

**METILAÇÃO DE DINUCLEOTÍDEOS CpG PROXIMAIS A REPETIÇÃO
CONSERVADA (CTG)_n NO ÉXON 1 DO GENE *SRPX* É INDICATIVA
DO ESTADO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X EM HUMANOS
E EM SAGUIS**

THIAGO BARBOSA DE SOUZA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO - UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

FEVEREIRO DE 2014

**METILAÇÃO DE DINUCLEOTÍDEOS CpG PROXIMAIS A REPETIÇÃO
CONSERVADA (CTG)_n NO ÉXON 1 DO GENE *SRPX* É INDICATIVA
DO ESTADO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X EM HUMANOS
E EM SAGUIS**

THIAGO BARBOSA DE SOUZA

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.

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
FEVEREIRO DE 2014

**METILAÇÃO DE DINUCLEOTÍDEOS CpG PROXIMAIS A REPETIÇÃO
CONSERVADA (CTG)_n NO ÉXON 1 DO GENE *SRPX* É INDICATIVA
DO ESTADO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X EM HUMANOS
E EM SAGUIS**

THIAGO BARBOSA DE SOUZA

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 24 de fevereiro de 2014.

Comissão examinadora:

Prof. Dra. Beatriz dos Santos Ferreira (Doutora em Biociências e Biotecnologia) – UNES

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

Prof. Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios (Doutor em Ciências Biológicas) - UENF

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Célia Barbosa e Dirceu Rezende de Souza, por toda a confiança, apoio e zelo, e também por toda a educação ensinada;

Aos meus irmãos, Verônica Barbosa de Souza e José Leandro Rezende, pelo apoio, presença, amizade e companheirismo ao longo desses anos;

Ao meu primo Gabriel Barbosa, por estar sempre presente e sempre torcendo pelo meu sucesso;

Aos meus companheiros de laboratório, Maria, Thaís, Antônio, Viviane, Graziela, Fabrício, Katrine e Filipe, pela amizade, parceria e cumplicidade em momentos de alegria e em momentos de tristeza;

Ao Professor Enrique Medina-Acosta, por toda a paciência, pelos ensinamentos, por acreditar e investir tempo e recursos em minha formação, desde a graduação, ajudando de forma crucial em minha formação acadêmica;

Aos professores Fabrício Fernandes, Adriana Lajes e Alexandre Sereno por todo o incentivo e ensinamentos durante minha graduação, motivando-me a querer sempre ir além de minhas capacidades;

Ao professor Marcílio Parreira dos Reis por me ensinar algo além dos planos de aula no ensino médio, ensinar a querer;

Aos meus amigos e companheiros de caminhada Wilker, Otávio e Danilo, pela amizade, cumplicidade e confiança construídos ao longo do último ano;

À Uenf e professores que me acompanharam durante esses anos, desde a iniciação científica;

Ao Hospital Escola Álvaro Alvim e a Mary Jane Batista pela colaboração em minha formação;

Às instituições de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ pelo apoio em recursos financeiros para a realização desta dissertação.

Quando um homem adquire conhecimento
Ele se torna um pássaro
Que fez do voo liberdade
Fez do canto poesia
Rompeu as grades da gaiola
E planou nos ventos de sua vida
(Thiago Barbosa de Souza)

“Não há fatos eternos, como não há verdades absolutas.”
(Friedrich Nietzsche)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Informações para a interpretação de um eletroferograma.....	30
Figura 2. Fórmula estatística empregada para calcular a proporção de ICX entre os alelos.....	31
Figura 3. Alinhamento da região contendo o locus STR no éxon 1 do gene <i>SRPX</i> em 9 espécies de primatas.	33
Figura 4. Árvore filogenética da região contendo o STR no gene <i>SRPX</i> em nove espécies de primatas.	35
Figura 5. Eletroferograma dos perfis alélicos encontrados para o <i>SRPX</i> em mulheres.....	35
Figura 6. Eletroferograma comparando em uma mesma amostra os iniciadores utilizados neste estudo com os iniciadores utilizados por Amendro em 2013 em mulheres.....	36
Figura 7. Eletroferograma dos perfis alélicos antes e após digestão com enzima sensível à metilação em uma mulher heterozigota.....	37
Figura 8. Eletroferogramas dos perfis alélicos encontrados em sagui.	39
Figura 9. Eletroferograma dos perfis alélicos encontrados para o polimorfismo em <i>SRPX</i> em dois saguis macho.	40
Figura 10. Eletroferogramas dos perfis genotípicos para o <i>SRPX</i> encontrados em duas amostras de sagui antes e após digestão com <i>HpaII</i>	42
Figura 11. Perfil eletroforéticos de Macho heterozigoto para o <i>SRPX</i> antes e após digestão enzimática por <i>HpaII</i> (A e B, respectivamente).....	42
Figura 12. Eletroferograma dos perfis alélicos para o polimorfismo em <i>SRPX</i> em dois saguis antes e após digestão enzimática com a enzima <i>HhaI</i> , também apresentando sítio na região analisada.	43
Figura 13. Eletroferograma de amostra de sagui macho positivo para o marcador SRY.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores desenhados para os ensaios em humanos e saguis	28
Tabela 2. Pontuação de identidade entre as sequências dos 9 primatas	33
Tabela 3. Distribuição de heterozigose e homozigose para as mulheres genotipadas	36
Tabela 4. Padrões de inativação em mulheres heterozigotas	38
Tabela 5. Distribuição de heterozigose e homozigose para os saguis genotipados	39
Tabela 6. Padrões de inativação nos saguis heterozigotos	41
Tabela 7. Relação entre sexo fenotípico e presença do marcador sexual SRY.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa - Aminoácidos

AR - do inglês *Androgen Receptor* (Receptor de Andrógeno)

C - Citosina

CGIs - Ilhas CpG

CpGs - Citosina-fosfato-Guanina

Del - Deleção

DNMTs - DNA metiltransferases

EDTA - do inglês *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* (Ácido Etileno diaminotetracético)

G - Guanina

HDAC - Histonas desacetilazes

HhaI - Enzima de restrição sensível à metilação

HpaII - Enzima de restrição sensível à metilação

ICX - Inativação do Cromossomo X

Kb - kilobase

miRNAs - microRNAs

NCBI - National Center for Biotechnology Information

pb - Pares de bases

PCR - do inglês *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da Polimerase)

PELO - Pelota homolog *Drosophila*

SRPX - do inglês *Sushi repeat-containing protein*, X-linked

SRY - do inglês *sex determining region Y* (Fator determinante de testículo)

STR - do inglês *short tandem repeats* (Sequências curtas repetidas em tandem)

TSIX - Gene antisentido ao *XIST*

TSS - do inglês *transcriptional start sites* (sítios de início de transcrição)

v-src - gene Rous sarcoma vírus transformado

XCE - *Elemento controlador do cromossomo X*

XIST - do inglês *X inactivation specific transcript*

XITE - do inglês *X-inactivation intergenic Transcription element*

Sumário

ÍNDICE DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução.....	15
1.1. Marcas Epigenéticas.....	17
1.2. Metilação do DNA.....	19
1.3. Inativação do Cromossomo X	20
1.4. Gene <i>SRPX</i>	22
1.5. O sagui <i>Callithrix spp.</i>	24
2. Objetivo Geral	25
2.1. Objetivos Específicos.....	25
3. Materiais e Métodos.....	26
3.1. Aspectos éticos:.....	26
3.2. Sujeitos de pesquisa	26
3.3. Amostras biológicas	27
3.4. Extração de DNA:.....	27
3.5. Quantificação do DNA genômico:.....	27
3.6. Desenho de iniciadores	27
3.7. Tipagem dos locus estudados.....	29
3.8. Caracterização dos alelos amplificados.....	29
3.9. Cálculo de frequências alélicas.....	30
3.10. Digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação.....	30
3.11. Quantificação das proporções de inativação:.....	31
3.12. Alinhamento de sequências e construção da árvore filogenética:	31
4. Resultados.....	32

4.1. Análise <i>in silico</i> da região flanqueadora do locus STR no gene <i>SRPX</i> em primatas:	32
4.2. Genotipagem do <i>SRPX</i> em humanos e dados populacionais	35
4.3. Avaliação do estado da ICX em mulheres heterozigotas	37
4.4. Genotipagem do <i>SRPX</i> em saguis	39
4.5. Avaliação do estado da ICX nos saguis heterozigotos	40
4.6. Genotipagem do Marcador SRY	43
5. Discussão	46
5.1. Análise <i>in silico</i> da região flanqueadora do locus STR no gene <i>SRPX</i> em primatas:	46
5.2. Genotipagem do <i>SRPX</i> em humanos e dados populacionais.	46
5.3. Avaliação do estado da ICX em mulheres heterozigotas	48
5.4. Genotipagem do <i>SRPX</i> em saguis	48
5.5. Avaliação do estado de inativação em saguis heterozigotos.....	49
5.6. Genotipagem do marcador SRY	50
6. Conclusões.....	51
Referências bibliográficas	52

Resumo

A inativação do cromossomo X (ICX) é um processo natural que ocorre em fêmeas de mamíferos eutérios pelo qual a maioria dos genes em um dos cromossomos X em cada célula é silenciada. Diversos modelos animais têm sido estudados para compreender os mecanismos de inativação do cromossomo X, entre eles há modelos caninos, equinos, suínos e primatas como o macaco Rhesus. As metodologias empregadas para determinação do estado da ICX exploram marcas epigenéticas como a metilação do DNA. A principal metodologia empregada explora a heterozigose de uma repetição curta em tandem (STR) polimórfica, do trinucleotídeo CAG no éxon 1 do gene *AR*. Esse locus é monomórfico em alguns primatas, como os do gênero *Callithrix*, portanto, não informativo para esses primatas. O propósito do presente estudo foi avaliar o perfil de metilação pontual próximo ao locus STR trinucleotídico (CTG)_n no éxon 1 do gene *SRPX* em humanos e em saguis híbridos entre as espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*. O gene *SRPX* é um supressor tumoral. Os saguis são importantes modelos experimentais para pesquisas biomédicas, dada a sua semelhança anatômica, fisiológica e genética com humanos. DNA genômico de 72 mulheres saudáveis, 18 fêmeas e 14 saguis machos foram genotipados para o locus *SRPX* (CTG)_n por PCR quantitativa fluorescente (QFPCR). O estado da ICX foi determinado indiretamente por digestão enzimática sensível à metilação associada à QFPCR (DESM-QFPCR). Sexagem molecular foi realizada nos saguis por análise de marcador no gene *SRY*. Foram encontrados dois alelos para o *SRPX* tanto em humanos quanto em saguis. As taxas de heterozigose observadas foram de 0,39 e 0,44 para humanos e saguis respectivamente. Ensaio de inativação foi feito em 17 mulheres heterozigotas para o locus estudado. Nove dessas apresentaram perfil aleatório enquanto as demais apresentaram perfil levemente preferencial. Oito saguis fêmeas foram heterozigotas para o locus CTG. Uma fêmea apresentou perfil altamente preferencial, outra apresentou perfil levemente preferencial e as demais exibiram perfis aleatórios. Interessantemente dois machos foram heterozigotos, um exibindo perfil aleatório de ICX e o outro levemente preferencial. Sete saguis fêmeas apresentaram genótipo positivo para o marcador *SRY*. Estes resultados foram interpretados como evidência de quimerismo com fêmeas e machos, respectivamente. Isto permitiu a determinação dos padrões de ICX das irmãs gêmeas a partir de DNA genômico

obtido de machos quiméricos. O polimorfismo STR no gene *SRPX* é conservado em humanos e em saguis, primata evolutivamente distante do homem, o que pode ser um indício de pressão seletiva para a manutenção de apenas dois alelos, importante à função de supressor tumoral. A discrepância observada em saguis apresentando machos heterozigotos para um locus no cromossomo X e fêmeas positivas para um marcador no cromossomo Y pode ser explicada por quimerismo, evento altamente comum nesses primatas. O polimorfismo estudado no gene *SRPX* e o marcador sexual *SRY* são indicadores de quimerismo em saguis nesse estudo. Os dados deste estudo permitem propor a utilização do locus CTG no gene *SRPX* como um marcador para interrogação da ICX em primatas humanos e não humanos.

