG, Inativação do Cromossomo X, Metilação, Sagui

## ABSTRACT

**Introduction:** X chromosome inactivation (XCI) is an epigenetic mechanism of gene dose compensation that aims at silencing one of the two X chromosomes present in females of mammals and at an increase of the expression of genes localized in the active X chromosome to levels comparable to those of genes localized in autosomes. In female marsupials, XCI is by imprinting with the inactivation of the paternal X chromosome. In females of eutherian mammals, XCI is random and thus it quantitatively affects both maternal and paternal X chromosomes in different cells. Nevertheless, in humans, 10% of women exhibit non-random patterns of XCI, in that one of the two X chromosomes is preferentially inactivated. One of the epigenetic marks more studied in XCI is the methylation of cytosine residues in the context of the dinucleotide CpG sequence. Promoter regions of genes localized in the active X chromosome are normally unmethylated or hypomethylated. Although there exist mammalian models for the understanding of the mechanism of XCI, no primate model is available. In that respect, *Callithrix jacchus* (White-tufted-ear marmoset), for its small size, rapid development, rapid procreation, and genome more related to humans could be a working model. **Objectives:** To identify polymorphic loci of the microsatellite type (short tandem repeats, STR) proximal to CpG islands in *Callithrix jacchus* X chromosome aiming at the development of DNBA markers that exhibit elevated rate of heterozygosity and that are informative in relation to the methylation status of X chromosomes. **Methods:** The strategy for mining STR loci consisted in an *in silico* scan of the reference DNA sequence of X chromosome in white-tufted-ear marmoset, comparison and validation of homolog targets in humans, and selection of conserved loci with respect to known or predicted informative potential in humans. To query for the polymorphism in white-tufted-ear marmoset, genomic DNA extracted from different tissues of 22 animals (14 females and 8 males) was genotyped by quantitative fluorescence PCR (QFPCR). The methylation state at single nucleotide level was determined by a methylation-sensitive restriction enzyme-based PCR assay and analysis of amplicons by high resolution capillary electrophoresis, Aiming at developing a DNA marker for genetic sex

determination the genes polymorphic loci in the amelogenin (*Amgx/Amgy*) gene and in the Y chromosome were investigated. **Results:** A candidate (GAAA)<sub>n</sub> tetranucleotide repeat-containing STR locus, upstream of the predicted promoter region of the *RP2* gene was identified, with the desired predicted features. In female white-tufted-ear marmosets two alleles ((317bp and 328bp) were observed while in males only the major allele was observed. In heterozygote females, XCI was random in all tissues analyzed. A locus containing tree indels in the *Amg* gene was monomorphic in both sexes. Two STR loci (DYS389478 e DYS990506), chosen from the reference Y chromosome sequence, yielded varying diallelic profiles inclusive in females. **Conclusions:** The (GAAA)-containing STR locus at the *RP2* gene was developed into a methylation-sensitive restriction enzyme-based QFPCR assay for interrogation of the methylation state of the X chromosomes in *Callithrix jacchus*. The INDEL-containing locus at the *Amg* gene did not discriminate male from female white-tufted-ear marmosets. The data suggest that *Callithrix jacchus* may be a good primate candidate model to study XCI.

**Keywords:** AR assay, *Callithrix jacchus*, CpG island, methylation, methylation-sensitive restriction enzyme, *RP2*, white-tufted-ear marmosets, X chromosome inactivation,

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Callithrix jacchus</i> ou sagui-de-tufos-brancos.....	15
Figura 2. Informações para a interpretação de um eletroferograma .....	27
Figura 3. Fórmula estatística empregada para calcular a proporção de ICX entre os alelos .....	28
Figura 4. Proporções da distribuição dos locos STR no cromossomo X de <i>Callithrix jacchus</i> .....	29
Figura 5. Sequências dos produtos de amplificação in silico para o loco STR no gene RP2 em humanos (A) sagui.....	30
Figura 6. Alinhamento da região contendo o STR no gene RP2 em humanos e sagui pelo programa CLUSTAW. ....	31
Figura 7. Alinhamento dos amplicons contendo o SR no gene RP2 em humanos e saguis.....	32
Figura 8. Eletroforese com resultado para o iniciador DXS45790627CJ1.....	34
Figura 9. Perfil alélico para o locos SRT RP2 antes e depois da digestão.....	35
Figura 10. Validação in silico dos iniciadores para os três locos SRT no cromossomo Y analisador.....	38
Figura 11. Eletroforese com resultado da amplificação para o primer DYS389478	39
Figura 12. Eletroforese com resultado da amplificação para o primer DYS990506	39
Figura 13. Validação in silico dos iniciadores para o gene Amgx de <i>Callithrix jacchus</i> .....	41
Figura 14. Alinhamento das sequências contendo os polimorfismos INDELS .....	42
Figura 15. Perfil monoalélico para o marcador Amelx/Amely em <i>Callithrix jacchus</i> . Machos e; Fêmeas .....	43
Figura 16. Perfil monoalélico para o marcador Amelx/Amely em <i>Callithrix jacchus</i> . fêmeas e macho. e perfil bialélico para o marcador AMGX/AMGY em <i>Homo sapiens</i> :.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Iniciadores validados para ICX em humanos utilizados na mineração dos locos STR em <i>Callithrix jacchus</i> .....	23
Tabela 2. Iniciadores testados na genotipagem do locos STR <i>RP2</i> em <i>Callithrix jacchus</i> .....	33
Tabela 3. Melhores condições de amplificação por PCR para cada par de iniciador.....	33
Tabela 4. Genótipos para o loco STR <i>RP2</i> em <i>Callithrix jacchus</i> .....	34
Tabela 5. Porcentagem de inativação encontrada em cada tecido de cada indivíduo ...	36
Tabela 6. Locos STR identificados <i>in silico</i> na sequência do cromossomo Y de <i>Callithrix jacchus</i> . Em destaque cinza os locos de marcadores dinucleotídeos, em amarelo os locos tetranucleotídeos. E em destaque os locos que não tiveram Indels nos resultados .....	36
Tabela 7. Sequência dos iniciadores desenhados para locos SRT no cromossomo Y de <i>Callithrix jacchus</i> .....	37
Tabela 8. Sequência dos iniciadores desenhados para o loco no gene <i>Amgx</i> de <i>Callithrix jacchus</i> . .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Epigenética

Nas células eucarióticas, o DNA encontra-se organizado em uma estrutura primária denominada nucleossomo onde a dupla fita se enrola em torno de um núcleo proteico formado por um octâmero de histonas (*core*). O nucleossomo é a unidade básica da cromatina que, em sua configuração nativa, é inacessível aos complexos de iniciação da transcrição. No entanto, algumas modificações químicas nas unidades das histonas, que compõem a partícula *core*, e na própria molécula do DNA, são sinais para a ligação de complexos remodeladores da cromatina, que a modificam em conformações repressivas ou permissivas para a transcrição (Hsieh, 1994; Fukuda *et al.*, 2006; Bonasio *et al.*, 2011). No conjunto, estas modificações são denominadas de epigenéticas. As modificações epigenéticas constituem um mecanismo especial de regulação da expressão gênica. Esse nível de regulação se sobrepõe àquele associado à sequência do DNA.

As modificações epigenéticas são tão robustas que mesmo gêmeos monozigóticos podem ser identificados através da análise de seus padrões epigenéticos exclusivos (Tammen *et al.*, 2012). Estas modificações incluem a metilação do DNA e as modificações das histonas. São consideradas reversíveis, por não alterarem a sequência do DNA, e herdáveis, por serem transmitidas de forma estável após sucessivos ciclos de divisão celular (Jaenisch e Bird, 2003; Fackler *et al.*, 2004; Ushijima, 2005; Rando, 2006; Tammen *et al.*, 2012). Assim, as modificações epigenéticas fornecem estabilidade e diversidade ao fenótipo celular. Afetando o potencial transcricional local por modificações das marcas nos genes que são conservadas ou regeneradas durante a divisão celular (Laird, 2010).

A metilação do DNA é a modificação epigenética melhor caracterizada até o momento (Garcia-Gimenez *et al.*, 2012), exercendo grande importância no silenciamento e regulação gênica, em particular no *imprinting* genômico, na inativação do cromossomo X (ICX) e no silenciamento de transposons (Teixeira e Colot, 2009; Bell *et al.*, 2011). Em eucariotos, ela é encontrada predominantemente no carbono da posição 5 da citosina seguida por uma guanina no dinucleotídeo CpG. Esta modificação

é biologicamente relevante quando ocorre simetricamente em regiões ricas em dinucleotídeos CpG conhecidas como ilhas CpG (Herman *et al.*, 1996; Turan *et al.*, 2010). Em mamíferos, também é observada metilação em citosinas não-CpG; esta é exclusivamente encontrada em células-tronco embrionárias (Lister *et al.*, 2009).

No geral, a metilação do DNA nas ilhas CpG presentes nas regiões promotoras resulta em silenciamento gênico devido à inibição estérica da ligação dos complexos de transcrição às regiões regulatórias (Bernstein *et al.*, 2007) ou pelo recrutamento de proteínas que se ligam às sequências CpG metiladas iniciando modificações epigenéticas coordenadas na cromatina (Esteller, 2007; Laird, 2010).

Como a metilação do DNA é uma marca epigenética herdável, a manutenção e a transmissão precisa desses padrões às células filhas é um processo essencial do ciclo celular e em genes transcricionalmente ativos, estas ilhas são normalmente não metiladas. Entretanto, elementos repetitivos e a região promotora de alguns genes caracterizados por ausência de expressão são geralmente metiladas na maioria dos tecidos (Espada e Esteller, 2010). É importante destacar que a metilação do DNA resultando em repressão transcricional foi também observada em regiões conhecidas como *shores* de ilhas CpG localizadas a até 2Kb de uma ilha CpG típica e que apresentam uma densidade de CpG bem menor (Irizarry *et al.*, 2008; Illingworth *et al.*, 2011).

Nas histonas, as modificações que ocorrem após a tradução representam outro grupo de modificações epigenéticas que mostram um maior nível de complexidade e diversidade. Essas envolvem, entre outras, acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação de aminoácidos específicos. As interações entre a metilação do DNA e as modificações das histonas determinam um efeito importante na expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário e na diferenciação celular (Esteller, 2007; Tammen *et al.*, 2012).

O padrão de metilação normal do DNA nas células é mantido através das sucessivas divisões celulares em tecidos adultos e a herança desta informação é denominada de Herança Epigenética (Laird, 2003). Alterações neste padrão de metilação do DNA e acetilação de histonas são comuns em muitas doenças humanas, como o câncer, e há evidências de que a perda da regulação epigenética pode ser o

evento transformante preliminar (Feinberg, 2005; Turan *et al.*, 2010). Como exemplo, podemos citar a hipometilação global do DNA e a hipermetilação promotor-específica (Lujambio *et al.*, 2007) que são normalmente observadas em neoplasias benignas e em tumores em estágio inicial. Isto sugere que essas alterações epigenéticas são eventos precoces na perda da homeostasia celular e podem, inclusive, preceder mutações genéticas e instabilidade genômica (Tammen *et al.*, 2012).

Portanto, a identificação dos perfis anormais de metilação não só em ilhas CpG, mas também em regiões adjacentes, é importante para a compreensão tanto da expressão gênica normal como em diferentes doenças. O conhecimento dos eventos moleculares que iniciam e mantêm o silenciamento epigenético pode levar ao desenvolvimento de abordagens relacionadas à identificação de marcadores para diagnósticos e prognósticos de doenças humanas, bem como de terapias alternativas capazes de reverter esses eventos que conduzem à proliferação celular anormal (Baylin e Ohm, 2006).

O estudo epigenético não se baseia apenas na metilação do DNA. Outro evento epigenético também está associado com a estrutura da cromatina e que também apresenta um papel importante no controle da expressão gênica, é a acetilação e metilação das histonas (Mukai e Sekiguchi, 2002; Cedar e Bergman, 2009). A acetilação de vários resíduos de aminoácidos das histonas H3 e H4 está geralmente associada com a configuração da cromatina ativa (eucromatina) e, portanto com a expressão gênica. Ao contrário, histonas desacetiladas estão geralmente associadas com a cromatina condensada (heterocromatina) e conseqüentemente com a repressão gênica (Reik *et al.*, 2003; Eissenberg e Shilatifard, 2010).

## **1.2. Metilação do DNA**

A metilação do DNA consiste em uma modificação covalente resultante da atividade de uma família de enzimas denominada DNA metiltransferases (DNMT) que catalisam a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (SAM) para um resíduo de citosina que antecede uma guanina - dinucleotídeo CpG (Strathdee e Brown, 2002; Bell *et al.*, 2011). Cinco membros da família DNMT já foram descritos em camundongos e o papel de cada uma deles durante o desenvolvimento foi estudado mediante análise

fenotípica de camundongos com mutações em seus genes (Jaenisch e Bird, 2003; Jones, 2012).

A primeira enzima a ser identificada foi a DNMT1 e sua função é a de manter o padrão de metilação após a síntese da nova fita do DNA, desde que a fita mãe também esteja metilada uma vez que ela exibe maior atividade no DNA hemi-metilado do que no não-metilado (Strathdee e Brown, 2002). Alguns trabalhos têm demonstrado que DNMT1 interage com a maquinaria de replicação por meio da ligação com o antígeno nuclear de proliferação celular (Jones, 2003); este achado reforça o papel desta enzima em manter o padrão de metilação normal da célula. Subsequentemente, duas outras enzimas – DNMT3a e DNMT3b – foram identificadas. Ao contrário da DNMT1, estas enzimas não apresentaram preferência por DNA hemi-metilado (Jones e Baylin, 2002; Jones, 2012).

Foi demonstrado que a perda homocigótica para qualquer uma destas três enzimas é letal em camundongos e a ação delas é provavelmente vital para o correto padrão da expressão gênica durante o desenvolvimento (Li *et al.*, 1992; Strathdee e Brown, 2002).

Os dois últimos membros da família da DNMT são a DNMT3L e a DNMT2. A primeira é uma proteína que não apresenta atividade catalítica, mas localiza-se juntamente com DNMT3a e DNMT3b sendo essencial para o estabelecimento do *imprinting* em linhagens germinativas femininas. Por último, a deleção da DNMT2 não apresentou nenhuma alteração no fenótipo de camundongos, no entanto, este gene é conservado em *Drosophila*, sendo altamente expresso durante a oogênese (Jaenisch e Bird, 2003).