Palavras-chaves: Inativação do cromossomo X, quimerismo, saguis, *SRPX*, *SRY*.

Abstract:

The X-chromosome inactivation (XCI) is a naturally occurring in female eutherian mammals by which most genes in one X in each cell are silenced. Several animal models have been studied to understand the mechanisms of X chromosome inactivation, such as canine models, horses, pigs and primates such as the Rhesus monkey. The methodologies used to determine the state of XCI explore epigenetic marks such as DNA methylation. The main methodology explores the heterozygosity of a polymorphic short tandem repeat (STR), a CAG trinucleotide in exon 1 of the *AR* gene. This locus is monomorphic in some primates such as the genus *Callithrix* therefore uninformative for these primates. The purpose of this study was to evaluate the methylation profile near the locus STR (CTG)_n in exon 1 of the *SRPX* gene in humans and hybrids between species *Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata* marmosets. The *SRPX* gene is a tumor suppressor. The marmosets are important experimental models for biomedical research, given its anatomical, physiological and genetic similarity with humans. Genomic DNA from 72 healthy women, 18 female and 14 male marmosets were genotyped for the *SRPX* (CTG)_n locus by fluorescent quantitative PCR (QFPCR). The state of the XCI was determined indirectly by the methylation sensitive enzymatic digestion associated QFPCR (MSED - QFPCR). Molecular sexing was performed in marmosets by marker analysis in the *SRY* gene. Two *SRPX* (CTG) alleles were found in both humans and marmosets. Heterozygosity was 0.39 and 0.44 for humans and marmosets, respectively. Inactivation assays were performed in 17 heterozygous women. In nine, a random profile of XCI was observed while in the remaining the pattern was slightly preferential. Eight female marmosets were heterozygous for the CTG site. One female showed skewed profile (%), another showed slightly preferred and the others exhibited random profiles. Interestingly, two male marmosets were heterozygous for the X-linked *SRPX* marker. Furthermore, seven female marmosets tested positive for the *SRY* marker. These results were interpreted as evidence for chimerism with female and males, respectively. This allowed the determination of the XCI patterns for the sister twins in genomic DNA obtained from chimeric males. The STR polymorphism in *SRPX* gene is conserved in humans and marmosets, evolutionarily distant primate of humans, which may be indicative of selective pressure to maintain only two alleles. The discrepancy observed in marmosets heterozygote males presenting to a marker on chromosome X and positive for a marker Y chromosome in

females can be explained by chimerism, a highly common event in these primates. The polymorphic STR locus in the *SRPX* and the *SRY* male-determining marker are indicators of chimerism in marmosets in this study. The data from this study allow us to propose that the *SRPX* (CTG)_n can be used as a marker for determination of XCI in humans and nonhuman primate..

Keywords: Chimerism, marmosets, *SRPX*, *SRY*, X-chromosome inactivation.

1. Introdução

Células somáticas em mamíferos fêmeas têm duas cópias do cromossomo X, uma das quais sofre processo normal de inativação, mormente aleatório, para compensação de dose entre os sexos (Lyon, 1961). Desta forma, mamíferos fêmeas exibem mosaicismo somático quanto aos cromossomos X ativos (Lyon, 1961; Beutler, Yeh *et al.*, 1962). Entretanto, a inativação do cromossomo X (ICX) pode ser às vezes preferencial para um dos cromossomos X parentais. Nesses casos, fêmeas heterozigotas para alguma mutação em gene dominante no cromossomo X podem manifestar doenças ligadas ao X quando o alelo normal se encontra no cromossomo preferencialmente inativo. Por exemplo, em mulheres acometidas por hemofilia, distrofia muscular de Duchenne, daltonismo, etc. A ICX, aleatória ou preferencial, resulta em variação fenotípica. A ICX é considerada preferencial se a proporção entre cromossomos X ativos para inativos for menor que 20% ou superior a 80% (Plenge, Stevenson *et al.*, 2002).

Estudos sobre o estado de ICX auxiliam na determinação da origem parental de doenças ligadas ao X bem como sua etiologia, além de estudos de clonalidade em câncer. As metodologias de determinação do estado de ICX podem ser diretas ou indiretas. A análise direta pode ser feita através de sequenciamento do transcrito (Brown e Robinson, 1997) e sequenciamento do DNA pré-tratado com bissulfito. (Frommer, McDonald *et al.*, 1992). A análise indireta pode ser realizada pela interrogação de sítios alvos no cromossomo X para enzimas de restrição sensíveis a metilação de DNA. Em sua maioria, essas metodologias exploram marcas epigenéticas regulatórias no processo de inativação e manutenção da mesma. Uma das principais marcas epigenéticas estudadas é a metilação do resíduo citosina no dinucleotídeo CpG no DNA (Garcia-Gimenez, Sanchis-Gomar *et al.*, 2012).

O ensaio indireto padrão para análise da ICX é o ensaio HUMARA (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992). Esse ensaio permite interrogar o estado de metilação de sítios CpG proximais ao locus polimórfico STR (Short Tandem Repeat) CAG no éxon 1 do gene *AR* (Androgen Receptor). Essa região apresenta sítios de restrição que estão metilados no cromossomo inativo e não metilados no cromossomo X ativo. As enzimas digerem apenas o cromossomo ativo, deixando o DNA do cromossomo inativo íntegro. Segue-se então a genotipagem do marcador STR para correlacioná-

lo com o cromossomo inativo (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992). HUMARA, embora amplamente utilizado, apresenta limitações. O locus STR CAG não é informativo em 10-20% das mulheres. Não há evidência experimental direta que estabeleça inequivocamente que os perfis de metilação referidos pelo ensaio HUMARA estejam correlacionados com os níveis de expressão ou silenciamento do gene *AR*. As correlações têm sido feitas com a expressão de outros genes no cromossomo X. Em alguns desses estudos a expressão desses genes não reflete o padrão de metilação estabelecido pelo ensaio HUMARA. (Swierczek, Piterkova *et al.*, 2012). Em relação a modelos primatas de pequeno porte, o locus STR CAG no gene *AR* é monomórfico, como exemplo o sagui (*Callithrix* spp.) e o macaco Rhesus (Mubiru, Cavazos *et al.*, 2012). Assim, novas abordagens são necessárias para perfazer esses casos em que o teste do locus *AR* não é informativo em humanos e em primatas de pequeno porte.

Diversos modelos animais têm sido estudados para compreender os mecanismos de ICX. Entre eles há cães, camundongos, suínos, bovinos, equinos e coelhos (Tachibana, Ma *et al.*, 2012; Wang, Miller *et al.*, 2012; Dupont e Gribnau, 2013; Sado e Sakaguchi, 2013). Há também trabalhos empregando o macaco Rhesus como modelo primata para estudo da ICX (Tachibana, Ma *et al.*, 2012). O propósito do presente estudo foi avaliar o perfil de metilação pontual próximo ao locus STR do trinucleotídeo CTG no éxon 1 do gene *SRPX* em humanos e em saguis híbridos entre as espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*. Nosso grupo de pesquisa identificou esse locus por análise de bioinformática como um alvo potencial para determinação do perfil de metilação associado com ICX em humanos (Medina-Acosta, E., Machado, FB, dados não publicados). O estado de metilação pontual ao redor desse locus foi recentemente correlacionado aos perfis de metilação e de ICX utilizando o teste HUMARA (Amendro, 2013).

Os saguis são importantes modelos experimentais para pesquisas biomédicas, dada sua alta similaridade anatômica, fisiológica e genética com humanos. Sabe-se que o locus *AR* não é informativo nestes animais (Mubiru, Cavazos *et al.*, 2012). Análise de bioinformática desse locus indica que o STR CAG no gene *AR* em saguis é imperfeita, isto é, interrompida por sequências outras que a unidade de repetição (Medina-Acosta, E., comunicação pessoal). Dada a alta homologia entre o *SRPX* humano com o do sagui, acreditamos que nesses animais o estado de metilação pontual em CpGs ao redor do locus STR CTG no gene *SRPX* também seja indicativo do estado da ICX.

O gene *SRPX* é um supressor tumoral. (Dry, Aldred *et al.*, 1995; Meindl, Carvalho *et al.*, 1995) O locus de análise escolhido neste gene está localizado em seu primeiro éxon e consiste em um polimorfismo STR trinucleotídico CTG que confere uma variação fenotípica com deleção de até 7 resíduos de leucina (17-23LDeI). (Dry, Aldred *et al.*, 1995). Este locus foi escolhido com base em critérios de varredura no cromossomo X para o rastreamento de microssatélites em humanos como descrito na literatura (Medina-Acosta, e Machado, FM, comunicação pessoal). A mineração foi realizada utilizando-se a sequência de referência do cromossomo X disponível no banco de dados público NCBI (National Center for Biotechnology Information). Entre os critérios, podemos citar: polimorfismo em região intragênica ou em região promotora em relação a genes que não escapam à ICX em humanos, proximidade a sítios de restrição susceptíveis à 5mC (5-metil-citosina) e alta taxa de heterozigose. Contudo, genotipagem recente para este locus em nossa população revelou a prevalência de dois alelos, cujos comprimentos se diferenciam em três pares bases, com frequências 0,19 e 0,80, respectivamente, e taxa de heterozigose observada de 0,4. Um terceiro alelo expandido em 27pb também foi encontrado e a frequência deste é 0,09 (Amendro, 2013).

1.1. Marcas Epigenéticas

Alterações Epigenéticas são aquelas que não envolvem modificações na sequência de DNA. Entre os mecanismos envolvidos na regulação epigenética se destacam a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas, RNA de interferência (RNAi) e a organização nuclear. Embora sejam diferentes, esses mecanismos são complementares e podem estar correlacionados durante o processo de regulação epigenética. Eles apresentam importância na manutenção da estabilidade cromossômica, divisão celular, silenciamento gênico, imprinting genômico, inativação do cromossomo X entre outros. (Garcia-Gimenez, Sanchis-Gomar *et al.*, 2012)

Uma grande eclosão de estudos explorando alterações epigenéticas tem encontrado aplicações em câncer, doenças autoimunes e doenças psiquiátricas ou degenerativas nas últimas décadas. Esses estudos buscam marcas epigenéticas que possam ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico ou alvo terapêutico. (Baylin e Jones, 2012; Garcia-Gimenez, Sanchis-Gomar *et al.*, 2012) Como exemplo,

podemos citar as modificações pós-traducionais das histonas. Essas modificações consistem em acetilação, metilação, fosforilação, carbonilação, entre outras. Elas podem alterar o padrão de expressão de determinados genes, visto que podem modificar a estrutura da cromatina.

Outro exemplo são os microRNAs (miRNAs), que funcionam como RNAs de interferência. Os miRNAs são uma pequena classe de RNAs não-codificantes (19-23 nucleotídeos) que podem diminuir a expressão de determinados genes. (Bartel, 2004) Desta forma, o perfil de expressão de determinados tipos de miRNAs pode servir como biomarcador para a avaliação do prognóstico da doença e a eficácia do tratamento. (Garcia-Gimenez, Sanchis-Gomar *et al.*, 2012) Em 2008, o grupo de Davidson descreveu que o miRNA miR-9/miR9 está pouco expresso em pacientes com Huntington. (Packer, Xing *et al.*, 2008)

Entre as modificações epigenéticas, a metilação do DNA tem sido uma das mais estudadas. Uma aplicação que explora estas modificações é a determinação do estado de inativação do cromossomo X. Em mamíferos, um dos cromossomos X sofre inativação para compensação de dose em fêmeas. Como é um processo aleatório e randômico, fêmeas exibem um mosaicismo somático, visto que tanto o cromossomo X de origem paterna quanto o de origem materna tem a mesma probabilidade de serem inativos. (Lyon, 1961; Beutler, Yeh *et al.*, 1962; Graves, 2006) Entretanto, pode ocorrer inativação preferencial em um dos cromossomos. Tal fato é prejudicial quando o cromossomo ativo apresenta mutações. Algumas doenças podem se manifestar dessa forma, entre elas a hemofilia e a distrofia muscular de Duchenne. A determinação do estado de inativação é importante para se determinar a origem parental do cromossomo ativo.