No genoma humano, os dinucleotídeos CpG estão presentes em uma frequência de 5 a 10% e 70-80% destes dinucleotídeos estão metilados e localizados em regiões não codificadoras (Tammen *et al.*, 2012). Durante a evolução humana, a frequência de CpG no genoma vem diminuindo devido às altas taxas de desaminação espontânea que sofrem as 5metil-citosinas (5mC) (Verma e Srivastava, 2002; Illingworth e Bird, 2009). Aproximadamente 80% dos sítios CpG em humanos tem sido perdidos desta forma. No entanto, em todo o genoma têm-se preservado pequenas extensões de 0,5-5 Kb ricas em CpG e que são denominadas de ilhas CpG (Jones, 2003; Aerts *et al.*,

2004). A importância funcional das ilhas CpG dentro dos promotores está associada com a repressão transcricional dos genes (Strathdee e Brown, 2002).

O papel da metilação do DNA na célula normal é claramente importante durante o desenvolvimento dos mamíferos iniciando com uma onda de demetilação durante a clivagem após a implantação do óvulo fecundado. A demetilação é um processo ativo no genoma paterno e ocorre logo após a fertilização, pelo contrário, o genoma materno é passivamente demetilado durante as subseqüentes clivagens. A metilação do genoma do embrião ocorre na gastrulação e tende a diminuir durante a diferenciação em tecidos específicos. (Jaenisch e Bird, 2003; Migicovsky e Kovalchuk, 2011).

Embora a metilação do DNA não seja um mecanismo usual para a regulação normal da expressão gênica, algumas vezes ela pode realizar este propósito. É o caso, por exemplo, daqueles genes cuja expressão está restrita às linhagens germinativas do macho ou da fêmea e que não são expressos em nenhum tecido adulto, como os genes da família *MAGE* e *LAGE* (Esteller e Herman, 2002). Da mesma forma, ela tem sido postulada como um mecanismo de silenciamento de alguns genes tecido-específico, ela é o mecanismo fundamental para o controle da expressão gênica ocorrendo apenas na ICX em fêmeas e no *imprinting* de genes nos quais o alelo não expresso (paterno ou materno) apresenta a sua região promotora metilada (Strathdee e Brown, 2002).

Outro papel biológico da metilação do DNA em células normais é a repressão de transposons, retrovírus e alguns elementos repetitivos, limitando assim a propagação destes elementos pelo genoma (Mukai e Sekiguchi, 2002). Estas seqüências parasitárias podem ser controladas por repressão transcricional mediada por muitas proteínas hospedeiras, mas é possível que a principal linha de defesa contra a expressão destas seqüências seja a inativação através da metilação dos seus promotores (Esteller, 2003; Eissenberg e Shilatifard, 2010). Assim, tem sido proposto que a metilação do DNA foi primariamente um mecanismo de defesa do hospedeiro contra parasitas intragenômicos e que as outras funções, como o *imprinting*, por exemplo, poderiam ter evoluído a partir deste sistema de defesa (Reik *et al.*, 2003).

### 1.3. Surgimento dos cromossomos sexuais

A origem dos cromossomos sexuais X e Y em humanos parece ser autossômica, com a aquisição por um dos pares autossômicos de um locus de determinação sexual como o fator de determinação testicular (TDF-*Testis Determining Factor*, *SRY*). Essa aquisição, determinante da formação de testículos, em combinação com o acúmulo de genes também específicos do sexo masculino, teria levado à diminuição de regiões recombinantes entre os dois homólogos (Charlesworth, 1991; Ross *et al.*, 2005). Os cromossomos sexuais foram divergindo progressivamente. A falta de recombinação ao longo dos cromossomos X e Y na meiose levou a uma rápida redução do cromossomo Y, restando apenas pequenas regiões com homologia no X, como as regiões pseudo-autossômicas, importantes para o correto pareamento dos cromossomos sexuais no processo de meiose (Graves, 2006). No *Homo sapiens* moderno, o cromossomo X tem cerca de 155 Megabases (Mb) (Ross *et al.*, 2005), enquanto que o Y com quase 60Mb (Skaletsky *et al.*, 2003).

Na primeira fase do desenvolvimento embrionário em mamíferos, as gônadas são consideradas indiferenciadas ou bipotenciais sendo chamadas assim por não apresentarem diferença histológica entre uma gônada masculina de uma gônada feminina. Porém, a presença do cromossomo Y no genoma do embrião na 6ª semana da gestação é que faz com que os testículos se desenvolvam a partir da gônada indiferenciada, processo mediado pelo gene localizado no cromossomo Y determinante do sexo (*SRY*) (Graves, 2006).

#### 1.3.1 O cromossomo X humano e o mecanismo de compensação de dose

A primeira sequência do cromossomo X humano foi publicada em 2005. A última versão do genoma humano foi depositado em outubro de 2012 (NC\_000023.10) é conhecido como. O conteúdo de G+C (39%) do cromossomo X é mais baixo que a média do genoma (41%). Na sequência de referência do cromossomo X humano foram anotados 1098 genes (7,1 por Mb), uma das mais baixas densidades gênicas comparada a outros cromossomos. Os exons dos 1098 genes correspondem apenas 1,7% da sequência completa do cromossomo X e 33% da sequência é transcrita. 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 (DMD) localizado em Xp21.1, que se expande por 2.220.223 bp (Ross *et al.*, 2005).

O cromossomo X possui muitas características que são únicas no genoma humano. Mulheres herdam um cromossomo X de cada um dos pais, enquanto os homens herdam somente o cromossomo X materno. 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).

As doenças recessivas ligadas ao X afetam principalmente homens devido ao caráter de hemizigose para a maioria dos genes. Outras doenças ligadas ao sexo podem exibir características atípicas que resultam do processo de inativação do cromossomo X e de consequências de mosaicismo em alguns tecidos, o que significa na ocorrência de células com constituição cromossômica variada (Ballabio *et al.*, 2006).

O dimorfismo cromossômico é característico de organismos com determinação sexual genética. Com isso, duas importantes implicações surgem devido à perda de genes no cromossomo Y em relação aos seus equivalentes que permaneceram no X: primeira, os genes do cromossomo X estão presentes em uma única cópia no sexo heterogamético (XY), resultando em hemizigose quando comparados aos genes autossômicos, presentes em dose dupla em ambos os sexos. Uma segunda consequência está relacionada ao fato de que os genes no cromossomo X estão presentes em dois alelos no sexo homogamético, o que resultaria em dose desigual desses produtos gênicos entre os sexos. A expressão aumentada de alguns genes pode ser necessária para definir traços fenotípicos que diferem os sexos (Berletch *et al.*, 2011) A evolução de intrincados mecanismos epigenéticos garantiu a compensação de dosagem dos produtos transcricionais de genes presentes no X, protegendo os organismos dos efeitos deletérios relacionados à monossomia do X (Straub e Becker, 2007).

#### 1.4. Inativação do cromossomo X

Desde o final da década de 1940, 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 (Ohno *et al.*, 1959) (Ohno e Hauschka, 1960). Eles observaram 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, 1949).

No ano seguinte, a renomada pesquisadora Mary Lyon publicou um curto trabalho no qual associava a cromatina sexual com o X inativo (Xi) (Lyon, 1961). 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, na verdade, o cromossomo X geneticamente inativo. Em humanos, a primeira constatação de que a ICX ocorre também de maneira aleatória foi publicada apenas alguns meses depois do trabalho de Mary Lyon (Beutler *et al.*, 1962).

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 X paterno (Xp) ou materno (Xm), tornando as mulheres, assim, mosaicos em relação à ICX. No mesmo ano, Lyon publicou um extenso trabalho no qual descreveu diversos exemplos fenotípicos derivados do padrão aleatório de

inativação do cromossomo X, observados em fêmeas de camundongos, gatos e humanos (Lyon, 1962).

Nos últimos 50 anos, os fenômenos relacionados à ICX, bem como os mecanismos do processo de inativação, têm sido extensivamente estudados em camundongos, humanos e também em alguns animais domésticos. Entretanto, apesar dos esforços para elucidar os eventos iniciais responsáveis por esse processo, estes ainda não são completamente compreendidos. A ICX é um impressionante 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). Uma vez iniciada a ICX, sua estabilidade é mantida durante as sucessivas divisões celulares e, assim, células em uma população clonal terão sempre o mesmo cromossomo X inativo (Xi).

A estabilidade durante as mitoses é resultado de um sinergismo entre múltiplos fatores epigenéticos que caracterizam o estado inativo do cromossomo X (Csankovszki *et al.*, 2001). Esse estado heterocromático do Xi se deve a um complexo processo de múltiplas etapas, que envolvem mecanismos de contagem (quando a célula identifica quantos cromossomos X estão presentes por genoma haplóide); de escolha do futuro Xi (que compromete todos menos um cromossomo X ao processo de inativação); de início do processo de silenciamento; e manutenção do estado inativo. Um loco chave para a ICX é o Centro de Inativação do Cromossomo X (XIC – do inglês *X Inactivation Centre*), primeiramente descrito em camundongos e posteriormente em humanos (Rastan e Cattanach, 1983; Brown *et al.*, 1991).

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). Essa interação está diretamente relacionada aos processos de contagem, escolha e iniciação do silenciamento, sendo que cada célula irá inativar todos menos um cromossomo X por genoma diplóide. Assim, espera-se que células femininas  $2n$  tenham um Xi e um X ativo (Xa) e células  $4n$  apresentem dois Xi e dois Xa. É interessante observar que as células de homens com a síndrome de Klinefelter ( $47,XXY$ ) também apresentam um Xi e um Xa, já mulheres com a síndrome de Turner ( $45,X$ ) possuem apenas um X ativo. O início do silenciamento depende da expressão, durante a embriogênese, de um gene

especial localizado dentro da região do XIC, o *XIST* em humanos (Xq13.2), *Xist* nos outros mamíferos (do inglês *X-inactive specific transcript*). Em um primeiro momento, o gene *XIST/Xist* tem sua expressão positivamente regulada e transcreve para um RNA nuclear não codante (ncRNA) que se associa em cis ao longo de toda a extensão do futuro Xi (Brockdorff *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1992; Clemson *et al.*, 1996).

Em camundongos, foi identificado um gene anti-sentido ao *Xist*, o *Tsix* (do inglês *-X (inactive-specific transcript, antisense)*) (Lee *et al.*, 1999). A sequência de *Tsix* se sobrepõe a toda a extensão de *Xist*, e sua expressão está relacionada à supressão de *Xist*, mantendo o X ativo (Lee e Lu, 1999). O homólogo *TSIX* humano foi descrito em 2001 (Migeon *et al.*, 2001).

Em extensão, o *TSIX* não cobre a região promotora de *XIST* (fundamental para sua repressão), pois possui uma extremidade 3' truncada, e ainda, suas ilhas CpG são incompletas se comparadas às de camundongos (Migeon *et al.*, 2001). Ao contrário do que se observa claramente em experimentos com células de murinos, foi detectada a expressão de *TSIX* em células humanas diferenciadas a partir do Xi, ou seja, do mesmo cromossomo que expressa *XIST* (Migeon *et al.*, 2002).

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. Em termos gerais, o estado inativo é mantido por uma ação conjunta de mecanismos como metilação de suas ilhas CpG, a constante transcrição de *XIST/Xist*, modificações das histonas (metilação e hipoacetilação), e a presença da variante de histona macroH2A (Csankovszki *et al.*, 2001; Mietton *et al.*, 2009).

Em humanos, ainda que a maioria dos genes no cromossomo Xi esteja silenciada, 15% deles permanecem transcricionalmente ativos e outros 10% apresentam padrões de atividade que podem variar até mesmo entre os indivíduos (Anderson e Brown, 1999; Carrel e Willard, 2005). Estes genes, incluindo muitos sem equivalentes funcionais no cromossomo Y, estão provavelmente relacionados com as diferenças entre os gêneros e também podem explicar as anormalidades clínicas reconhecidas em pacientes com aneuploidias e poliploidias do cromossomo X (Disteche, 1999). Dessa 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; Payer e Lee, 2008).

Vários modelos animais para inativação vêm sendo estudados com intuito de melhor entender o mecanismo de inativação do cromossomo x e doenças relacionadas à inativação, os animais mais utilizados são camundongos, cães, suínos, bovinos e equinos (Yen *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012). Ainda não existe modelo animal em primatas. A proposta do presente trabalho é explorar a possibilidade de usar o sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) como modelo primata para o estudo do mecanismo de ICX.

### **1.5. O sagui-de-tufos-brancos *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758)**

Dentre os diferentes grupos da classe Mammalia, Primates é considerada a primeira ordem na classificação zoológica, dada a ser a com mais características derivadas do Reino Animal. Praticamente todos os indivíduos dessa ordem encontram-se em terras tropicais ou semitropicais, próximas a linha equatorial. Os primatas compartilham uma história evolutiva comum e são classificados em grupos que refletem esse relacionamento evolutivo. O primeiro grupo compreende os platirrinos ou primatas do Novo Mundo, que inclui as famílias *Callitrichidae* e *Cebidae* e o segundo grupo compreende os catarrinos ou primatas do Velho Mundo, que inclui as famílias *Cercopithecidae*, *Hylobatidae*, *Pongidae* e *Hominidae* (Brown, 1997; Moraes *et al.*, 2006).

Dentre os platirrinos, a família *Callitrichidae* é integrada por cinco gêneros, sendo que *Callithrix* e *Leontopithecus* habitam o ecossistema da Mata Atlântica e com um representante no Cerrado (*Callithrix penicillata*), ao passo que *Mico*, *Cebuella* e *Saguinus* são exclusivos do ecossistema Amazônico (Nagamachi *et al.*, 1997).

Os representantes do gênero *Callithrix* são os saguis, que representam os menores macacos existentes; pesam entre 200 e 400g e medem entre 20 e 30cm. Apresentam pelagem longa, densa, de coloração cinza rajada com tufos nas orelhas de cor preta (*C. penicillata*), branca (*C. jacchus*) ou cinza (híbrido das 2 espécies: *C. penicillata*/*C. jacchus*)(Figura 1) (Nagamachi *et al.*, 1997). São encontrados nas selvas

da América do Sul e Central, desde a Zona do Canal, no Panamá, até o Estado do Paraná. Os grandes centros de distribuição das espécies são a floresta amazônica e a floresta atlântica. Vivem nas regiões do Nordeste, Centro Oeste e Norte de São Paulo (Morais e Romijn, 2010).

Os saguis são onívoros, alimentam-se tanto de produtos de origem animal quanto de origem vegetal. Na natureza, os calitriquídeos alimentam-se de insetos, pequenos vertebrados (aves, répteis, roedores), frutas, ovos, grãos, tubérculos e flores. Possuem dentição e mordeduras diferenciadas, caninos inferiores curtos e incisivos inferiores estreitos e longos, lateralmente comprimidos e providos na parte dianteira de grossa camada de esmalte e resistentes ao desgaste, o que favorece a busca de gomas e exsudatos, sendo capazes de perfurar a casca e fazer buracos em troncos e galhos de árvores. São animais inteligentes, com expressões faciais e muito ágeis (Verona e Pissinatti, 2006). Em vida livre, os saguis vivem em grupos familiares, normalmente com uma fêmea reprodutora, um ou mais machos, dois a quatro subadultos e dois juvenis, e são animais migratórios, sujeitos a sazonalidade alimentar (Verona e Pissinatti, 2006).

O *Callithrix jacchus* é um primata do novo mundo pertencente à família *Callitrichidae*. Os animais são nativos das florestas da costa atlântica no nordeste do Brasil, são encontrados nos biomas: Caatinga, Cerrado, e Mata Atlântica, circundado pelos Rios São Francisco, ao norte, e Rio Paraíba, ao leste (Auricchio, 1995). Esta espécie apresenta grande flexibilidade ecológica ao permear com sucesso por áreas florestas primárias e secundárias, vegetações xerófitas, clareiras, habitats de borda e florestas de galeria. É pequeno no tamanho, com os adultos pesando 350-400g. O ciclo de vida de saguis é relativamente curto em comparação com outros primatas não humanos, pois atingem a maturidade por volta dos 18 a 24 meses de idade, a partir daí reproduzem-se até chegar à velhice a partir dos 8 anos de idade podendo chegar até os 16 anos de vida (Abbott e Hearn, 1978). Muitos espécimes de *Callithrix jacchus* e também de outras espécies como do *Callithrix penicillata* foram introduzidos pelo homem, por meio do tráfico ilegal, para serem utilizados como animais de estimação, com isto, acabaram se dispersando para variados tipos de matas do Brasil (Abbott *et al.*, 2003; Reis, 2008).



Figura 1. Híbrido de *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* ou sagui-de-tufos-cinzas (De Moraes *et al.*, 2011)

O sagui não é uma espécie em extinção, sendo considerada, no contexto de conservação, como pouco preocupante pela União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (**IUCN** ou *International Union for Conservation of Nature*, <http://www.iucn.org>). O sagui é também atraente para a pesquisa científica porque a população natural e em cativeiro não é limitante, com a facilidade de manejo e acompanhamento de várias gerações em prazos relativamente curtos em comparação com primatas de maior porte (Abbott *et al.*, 2003; Mansfield, 2003).

*Callithrix jacchus* tem um grande potencial como um modelo primata alternativo para o estudo de doenças humanas, tendo muitas vantagens para a disfunção metabólica associada com a obesidade modelagem durante toda a vida, bem como as disfunções que podem ser causadas pelo envelhecimento, em si. (Tardif *et al.*, 2011). Estudo comportamental e hormonal em *Callithrix jacchus* (Barbosa e Da Silva Mota, 2013). O sagui foi demonstrado ser um excelente modelo para estudar o envelhecimento, a reprodução, neurociência, toxicologia e doenças infecciosas (Mansfield, 2003). Mas ainda não foi testado para ICX.

### 1.5.1. Os cromossomos X e Y do sagui

O primeiro esboço (Build 1.1) do genoma do sagui foi postado e este está disponível desde 21-Jan-2010 em banco de dados públicos pelo Baylor College of Medicine e Washington University School of Medicine. Disponível em <http://genome.wustl.edu/genomes/detail/callithrix-jacchus/>. O cromossomo X de *Callithrix jacchus* possui tamanho aproximado de 142Mb com um total de 1299 genes descritos com uma média de 9 genes por Mb (maior que em humanos que a média é de 7 genes por MB). O cromossomo Y tem seu DNA parcial depositado contendo 3Mb e somente 28 genes descritos.

### 1.6. Marcadores Moleculares STR

Os marcadores moleculares podem ser definidos como sendo qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso das isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas, ou não, do genoma. Esses apresentam um comportamento Mendeliano simples, por isto podem ser empregados como marcadores genéticos. Outra característica importante dos marcadores moleculares é o fato de sua herança não ser influenciada pelo meio ambiente (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os marcadores STR são sequências curtas de DNA repetidas em série altamente polimórficas, 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 procaríotos. 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*. Os deslizamentos 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*.

O deslizamento da polimerase 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). As taxas de mutações observadas dependem da frequência de deslizamentos da polimerase e da eficiência no mecanismo de reparo (Fan e Chu, 2007). As taxas de mutações *in vitro* são maiores que as encontradas *in vivo* devido ao sistema de reparo da replicação do DNA.

A taxa de formação de *stutter* é inversamente proporcional ao tamanho da unidade de repetição. Locos com imperfeições nessas unidades tendem a ser menos mutáveis (Fan e Chu, 2007). Mutações pontuais também estão presentes nos STRs, embora o mecanismo de deslizamento da polimerase exceda o número deste tipo de mutação por uma a duas ordens de grandeza (Pumpernik *et al.*, 2008). Por este motivo o presente trabalho usará microssatélites baseados em tetra nucleotídeos para evitar o aparecimento dos *stutters*.

Os STRs apresentam variabilidade alélica 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).

A análise dos STRs é feita por amplificação do DNA genômico usando iniciadores que flanqueiam os arranjos nucleotídeos repetidos, sendo os produtos de amplificações geralmente separados em géis de poliacrilamida, pois apresentam resolução suficiente para separar os fragmentos de DNA que, em geral, diferem por poucos nucleotídeos (até mesmo 1 ou 2). Os alelos de um STR diferem no número de cópias da unidade de repetição básica. Os blocos de repetição são geralmente menores do que 1kb (Chambers e Macavoy, 2000).

Resumindo, os locos de STR apresentam as seguintes características altamente desejáveis:

- a. Estão ampla e uniformemente distribuídos pelo genoma dos eucariotos;
- b. São altamente multialélicos;
- c. São amplificados via PCR, o que facilita sua obtenção mesmo com poucas quantidades de DNA;
- d. Iniciadores marcados com fluorescência apresentam a vantagem de possibilitarem sistema multiplex, o que permite avaliar rapidamente um grande número de indivíduos para um grande número de locos em pouco tempo.
- e. São marcadores codominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto podem ser visualizados.

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

Análise direta do padrão de metilação: Consiste no sequenciamento com DNA pré-tratado com bissulfito de sódio. O tratamento com bissulfito converte resíduos citosinas, no contexto CpG, não metilados em Timina (via Uracila), o que leva à perda da complementaridade entre as fitas 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 de citosinas metiladas por comparação dessas regiões em sequências depositadas nos bancos de dados (Frommer *et al.*, 1992).

O estado de ativação 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).

Análise indireta do padrão de metilação: pode ser 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. Se ao redor do sítio de digestão houver um polimorfismo, a tipagem deste genoma

poderá facilitar a identificação dos cromossomos X paterno (Xp) e X materno (Xm); em conjunto esses ensaios permitem identificar qual X está metilado nesse sitio, Xp ou Xm. Esse resultado permite associar o estado de metilação com o estado de ativação dos cromossomos X. A expressão gênica pode não refletir necessariamente o padrão de metilação do gene (Swierczek *et al.*, 2012). O marcador polimórfico mais utilizado para este tipo de análise em mulheres é o teste do STR CAG no exon 1 do *AR* (Allen *et al.*, 1992), conhecido como ensaio HUMARA. O loco STR no gene *AR* apresenta heterozigose media de 85% em diferentes populações. Em *Callithrix jacchus* no exon1 do gene *AR* não possui o STR como em humanos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Identificar locos polimórficos do tipo STR próximos a ilhas CpG no cromossomo X de híbridos de *Callithrix jacchus* / *Callithrix penicillata* visando ao desenvolvimento de marcadores que exibam elevadas taxas de heterozigose e que sejam informativos quanto ao estado de metilação dos cromossomos X.

### 2.2. Objetivos específicos

- a. Buscar em *Callithrix jacchus*, regiões homólogas às humanas envolvidas com a ICX
- b. Mineração *in silico* de locos STR utilizando a sequência de referência do cromossomo Y de *Callithrix jacchus* visando à diferenciação sexual em *Callithrix jacchus*;
- c. Desenvolver marcadores STR específicos do cromossomo X para tipagem de indivíduos;
- d. Desenvolver ensaio de interrogação do estado de metilação pontual baseado na Digestão Enzimática Sensível à Metilação associada à PCR quantitativa fluorescente (DESM-QFPCR);
- e. Verificar a informatividade dos marcadores quanto ao estado de inativação dos cromossomos X de *Callithrix jacchus*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Tipo de estudo**

Estudo exploratório, qualitativo, com amostragem por conveniência ou acessibilidade, não probabilística, portanto, destituída de qualquer rigor estatístico, cálculo *a priori* de tamanho amostral e poder de estudo.

##### **3.1.1. Material biológico**

Sangue venoso: amostras de 0,5-2mL de sangue venoso foram coletadas em tubo contendo anticoagulante EDTA e mantidas sob refrigeração até o momento da extração de DNA dos leucócitos.

Tecidos: Pelo + pele, tecido muscular, tecido cerebral e tecido do fígado foram mantidos em freezer -70°C.

##### **3.1.2. Extração de DNA**

As amostras de sangue coletadas foram submetidas ao método de extração do DNA genômico utilizando o kit de extração e purificação de DNA genômico *Illustra blood genomicPrep*, GE Healthcare, UK, conforme a especificação do fabricante.

Os Tecidos: Pelo + pele, tecido muscular, tecido cerebral e tecido do fígado foram submetidos ao protocolo de extração de DNA por NaCl. (Olerup e Zetterquist, 1992)

Todas as amostras de DNA genômico foram armazenadas em freezer -20C.

##### **3.1.3 Quantificação do DNA genômico**

2ul de cada amostra de DNA extraído foi submetido à quantificação direta utilizando o aparelho de espectrofotometria *NanoDrop 2000c™* - *Thermo Scientific*.

#### **3.2. Sujeitos da pesquisa**

Para esta pesquisa foram utilizados 22 animais (14 fêmeas e 8 machos) eutanasiados híbridos de *Callithrix jacchus* / *Callithrix penicillata* oriundos da Ilha D'Água, na Bahia de Guanabara da cidade do Rio de Janeiro – RJ. As amostras foram

depositadas no banco de DNA genômico do Núcleo de Diagnóstico e Investigação Molecular – NUDIM.

### 3.3. Estratégias de mineração para o cromossomo X

A estratégia para mineração e predição de locos de microssatélites altamente informativos localizados no cromossomo X se baseou nos seguintes parâmetros: (a) informatividade (heterozigose) estabelecida para microssatélites utilizados na genética forense e clínica; (b) composição das repetições nos locos alvos; (c) tamanho da repetição; (d) localização no cromossomo X em relação às ilhas CpG; (e) localização intragênica ou em região promotora em relação a genes que não escapam à inativação do cromossomo X em humanos (para uso comparativo com DNA depositado de *Callithrix jacchus*); (f) localização proximal a sítios de restrição susceptíveis à 5<sup>me</sup>C.

Para esta mineração foram utilizadas 2 estratégias de mineração de locos STR para o cromossomo X de *Callithrix jacchus*:

- a. Baseando-se nos dados de uma tabela de iniciadores desenhados e testados pelo grupo para ICX em humanos (tabela 1, também disponível online <https://sites.google.com/site/chromosomexstrs/callithrix-jacchus>). Para cada um dos produtos de amplificação (amplicon) desses iniciadores humanos validados, foi realizado um alinhamento pela ferramenta BLAST (Basic local alignment search tool) contra o genoma de *Callithrix jacchus*. Buscando regiões STR homólogas nos 2 cromossomos e posteriormente, utilizando a ferramenta online Map viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) no cromossomo X de sagui (versão **Build 1.1**) utilizando as posições iniciais e finais do alinhamento em sagui para identificar suas posições físicas no cromossomo e a existência de ilhas CpG próximas a estas regiões.
- b. Outra mineração no cromossomo X foi feita utilizando a sequência de referência do cromossomo X de *Callithrix jacchus* disponível em banco de dados público NCBI, National Center for Biotechnology Information

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com o número de acesso NC\_013918.1 teve suas sequências de nucleotídeos varridas em busca de marcadores do tipo STR utilizando o programa *Tandem Repeat Finder* TRF (Benson, 1999). Este software utiliza um algoritmo capaz de encontrar os elementos repetitivos pelo percentual de identidade e pela frequência de *indels* (inserções e/ou deleções) comparado a uma sequência referência com repetições perfeitas em série. A estratégia de mineração de locos STR foi baseada na utilizada em diversos trabalhos (Machado, 2008; Machado *et al.*, 2009; Machado e Medina-Acosta, 2009a; b; Alves Da Silva, 2011; Machado *et al.*, 2011).