O teste padrão-ouro para determinação indireta do estado de ICX é o ensaio HUMARA. Esse teste consiste na identificação de citosinas metiladas contendo sítios de restrição próximos à sequência curta repetida em tandem (CAG)_n no éxon 1 do gene *AR*. As enzimas de restrição sensíveis a metilação de citosina não reconhecem seus sítios quando o DNA está metilado. Este teste é uma ferramenta útil em estudos de doenças ligadas ao X em que ocorre inativação preferencial e estudos de clonalidade em câncer (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992; Mutter, Chaponot *et al.*, 1995; Ko, Choi *et al.*, 1997).

1.2. Metilação do DNA

O somatório das marcas epigenéticas em uma célula é chamado de epigenoma. Enquanto todas as células do corpo têm o mesmo genótipo, cada célula ou grupo de células tem determinado epigenoma. Este é variável de acordo com estímulos endógenos e exógenos. Um dos eventos epigenéticos mais estudado é a metilação do DNA. Consiste na introdução de um grupo metil (CH₃) na posição 5 de uma citosina (5-metil-citosina; 5mC) (Garcia-Gimenez, Sanchis-Gomar *et al.*, 2012). Mediado por DNA metiltransferases, o processo de metilação ocorre principalmente no contexto de sequências ricas em CpG (ilhas CpG; CGIs). (Leung, Schones *et al.*, 2012) Por definição, ilhas CpG são sequências com conteúdo de C+G > 0.55, densidade observada x esperada >0.5 e comprimento maior que 300pb (Aerts, Thijs *et al.*, 2004).

Mais da metade dos genes em vertebrados contém CGIs. O restante do genoma apresenta baixa quantidade dessas ilhas devido ao fato de ocorrer a desaminação espontânea ou enzimática de sequências metiladas na linhagem germinativa. O processo de desaminação ocorre na 5mC, sendo esta convertida à timina (Smallwood, Tomizawa *et al.*, 2012). Em organismos com sequência idêntica de DNA, o processo de metilação é um dos processos que permite a diferenciação celular. (Zilberman e Henikoff, 2007) Domínios pobres em metilação compreendem regiões promotoras, Ilhas CpG e os éxons iniciais. Enquanto que domínios ricos em sítios metilados compreendem sequências repetidas em tandem, éxons que não os iniciais e cópias únicas de sequências pobres em ilhas CpG (Rollins, Haghghi *et al.*, 2006).

Diversas abordagens demonstram que a posição das sequências 5mC influencia o controle gênico. Metilação próxima aos locais de iniciação de transcrição (TSS, do inglês *transcriptional start sites*) bloqueia a iniciação. Todavia, quando o processo de metilação ocorre no corpo gênico, não há bloqueio da transcrição, podendo até estimular a elongação da mesma. A metilação presente nos centrômeros contribui para a manutenção da estabilidade cromossômica (Jones, 2012). Segundo alguns autores, a maior parte das CGIs permanece não-metiladas em células somáticas (Jones, 2012). Contudo, análise de bioinformática utilizando bancos de dados do metiloma humano aponta o contrario (Medina-Acosta E, comunicação pessoal). Ilhas CpG metiladas geralmente estão presentes nas regiões

promotoras de genes cuja expressão deve ser reprimida por longo período, como genes que passam por imprinting e genes localizados no cromossomo X inativo (Jones, 2012). Embora a maior parte das ilhas CpG em genes autossômicos permaneça não-metiladas em células somáticas, cerca de 10% destas estão metiladas em algum tecido ou célula (Illingworth e Bird, 2009). Os padrões de metilação do DNA são criados no período de desenvolvimento embrionário pela ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMT), principalmente DNMT3A e DNMT3B. Alterações nesses padrões podem acarretar eventos genéticos envolvidos em doenças, como o câncer. (Jones, 2012) Reduções globais nos níveis de metilação causados por mutações nos genes da DNA metiltransferase são letais (Li, Bestor *et al.*, 1992).

1.3. Inativação do Cromossomo X

No sistema de determinação sexual XY em mamíferos, as células somáticas nas fêmeas portam dois cromossomos X, enquanto que em machos apenas um X e um cromossomo Y. Se a expressão gênica do cromossomo X fosse igual em ambos os sexos, indivíduos fêmeas XX produziram duas vezes mais transcritos. Como a maior parte dos genes ligados ao X não está relacionada à determinação sexual, poderia ocorrer distúrbio metabólico em algum dos sexos. Desta forma, há um mecanismo de dosagem compensatória em fêmeas, conhecido com inativação do cromossomo X (ICX) (Lyon, 1961; Graves, 2006).

A ICX é um processo aleatório e randômico em humanos. Mulheres exibem um mosaicismo somático. O cromossomo X de origem paterna e o de origem materna têm a mesma probabilidade de serem inativos (Lyon, 1961; Beutler, Yeh *et al.*, 1962; Graves, 2006). Entretanto, há a possibilidade de ocorrer inativação preferencial em um dos cromossomos. Tal fato resulta na formação de duas populações de células com um dos dois cromossomos X ativo em um tecido, no qual uma apresenta maior prevalência que a outra. Estudos apontam que este é um evento sensível à idade e tipo de tecido. A inativação preferencial é mais comum em células do sangue comparado a epitélio bucal e epitélio urinário (Sharp, Robinson *et al.*, 2000). Em relação à idade, a inativação preferencial é maior em mulheres idosas, ocorrendo em 7% de mulheres até 25 anos e em 16% de mulheres com idade acima dos 60 (Sharp, Robinson *et al.*, 2000).

O início do silenciamento depende da expressão do gene *XIST* (do inglês *X-inactive specific transcript*) durante a embriogênese no centro de inativação do cromossomo X (XIC). Seu transcrito é um ncRNA (noncoding RNA) que age em *cis*, ou seja, é expresso no cromossomo que se tornará inativo (Brown, Ballabio *et al.*, 1991; Clemson, Mcneil *et al.*, 1996). Uma vez inativo, o cromossomo permanecerá nesse estado durante toda a vida do organismo. A cromatina do cromossomo X inativo é convertida em heterocromatina, sendo nomeado de corpúsculo de Barr (Barr e Bertram, 1949). É mantido inativo pela ação de mecanismos que atuam em sinergismo, como a metilação de suas ilhas CpG, modificações nas histonas (hipoacetilação) e constante transcrição do gene *XIST* (Csankovszki, Nagy *et al.*, 2001).

Outro gene importante durante o processo de inativação é o *TSIX* (do inglês *X inactive-specific transcript, antisense*). É um transcrito antisense do *XIST*. (Debrand, Chureau *et al.*, 1999) Sua expressão inibe a transcrição do *XIST* por interferir no recrutamento de RNA polimerase. (Luikenhuis, Wutz *et al.*, 2001) A transcrição do *TSIX* é controlada pelo gene *XITE* (do inglês *X-inactivation intergenic Transcription element*), que está localizado no elemento controlador de X (XCE) próximo ao *TSIX*. É proposto como um dos principais genes influentes na escolha do cromossomo X a ser inativo. A expressão desse gene promove a transcrição de *TSIX* em *cis* (Ogawa e Lee, 2003).

Alguns genes escapam da ICX. Cerca de 15% dos genes localizados no cromossomo X inativo permanecem transcricionalmente ativos, o que gera o perfil bialélico de expressão para esses genes em mulheres. Outros 10% apresentam padrões variáveis de expressão entre indivíduos (Anderson e Brown, 1999; Carrel e Willard, 2005). Genes que escapam da inativação estão localizados ao longo do cromossomo, predominando em regiões curtas com homologia ao cromossomo Y, conhecidas como regiões pseudoautosômicas. Genes fora dessas regiões que têm ortólogos no cromossomo Y também escapam da inativação. Entretanto, alguns genes que escapam não apresentam ortólogos, o que pode ser explicado por perda ou diferenciação. A expressão aumentada desses genes pode ser necessária para definir traços fenotípicos que diferem os sexos (Berletch, Yang *et al.*, 2010; Berletch, Yang *et al.*, 2011).

1.4. Gene *SRPX*

O gene *SRPX* (do inglês *sushi-repeat containing protein, X-linked*), também conhecido como *DRS*, *ETX1* e *SRPX1*, foi descrito por dois grupos em 1995 (Dry, Aldred *et al.*, 1995; Meindl, Carvalho *et al.*, 1995). É caracterizado como supressor tumoral em linhagens celulares submetidas à transformação pelo oncogene *v-src* (gene Rous sarcoma vírus transformado) (Pan, Nakanishi *et al.*, 1996). O gene *SRPX* contém 10 éxons e tamanho aproximado de 71.59kb em humanos. Em saguis também há 10 éxons e o tamanho do gene é de 76,30kb. O maior transcrito em humanos apresenta 1920pb e a proteína correspondente 464 aminoácidos (aa). Está situado na posição física Xp21.1 (Shimakage, Takami *et al.*, 2002). Em saguis, o maior transcrito contém 1749pb e a proteína correspondente 464aa.

A proteína *SRPX* apresenta um domínio transmembrana (aa, resíduos 376-413) e três repetições de consenso (resíduos 57-115, 120-174 e 262-317). Essas repetições apresentam conservação no domínio extracelular da família das selectinas, como a P-selectina. Tal fato sugere que o *SRPX* provavelmente decodifica uma proteína transmembrana (Pan, Nakanishi *et al.*, 1996). Outro estudo recente demonstrou que a proteína *SRPX* está situada no citoesqueleto em interação com a proteína PELO (Pelota homolog *Drosophila*). Ambas formando um complexo com outras proteínas cuja função é degradar RNAs mensageiros aberrantes. (Burnicka-Turek, Kata *et al.*, 2011). Assim, pelo menos uma forma do *SRPX* encontra-se livre no citosol, e não ligada à membrana.

O gene *SRPX* já foi considerado candidato para retinite pigmentosa (RP3), mas não apresentou mutação exclusiva em pacientes com RP3 (Dry, Aldred *et al.*, 1995). Dry *et al.* verificaram que o *SRPX* está mais expresso na retina e coração em comparação com outros tecidos. A expressão do gene *SRPX* é reduzida em vários tipos de tumores malignos, como câncer próstata, de colo, ovário, intestino, câncer de bexiga etc. (Tambe, Isono *et al.*, 2004) e assim é tido como biomarcador tumoral. Expressão ectópica desse gene é capaz de induzir apoptose em linhagens celulares humanas cancerígenas, com via mediada por retículo endoplasmático (Tambe, Isono *et al.*, 2004; Tambe, Yoshioka-Yamashita *et al.*, 2007). Tambe *et al.* verificaram em seu estudo que 30% de ratos knockout para *SRPX* desenvolveram tumores malignos, entre eles linfomas, hepatomas e adenocarcinoma do pulmão (Tambe, Yoshioka-Yamashita *et al.*, 2007). Altos níveis de expressão foram

encontrados na rede trabecular em olho glaucomatoso (Iragavarapu, Algeciras *et al.*, 2009).

O gene *SRPX* não escapa do processo de ICX. Exibe assim um perfil monoalélico de expressão por célula (Anderson e Brown, 1999; Carrel e Willard, 2005). No éxon 1 contém um polimorfismo STR trinucleotídico CTG, que se resulta numa variação entre 7 e 6 resíduos de leucina (Dry, Aldred *et al.*, 1995). Embora se saiba que esta deleção se encontra no peptídeo sinal da proteína, não se conhece a funcionalidade deste polimorfismo nem o porquê da sua não expansão. Estudo recente demonstrou que a ausência da região decodificadora do peptídeo sinal diminui a atividade antitumoral da *SRPX* em linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão. Esse estudo também encontrou uma forma de *SRPX* secretada que induz apoptose em células cancerígenas (Michael Green *et al.*, Universidade de Massachusetts, patente WO2013040504A3).