**Tabela 1. Iniciadores validados para ICX em humanos utilizados na mineração dos locos STR em *Callithrix jacchus*.**

Iniciador	Posição	Fluorocromo	Amplicon <i>In silico</i>	Motif	PCR	XCI
DXS637431F	Intergenic	FAM	168-173	AAAAT		
DXS637431bF	Intergenic	FAM	225-230	AAAAT		
DXS811096F	Intergenic	VIC	391	GAAA		
DXS940172F	Intergenic	PET	289	ATAG		
DXS8026484F	Intergenic	NED	325-330	TTCC		
DXS11192627F	<a href="#">ARHGAP6</a>	FAM	422	TTCT		
DXS14311814F	Intergenic	VIC	430-442	TTTC		
DXS15050203F	Intergenic	PET	252-256	AAAT		
DXS15050203bF	Intergenic	PET	343-347	AAAT		
DXS15178285F	Intergenic	NED	197-207	AAAAT		
DXS15178285bF	Intergenic	NED	270-280	AAAAT		
DXS18094731F	Intergenic	FAM	381-385	TTTA		
DXS19792773F	<a href="#">SH3KBP1</a>	VIC	428-432	AAAG		
DXS24771435F	Intergenic	PET	336	TTTTA		
DXS27761812F	Intergenic	NED	256	TTTA		
DXS27761812bF	Intergenic	NED	313	TTTA		
DXS32315353F	<a href="#">DMD</a>	FAM	263-267	TTTA		
DXS46638973F	Intergenic	VIC	294	TTCC		
DXS46695772F	Intergenic	PET	378-382	AAAG		
DXS46950266F	<a href="#">RGN</a>	NED	312-352	AAAG		
DXS47202502F	Intergenic	FAM	209-213	TTTC		
DXS47202502bR	Intergenic	NED	252-256	TTTC		
DXS70204902bF	Intergenic	VIC	320-324	AGGA		

DXS70204902cF	Intergenic	NED	273-277	AGGA	
DXS77086468F	<a href="#">MAGT1</a>	PET	204-224	TTTTA	
DXS84583175F	Intergenic	NED	210	TTTA	
DXS84583175bR	<a href="#">POF1B</a>	NED	286	TTTA	
DXS96580543F	<a href="#">DIAPH2</a>	FAM	218	TTATT	
DXS111970857F	Intergenic	PET	441-457	GAAA	
DXS112187203F	Intergenic	NED	400-404	TTTC	
DXS123055705F	Intergenic	FAM	293	TTTTA	
DXS128688926F	<a href="#">OCRL</a>	VIC	211	AAAT	
DXS128688926bF	<a href="#">OCRL</a>	VIC	426	AAAT	
DXS134827648F	Intergenic	PET	207	TTAT	
DXS134827648bR	Intergenic	NED	301	TTAT	
DXS135673470F	Intergenic	NED	302-322	AAAG	
DXS135673470bR	Intergenic	NED	402-422	AAAG	
DXS139053213F	Intergenic	FAM	318-322	CCTT	
DXS144275076F	Intergenic	VIC	410-430	TTTA	
DXS24941692	<a href="#">ARXExon4</a>	NED	315	GCC	
DXS37964920A	<a href="#">SRPXExon10</a>	PET	212	CAG	
DXS37964920B	<a href="#">SRPXExon11</a>	PET	313	CAG	
SRPXExon1	SRPXExon1	PET	98	CAG/CTG	
DXS50351410	<a href="#">SHROOM4Ex1</a>	FAM	406-414	TTTC	
DXS66681884	<a href="#">ARExon1</a>	PET	346	CAG	
DXS66681884B	<a href="#">ARExon2</a>	PET	394	CAG	
DXS66683082A	<a href="#">ARExon1-B</a>	VIC	343	GGC	
DXS66683082B	<a href="#">ARExon1-B</a>	PET	391	GGC	
DXS84385786	<a href="#">ZNF711Exon1</a>	NED	393	GGC	
DXS131179803	<a href="#">RAP2CExon4</a>	FAM	283-293	CCCCCA	
DXS125127614A	<a href="#">DCAF12L2Ex1</a>	PET	298	GGC	
DXS125127614B	<a href="#">DCAF12L2Ex1</a>	VIC	200	GGC	
DXS146801247A	<a href="#">FMR1Exon1</a>	FAM	324	GGC	
DXS146801248B	<a href="#">FMR1Exon1</a>	NED	277	GGC	
DXS147389817	<a href="#">AFF2Exon1</a>	NED	350	GCC	
DXS67399362	h18	PET	251	TCCTG	
DXS70121627	h18	VIC	336	AGGA	
DXS70324386	h18	FAM	308	TATT	
DXS71675790	h18	NED	277	AAAT	
DXS71715055	h18	VIC	213	AAAAG	
DXS71976720	h18	PET	330	AAAGC	

### Legenda

	Testado OK
	Não amplificou
	Amplificação ruim
	Não testado

#### 3.3.1. Mineração de microssatélites no cromossomo Y

A mineração *in silico* de tais sítios foi realizada como descrito no item 3.3-b para o cromossomo Y.

#### 3.3.2. Desenho de Iniciadores

Iniciadores foram desenhados para novos marcadores nas regiões exônicas, intrônicas e intergênicas nos cromossomos X e Y. de *Callithrix jacchus*

Para o desenho dos iniciadores do cromossomo X foram ainda levadas em conta: a localização próxima a ilhas CpG e possuir pelo menos um sítio para enzima de restrição sensível à metilação.

Para o desenho de iniciadores ao redor das sequências repetidas foram utilizados os programas livres e online: *OligoPerfect™ Designer* da *Invitrogen™* (<http://www.invitrogen.com/>), *WebSat* (<http://wsmartins.net/websat/>) e o *OligoCalc – Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Os iniciadores desenhados possuem de 18-22 nucleotídeos e amplificam produtos *in silico* de 100 a 450 pares de bases (pb) (Machado e Medina-Acosta, 2008).

Os iniciadores foram sintetizados pela *Applied Biosystems, USA*, com a fluorescência 6-FAM™ (azul).

Para avaliar a complementaridade específica de cada par de iniciadores as regiões flangeadoras dos marcadores de interesse, foi utilizada a ferramenta *online* *iPCR – UCSC (in silico PCR University of California Santa Cruz, USA – <http://www.genome.ucsc.edu>)*.

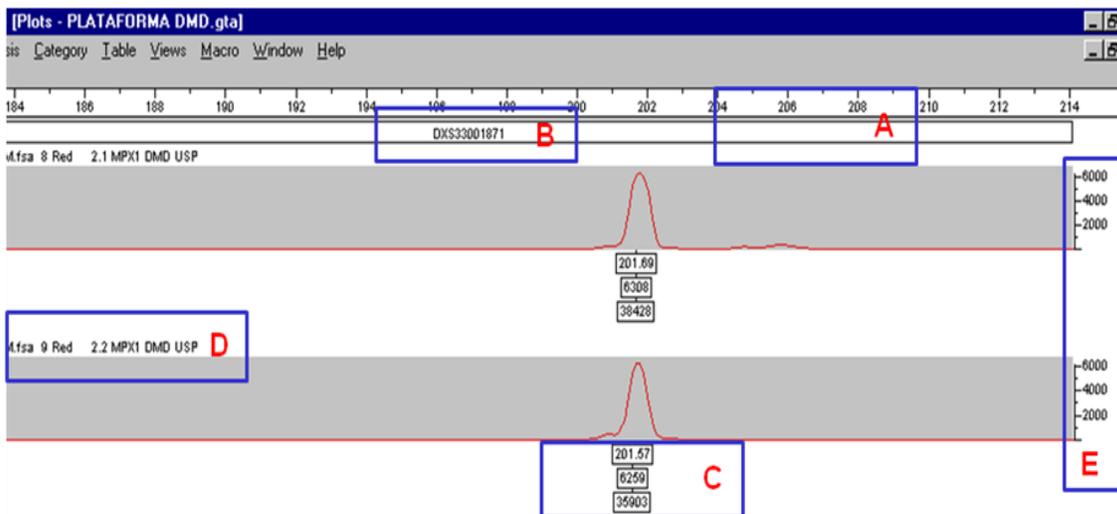
### 3.4. Padronização da QF-PCR convencional

Primeiramente os iniciadores foram submetidos a PCR em um termociclador gradiente (*96-Well Veriti Thermal Cycler - Applied Biosystems, USA*) para caracterizar a melhor temperatura para o funcionamento dos iniciadores, separadamente.

Foram avaliados separadamente os efeitos das seguintes variáveis: concentração do DNA alvo, concentração dos iniciadores, e ciclos térmicos. Para padronização foram realizados ensaios de gradiente com as seguintes variáveis: Temperatura de anelamento, concentração de iniciadores,  $MgCl_2$  e de DNA. O tampão de reação utilizado teve a seguinte formulação: 0.2 mM dNTP, 1-2 mM  $MgCl_2$ , 1.25U Taq Polimerase (Alves Da Silva, 2007). O volume final da reação foi de 12,5  $\mu$ L.

#### 3.4.1. Eletroforese em capilar

Para separação dos produtos de amplificação foi utilizada tecnologia de eletroforese capilar, em um analisador automático de fragmentos ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), com capilar de 47 cm de comprimento contendo polímero separador POP-4<sup>™</sup>. As amostras foram injetadas por 12 segundos utilizando uma potência de 15kV. A corrida foi de 40 minutos. A detecção dos produtos foi por tecnologia de laser. Para a análise foram utilizados os programas GeneScan (Applied Biosystems, USA) e Genotyper (Applied Biosystems, USA). Para cada mistura de reação de amplificação, uma alíquota de 0,54  $\mu$ L foi misturada a 8,9  $\mu$ L de Hi-Di<sup>™</sup> Formamida e 0,1  $\mu$ L de GeneScan LIZ-500 *size Standard* (padrão de tamanho de fragmentos variando de 75-500 bp, marcado com fluorocromo LIZ<sup>™</sup> de fluorescência laranja (Applied Biosystems). A mistura foi aquecida a 95°C durante 3 minutos e em seguida esfriada a 4°C por 3 minutos. A interpretação do eletroferograma se baseou em dados de altura e posição dos picos (produtos de amplificação fluorescentes) (Figura2).



**Figura 2.**

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)).

### 3.4.2. Frequências alélicas para os marcadores *STRs* selecionados

As frequências alélicas foram calculadas com o uso do programa livre PowerStats (<http://www.promega.com/geneticidtools/powerstats/>), um programa executável em uma planilha de Microsoft Excel.

### 3.4.3. Digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação

As amostras DNA genômico (500 ng) das fêmeas heterozigotas para os marcadores do X foram digeridas com 0,3µL da enzima de restrição *Bst* *UI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, EUA) em 1X Buffer 4 próprio, num volume final de 10 µL, por 8h a 60°C. Os produtos foram analisados conforme descrito no meral 3.4.1.

### 3.4.4. Cálculo da porcentagem de inativação dos cromossomos X

A proporção da ICX de todas as amostras foi calculada a partir da estatística descrita por (Busque *et al.*, 2009). A interpretação do resultado da equação é: porcentagem de células com o alelo maior (B) ativo (Figura 3).

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

**Figura 3**

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. Mineração *in silico* de locos STR no cromossomo X

Foram encontrados 2.110 locos STR em toda extensão do cromossomo X de *Callithrix jacchus*, destes 1.206 não contem Indels. A distribuição de locos STR por tamanho da repetição foi 0,6% mono; 52% Di, 2,7 % tri, 40,7% tetra e 4% penta (Figura 4).

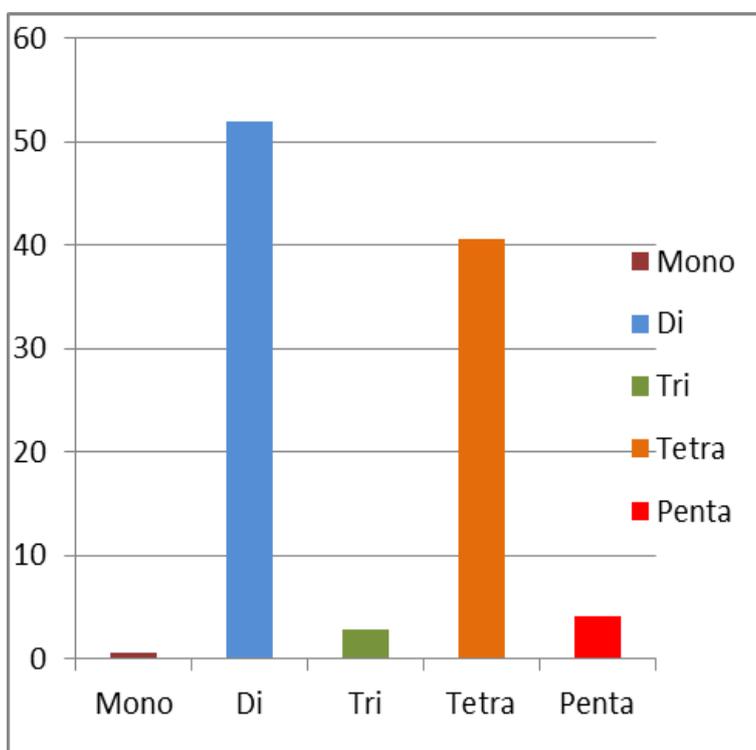


Figura 4. Proporções da distribuição dos locos STR no cromossomo X de *Callithrix jacchus*

A relação completa das características dos locos STR identificados está disponível online (<https://sites.google.com/site/chromosomexstrs/callithrix-jacchus>)(Tabela 1-online).

Usando a metodologia descrita no tópico **3.3-a** na busca de regiões homólogas no cromossomo X de Saguí com regiões dos iniciadores descritos na tabela 1. Essa comparação rendeu um único loco STR candidato. Esse loco está localizado à montante do gene *RP2*, coordenadas 45791259..45835055, NC\_013918.1. As sequências do amplicon em humano utilizada para essa análise é apresentada na

figura 5. Os alinhamentos com os ortólogos em sagui são mostrados nas figuras 6 e 7. Este loco já está bem caracterizado em humanos pelo grupo e é um bom candidato para ICX.

### A.

>[chrX:46695746+46696128](#) (383bp)

```
TGACATAGCGAGACCCCTGTGaaagaaaaagaaagaaagaaagaaagaaag
aaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaaagaagagcacagaag
aggattgggagggttatgggggtacaatttcttgaggggggtgaccctggccag
gcatgagagggcggttaggaaggggtgatgaggggagaagaggatttagaa
atacaaatttcaggggtcttcttggtgacgagggaatttctgtccctcaca
actttcatcataagataaatctaattggttcaactagagatctctcccgcgc
cttgaacttgcaaatttatgaatcaggggcaaaaaaaaccgggataccga
gcctggcctcccACCAGCTAGAGAACCCACCAa
```

### B.

>[chrX:45790627+45790955](#) (329bp)

```
TTGCACTCCAGACTGGGTAAcaagagtgaactctgtctcaaaaaaaaaa
aaaaagaaaagaaagaaagaaagaaagaaagataaaaagcacagaagag
gattgggagggttatgggggtacagttattgagggggtaaccctggccaggc
aatgaggggggtggttaggaaggggtgatacggggagaagaggatttaggaat
acaaatttcaggggtctttttgtgtccgcaggaatttctgttccctcacac
ctttcatcataagataaatctaattggttcgactagagaccgctcccgcgac
ttgaacttgCAAATGTATGAACCAGGGGg
```

### C.

>[chry:45790627+45790948](#) (317bp)

```
TTGCACTCCAGACTGGGTAAcaagagtgaactctgtctcaaaaaaaaaa
Aaaaagaaaagaaagaaaagataaaaagcacagaagaggattgggagggt
Atgggggtacagttattgagggggtaaccctggccaggcaatgaggggggtg
Gtaggaaggggtgatacggggagaagaggatttaggaatacaaatctcagg
Gtctttttgtgtccgcaggaatttctgttccctcacacctttcatcataa
gataaatctaattggttcgactagagaccgctcccgcgacttgaacttgCAA
ATGTATGAACCAGGGGg
```

### Figura 5

Sequências dos produtos de amplificação in silico para o loco STR no gene RP2 em humanos (A) sagui (B, alelo maior; C: alelo menor).

Na sequência de referência em humanos, o loco STR *RP2* contém 16,3 repetições do tetra nucleotídeo AAAG (em realce amarelo na Figura 5.A). O seu ortólogo em sagui contém 5 repetições (em realce verde figura 5.B).



## CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

chrX_46695746+46696128      TGACATAGCGAGACCTGTGAAAGAAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG
chrX_45790627+45790955      TTGCACT-CCAGACTGGGTAACAAGAGTGAAACTCTGTCTCAAAAAAAAAA
*  **   *  ****   ** * * *   **           ***  ***

chrX_46695746+46696128      AAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAGCACAGAAG
chrX_45790627+45790955      AAAAAAGAAAAGAAAGAAAGAAAGAAAGAAA-AGATAAAAAGCACAGAAG
*** **  ***** * * *** *****

chrX_46695746+46696128      AGGATTGGGAGGTTATGGGGTACAATTCTTGAGGGGGTGACCCTGGCCAG
chrX_45790627+45790955      AGGATTGGGAGGTTATGGGGTACAGTTATTGAGGGGGTAACCCTGGCCAG
***** ** ***** *****

chrX_46695746+46696128      GCGATGAGAGGGCGGTAGGAAGGGTGATGAGGGGAGAAGAGGATTTAGAA
chrX_45790627+45790955      GCAATGAGGGGGTGGTAGGAAGGGTGATACGGGGAGAAGAGGATTTAGGA
** ***** ** ***** ***** *

chrX_46695746+46696128      ATACAAATTTCAGGGTCTTCTTGTGTGTCAGCGGAATTTCTGT-CCCTCAC
chrX_45790627+45790955      ATACAAATTTCAGGGTCTTTTGTGTCCGCAGGAATTTCTGTTCCCTCAC
***** ** ***** *****

chrX_46695746+46696128      AACTTTTCATCATAAGATAAATCTAATGTTCAACTAGAGATCTCTCCCGCG
chrX_45790627+45790955      ACCTTTTCATCATAAGATAAATCTAATGTTTCGACTAGAGACCGCTCCCGCG
* ***** ***** * *****

chrX_46695746+46696128      CCTTGAACCTTGCAAATTTATGAATCAGGGGCACAAAAAACCCGGATACCG
chrX_45790627+45790955      ACTTGAACCTTGCAAATGTATGAACCAGGGG-----
***** *****