1.5. O sagui *Callithrix spp.*

A família *Callitrichidae* é composta por 5 gêneros. Os gêneros *Callithrix* e *Leontopithecus* habitam a Mata Atlântica. Os saguis são os representantes do gênero *Callithrix*. Esses macacos são os menores existentes, pesando entre 200 e 400g medindo entre 20 e 30cm. (Nagamachi, Pieczarka *et al.*, 1997) É um primata com ciclo de vida relativamente curto alcançando a maturidade sexual por volta de 18 a 24 meses de vida. Pode chegar até 16 anos de vida. (Abbott, Barnett *et al.*, 2003) Tais fatos o tornam um modelo atraente para pesquisas biomédicas, dada a facilidade de criação e reprodução em cativeiro. (Mansfield, 2003) É utilizado em estudos comportamentais, de disfunção hormonal, toxicologia, imunologia entre outros. (Mansfield, 2003; Tardif, Mansfield *et al.*, 2011)

Esse modelo animal é interessante por outro fenômeno biológico, a alta presença de quimerismo de ocorrência natural. A ocorrência de quimerismo é comum em toda a família *Callitrichidae*. (Ross, French *et al.*, 2007) Saguis frequentemente produzem gêmeos dizigóticos que se conectam através da placenta por anastomose vascular. (Bigatti, Lamberti *et al.*, 1992) Dessa forma, é comum indivíduos gêmeos do mesmo sexo ou sexo oposto compartilharem populações de células XX ou XY. Saguis quiméricos são viáveis e se reproduzem normalmente.

2. Objetivo Geral

Avaliar o perfil de metilação pontual próximo ao locus STR do trinucleotídeo (CTG)_n no éxon 1 do gene *SRPX* em humanos e em saguis híbridos entre as espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*.

2.1. Objetivos Específicos

2.1.1. Determinar a extensão do polimorfismo STR (CTG)_n no gene *SRPX* em saguis;

2.1.2. Determinar frequências alélicas para o locus STR alvo em saguis e comparar com uma subpopulação de mulheres da região norte e noroeste Fluminense;

2.1.3. Desenvolver ensaio para interrogação do estado de metilação pontual baseado em digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa fluorescente (DESM-QFPCR);

2.1.4. Estabelecer indiretamente o estado de ICX em saguis fêmeas heterozigotas para o locus STR;

2.1.5. Estabelecer indiretamente o estado de ICX em mulheres heterozigotas.

3. Materiais e Métodos

3.1. Aspectos éticos:

Todas as coletas dos sujeitos da pesquisa para o estudo populacional de frequências em humanos foram feitas perante assinatura do *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade de Medicina de Campos sob código de aprovação FR-278769. As amostras biológicas de saguis foram cedidas pelo Dr. Leonardo Serafim da Silveira, veterinário do Setor de Estudos em Etologia, Reintrodução e Conservação de Animais Selvagens (SERCAS) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. O manejo em cativeiro dos animais e as coletas foram feitas sob os licenciamentos do Instituto Brasileiro Chico Mendes para a Conservação da Biodiversidade (ICMBio no. 33965-2) e do Instituto Brasileiro do Ambiente e Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (CGEF no. AM3301.8101/2013-RJ) outorgados ao Prof. Dr. Carlos Ramon Ruiz Miranda, Coordenador Geral do SERCAS, e colaborador deste estudo. As amostras biológicas foram coletadas através de venopunção femoral. A colônia de saguis foi criada como parte de um programa de controle de espécies invasoras em uma zona industrial propriedade da companhia brasileira de exploração de petróleo TRANSPETRO, localizada no Estado de Rio de Janeiro, em estrita concordância com as recomendações do ICMBio e do Manual de Cuidados e Uso de Animais em Laboratório da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Nenhum sagui foi sacrificado para os propósitos desta pesquisa.

3.2. Sujeitos de pesquisa:

Foram convidadas a participar da pesquisa 72 mulheres saudáveis (faixa etária 18-40 anos) para determinação das frequências alélicas. Cada participante foi informada do conteúdo do projeto de pesquisa e da opção em participar do estudo por profissional devidamente treinado. Foram feitas coletas de sangue periférico de 32 saguis híbridos entre as espécies *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* e pertencentes a uma mesma colônia em cativeiro.

3.3. Amostras biológicas:

Sangue periférico (0,5 a 5 ml em humanos e 0,1ml em saguis) foi coletado em tubo *vacutainer* contendo EDTA como anticoagulante.

3.4. Extração de DNA:

As amostras coletadas foram submetidas à extração de DNA genômico utilizando o kit de extração e purificação de DNA genômico *Illustra blood genomicPrep*, GE Healthcare, UK, conforme as especificações do fabricante.

3.5. Quantificação do DNA genômico:

Foi utilizado 1µl do DNA extraído para quantificação direta utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000c™-Thermo Scientific com o comprimento de onda seguindo a razão de 260/280 nm.

3.6. Desenho de iniciadores:

Os iniciadores foram desenhados nas regiões flanqueadoras ao marcador STR utilizando os programas livres e online: Oligo Perfect™ Designer da Invitrogen™ (<http://www.invitrogen.com/>) e Oligo Calc–Oligonucleotide PropertiesCalculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) Foram sintetizados pela Applied Biosystems, USA, com a fluorescência 6-FAM™ (azul). Para avaliação da complementaridade específica de cada par de iniciadores com as regiões flanqueadoras 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>). Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1. Cada iniciador direto foi marcado com fluorocromo azul (FAM).

Tabela 1. Iniciadores desenhados para os ensaios em humanos e saguis

	Iniciador Direto	Iniciador Reverso	Produto esperado
SRPX Humano	CCTCTATCCCGAGCGAAGG*	CTGCCGAGGCGAGCTAAG	212 pb
SRPX Saguí	CGGCACCTCCCTCTATCC	CTGCTCACCCACTCGCTATG	208 pb
SRY	TTACTGAAGCCGAAAAATGG	GAGGTCGATACTTATAATTCGGGTA	93 pb

*Sequências de iniciadores direto e reverso idênticas aos utilizados por Amendro em 2013. Alterou-se apenas o fluorocromo utilizado. Amendro utilizou iniciador direto marcado com fluorocromo vermelho (PET). Para esse estudo utilizamos o iniciador direto marcado com fluorocromo azul (FAM).

3.7. Tipagem dos locus estudados:

Para tipagem do locus STR e do marcador *SRY*, uma alíquota de DNA total, após diluição, foi submetida ao processo de amplificação em sistema uniplex pelo método da reação em cadeia da polimerase quantitativa por fluorescência (QF-PCR). Para padronização deste ensaio foram realizados gradientes com as seguintes variáveis: (1) temperatura de anelamento, (2) concentração de iniciadores, (3) concentração de $MgCl_2$ e (4) concentração de DNA alvo. As condições após padronização são: 59° C de temperatura de anelamento, 10pMol de iniciadores, 1,0 mM de $MgCl_2$ e 20ng de DNA alvo.

3.8. Caracterização dos alelos amplificados:

Aos produtos de amplificação foram adicionados formamida (Hi-Di Formamida, Applied Biosystems) e os padrões de massa molecular GeneScan 500, marcados com o fluorocromo LIZTM500 (fluorescência laranja) (Applied Biosystems). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese capilar com o polímero POP4 (contendo 4-6% de acrilamida), utilizando a plataforma ABI PrismTM 310 Genetic Analyzer. Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando os programas GeneScanTM e GenotyperTM (Applied Biosystems). A interpretação do eletroferograma se baseou em dados de área e posição dos picos (produtos de amplificação fluorescentes). Os alelos foram nomeados com o valor em pares de nucleotídeos (figura 1).

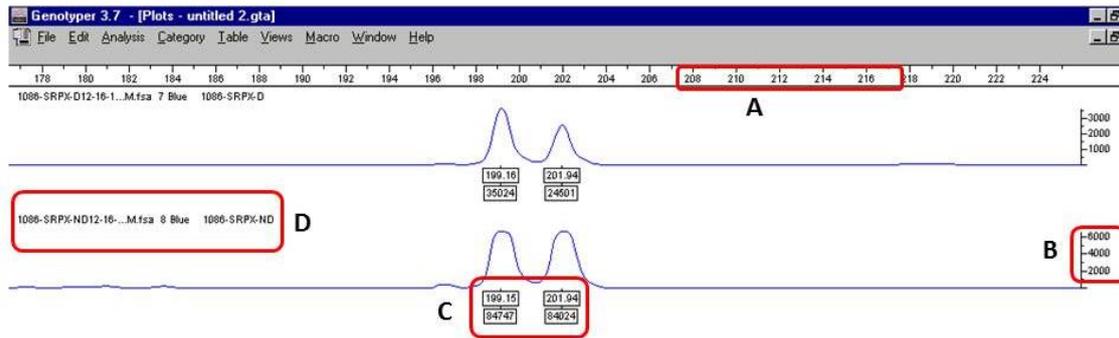


Figura 1. Informações para a interpretação de um eletroferograma. No eixo X representado por A, escala em número de pares de base (pb). No eixo Y, representado por B, escala da atividade de fluorescência em unidades arbitrárias. Em C, informações alélicas representadas pela caracterização dos alelos em pares de base e dosagem da proporção alélica quanto à área do alelo. Em D, identificação da amostra analisada. A intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de DNA amplificado.

3.9. Cálculo de frequências alélicas:

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). Dados populacionais relevantes: He, heterozigose observada.

3.10. Digestão com enzimas de restrição sensíveis à metilação:

Para avaliar o estado da ICX, foi utilizada 2U da enzima de restrição sensível à metilação *HpaII* (New England BioLabs) que reconhece e cliva o sítio polimórfico de restrição CCGG. Para o ensaio de restrição foram utilizados 250ng de DNA com a enzima *HpaII* a 37°C por 4 horas seguidas de uma etapa de 20 minutos à 65°C para inativação da enzima. A amplificação por PCR quantitativo fluorescente (QF-PCR) foi feita por ensaios em uniplex para o locus *SRPX* em humanos e em saguis com 10pmols de cada par de iniciadores e 20 ng de DNA. Na reação de amplificação foi adicionado betaína na concentração final de 2M na reação. Esse agente facilita a separação das fitas de DNA e aumentar o rendimento e especificidade dos produtos da PCR (Frackman, Kobs *et al.*, 1998). Alternativamente, para o ensaio de digestão

pode-se utilizar a enzima de restrição sensível à metilação *HhaI* (New England BioLabs) que reconhece o sítio GCGC seguindo especificações do fabricante.

3.11. Quantificação das proporções de inativação:

A proporção da ICX para cada amostra heterozigota foi calculada a partir de cálculos estatísticos baseados em Busque et al. (2009) e Amendro (2013). A interpretação do resultado da equação é: B = % de células com o alelo maior (B) ativo (Figura 2).

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

Figura 2. Fórmula estatística empregada para calcular a proporção de ICX entre os alelos. A: corresponde à área do alelo menor não digerido; B :corresponde à área do alelo maior não digerido; A': corresponde à área do alelo menor digerido; B': corresponde à área do alelo maior digerido. (Busque, Paquette *et al.*, 2009; Amendro, 2013)

3.12. Alinhamento de sequências e construção da árvore filogenética:

As sequências dos nove primatas (*Homo sapiens*, *Gorilla gorila*, *Pan troglodytes*, *Pan paniscus*, *Papio Anubis*, *Macaca mulata*, *Pongo abelli*, *Callithrix jacchus* e *Saimire boliviensis*) foram obtidas a partir de um alinhamento básico com a ferramenta online BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este alinhamento foi realizado com a sequência de amplificação gerada pelos iniciadores para o *SRPX* de humano. As sequências obtidas na etapa anterior foram então alinhadas com o programa livre e online ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) para obtenção da figura de alinhamento e a tabela com informações de homologia. Para a construção da árvore filogenética, foi utilizado o programa MEGA, versão 5 (Tamura, Peterson *et al.*, 2011).


```

Orangotango      TTCCCAGGTAGGATCGGAGGCGTGGCTGCCTTCTCAGCTGGGCACCAAAGATCCCCGGAG
Sagui            TTCCCAGGTAGGATTGGAGGTGTGGCTGCCTCCTCAGCTGGGCACCAAAGAACCCCGGAG
Saimire          TTCCCAGGTAGGATTGGAGGCGTGGCTGCCTCCTCAGCTGGGCACCAAAGAACCCCGGAG
*****          *****
Babuino          TCGCCG---TTGGGACCCTTCGCTCGGGATAG---
Rhesus           TCGCCG---TTGGGACCCTTCGCTCGGGATAG---
Chimpanzé       TCGCCG---TTGGGACCCTTCCTCGGGATAGAGG
Bonobo           TCGCCG---TTGGGACCCTTCGCTCGGGATAGAGG
Humano           TCGCCG---TTGGGACCCTTCGCTCGGGATAGAGG
Gorila           TCGCCG---TTGGGACCCTTCGCTCGGGATAGAGG
Orangotango     TCGCCGCCGTTGGGACCCTTCGCTCGGGATAGAGG
Sagui            TCGCCA---CTGGGTCCCTTCGCTCGGGATAGAGG
Saimire          TCGCCA---CTGGGACCCTTCGCTCGGGACAGAGG
*****          **** ***** ***** **

```

Figura 3. Alinhamento da região contendo o locus STR no éxon 1 do gene *SRPX* em 9 espécies de primatas. Humano (*Homo sapiens*), Gorila (*Gorilla gorila*), Chimpanzé (*Pan troglodytes*), Bonobo (*Pan paniscus*), Babuíno (*Papio Anubis*), Rhesus (*Macaca mulata*), Orangotango (*Pongo abelli*), Sagui (*Callithrix jacchus*) e Saimire (*Saimire boliviensis*). As sequências correspondem à fita complementar. Em amarelo, o polimorfismo STR estudado destacado nos diferentes sequências. Nota-se que a sequência de referência para humanos apresenta sete repetições CTG enquanto em saguis oito.

A partir do mesmo programa, foi gerada uma tabela com a pontuação de homologia entre as sequências das 9 espécies de primatas (tabela 2).

Tabela 2. Pontuação de identidade entre as sequências dos 9 primatas

Sequência A	Sequência B	Extensão das sequências (A/B)*	Identidade
Humano	Gorila	212/212	100,0
Humano	Chimpanzé	212/212	99,53
Humano	Bonobo	212/212	99,53
Humano	Babuíno	212/206	97,57
Humano	Rhesus	212/206	97,57
Humano	Orangotango	212/209	97,13
Humano	Sagui	212/212	90,09
Humano	Saimire	212/212	90,09
Gorila	Chimpanzé	212/212	99,53
Gorila	Bonobo	212/212	99,53

Gorila	Babuíno	212/206	97,57
Gorila	Rhesus	212/206	97,57
Gorila	Orangotango	212/209	97,13
Gorila	Sagui	212/212	90,09
Gorila	Saimire	212/212	90,09
Chimpanzé	Bonobo	212/212	99,06
Chimpanzé	Babuíno	212/206	97,09
Chimpanzé	Rhesus	212/206	97,09
Chimpanzé	Orangotango	212/209	96,65
Chimpanzé	Sagui	212/212	89,62
Chimpanzé	Saimire	212/212	89,62
Bonobo	Babuíno	212/206	97,09
Bonobo	Rhesus	212/206	97,09
Bonobo	Orangotango	212/209	96,65
Bonobo	Sagui	212/212	89,62
Bonobo	Saimire	212/212	89,62
Babuíno	Rhesus	206/206	99,03
Babuíno	Orangotango	206/209	94,66
Babuíno	Sagui	206/212	89,81
Babuíno	Saimire	206/212	89,81
Rhesus	Orangotango	206/209	94,66
Rhesu	Sagui	206/212	88,83
sRhesus	Saimire	206/212	88,83
Orangotango	Sagui	209/212	89,47
Orangotango	Saimire	209/212	89,0
Sagui	Saimire	212/212	95,28

*A=Tamanho em pb da sequência A; B=Tamanho em pb da sequência B.

A partir de outro alinhamento feito com o programa MEGA versão 5, foi construída uma árvore filogenética baseada na identidade das nove sequências (figura 4).

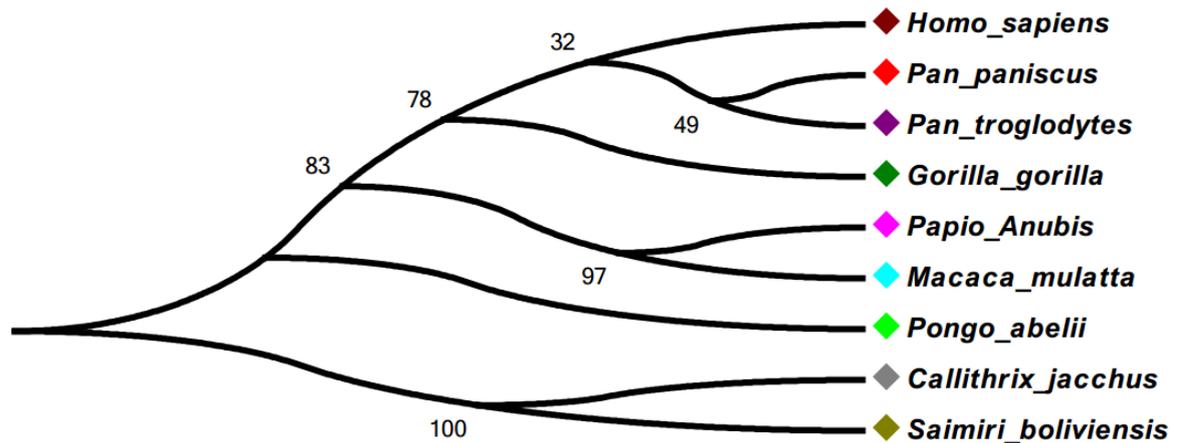


Figura 4. Árvore filogenética da região contendo o STR no gene *SRPX* em nove espécies de primatas. Humano (*Homo sapiens*), Gorila (*Gorilla gorilla*), Chimpanzé (*Pan troglodytes*), Bonobo (*Pan paniscus*), Babuíno (*Papio Anubis*), Rhesus (*Macaca mulatta*), Orangotango (*Pongo abelii*), Saguí (*Callithrix jacchus*) e Saimire (*Saimire boliviensis*). Os números próximos aos ramos se referem à porcentagem de árvores idênticas para a ramificação correspondente em 1000 réplicas (teste bootstrap). A análise filogenética foi realizada com o programa MEGA, versão 5 (Tamura, Peterson *et al.*, 2011).

4.2. Genotipagem do *SRPX* em humanos e dados populacionais

Para o locus STR (CTG)_n em humanos foram genotipadas 72 mulheres da região norte e noroeste fluminense. Foram observados apenas dois alelos, um contendo 198 e outro 201pb. (figura 5)

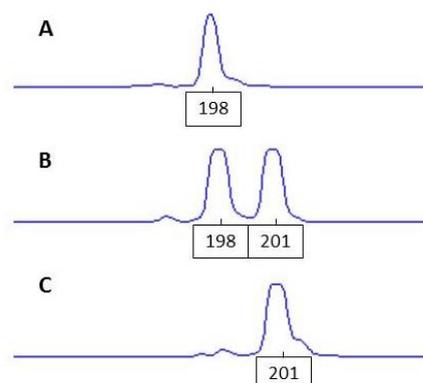


Figura 5. Eletoferograma dos perfis alélicos encontrados para o *SRPX* em mulheres. (A) genótipo homocigoto para o alelo 198; (B) genótipo heterocigoto; (C) genótipo homocigoto para o alelo 201. Iniciadores marcados com fluorocromo azul (FAM).

A frequência do alelo 198 foi de 0,292 e a do alelo 201 foi de 0,708 na amostragem de 72 mulheres. A taxa de heterozigose encontrada foi de 0,39. Os genótipos encontrados estão na tabela 3.

Tabela 3. Distribuição de heterozigose e homozigose para as mulheres genotipadas

Genótipos	N (obs)	Frequência	
		(Obs)	(Esp)
198/198	7	9,72	8,52
201/201	37	51,38	41,24
198/201	28	38,88	41,34

Foi feita genotipagem de uma mesma amostra para o locus STR (CTG)_n em azul deste estudo com o marcador em vermelho (fluorescência PET) utilizado por Amendro em 2013 (figura 6) a fim de verificar se há variação quanto à fluorescência visto que a sequência dos iniciadores é a mesma.

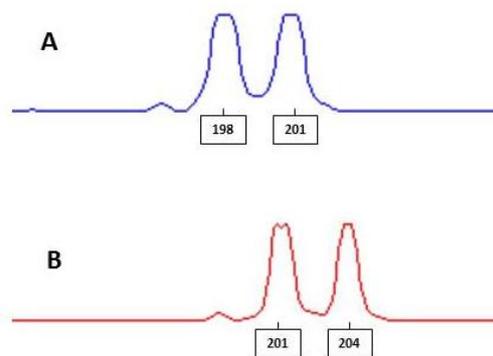


Figura 6. Eletroferograma comparando em uma mesma amostra os iniciadores utilizados neste estudo com os iniciadores utilizados por Amendro em 2013 em mulheres. (A) Alelos observados (198 e 201) para os iniciadores utilizados para o polimorfismo no SRPX com fluorescência FAM em uma mulher heterozigota. (B) Alelos observados (201 e 204) para os iniciadores utilizados pela referência (Amendro 2013) com fluorescência PET.

4.3. Avaliação do estado da ICX em mulheres heterozigotas

Das 72 mulheres estudadas, 28 apresentaram genótipo heterozigoto. Foram realizados ensaios de inativação em 17. (figura 7) Ao todo, 9 mulheres apresentaram padrão de inativação aleatório. As 8 restantes apresentaram padrão levemente preferencial. Os perfis encontrados para inativação estão na tabela 4.

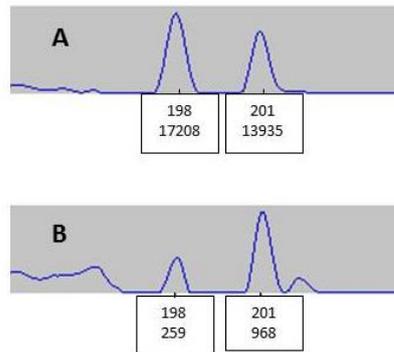


Figura 7. Eletroferograma dos perfis alélicos antes e após digestão com enzima sensível à metilação em uma mulher heterozigota. (A) perfil alélico antes da digestão, com numerações correspondentes ao tamanho do fragmento em pb (198 e 201) e área do pico (17208 e 13935), informações necessárias para o cálculo do estado da ICX; (B) perfil alélico após a digestão com *HpaII*. Numerações correspondentes ao tamanho do fragmento em pb (198 e 201) e área do pico (259 e 968).