chrX_46695746+46696128      AGCCTGGCCTCCCACCAGCTAGAGAACCACCAA
chrX_45790627+45790955      -----

```

**Figura 7.**

Alinhamento dos amplicons contendo o SR no gene RP2 em humanos e saguis. Os iniciadores utilizados para amplificação em humanos estão em realce colorido.

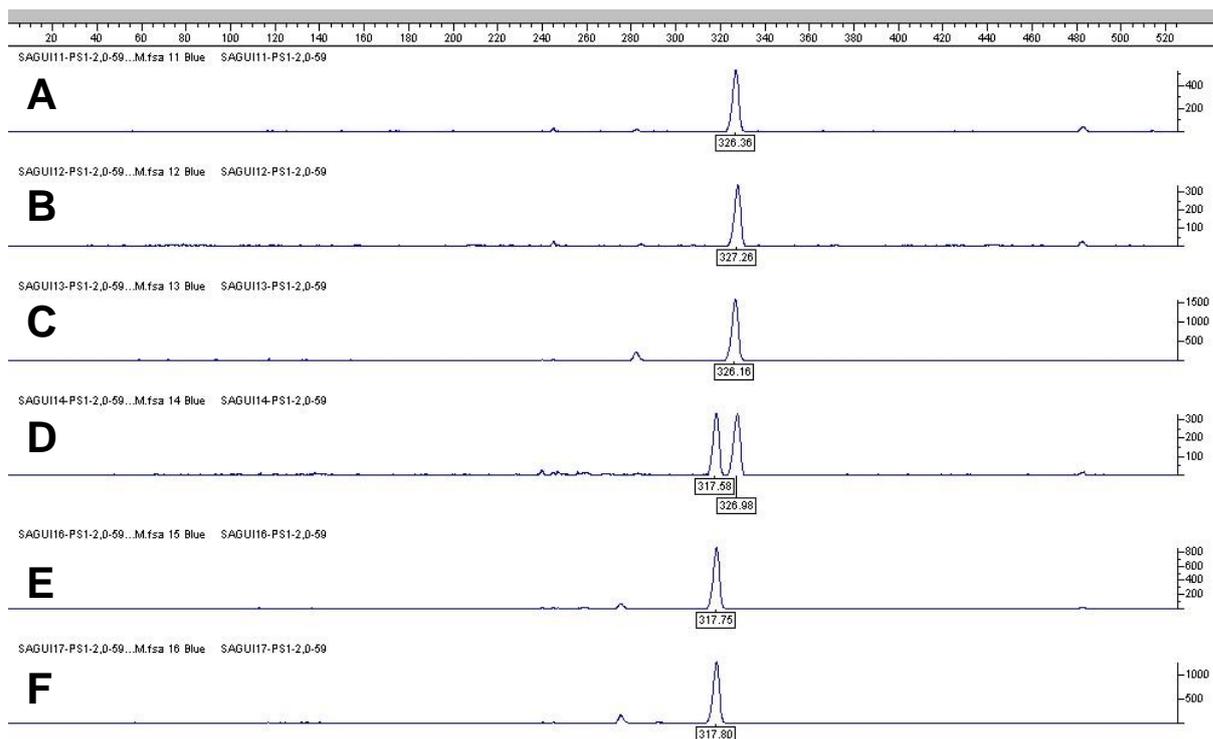
Foram desenhados 3 iniciadores para este loco STR (Gaaa) em sagui que foi validado experimentalmente em DNA genômico. Dos três pares de iniciadores testados para esse loco (Tabela 2), apenas um par de iniciadores rendeu resultados reproduzíveis nas condições otimizadas de amplificação (Tabela 3). Em 14 fêmeas foram observados unicamente dois alelos. O alelo menor (317pb) e o alelo maior (328pb), sendo 5 fêmeas heterozigotas (taxa de heterozigose de 35%), 7 homozigotas para o alelo maior e 2 para o alelo menor (Figura 8). Os genótipos dos indivíduos constam na tabela 4. Em machos só foi observado o alelo maior. O alelo maior se mostrou mais frequente na população estudada aparecendo em 86% das fêmeas e em 100% dos machos. O alelo menor 317pb apareceu em 50% das fêmeas (n=14).

**Tabela 2. Iniciadores testados na genotipagem do locos STR *RP2* em *Callithrix jacchus*.**

Nome	Iniciador 5'	Iniciador 3'	tamanho (bp)
DXS45790627CJ1	TTGCACTCCAGACTGGGTAA	GCCCCTGGTTCATACATTTG	329
DXS45790627CJ2	TTGCACTCCAGACTGGGTAA	GCTTGGTGGGCTCTCTTG	384
DXS45790627CJ3	GGTGAAACCCCGTCTCTAC	GTCCCAATCCTCTTCTGTGCT	254

**Tabela 3. Melhores condições de amplificação por PCR para cada par de iniciador**

Nome	Temperatura	C. MgCl <sub>2</sub>	Ciclos	DNA
DXS45790627CJ1	59°C	2,0µg	28	25 µg/µL
DXS45790627CJ2	Não amplificou	-----	-----	-----
DXS45790627CJ3	61°C	1,5µg	35	25 µg/µL
DXS59175820CJ4	Não testado	-----	-----	-----
DXS11314397	59°C	2,0µg	28	25 µg/µL
DYS389478	59°C	2,0µg	28	25 µg/µL
DYS990506	59°C	2,0µg	28	25 µg/µL
DYS1652885	Não Amplificou	-----	-----	-----



**Figura 8**

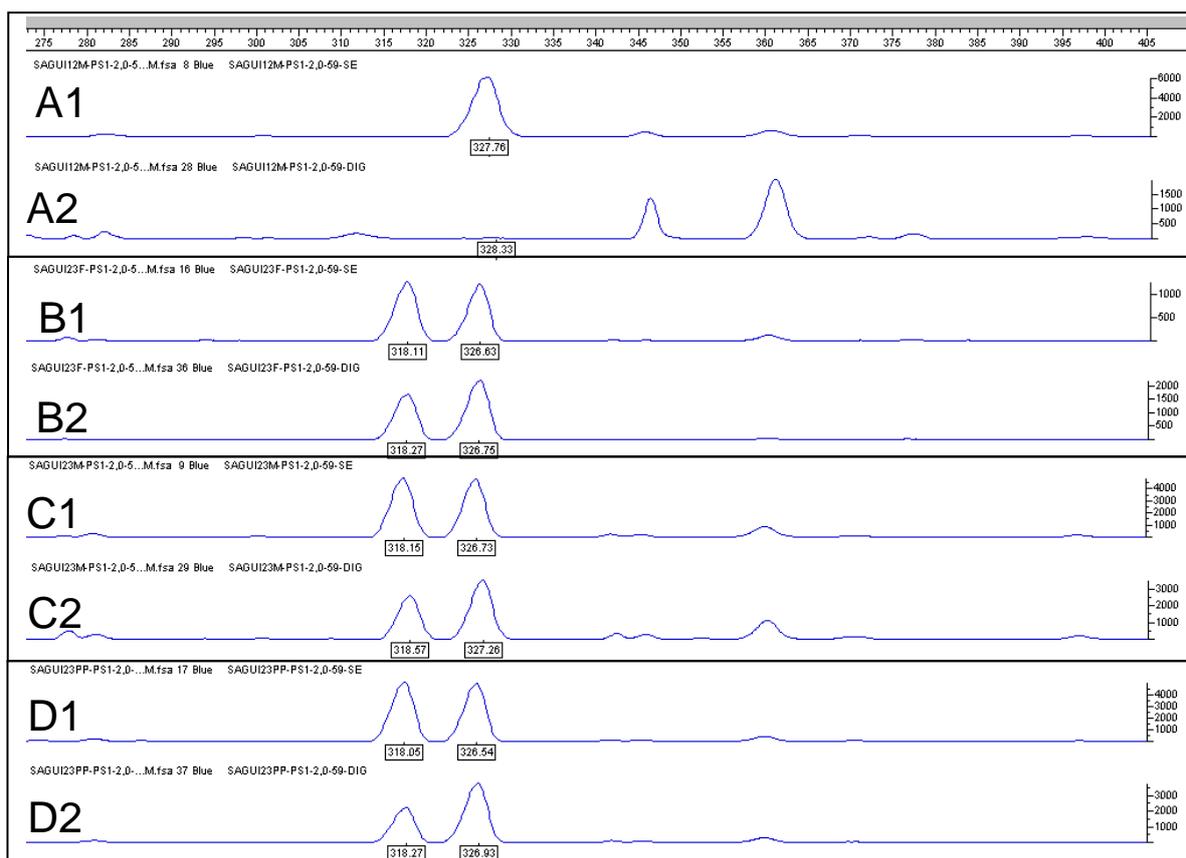
Eletroforese com resultado para o iniciador DXS45790627CJ1 mostrando 6 dos 22 indivíduos. Onde A, B e C são machos e D, E e F são fêmeas. Observados dois alelos na população de estudo. O alelo menor de 317pb e o alelo maior de 328 bp.

**Tabela 4. Genótipos para o loco STR *RP2* em *Callithrix jacchus*.**

FÊMEAS	Alelo 1(pb)	Alelo 2(pb)	MACHOS	Alelo 1(pb)
SAGUI16	317	-	SAGUI11	328
SAGUI17	317	-	SAGUI12	328
SAGUI18	-	328	SAGUI13	328
SAGUI20	-	328	1088	328
SAGUI23	317	328	1089	328
SAGUI24	317	328	1091	328
SAGUI25	317	328	1093	328
SAGUI26	-	328	1095	328
SAGUI27	317	328		
1086	-	328		
1087	-	328		
1090	317	328		
1092	-	328		
1094	-	328		

## 4.2. Teste de inativação do cromossomo X

As 5 fêmeas heterozigotas para o iniciador DXS45790627CJ1 (1090, Sagui23, Sagui24, Sagui25 e Sagui 27) e 1 macho controle (SAGUI11) tiveram 500ng de seu DNA genômico dos 3 tecidos (tecido muscular, fígado e pelo+pele) digeridos pela enzima Bst UI. Apenas a fêmea 1090 possuía além dos 3 tecidos, amostra de sangue e de tecido cerebral (Figura 9). O perfil de inativação nestas fêmeas foi aleatório. Assim, nenhuma das fêmeas exibiu um perfil de inativação preferencial (acima de 70% de inativação) (Tabela 5). Os resultados mostram que a inativação ocorreu de forma aproximada em todos os tecidos em todos os indivíduos. Com exceção da fêmea 1090 a qual a inativação se mostrou, mesmo que dentro do normal, diferente com relação ao X que está sendo inativado de acordo com o tecido testado.



**Figura 9**

Perfil alélico para o locus SRT RP2 antes (1) e depois (2) da digestão com a enzima Bst UI susceptível a metilação de DNA genômico de diferentes indivíduos. Macho: A1 e Fêmeas: B1, C1 e D1 e depois da digestão por Bst UI (Macho: A2 e Fêmeas: B2, C2 e D2).

**Tabela 5. Porcentagem de inativação encontrada em cada tecido de cada indivíduo**

<b>AMOSTRA</b>	<b>%de Inativação</b>
1090 sangue	51%
1090 cérebro	59%
1090 músculo	65%
1090 fígado	35%
1090 pelo/pele	38%
Sagui 23 fígado	42%
Sagui 23 músculo	36%
Sagui 23 pelo/pele	36%
Sagui 24 fígado	46%
Sagui 24 pelo/pele	45%
Sagui 24 músculo	41%
Sagui 25 fígado	52%
Sagui 25 músculo	54%
Sagui 25 pelo/pele	55%
Sagui 27 fígado	46%
Sagui 27 músculo	44%
Sagui 27 pelo/pele	45%

### 4.3. Mineração *in silico* de locos STR no cromossomo Y

O intuito de minerar locos STR no cromossomo Y é o desenvolvimento de marcadores cromossomo-específico para utilização em sexagem molecular e assim poder diferenciar amostras biológicas oriundas de machos e de fêmeas, o cromossomo Y de *Callithrix jacchus* está parcialmente sequenciado. A sequência disponível contém apenas 2.7 megabases (NC\_013919.1), onde completo, deveria ter aproximadamente 65 megabases. Para esse segmento foram encontrados 28 locos STRs entre di(60,7%), tri(3,6%) e tetra(35,7%) nucleotídeos (Tabela 6). Destes 28, foram selecionados 12 alvos e apenas 8 não apresentaram Indels (6 dinucleotídeos e 4 tetranucleotídeos). Esses 28 locos foram analisados para desenhar iniciadores alvo-específicos. Apenas para 3 desse locos foi possível desenhar iniciadores que renderam amplicons únicos *in silico* (Tabela 7).