Tabela 4. Padrões de inativação em mulheres heterozigotas

Código das Amostras	Estado da ICX	Classificação
1138	52:48	ALEATÓRIO
1155	64:36	ALEATÓRIO
1159	74:26	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1161	44:56	ALEATÓRIO
1215	82:18	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1218	80:20	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1219	77:23	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1223	50:50	ALEATÓRIO
1228	62:38	ALEATÓRIO
1231	65:35	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1233	69:31	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1234	72:28	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1237	63:37	ALEATÓRIO
1238	37:63	ALEATÓRIO
1242	63:37	ALEATÓRIO
1229	19:81	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1105	60:40	ALEATÓRIO

4.4. Genotipagem do *SRPX* em saguis

Foram genotipados 32 saguis, totalizando 14 machos e 18 fêmeas. Foram observados apenas dois alelos, um com 198 e outro com 201pb. (Figura 8)

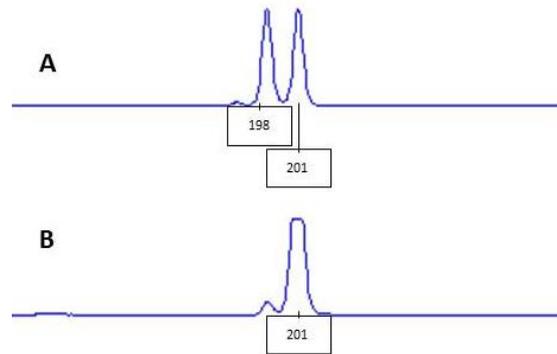


Figura 8. Eletroferogramas dos perfis alélicos encontrados em sagui. Fluorescência FAM. (A) alelos observados (198 e 201) em um sagui heterozigoto para o polimorfismo no gene *SRPX*. (B) sagui homozigoto para o alelo 201.

A frequência do alelo 198 foi de 0,222 e a do alelo 201 foi de 0,778. A taxa de heterozigose observada foi de 0,44. Para este locus, não foram encontrados saguis homozigotos para o alelo menor. Os genótipos encontrados estão na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição de heterozigose e homozigose para os saguis genotipados

Genótipos	Indivíduos
198/198	0
201/201	22
198/201	10

Foram encontrados dois machos heterozigotos para o locus *SRPX*. (figura 9, A e B) Um deles apresentou desproporção alélica considerável (Figura 8B), com o alelo 201 contendo menor área de pico.

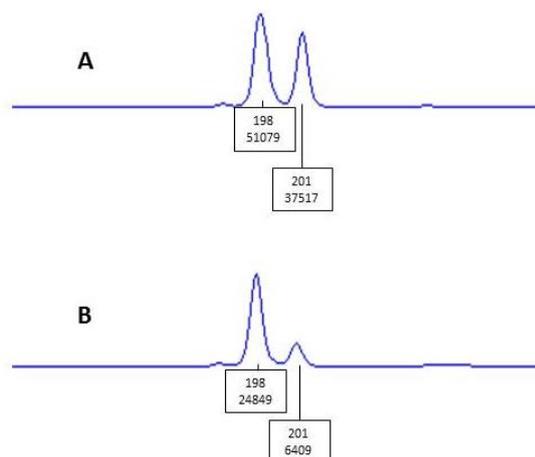


Figura 9. Eletroferograma dos perfis alélicos encontrados para o polimorfismo em *SRPX* em dois saguis macho. (A) Sagui macho com áreas de pico dos alelos 198 e 201 (51079 e 37517 respectivamente) próximas. (B) Sagui macho com desproporção considerável quanto às áreas referentes aos picos 198 e 201 (24849 e 6409 respectivamente).

4.5. Avaliação do estado da ICX nos saguis heterozigotos

Foram encontrados oito saguis fêmeas heterozigotas para o locus *SRPX*. Do total, seis apresentaram perfil de inativação aleatório, 1 com perfil levemente preferencial e 1 com perfil preferencial. Os perfis de inativação e sexo referente aos saguis heterozigotos encontram-se na tabela 6.

Os perfis de inativação aleatória, levemente preferencial e preferencial estão representados pelos eletroferogramas de 3 amostras nas figuras 10 e 11. Foi encontrado um sagui do sexo feminino com inativação de 95:05 (figura 10C e D). Observa-se que em DNA não digerido (Fig.10C) este sagui apresenta uma desproporção no tamanho dos alelos esperados para *SRPX*. Após a digestão (Fig 10D), observa-se que o alelo maior de 201pb aumenta de tamanho em relação ao outro alelo.

Tabela 6. Padrões de inativação nos saguis heterozigotos

Amostra	Sexo	Estado da ICX	Classificação
1086	Fêmea	41:59	ALEATÓRIO
1087	Fêmea	95:05	PREFERENCIAL
1091	Macho	44:56	ALEATÓRIO
1092	Fêmea	49:51	ALEATÓRIO
1094	Fêmea	25:75	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1294	Fêmea	45:55	ALEATÓRIO
1309	Fêmea	61:39	ALEATÓRIO
1311	Fêmea	48:52	ALEATÓRIO
1314	Macho	81:19	LEVEMENTE PREFERENCIAL
1320	Fêmea	51:49	ALEATÓRIO

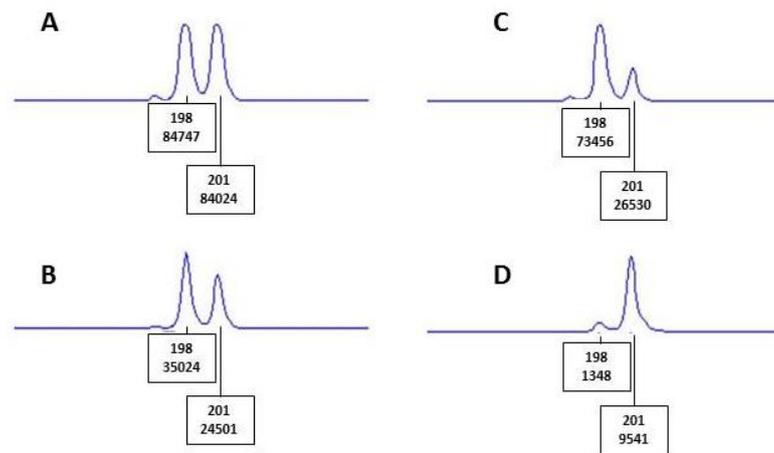


Figura 10. Eletroferogramas dos perfis genotípicos para o *SRPX* encontrados em duas amostras de sagui antes e após digestão com *HpaII*. A e B: perfis de sagui fêmea heterozigota antes (A) e após (B) digestão enzimática, com padrão de ICX aleatório (41:59). C e D: perfis de outra sagui fêmea heterozigota antes (C) e após (D) digestão enzimática com padrão de inativação preferencial (95:05).

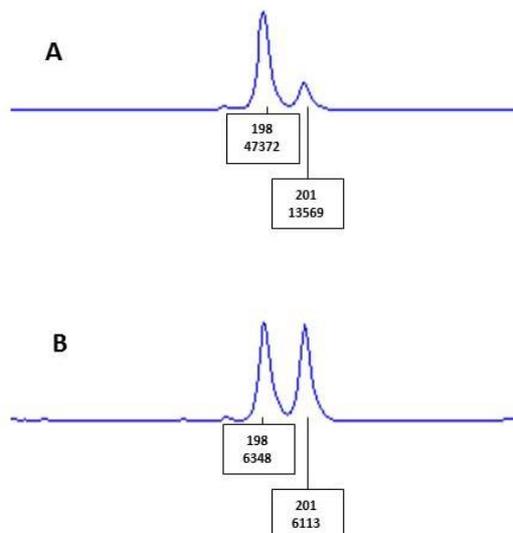


Figura 11. Perfil eletroforéticos de Macho heterozigoto para o *SRPX* antes e após digestão enzimática por *HpaII* (A e B, respectivamente). Análise da desproporção alélica das áreas dos picos revelou padrão de ICX de 19% do alelo menor de 198pb (81:19). Este perfil é considerado levemente preferencial.

Foi realizada uma digestão com outra enzima (*HhaI*) sensível à metilação em duas amostras de sagui que apresentaram heterozigose. Um deles foi um macho cujo padrão de inativação foi 81:19 quando digerido com a enzima *HpaII* e padrão de 85:15 quando seu DNA foi digerido com a enzima *HhaI* (figura 12 A e B). O outro sagui analisado corresponde a uma fêmea com padrão de inativação de 51:49 quando digerido com *HpaII* e padrão 45:55 quando digerido com *HhaI* (figura 12 C e D).

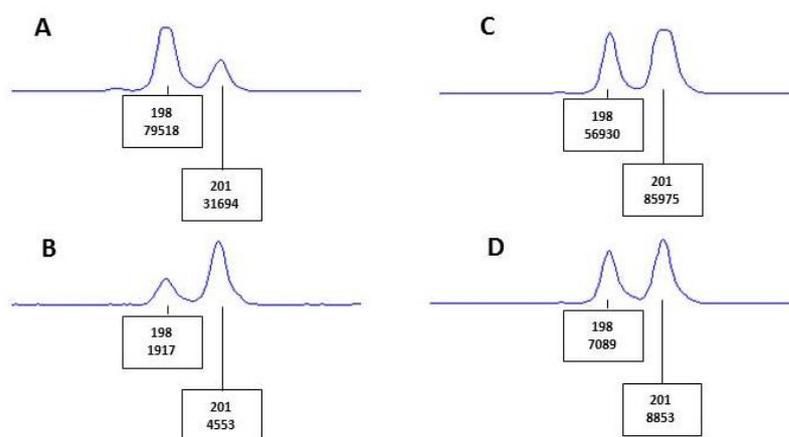


Figura 12. Eletroferograma dos perfis alélicos para o polimorfismo em *SRPX* em dois saguis antes e após digestão enzimática com a enzima *HhaI*, também apresentando sítio na região analisada. (A) Perfil alélico de macho heterozigoto antes da digestão com *HhaI*. (B) Perfil alélico do mesmo macho após digestão. Análise da desproporção alélica verificada nas áreas dos picos revelou estado da ICX de 85:15. (C) Perfil alélico de fêmea heterozigota antes da digestão com *HhaI*. (D) Perfil alélico dessa amostra após digestão. Análise da desproporção alélica nas áreas dos picos revelou estado da ICX de 45:55.

4.6. Genotipagem do Marcador SRY

Para o marcador SRY há apenas um alelo possível contendo 87pb (figura 13). Nesse estudo foram encontradas sete fêmeas positivas para SRY e um macho negativo. A relação entre números de amostras, sexo e presença ou ausência do marcador sexual SRY estão listados na tabela 7.

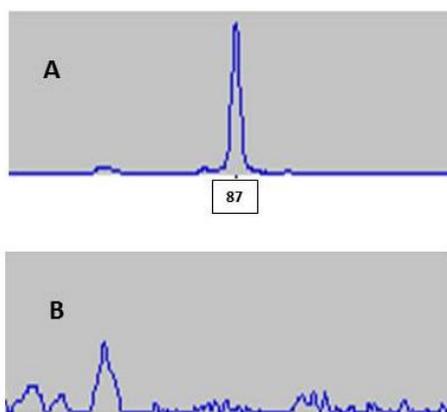


Figura 13. Eletroferograma de amostra de sagui macho positivo para o marcador SRY. (A) Alelo esperado contendo 87pb em fluorescência FAM. (B) Amostra de sagui fêmea negativa para o marcador *SRY*.

Tabela 7. Relação entre sexo fenotípico e presença do marcador sexual SRY

Amostra	Sexo*	SRY
1086	Fêmea	-
1087	Fêmea	+
1088	Macho	+
1089	Macho	+
1090	Fêmea	-
1091	Macho	+
1092	Fêmea	-
1093	Macho	+
1094	Fêmea	+
1095	Macho	-
1294	Fêmea	-
1295	Fêmea	+
1302	Fêmea	+
1304	Fêmea	+
1306	Macho	+
1307	Macho	+
1308	Fêmea	+
1309	Fêmea	-
1310	Macho	+

1311	Fêmea	-
1312	Fêmea	-
1313	Fêmea	-
1314	Macho	+
1319	Macho	+
1320	Fêmea	-
1321	Fêmea	-
1322	Fêmea	-
1323	Macho	+
1324	Macho	+
1325	Macho	+
1326	Fêmea	+
1327	Macho	+

5. Discussão

5.1. Análise *in silico* da região flanqueadora do locus STR no gene *SRPX* em primatas:

O polimorfismo STR selecionado para este estudo está no éxon 1 do gene supressor tumoral *SRPX* e consiste em um polimorfismo microssatélite trinucleotídico. Este polimorfismo é responsável pela decodificação de até 7 resíduos de leucina no peptídeo sinal da proteína *SRPX* madura. Estudo recente demonstrou a importância da manutenção do peptídeo sinal para a atividade supressora da proteína *SRPX*. Entretanto, o grupo não atentou para a existência do microssatélite nessa região. O mesmo estudo demonstrou que o peptídeo sinal é necessário para a manutenção da atividade supressora da proteína *SRPX* (Michael Green et al, Universidade de Massachusetts, patente WO2013040504A3).

No presente estudo, a análise de homologia entre as sequências de nove espécies de primatas (Babuíno, Rhesus, Chimpanzé, Bonobo, Humano, Gorila, Orangotango, Sagui e Saimire) demonstrou que a região analisada é bem conservada em primatas. Observamos que a menor identidade foi de 88,83%, na combinação entre Rhesus e Sagui e entre Rhesus e Saimire. Na análise filogenética observamos uma topologia próxima ao esperado quanto à distância evolutiva. Nota-se que apesar da distância filogenética a análise do locus STR nesse estudo revelou a presença de apenas dois alelos em sagui, primata evolutivamente distante do homem. Tal fato pode estar relacionado à função supressora tumoral das isoformas das proteínas *SRPX*, havendo pressão seletiva para manutenção de dois alelos. Para reforçar essa hipótese, genotipagens de outros primatas que não humanos e saguis para esse locus são necessárias.

5.2. Genotipagem do *SRPX* em humanos e dados populacionais.

Meindl et al (1995) foi o primeiro a sequenciar o gene *SRPX* e associar sua deleção com a retinite pigmentosa ligada ao X. Observou a deleção de 3pb dentro da repetição (CTG)_n no éxon 1 desse gene em 7 de 34 pacientes e em 13 de 38 amostras controle. Outro grupo no mesmo ano definiu esta variante como 17-23LDeI

e que se encontra no peptídeo sinal da proteína resultando na perda de uma leucina em uma série de 7 leucinas. (Dry, Aldred *et al.*, 1995) O mesmo estudo encontrou esta variante em 4 de 27 pacientes acometidos por retinite pigmentosa do sexo masculino e em 7 de 36 controles.

Há três SNPs dentro do locus STR registrados no SNPdatabase, são eles: rs72249350, rs72445954 e rs35523939. Há dados populacionais apenas para o SNP rs72249350, com o alelo menor apresentando frequência de 0,191 em 316 indivíduos. Estudo de 2013 encontrou um alelo expandido em oito repetições (CTG)_m no locus SRT e taxa de heterozigose observada de 0,40 (Amendro, 2013). Em nossa amostragem populacional de 72 mulheres não relacionadas encontramos uma taxa de heterozigose de 0,39, valor próximo ao encontrado por (Amendro, 2013).

Foi realizada uma comparação entre os iniciadores utilizados por Amendro em 2013 e aos utilizados nessa dissertação. As sequências dos iniciadores são as mesmas, diferindo apenas na fluorescência dos iniciadores direto. Os utilizados por Amendro estão em PET e os de nossa pesquisa estão em FAM. Análise da figura 6, mostrando uma comparação entre esses iniciadores em uma mesma amostra, revela uma diferença no tamanho dos alelos em pares de base. Os alelos 198 e 201 marcados em FAM correspondem aos alelos 201 e 204 marcados em PET, respectivamente. Assim, a diferença em pares de bases entre os dois alelos é a mesma (3 bp) para iniciadores marcados com diferentes fluorescências. Atenta-se o fato que o teste da QFPCR utilizado não é um ensaio de enumeração direta das repetições. Assim sendo, a inferência do número de repetições pela simples subtração do tamanho do produto esperado do observado deve ser evitada em consideração das diferenças observada nos sistemas fluorescentes. O número de repetições à qual esses alelos correspondem só pode ser avaliado através de sequenciamento.

5.3. Avaliação do estado da ICX em mulheres heterozigotas

Nas últimas décadas, testes para avaliar o estado da ICX têm sido utilizados como ferramentas de diagnóstico e/ou prognóstico em doenças ligadas ao cromossomo X. O teste padrão para determinar o estado de ICX é o ensaio do locus *AR* (HUMARA). Este ensaio explora a heterozigose de um marcador STR no éxon 1 desse gene. Esse marcador exibe taxa de heterozigose de 82 a 90%. (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992; Sleddens, Oostra *et al.*, 1992; Lose, Duffy *et al.*, 2008) Há três perfis possíveis para o estado da ICX, sendo eles aleatório (proporção X ativo:X inativo entre 50:50 e 64:36), levemente preferencial (65:35-84:16) e altamente preferencial (85:15-99:1) (Plenge, Hendrich *et al.*, 1997; Minks, Robinson *et al.*, 2008; Amendro, 2013).

Das 17 amostras analisadas quanto ao padrão da ICX em nosso estudo, não foi encontrada mulher com perfil de inativação altamente preferencial. Ao todo, oito apresentaram perfil levemente preferencial enquanto as demais apresentaram perfil aleatório. É importante ressaltar que o locus (CTG)_n nesta amostra populacional se comportou como um INDEL, isto é, com dois alelos e como tal com uma excelente taxa de heterozigose (informatividade de 41%). Nesse entendimento, o INDEL torna-se um excelente locus candidato para marcador de ICX. Este gene apresenta implicações em câncer. (Dry, Aldred *et al.*, 1995; Meindl, Carvalho *et al.*, 1995; Inoue, Pan *et al.*, 1998; Shimakage, Kawahara *et al.*, 2000; Mukaisho, Suo *et al.*, 2002; Kim, Shimakage *et al.*, 2003; Shimakage, Inoue *et al.*, 2007; Iragavarapu, Algeciras *et al.*, 2009; Shimakage, Kodama *et al.*, 2009) Assim, estudos futuros de ICX e clonalidade em câncer são importantes para a compreensão dos papéis desempenhados pelo *SRPX* no processo de tumorigênese.

5.4. Genotipagem do *SRPX* em saguis

Em saguis também foram encontrados apenas dois alelos. Coincidentemente, esses alelos também apresentam 198 e 201pb como nos humanos (figura 8). *In silico*, o sagui (*Callithrix jacchus*) apresenta até oito repetições (CTG)_n no locus polimórfico do *SRPX*, enquanto que humanos apresentam até sete. Não foram encontrados saguis homozigotos para o alelo menor. Uma hipótese é que esse alelo é mais recente no sagui e se manteve conservado em humanos. Outra hipótese é

que o tamanho da colônia de cativeiro está influenciado as frequências alélicas. Especulamos- que a não expansão desse locus STR gerando outros alelos está relacionada à atividade supressora do proteína SRPX, visto que o polimorfismo está localizado no peptídeo sinal, sendo, portanto, uma variante em região regulatória.

Foram encontrados dois machos heterozigotos para o locus polimórfico SRPX, ambos positivos para o marcador SRY. Tal fato pode ser explicado pela presença de quimerismo no tecido sanguíneo. (Ross, French *et al.*, 2007) A ocorrência de quimerismo é comum em todo o família *Callithricidae*. (Ross, French *et al.*, 2007) Saguis frequentemente produzem gêmeos dizigóticos que se conectam através da placenta por anastomose vascular (Bigatti, Lamberti *et al.*, 1992). Dessa forma, é comum indivíduos gêmeos compartilharem populações de células XX ou XY, ocorrendo a variabilidade alélica encontrada.

5.5. Avaliação do estado de inativação em saguis heterozigotos

Saguis são modelos animais importantes para pesquisas biomédicas. Apresentam semelhança anatômica, fisiológica e genética aos seres humanos, além de seu pequeno porte, facilidade de reprodução em cativeiro e manipulação de material biológico. Tais características tornam os saguis excelentes modelos experimentais para estudos de doenças humanas. Nosso grupo de pesquisa estudou um locus polimórfico no gene *RP2* em saguis, encontrando apenas padrões de inativação aleatórios para este marcador (Brum-Machado, 2013). A presente dissertação foi o primeiro trabalho a demonstrar que pode ocorrer inativação não aleatória em saguis. Todavia, a presença de quimerismo pode ocultar fêmeas com inativação preferencial ou indicar padrão de ICX preferencial enquanto que pode ser aleatório. Desta forma, os resultados deste estudo em saguis abre uma nova linha de pesquisa muito promissora e pouco estudada neste modelo primata: o quimerismo.

Em relação à amostra de DNA do sagui do sexo feminino que apresentou inativação preferencial (95:05) observa-se uma desproporção no tamanho dos alelos que pode ser resultado de quimerismo. O alelo maior pode estar presente em uma população de células cujo cromossomo X portador desse alelo se encontra mais inativo. Foi encontrado também um macho portando o alelo 201pb com área de pico desproporcional ao alelo 198. Após a digestão com *HpaII*, observa-se a diminuição

do alelo 198. Nossa hipótese é que o alelo 201 é representa uma menor população de células na quimera. Para avaliar essa hipótese se faz necessário uma análise de citogenética clássica e molecular para autossomos e cromossomos sexuais.

Foi realizado também um ensaio para determinação da ICX utilizando-se a enzima *HhaI* para validar o estado indicado pela enzima *HpaII*. Foram analisadas duas amostras, um macho e uma fêmea, cada um portando dois alelos. O estado da ICX encontrado com *HpaII* foi semelhante ao encontrado com *HhaI* para ambas as amostras, apresentando pouca variação. Assim, diferentes CpGs podem se interrogados ao redor do locus STR (CTG)_n.

5.6. Genotipagem do marcador SRY

O marcador SRY foi estudado para avaliar a possível presença de cromossomos Y em fêmeas e pelo fato de encontrarmos machos heterozigotos para o polimorfismo *SRPX*, que está no cromossomo X. Foram encontradas sete fêmeas positivas para o *SRY*. Tal fato é verificado em fêmeas quiméricas que exibem populações de células XX e XY (Sanchez-Morgado, Haworth *et al.*, 2003). Interessantemente, para uma amostra de um macho não foi gerado produto SRY. Essa amostra foi monoalélica para o locus STR (CTG)_n no gene *SRPX* (dados não mostrados), podendo assim corresponder a um macho (portanto, hemizigoto) ou uma fêmea homozigota. Esse resultado ainda não foi confirmado pela re-amostragem e assim pode ser mais bem explicado por erro na designação do sexo no repasse da amostra.

6. Conclusões

O polimorfismo STR (CTG)_n no gene *SRPX* é conservado em humanos e em saguis, primata evolutivamente distante, o que é um indício de pressão seletiva para manutenção desses alelos;

Em nosso estudo, a maior parte das mulheres exibe um padrão de inativação aleatório, condizente com a literatura. Esse perfil também é mais frequente nos saguis.

A interrogação do estado de metilação pontual próximo ao locus STR (CTG)_n no éxon 1 do gene *SRPX* e sua genotipagem indicaram presença de quimerismo em saguis;

O locus desenvolvido para o gene *SRY* serve para a sexagem genética em saguis e identificação de quimerismo em saguis do sexo feminino.

Para viabilizar o sagui como modelo primata para estudo de ICX com o polimorfismo no gene *SRPX* é necessário incluir análise de cariótipo e análise de outros locus polimórficos ou outras abordagens que possam quantificar a porcentagem de células quiméricas nos saguis.

Referências bibliográficas

Abbott, D. H., Barnett, D. K., Colman, R. J., Yamamoto, M. E. e Schultz-Darken, N. J. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research. Comp Med, v.53, n.4, Aug, p.339-50. 2003.

Aerts, S., Thijs, G., Dabrowski, M., Moreau, Y. e De Moor, B. 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., Moseley, A. B., Rosenblatt, H. M. e Belmont, J. W. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. Am J Hum Genet, v.51, n.6, Dec, p.1229-39. 1992.

Amendro, M. INTERROGAÇÃO PONTUAL DE MARCAS EPIGENÉTICAS DE METILAÇÃO EM TRÊS SISTEMAS MULTIALÉLICOS E DETERMINAÇÃO DE FREQUÊNCIAS DE VARIANTES DE NUCLEOTÍDEO SIMPLES NO PROMOTOR DO GENE XIST. (Dissertação de Mestrado). Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, CAMPOS DOS GOYTACAZES, 2013. 79 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.