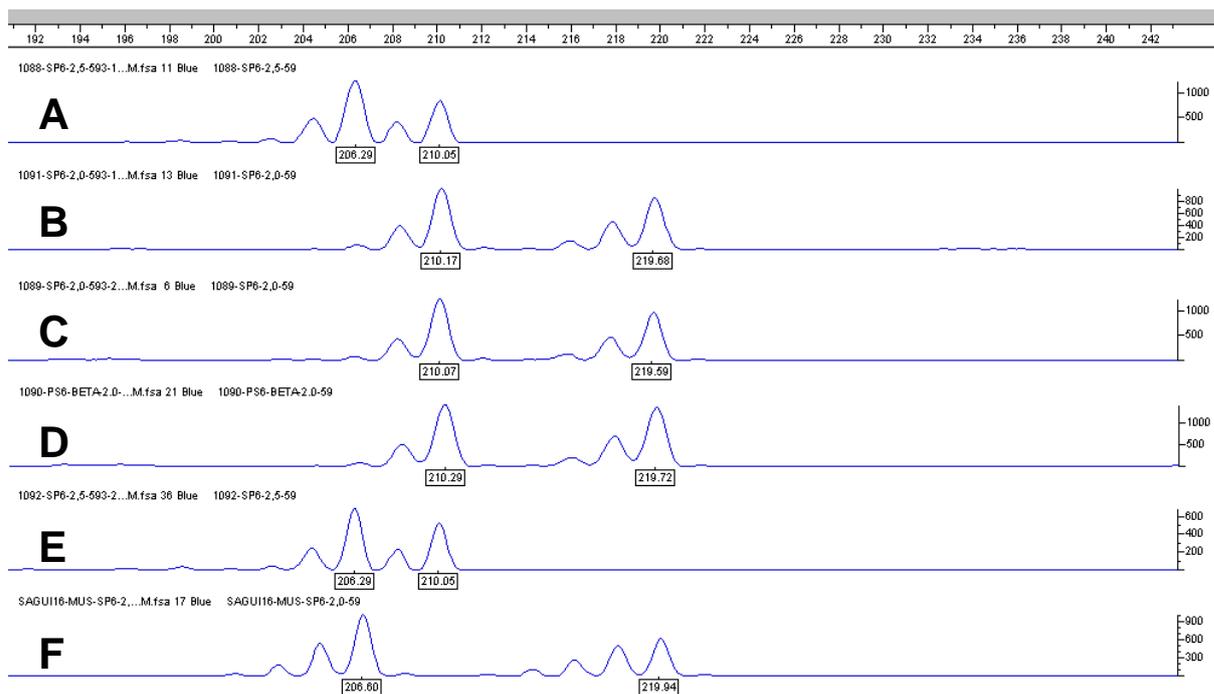
**Tabela 6. Locos STR identificados *in silico* na sequência do cromossomo Y de *Callithrix jacchus*. Em destaque cinza os locos de marcadores dinucleotídeos, em amarelo os locos tetranucleotídeos. E em destaque os locos que não tiveram Indels nos resultados**

Índices	Period	Copy	Consensus	Percent	Percent	Score	A	C	G	T	Repeat
	Size	Number	Size	Matches	Indels						
<u>60893--61280</u>	4	96.0	4	71	21	219	29	0	43	26	ATGG
<u>249649--249878</u>	2	114.5	2	79	9	146	38	2	10	48	AT
<u>325454--325680</u>	2	122.0	2	68	20	109	47	3	3	46	AT
<u>363865--363917</u>	2	26.5	2	96	0	97	49	1	0	49	TA
<u>389478--389526</u>	2	24.5	2	100	0	98	51	48	0	0	AC
<u>417527--417676</u>	2	76.5	2	73	18	93	40	2	4	53	TA
<u>470084--470138</u>	2	27.5	2	100	0	110	50	0	0	49	AT
<u>507590--508023</u>	4	109.3	4	71	9	183	47	9	18	24	AGAT
<u>508013--508071</u>	4	14.8	4	89	0	91	50	20	5	23	ATAC
<u>512470--512734</u>	4	67.5	4	72	3	144	0	37	8	53	TCTC
<u>515623--515765</u>	4	36.5	4	93	4	166	67	0	32	0	AAGA
<u>531670--531823</u>	3	52.0	3	81	2	132	1	38	0	58	CTT
<u>560429--560513</u>	2	45.5	2	82	13	101	48	50	1	0	AC
<u>593391--593512</u>	4	30.0	4	83	3	100	0	37	0	62	CTTT
<u>615959--616008</u>	2	25.0	2	100	0	100	50	50	0	0	CA
<u>700922--701436</u>	2	263.0	2	67	13	160	8	2	50	38	TG
<u>736615--736785</u>	2	88.5	2	72	6	93	10	2	39	47	TG
<u>894793--896001</u>	2	621.0	2	66	11	227	41	42	9	6	CA
<u>990506--990550</u>	2	22.5	2	100	0	90	51	48	0	0	AC
<u>1174330--1174404</u>	2	38.5	2	86	5	100	46	2	48	2	AG
<u>1462921--1463446</u>	2	274.5	2	69	11	253	39	50	5	4	CA
<u>1551119--1551580</u>	4	115.8	4	69	7	206	20	1	53	24	TGGA
<u>1598024--1598211</u>	4	46.3	4	81	11	152	1	30	0	68	TCTT
<u>1652885--1652944</u>	2	30.0	2	100	0	120	0	50	0	50	TC
<u>1781453--1781553</u>	4	26.0	4	88	6	154	0	28	0	71	TTTC
<u>2394877--2394949</u>	2	37.0	2	97	2	139	49	0	50	0	GA
<u>2410020--2410129</u>	4	27.8	4	84	12	147	0	24	0	75	TTTC
<u>2647628--2647695</u>	2	34.0	2	87	0	91	0	42	7	50	CT

Tabela 7. Sequência dos iniciadores desenhados para locos SRT no cromossomo Y de *Callithrix jacchus*

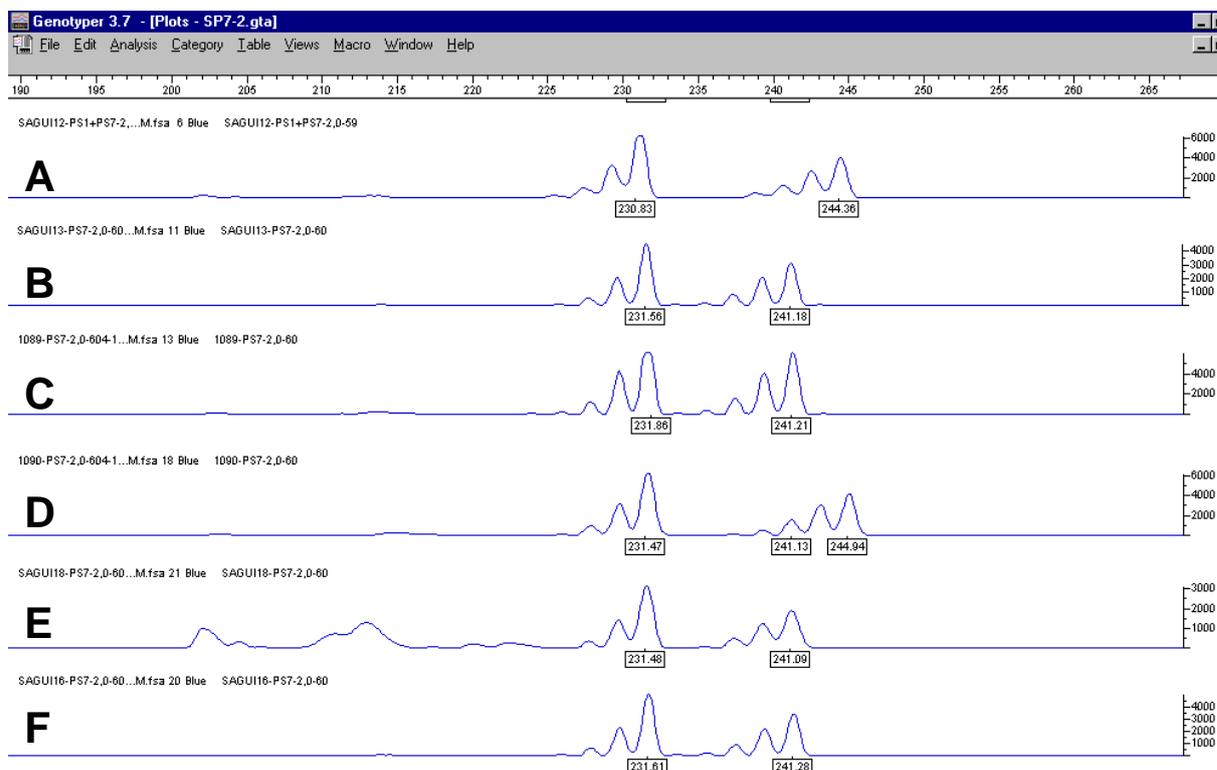
Nome	Iniciador 5'	Iniciador 3'	Size (bp)
DYS389478	CTCACCAATAGTGCCCAAGG	GCATGCAAAAAGATGTTCAAAA	215
DYS990506	GCCCCGTTAGACATCAAGAA	TTGCATAAGCTTGGGAAAT	247
DYS1652885	AGGATGCAGTGAGCCAAGAT	TGTGGACGGAACCAAAAAT	245





**Figura 11**

Eletroforese com resultado da amplificação para o primer DYS389478 demonstrando que mesmo tendo se mostrado específico para o cromossomo Y em *Callithrix jacchus* in silico, in vitro a amplificação se mostrou inespecífica. Estão representados os machos pelas letras A, B e C e as fêmeas pelas letras D, E e F.



**Figura 12**

Eletroforese com resultado da amplificação para o primer DYS990506 demonstrando que in vitro a amplificação se mostrou inespecífica. Machos letras A, C e D. Fêmeas letras B, E e F.

Considerando que os locos DYS389478 e DYS990506 não foram específicos para o cromossomo Y foi explorada a possibilidade de utilizar o gene Amelogenina para o desenvolvimento de um marcador de sexagem molecular em *Callithrix jacchus*. Em humanos o gene AMEL contém três polimorfismos INDEL totalizando oito nucleotídeos a menos no cromossomo Y em relação ao cromossomo X (figura 14). Foi desenhado um par de iniciadores (Tabela 8) com 100% identidade de anelamento aos genes para amelogenina de humanos e sagui. Esse par de iniciadores foi validado tanto in silico (figura 13) quanto experimentalmente (figuras 15 e 16).

**Tabela 8. Sequência dos iniciadores desenhados para o loco no gene Amgx de *Callithrix jacchus*.**

Nome	Iniciador 5'	Iniciador 3'	Size (bp)
DXS11314397	TTGACCACCTCCTGATCTACAA	AGACCTGGAAGCAGAAACCA	234/226

### A. DXS11314397 em sagui

>[chrX:9221615+9221848](#) (234bp)

TTGACCACCTCCTGATCTACAAgggaacatttgtgagacaattctctcct  
 tgttgatatttctttattgtataagagaaacatacttctctcttcaacat  
 ggggtgagtttgatcagaaagtaaagtgttgggtgggatagggtaggatt  
 catcgacaacacagggggttgggggtgggatgctgtccaagatcactgga  
 gagtaaatgtgtgcTGGTTTCTGCTTCCAGGTCT

### B. DXS11314397 em humanos

>[chrX:11314397+11314630](#) 234bp

TTGACCACCTCCTGATCTACAAgggaacattcgtgagacaattctctcct  
 tgttgatatttctttattgtgaaagagaaacacacttctctccccattat  
 ggggtgagttttatcagcaagtaaactgttgggcaggatagggtaggatt  
 cattgaaaacactgggcgtgggggtgggatgctgtccaagatcactgga  
 gaataaatgtgtgcTGGTTTCTGCTTCCAGGTCT

>[chrY:6738363-6738588](#) 226bp

TTGACCACCTCCTGATCTACAAgggaacatttgtgagacaactgcttggt  
 gatatttctttaccgtgtaaaagaaacatacttccactccccaacatggga  
 tgagttttatcagcaagtaaactgttagacaggataaggtagaattcatt  
 gacagcactgggggtgggagaaggatgttgtttgatcactggagaataaat  
 gtgtccTGGTTTCTGCTTCCAGGTCT

**Figura 13. Validação *in silico* dos iniciadores para o gene *Amgx* de *Callithrix jacchus***

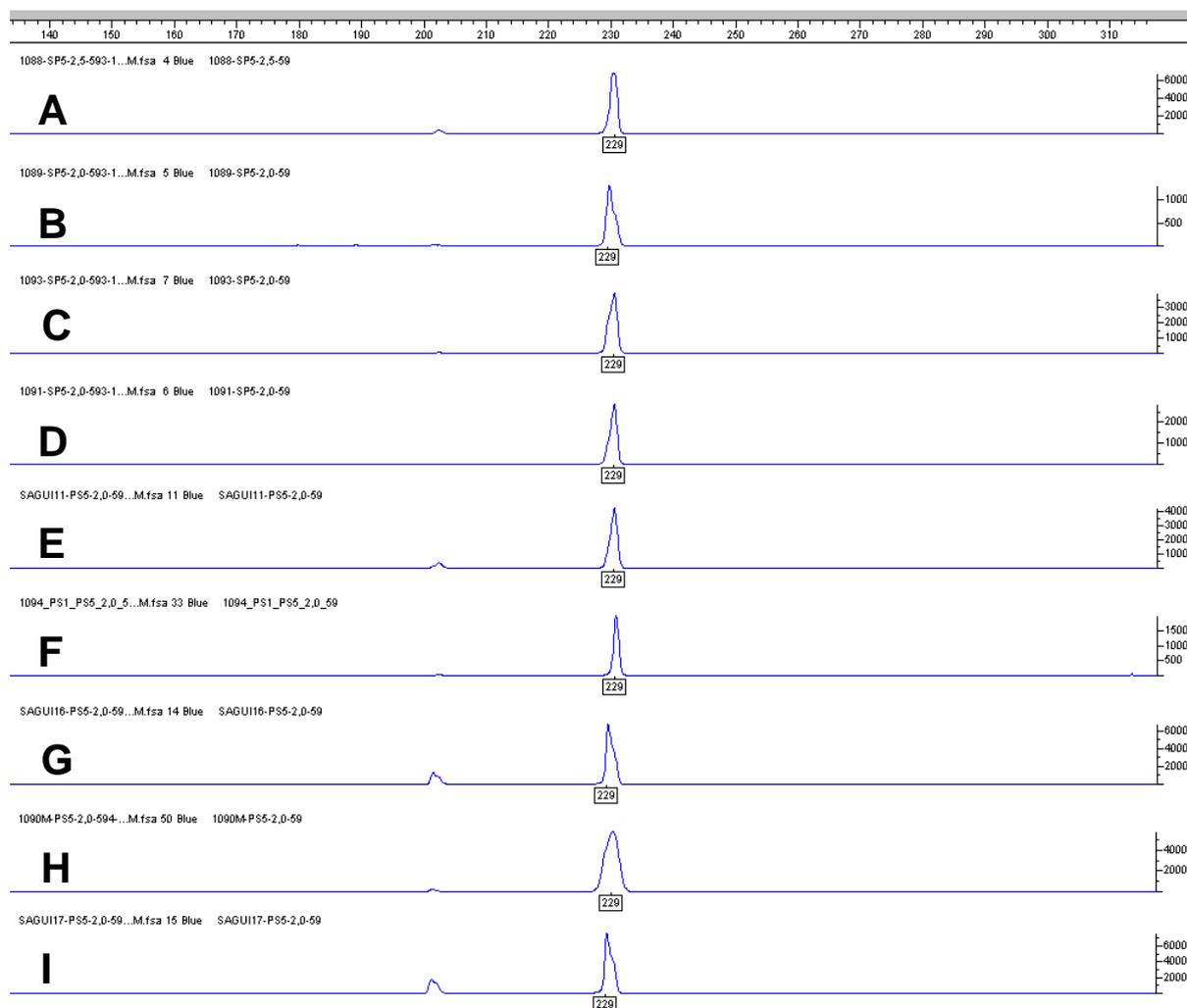
```