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.

Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.281-97. 2004.

Baylin, S. B. e Jones, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. Nat Rev Cancer, v.11, n.10, Oct, p.726-34. 2012.

Berletch, J. B., Yang, F. e Disteche, C. M. Escape from X inactivation in mice and humans. Genome Biol, v.11, n.6, p.213. 2010.

Berletch, J. B., Yang, F., Xu, J., Carrel, L. e Disteche, C. M. Genes that escape from X inactivation. Hum Genet, v.130, n.2, Aug, p.237-45. 2011.

Beutler, E., Yeh, M. e Fairbanks, V. F. 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.

Bigatti, P., Lamberti, L., Oberto, G. e Ardito, G. Sister-chromatid exchange rates in XX and XY cells of ten chimeric *Callithrix jacchus* individuals. Mutat Res, v.282, n.1, May, p.19-23. 1992.

Brown, C. J., Ballabio, A., Rupert, J. L., Lafreniere, R. G., Grompe, M., Tonlorenzi, R. e Willard, H. F. 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. 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.

Brum-Machado, F. DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES POLIMÓRFICOS DE DNA PARA INTERROGAÇÃO DO ESTADO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X EM HÍBRIDOS DO PRIMATA CALITRIQUIDEO SAGUI. (Dissertação de Mestrado). Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013. 69 p.

Burnicka-Turek, O., Kata, A., Buyandelger, B., Ebermann, L., Kramann, N., Burfeind, P., Hoyer-Fender, S., Engel, W. e Adham, I. M. Pelota interacts with HAX1, EIF3G and SRPX and the resulting protein complexes are associated with the actin cytoskeleton. BMC Cell Biol, v.11, p.28. 2011.

Busque, L., Paquette, Y., Provost, S., Roy, D. C., Levine, R. L., Mollica, L. e Gilliland, D. G. 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.

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.

Clemson, C. M., McNeil, J. A., Willard, H. F. e Lawrence, J. B. 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.

Csankovszki, G., Nagy, A. e Jaenisch, R. 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.

Debrand, E., Chureau, C., Arnaud, D., Avner, P. e Heard, E. Functional analysis of the DXPas34 locus, a 3' regulator of Xist expression. Mol Cell Biol, v.19, n.12, Dec, p.8513-25. 1999.

Dry, K. L., Aldred, M. A., Edgar, A. J., Brown, J., Manson, F. D., Ho, M. F., Prosser, J., Hardwick, L. J., Lennon, A. A., Thomson, K. e et al. Identification of a novel gene, ETX1 from Xp21.1, a candidate gene for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). Hum Mol Genet, v.4, n.12, Dec, p.2347-53. 1995.

Dupont, C. e Gribnau, J. Different flavors of X-chromosome inactivation in mammals. Curr Opin Cell Biol, v.25, n.3, Jun, p.314-21. 2013.

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

Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L. e Paul, C. L. 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.

Garcia-Gimenez, J. L., Sanchis-Gomar, F., Lippi, G., Mena, S., Ivars, D., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J. e Pallardo, F. V. 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.

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

Inoue, H., Pan, J. e Hakura, A. Suppression of v-src transformation by the drs gene. J Virol, v.72, n.3, Mar, p.2532-7. 1998.

Iragavarapu, S., Algeciras, M. E., Lee, R. K. e Bhattacharya, S. K. ETX1 is over-expressed in the glaucomatous trabecular meshwork. Mol Vis, v.15, p.2061-7. 2009.

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.

Kim, C. J., Shimakage, M., Kushima, R., Mukaisho, K., Shinka, T., Okada, Y. e Inoue, H. Down-regulation of drs mRNA in human prostate carcinomas. Hum Pathol, v.34, n.7, Jul, p.654-7. 2003.

Ko, H. M., Choi, C., Park, C. S. e Juhng, S. W. Analysis of clonality by X chromosome inactivation in uterine cervix cancer. J Korean Med Sci, v.12, n.4, Aug, p.322-6. 1997.

Leung, A., Schones, D. E. e Natarajan, R. Using epigenetic mechanisms to understand the impact of common disease causing alleles. Curr Opin Immunol, Aug 1. 2012.

Li, E., Bestor, T. H. e Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. Cell, v.69, n.6, Jun 12, p.915-26. 1992.

Lose, F., Duffy, D. L., Kay, G. F., Kedda, M. A. e Spurdle, A. B. Skewed X chromosome inactivation and breast and ovarian cancer status: evidence for X-linked modifiers of BRCA1. J Natl Cancer Inst, v.100, n.21, Nov 5, p.1519-29. 2008.

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

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

Mansfield, K. Marmoset models commonly used in biomedical research. Comp Med, v.53, n.4, Aug, p.383-92. 2003.

Meindl, A., Carvalho, M. R., Herrmann, K., Lorenz, B., Achatz, H., Apfelstedt-Sylla, E., Wittwer, B., Ross, M. e Meitinger, T. A gene (SRPX) encoding a sushi-repeat-containing protein is deleted in patients with X-linked retinitis pigmentosa. Hum Mol Genet, v.4, n.12, Dec, p.2339-46. 1995.

Minks, J., Robinson, W. P. e Brown, C. J. A skewed view of X chromosome inactivation. J Clin Invest, v.118, n.1, Jan, p.20-3. 2008.

Mubiru, J. N., Cavazos, N., Hemmat, P., Garcia-Forey, M., Shade, R. E. e Rogers, J. Androgen receptor CAG repeat polymorphism in males of six non-human primate species. J Med Primatol, v.41, n.1, Feb, p.67-70. 2012.

Mukaisho, K., Suo, M., Shimakage, M., Kushima, R., Inoue, H. e Hattori, T. Down-regulation of drs mRNA in colorectal neoplasms. Jpn J Cancer Res, v.93, n.8, Aug, p.888-93. 2002.

Mutter, G. L., Chaponot, M. L. e Fletcher, J. A. A polymerase chain reaction assay for non-random X chromosome inactivation identifies monoclonal endometrial cancers and precancers. Am J Pathol, v.146, n.2, Feb, p.501-8. 1995.

Nagamachi, C. Y., Pieczarka, J. C., Schwarz, M., Barros, R. M. e Mattevi, M. S. Comparative chromosomal study of five taxa of genus *Callithrix*, group *jacchus* (Platyrrhini, Primates). Am J Primatol, v.41, n.1, p.53-60. 1997.

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

Packer, A. N., Xing, Y., Harper, S. Q., Jones, L. e Davidson, B. L. The bifunctional microRNA miR-9/miR-9* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. J Neurosci, v.28, n.53, Dec 31, p.14341-6. 2008.

Pan, J., Nakanishi, K., Yutsudo, M., Inoue, H., Li, Q., Oka, K., Yoshioka, N. e Hakura, A. Isolation of a novel gene down-regulated by v-src. FEBS Lett, v.383, n.1-2, Mar 25, p.21-5. 1996.

Plenge, R. M., Hendrich, B. D., Schwartz, C., Arena, J. F., Naumova, A., Sapienza, C., Winter, R. M. e Willard, H. F. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. Nat Genet, v.17, n.3, Nov, p.353-6. 1997.

Plenge, R. M., Stevenson, R. A., Lubs, H. A., Schwartz, C. E. e Willard, H. F. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. Am J Hum Genet, v.71, n.1, Jul, p.168-73. 2002.

Rollins, R. A., Haghghi, F., Edwards, J. R., Das, R., Zhang, M. Q., Ju, J. e Bestor, T. H. Large-scale structure of genomic methylation patterns. Genome Res, v.16, n.2, Feb, p.157-63. 2006.

Ross, C. N., French, J. A. e Orti, G. Germ-line chimerism and paternal care in marmosets (*Callithrix kuhlii*). Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.15, Apr 10, p.6278-82. 2007.

Sado, T. e Sakaguchi, T. Species-specific differences in X chromosome inactivation in mammals. Reproduction, v.146, n.4, Oct, p.R131-9. 2013.

Sanchez-Morgado, J. M., Haworth, R. e Morris, T. H. XY female marmoset (*Callithrix jacchus*). Comp Med, v.53, n.5, Oct, p.539-44. 2003.

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

Shimakage, M., Inoue, N., Ohshima, K., Kawahara, K., Yamamoto, N., Oka, T., Tambe, Y., Yasui, K., Matsumoto, K., Yutsudo, M. e Inoue, H. Downregulation of drs mRNA expression is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. Int J Oncol, v.30, n.6, Jun, p.1343-8. 2007.

Shimakage, M., Kawahara, K., Kikkawa, N., Sasagawa, T., Yutsudo, M. e Inoue, H. Down-regulation of drs mRNA in human colon adenocarcinomas. Int J Cancer, v.87, n.1, Jul 1, p.5-11. 2000.

Shimakage, M., Kodama, K., Kawahara, K., Kim, C. J., Ikeda, Y., Yutsudo, M. e Inoue, H. Downregulation of drs tumor suppressor gene in highly malignant human pulmonary neuroendocrine tumors. Oncol Rep, v.21, n.6, Jun, p.1367-72. 2009.

Shimakage, M., Takami, K., Kodama, K., Mano, M., Yutsudo, M. e Inoue, H. Expression of drs mRNA in human lung adenocarcinomas. Hum Pathol, v.33, n.6, Jun, p.615-9. 2002.

Sleddens, H. F., Oostra, B. A., Brinkmann, A. O. e Trapman, J. Trinucleotide repeat polymorphism in the androgen receptor gene (AR). Nucleic Acids Res, v.20, n.6, Mar 25, p.1427. 1992.

Smallwood, S. A., Tomizawa, S., Krueger, F., Ruf, N., Carli, N., Segonds-Pichon, A., Sato, S., Hata, K., Andrews, S. R. e Kelsey, G. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. Nat Genet, v.43, n.8, Aug, p.811-4. 2012.

Swierczek, S. I., Piterkova, L., Jelinek, J., Agarwal, N., Hammoud, S., Wilson, A., Hickman, K., Parker, C. J., Cairns, B. e Prchal, J. T. Methylation of AR locus does not always reflect X chromosome inactivation state. Blood, v.119, March, p.100-109. 2012.

Tachibana, M., Ma, H., Sparman, M. L., Lee, H. S., Ramsey, C. M., Woodward, J. S., Sritanaudomchai, H., Masterson, K. R., Wolff, E. E., Jia, Y. e Mitalipov, S. M. X-chromosome inactivation in monkey embryos and pluripotent stem cells. Dev Biol, v.371, n.2, Nov 15, p.146-55. 2012.

Tambe, Y., Isono, T., Haraguchi, S., Yoshioka-Yamashita, A., Yutsudo, M. e Inoue, H. A novel apoptotic pathway induced by the drs tumor suppressor gene. Oncogene, v.23, n.17, Apr 15, p.2977-87. 2004.

Tambe, Y., Yoshioka-Yamashita, A., Mukaisho, K., Haraguchi, S., Chano, T., Isono, T., Kawai, T., Suzuki, Y., Kushima, R., Hattori, T., Goto, M., Yamada, S., Kiso, M., Saga, Y. e Inoue, H. Tumor prone phenotype of mice deficient in a novel apoptosis-inducing gene, drs. Carcinogenesis, v.28, n.4, Apr, p.777-84. 2007.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. e Kumar, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, v.28, n.10, Oct, p.2731-9. 2011.

Tardif, S. D., Mansfield, K. G., Ratnam, R., Ross, C. N. e Ziegler, T. E. The marmoset as a model of aging and age-related diseases. Ilar J, v.52, n.1, Feb 8, p.54-65. 2011.

Wang, X., Miller, D. C., Clark, A. G. e Antczak, D. F. Random X inactivation in the mule and horse placenta. Genome Res, v.22, n.10, Oct, p.1855-63. 2012.

Zilberman, D. e Henikoff, S. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. Development, v.134, n.22, Nov, p.3959-65. 2007.