AmelX_Cj      TTGACCACCTCCTGATCTACAAAGGGAACATTTGTGAGACAATTCTCTCCTTGTTGATATT
AMELX-Hs      TTGACCACCTCCTGATCTACAAAGGGAACATTCGTGAGACAATTCTCTCCTTGTTGATATT
AMELY-Hs      TTGACCACCTCCTGATCTACAAAGGGAACATTTGTGAGACAA----CTGCTTGTTGATATT
*****
AmelX_Cj      TCTTTATTGTATAAGAGAAACATACTTCTCTCTTCAACATGGGGTGAGTTTGATCAGAAA
AMELX-Hs      TCTTTATTGTGAAAGAGAAACACACTTCTCTCCCCATTATGGGGTGAGTTTTATCAGCAA
AMELY-Hs      TCTTTACCGTGTAAGAGAAACATACTTCACTCCCAACATGGGATGAGTTTTATCAGCAA
*****
AmelX_Cj      GTAAAGTGTGGGTGGGATAGGGTAGGATTCATCGACAACACAGGGGGTTGGGGTGGGAT
AMELX-Hs      GTAAACTGTTGGGCAGGATAGGGTAGGATTCATTGAAAACACTGGGCGTGGGGTGGGAT
AMELY-Hs      GTAAACTGTTAGACAGGATAAGGTAGAATTCATTGACAGCACTGGG-GTGGGAGAAGGAT
*****
AmelX_Cj      GCTGTCCAAAGATCACTGGAGAGTAAATGTGTGCTTGGTTTCTGCTTCCAGGTCT
AMELX-Hs      GCTGTCCAAAGATCACTGGAGAATAAATGTGTGCTTGGTTTCTGCTTCCAGGTCT
AMELY-Hs      GTTGTTT---GATCACTGGAGAATAAATGTGTCCTGGTTTCTGCTTCCAGGTCT
* ***

```

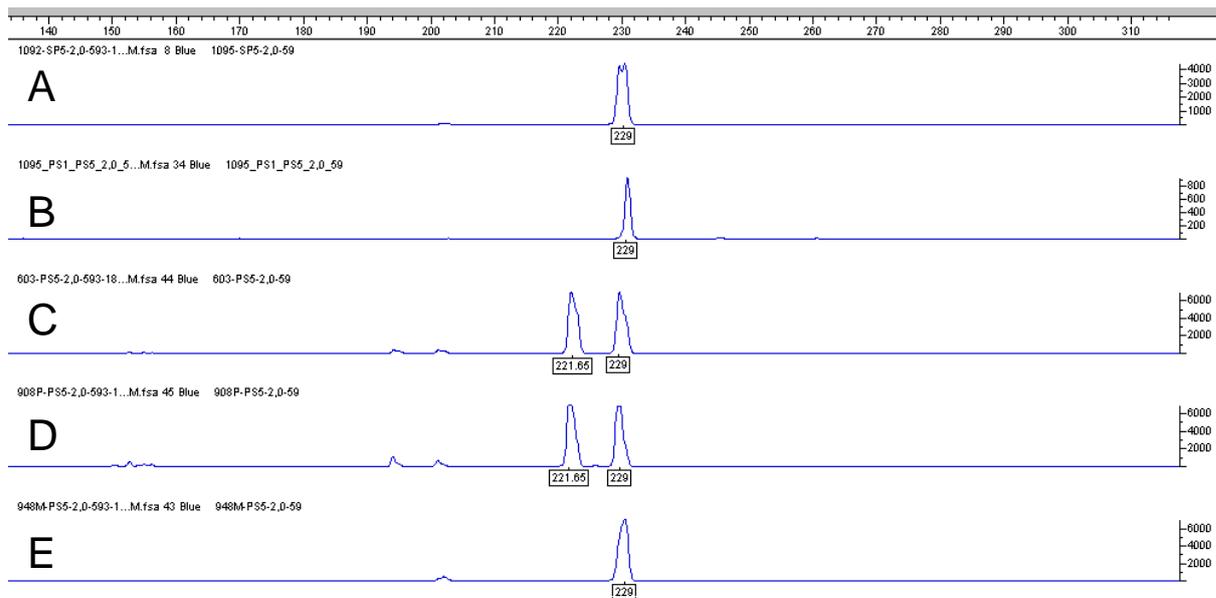
**Figura 14.** Alinhamento das sequências contendo os polimorfismos INDELS nos genes para amelogenina em *Callithrix jacchus* (Cj) e *Homo sapiens* (Hs). As sequências dos iniciadores estão indicadas em cores

Em humanos, esse par de iniciadores diferenciou DNA genômico isolado de homens e mulheres (Figura 16, A, B), com perfil dialélico (221 pb e 229bp) para homens e monomórficos (229b) para mulheres. Em saguis, esse marcador foi monomórfico (229pb) tanto em machos quanto em fêmeas. Assim sendo, o marcador amelogenina não diferenciou machos de fêmeas em *Callithrix jacchus*.



**Figura 15**

Perfil monoalélico para o marcador Amelx/Amely em *Callithrix jacchus*. Machos: A, B, C, D e E; Fêmeas: F, G, H e I..



**Figura 16**

Perfil monoalélico para o marcador Amelx/Amely em *Callithrix jacchus*. Fêmea: A; macho: B. e perfil dialélico para o marcador AMGX/AMGY em *Homo sapiens* Homens: C e D e em uma Mulher: E.

## 5. DISCUSSÃO

Em humanos o gene *RP2* (OMIM 312600) está localizado no braço curto do cromossomo X, no intervalo Xp11.3-11.23 (Schwahn *et al.*, 1998). É composto por cinco exons (Schwahn *et al.*, 1998) e codifica um polipeptídeo de 350 aminoácidos, o qual é expresso ubiquamente nos tecidos humanos (Schwahn *et al.*, 1998; Chapple *et al.*, 2000). 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 (Arl3) 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. Perturbações na máquina do tráfico de proteínas a partir do interior para os segmentos fotosensoriais externos, resultam na degeneração dos fotorreceptores, podendo ocasionar várias doenças como a retinose pigmentar (*RP2*) (Evans *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2010; Holopainen *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2011).

. Em humanos esse loco STR *RP2* exibe 13 diferentes alelos (Dados do grupo do NUDIM ainda não publicados). Porque então foram observados só dois alelos em saguis?

Embora não validados por sequenciamento, a diferença entre os produtos de amplificação para esses alelos sugere que o alelo maior contem 3 repetições AAAG a mais do que o alelo menor. Esse par de iniciadores identifica um produto de 329pb pela PCR *in silico*. Esse amplicon contem 5 repetições perfeitas (AAAG). Considerando o tamanho do alelo maior observado experimentalmente, o alelo maior deve corresponder alelo *in silico* contendo 5 repetições. Assim sendo, o alelo menor conteria só duas repetições AAAG. Nesse sentido, o loco STR *RP2* em sagui parece corresponder ao INDEL de 3 repetições.

Os resultados indicam uma prevalência do alelo maior na população, aparecendo em todos os 8 dos machos de sagui do estudo, e em 7 fêmeas homozigotas. Mas um bom indicativo de que estes dois alelos estejam circulando na população e que ainda existam machos com este alelo na população é o fato de terem sido identificadas duas fêmeas homozigotas para o alelo menor (sagui16 e

sagui17) indicando que este alelo obrigatoriamente tenha origem também de um X paterno.

É importante ressaltar que todos os animais genotipados nesta pesquisa são oriundos do mesmo local (Ilha D'água, RJ), pertencentes ao mesmo grupo familiar e provavelmente já estão isolados a muitas gerações. Não se têm dados desde quando estes animais vêm sendo introduzidos na ilha. Este isolamento provavelmente ajudou para fixação destes dois alelos nesta população. O que causa um desequilíbrio para a população e para as gerações futuras, diminuindo a variabilidade genética, o que podem ocasionar um maior risco de aparecimento de doenças recessivas nestes animais. Um caso clássico de perda genética é dos guepardos (*Acinonyx jubatus*) na África. (Charruau *et al.*, 2011)

Estes cenários só seriam confirmados se fossem genotipados mais indivíduos, machos e fêmeas de fora deste grupo familiar e se possível de várias regiões do Brasil (onde estes animais são endêmicos).

Em sagui o resultado se mostrou aleatório nas fêmeas heterozigotas. Em humanos a taxa de inativação não aleatória é encontrada em aproximadamente 15% das mulheres (Wong *et al.*, 2011). Para determinação direta do padrão de inativação seria feita uma modificação por bissulfito dos nucleotídeos metilados e posteriormente o sequenciamento desta região e comparadas às regiões nos 2 cromossomos analisados em cada tecido de cada indivíduo.

As taxas de inativação preferenciais não foram detectadas em nenhum indivíduo e em nenhum dos diferentes tecidos estudados. Mas uma diferença significativa na proporção dos alelos foi observada entre diferentes tecidos de um mesmo indivíduo principalmente da fêmea 1090 que demonstrou inativação diferenciada para cada alelo em cada tecido. Em humanos diferenças de metilação também são observadas em diferentes tecidos (Moreira De Mello *et al.*, 2010; Cotton *et al.*, 2011).

Um segundo objetivo deste estudo foi desenvolver marcadores para determinação do sexo genético em *Callithrix jacchus*. Os locos STR DYS389478 e DYS990506 não se mostraram específicos para o cromossomo Y, a pesar de terem sido validados *in silico* com tais. O perfil dialélico observado para estes marcadores em fêmeas sugere que esses locos estejam presentes nos cromossomos X (ou em um autossomo). A hipótese de esses locos estarem presentes também em um autossomo parece pouco provável, haja vista que em nenhuma das amostras de

machos ou fêmeas foi observado um perfil trialélico. Assim sendo, os resultados sugerem que esses locos estejam presentes tanto no cromossomo Y quanto no cromossomo X. Essa possibilidade não pode ser validada *in silico* haja vista que o genoma de referência é um esboço.

Outro dado é que estes saguis estudados não são animais puros da espécie *Callithrix jacchus*, eles são híbridos de 2 espécies de Saguis – *Callithrix jacchus* (Sagui-de-tufos brancos) e *Callithrix penicillata* (Sagui-de-tufos-pretos), mesmo sendo espécies próximas, estes animais apresentam diferenças físicas marcantes e o híbrido possui também uma característica marcante que são os tufos cinzas ao redor das orelhas. Estes híbridos são férteis e podem se reproduzir sem problemas com outros híbridos, com *C. jacchus* ou *C. penicillata*. Como apenas o genoma do *Callithrix jacchus* está depositado no banco de dados do NCBI, este foi o utilizado como padrão para análise dos dados.

O polimorfismo INDEL no gene *Amelx* não foi observado em sagui. Os iniciadores desenhados para esse loco são conservados na sequência de referência do cromossomos X e Y humanos. Assim esses iniciadores foram experimentalmente validados em DNA humano, observando-se dois alelos em homens e um em mulheres. Duas hipótese podem explicar os resultados em saguis para o gene da amelogenina. A primeira, o cromossomo Y, na região de anelamento dos iniciadores, é diferente da encontrada no cromossomo X e estes não se anelem, assim deixando de produzir o perfil dialélico esperado. A segunda, as duas regiões de anelamento dos iniciadores nos cromossomos X e Y de *Callithrix jacchus* são exatamente idênticas sem os INDELS. O monomorfismo no gene *Amelx* em saguis foi observado anteriormente (Sanchez-Morgado *et al.*, 2003), porém interrogando um INDEL de seis nucleotídeos localizado aproximadamente 600pb à jusante dos INDELS interrogados neste trabalho. Esses dados demonstram que o gene da amelogenina em saguis não possui a maioria dos INDELS utilizados para diferenciar os cromossomos X e Y em humanos.

## 6. CONCLUSÕES

O loco STR contendo a repetição (GAAA)<sub>n</sub> perto do gene *RP2* foi utilizado para desenvolver um ensaio de digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa fluorescente para a interrogação pontual do estado de metilação dos cromossomos X em saguis.

. O marcador contendo INDELS no gene *Amg* não discriminou saguis machos de fêmeas.

Devido à limitada informação disponível para a sequência de referência do cromossomo Y em *Callithrix jacchus* não foi possível selecionar locos STR únicos ao cromossomo Y.

O *Callithrix jacchus* é um bom candidato à modelo primata de estudo da ICX.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, D. H., Barnett, D. K., *et al.* Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. Comp Med, v.53, n.4, Aug, p.339-50. 2003.

Abbott, D. H. e Hearn, J. P. Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. J Reprod Fertil, v.53, n.1, May, p.155-66. 1978.

Aerts, S., Thijs, G., *et al.* Comprehensive analysis of the base composition around the transcription start site in Metazoa. BMC Genomics, v.5, n.1, Jun 1, p.34. 2004.

Allen, R. C., Zoghbi, H. Y., *et al.* Methylation of Hpall and Hhal 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, Dec, 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.

Alves Da Silva, A. F. A recombinação pericentromérica e o estágio meiótico da não disjunção do cromossomo 21 na síndrome de Down. (Mestrado). Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2011. 100 p.

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

Auricchio, P. Primatas do Brasil. São Paulo, Brasil. 1995

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, Mar, p.293-9. 2006.

Ballabio, D., Cosio, M. S., *et al.* A chemometric approach based on a novel similarity/diversity measure for the characterisation and selection of electronic nose sensors. Anal Chim Acta, v.578, n.2, Sep 25, p.170-7. 2006.

Barbosa, M. N. e Da Silva Mota, M. T. Alloparental responsiveness to newborns by nonreproductive, adult male, common marmosets (*Callithrix jacchus*). Am J Primatol, v.75, n.2, Feb, p.145-52. 2013.

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, Apr 30, p.676. 1949.

- Baylin, S. B. e Ohm, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? Nat Rev Cancer, v.6, n.2, Feb, p.107-16. 2006.
- Bell, J. T., Pai, A. A., *et al.* DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. Genome Biol, v.12, n.1, p.R10. 2011.
- Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. Nucleic Acids Res, v.27, n.2, Jan 15, p.573-80. 1999.
- Berletch, J. B., Yang, F., *et al.* Genes that escape from X inactivation. Hum Genet, v.130, n.2, Aug, p.237-45. 2011.
- Bernstein, B. E., Meissner, A., *et al.* The mammalian epigenome. Cell, v.128, n.4, Feb 23, p.669-81. 2007.
- 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, Jan 15, p.9-16. 1962.
- Bonasio, R., Tu, S., *et al.* Molecular signals of epigenetic states. Science, v.330, n.6004, Oct 29, p.612-6. 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, Oct 30, p.515-26. 1992.
- Brown, C. J., Ballabio, A., *et al.* A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature, v.349, n.6304, Jan 3, p.38-44. 1991.
- Brown, C. J., Hendrich, B. D., *et al.* The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. Cell, v.71, n.3, Oct 30, p.527-42. 1992.
- 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, Jul, p.5-8. 1997.
- Brown, D. W. Threat to Humans from Virus Infections of Non-human Primates. Rev Med Virol, v.7, n.4, Dec, p.239-246. 1997.
- 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, Apr 9, p.3472-4. 2009.
- Butler, J. M. Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. Oxford: Elsevier Academic Press. 2005. 1-647 p.
- 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, Jun 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, Mar 17, p.400-4. 2005.

Cedar, H. e Bergman, Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. Nat Rev Genet, v.10, n.5, May, p.295-304. 2009.

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

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, Aug 12, p.1919-26. 2000.

Charlesworth, B. The evolution of sex chromosomes. Science, v.251, n.4997, Mar 1, p.1030-3. 1991.

Charruau, P., Fernandes, C., *et al.* Phylogeography, genetic structure and population divergence time of cheetahs in Africa and Asia: evidence for long-term geographic isolates. Mol Ecol, v.20, n.4, Feb, p.706-24. 2011.

Clemson, C. M., Mcneil, J. A., *et al.* XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. J Cell Biol, v.132, n.3, Feb, p.259-75. 1996.

Cotton, A. M., Lam, L., *et al.* Chromosome-wide DNA methylation analysis predicts human tissue-specific X inactivation. Hum Genet, v.130, n.2, Aug, p.187-201. 2011.

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, May 14, p.773-84. 2001.

De Moraes, J. M. M., Ruiz-Miranda, C. R., *et al.* O Problema dos saguis introduzidos no Rio de Janeiro: Vítima ou vilão. CIÊNCIAHOJE. VOL. 48: 283 p. 2011.

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

Eissenberg, J. C. e Shilatifard, A. Histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation in development and differentiation. Dev Biol, v.339, n.2, Mar 15, p.240-9. 2010.

Espada, J. e Esteller, M. DNA methylation and the functional organization of the nuclear compartment. Semin Cell Dev Biol, v.21, n.2, Apr, p.238-46. 2010.

Esteller, M. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. Lancet Oncol, v.4, n.6, Jun, p.351-8. 2003.

Esteller, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat Rev Genet, v.8, n.4, Apr, p.286-98. 2007.

Esteller, M. e Herman, J. G. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. J Pathol, v.196, n.1, Jan, p.1-7. 2002.

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, Apr, 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, Apr 1, p.1358-67. 2010.

Fackler, M. J., Mcveigh, M., *et al.* Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. Cancer Res, v.64, n.13, Jul 1, p.4442-52. 2004.

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

Feinberg, A. P. Cancer epigenetics is no Mickey Mouse. Cancer Cell, v.8, n.4, Oct, p.267-8. 2005.

Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D. Introducción al uso de marcadores moleculares em el análisis genético. EMBRAPA CENARGEN, p. 220, v.(EMBRAPA CENARGEN Documento 20). 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, Mar 1, p.1827-31. 1992.

Fukuda, H., Sano, N., *et al.* Simple histone acetylation plays a complex role in the regulation of gene expression. Brief Funct Genomic Proteomic, v.5, n.3, Sep, p.190-208. 2006.

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, Oct 9, p.1576-82. 2012.

Graves, J. A. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. Cell, v.124, n.5, Mar 10, p.901-14. 2006.

Herman, J. G., Graff, J. R., *et al.* Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.18, Sep 3, p.9821-6. 1996.

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, Sep 7, p.7439-47. 2010.

Hsieh, C. L. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. Mol Cell Biol, v.14, n.8, Aug, p.5487-94. 1994.

Illingworth, R. S. e Bird, A. P. CpG islands--'a rough guide'. FEBS Lett, v.583, n.11, Jun 5, p.1713-20. 2009.

Illingworth, R. S., Gruenewald-Schneider, U., *et al.* Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. PLoS Genet, v.6, n.9, Sep. 2011.

Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., *et al.* Comprehensive high-throughput arrays for relative methylation (CHARM). Genome Res, v.18, n.5, May, p.780-90. 2008.

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

Jeon, B. G., Rho, G. J., *et al.* Low levels of X-inactive specific transcript in somatic cell nuclear transfer embryos derived from female bovine freemartin donor cells. Sex Dev, v.6, n.1-3, p.151-9. 2012.

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, Jun, p.1249-52. 2009.

Jones, P. A. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. Ann N Y Acad Sci, v.983, Mar, p.213-9. 2003.

Jones, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nat Rev Genet, v.13, n.7, Jul, p.484-92. 2012.

Jones, P. A. e Baylin, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat Rev Genet, v.3, n.6, Jun, p.415-28. 2002.

Laird, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. Nat Rev Cancer, v.3, n.4, Apr, p.253-66. 2003.

Laird, P. W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. Nat Rev Genet, v.11, n.3, Mar, p.191-203. 2010.

Leclercq, S., Rivals, E., *et al.* Detecting microsatellites within genomes: significant variation among algorithms. BMC Bioinformatics, v.8:125, p.1-18. 2007.

Lee, J. T., Davidow, L. S., *et al.* Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. Nat Genet, v.21, n.4, Apr, p.400-4. 1999.

Lee, J. T. e Lu, N. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. Cell, v.99, n.1, Oct 1, p.47-57. 1999.

- Li, E., Bestor, T. H., *et al.* Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell, v.69, n.6, Jun 12, p.915-26. 1992.
- Lister, R., Pelizzola, M., *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. Nature, v.462, n.7271, Nov 19, p.315-22. 2009.
- Lujambio, A., Ropero, S., *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. Cancer Res, v.67, n.4, Feb 15, p.1424-9. 2007.
- Lyon, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). Nature, v.190, Apr 22, p.372-3. 1961.
- Lyon, M. F. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. Am J Hum Genet, v.14, Jun, p.135-48. 1962.
- Machado, F. B. Análise compreensiva de marcadores STR no cromossomo X humano: aplicações na genética médica e forense. (Mestrado em Biociências). Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2008. 100 p.
- Machado, F. B., Alves Da Silva, A. F., *et al.* Informativeness of a novel multiallelic marker-set comprising an F8 intron 21 and three tightly linked loci for haemophilia A carriership analysis. Haemophilia, v.17, n.2, Mar, p.257-66. 2011.
- Machado, F. B., Duarte, L. P., *et al.* Improved criterion-referenced assessment in indirect tracking of haemophilia A using a 0.23 cM-resolution dense polymorphic marker set. Haemophilia, v.15, n.5, Sep, p.1135-42. 2009.
- Machado, F. B. e Medina-Acosta, E. An IKBKG, and not a G6PD, short tandem repeat marker is used in indirect diagnosis of haemophilia A. Haemophilia, v.14, n.4, Jul, p.849-50. 2008.
- Machado, F. B. e Medina-Acosta, E. Genetic map of human X-linked microsatellites used in forensic practice. Forensic Sci Int Genet, v.3, n.3, Jun, p.202-04. 2009a.
- Machado, F. B. e Medina-Acosta, E. High-resolution combined linkage physical map of short tandem repeat loci on human chromosome band Xq28 for indirect haemophilia A carrier detection. Haemophilia, v.15, n.1, Jan, p.297-308. 2009b.
- Mansfield, K. Marmoset models commonly used in biomedical research. Comp Med, v.53, n.4, Aug, p.383-92. 2003.
- Mietton, F., Sengupta, A. K., *et al.* Weak but uniform enrichment of the histone variant macroH2A1 along the inactive X chromosome. Mol Cell Biol, v.29, n.1, Jan, p.150-6. 2009.
- Migeon, B. R., Chowdhury, A. K., *et al.* Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation. Am J Hum Genet, v.69, n.5, Nov, p.951-60. 2001.

- Migeon, B. R., Lee, C. H., *et al.* Species differences in TSIX/Tsix reveal the roles of these genes in X-chromosome inactivation. Am J Hum Genet, v.71, n.2, Aug, p.286-93. 2002.
- Migicovsky, Z. e Kovalchuk, I. Epigenetic memory in mammals. Front Genet, v.2, p.28. 2011.
- Moraes, I. A., De-Carvalho, M. C., *et al.* Histology of the sternal and suprapubic skin areas in lion tamarins (*Leontopithecus* sp. Callitrichidae-primates). Am J Primatol, v.68, n.11, Nov, p.1120-6. 2006.
- Morais, N. B. e Romijn, P. C. Doenças emergentes. Agência Fiocruz de Notícias, Saúde e ciência para todos, v.Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1003&sid=12>>. n.Acesso em: 13 de junho de 2013. 2010.
- Moreira De Mello, J. C., De Araujo, E. S., *et al.* Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. PLoS One, v.5, n.6, p.e10947. 2010.
- Mukai, T. e Sekiguchi, M. Gene silencing in phenomena related to DNA repair. Oncogene, v.21, n.58, Dec 16, p.9033-42. 2002.
- Nagamachi, C. Y., Pieczarka, J. C., *et al.* Comparative chromosomal study of five taxa of genus *Callithrix*, group *jacchus* (Platyrrhini, Primates). Am J Primatol, v.41, n.1, p.53-60. 1997.
- Ohno, S. e Hauschka, T. S. Allocyclcy of the X-chromosome in tumors and normal tissues. Cancer Res, v.20, May, 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, Oct, p.415-8. 1959.
- Olerup, O. e Zetterquist, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens, v.39, n.5, May, p.225-35. 1992.
- 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.
- 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, Jan, p.53-61. 2008.

- Rando, O. J. Chromatin structure in the genomics era. Trends Genet, v.23, n.2, Feb, p.67-73. 2006.
- 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, Jun 16-22, p.635-7. 1983.
- Reik, W., Santos, F., *et al.* Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. Theriogenology, v.59, n.1, Jan 1, p.21-32. 2003.
- Reis, N. R. Primatas Brasileiros, v. 1 ed. 2008. 259 p p.
- Ross, M. T., Grafham, D. V., *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. Nature, v.434, n.7031, Mar 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.
- Sanchez-Morgado, J. M., Haworth, R., *et al.* XY female marmoset (*Callithrix jacchus*). Comp Med, v.53, n.5, Oct, p.539-44. 2003.
- Schwahn, U., Lenzner, S., *et al.* Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. Nat Genet, v.19, n.4, Aug, p.327-32. 1998.
- 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, Feb 1, p.974-80. 2003.
- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., *et al.* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature, v.423, n.6942, Jun 19, p.825-37. 2003.
- Strathdee, G. e Brown, R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. Expert Rev Mol Med, v.4, n.4, Mar, p.1-17. 2002.
- Straub, T. e Becker, P. B. Dosage compensation: the beginning and end of generalization. Nat Rev Genet, v.8, n.1, Jan, p.47-57. 2007.
- Swierczek, S. I., Piterkova, L., *et al.* Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. Blood, v.119, n.13, Mar 29, p.e100-9. 2012.
- Tammen, S. A., Friso, S., *et al.* Epigenetics: The link between nature and nurture. Mol Aspects Med, Aug 10. 2012.
- Tardif, S. D., Mansfield, K. G., *et al.* The marmoset as a model of aging and age-related diseases. Ilar J, v.52, n.1, Feb 8, p.54-65. 2011.
- Teixeira, F. K. e Colot, V. Gene body DNA methylation in plants: a means to an end or an end to a means? Embo J, v.28, n.8, Apr 22, p.997-8. 2009.

Turan, N., Katari, S., *et al.* Explaining inter-individual variability in phenotype: is epigenetics up to the challenge? Epigenetics, v.5, n.1, Jan 1, p.16-9. 2010.

Ushijima, T. Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. Nat Rev Cancer, v.5, n.3, Mar, p.223-31. 2005.

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, Apr, p.373-80. 2008.

Verma, M. e Srivastava, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. Lancet Oncol, v.3, n.12, Dec, p.755-63. 2002.

Verona, C. E. S. e Pissinatti, A. Primates - Primatas do Novo Mundo. São Paulo. 2006. p. 378-401. p. (Tratado de Animais Selvagens - medicina)

Wang, W., Fernandez De Castro, J., *et al.* Selective rod degeneration and partial cone inactivation characterize an iodoacetic acid model of Swine retinal degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci, v.52, n.11, p.7917-23. 2011.

Wang, X., Miller, D. C., *et al.* Random X inactivation in the mule and horse placenta. Genome Res, v.22, n.10, Oct, p.1855-63. 2012.

Wong, C. C., Caspi, A., *et al.* A longitudinal twin study of skewed X chromosome-inactivation. PLoS One, v.6, n.3, p.e17873. 2011.

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

Yen, Z. C., Meyer, I. M., *et al.* A cross-species comparison of X-chromosome inactivation in Eutheria. Genomics, v.90, n.4, Oct, p.453-63. 2007.