

**O POLIMORFISMO DO LOCO STR (GAAA)_n PROMOTOR-
ASSOCIADO NÃO ESTÁ CORRELACIONADO COM NÍVEIS
DIFERENCIADOS DE EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DO GENE
*RP2***

Viviane Lamim Lovatel

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES
MARÇO DE 2014**

**O POLIMORFISMO DO LOCO STR (GAAA)_n PROMOTOR-
ASSOCIADO NÃO ESTÁ CORRELACIONADO COM NÍVEIS
DIFERENCIADOS DE EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DO GENE
*RP2***

Dissertação de Mestrado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como um dos pré-requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, sob orientação do Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta.

Mestranda: Viviane Lamim Lovatel
Orientador: Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES
MARÇO DE 2014**

**O POLIMORFISMO DO LOCO STR (GAAA)_n PROMOTOR-
ASSOCIADO NÃO ESTÁ CORRELACIONADO COM NÍVEIS
DIFERENCIADOS DE EXPRESSÃO TRANSCRICIONAL DO GENE
*RP2***

VIVIANE LAMIM LOVATEL

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

Aprovada em _____ de março de 2014.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Cláudia Caixeta Franco Andrade (Doutora em Genética)-USP

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

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

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

AGRADECIMENTOS

À minha família e “agregados” por todo apoio e carinho que me deram mesmo distante;

Minha mãe por me ensinar que sempre podemos melhorar e ao meu pai pelo otimismo;

À minha irmã Vanessa e meu companheiro, amigo e amor Marco por serem meu porto seguro;

As minhas amigas do Planet Kids por todas as conversas e diversão que passamos juntas;

Aos meus amigos do Nudim Tom, Thaís, Thiago, Katrine, Gau, Maria, Filipe e Fabrício por tornarem nosso ambiente de trabalho mais leve e prazeroso;

À Paty por ser sempre tão prestativa e carinhosa comigo;

À Paula e professor Álvaro por todo ensinamento e pela amizade construída;

Aos sorrisos e apoio que encontrei nos corredores da UENF nos últimos meses que me mostraram que ainda existem pessoas boas;

À todos os meus 101 voluntários;

À Liliane por me ajudar com as coletas das amostras;

Ao professor Enrique pela oportunidade e ensinamentos durante esses 5 anos em que estive sob sua orientação.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
SUMÁRIO	iii
ÍNDICE DE FIGURA	v
ÍNDICE DE TABELA	vi
ÍNDICE DE GRÁFICO.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Epigenética.....	2
1.2. Inativação do cromossomo X.....	5
1.3 Métodos convencionais de detecção do estado de metilação.....	7
1.4 Gene <i>RP2</i>	10
1.5 Influência dos polimorfismos na expressão gênica	11
2. HIPÓTESE	15
3. OBJETIVO	15
3.1 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAS E MÉTODOS	15
4.1 Aspectos éticos	15
4.2 Desenho de Iniciadores.	16
4.3 Extração de DNA e RNA	16
4.4 Genotipagem do <i>marcador RP2</i>	16
4.5 Digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa de fluorescência - DESM-QFPCR	16
4.6 Caracterização dos alelos amplificados.	17
4.7 Frequências alélicas para o marcador <i>RP2</i>	17
4.8 Quantificação das proporções de inativação	17
4.9 Transcrição reversa.....	18

4.10	Reação de Cadeia de Polimerase – PCR	18
4.11	Quantificação da expressão por PCR em Tempo Real.....	18
5.	RESULTADOS.....	19
5.1	Extensão do polimorfismo do loco STR (GAAA) _n associado ao promotor <i>RP2</i>	19
5.2	Perfis de inativação do cromossomo X referidos pelo ensaio de metilação no polimorfismo do loco STR (GAAA) _n associado ao promotor <i>RP2</i>	20
6.	DISCUSSÃO	35
6.1	Extensão do polimorfismo do loco STR (GAAA) _n associado ao promotor <i>RP2</i> e os níveis de expressão transcricional do gene <i>RP2</i>	35
6.2	Os ensaios <i>RP2</i> e HUMARA referem à mesma origem parental dos cromossomos X _a e X _i e a correlação entre o estado de metilação interrogado pelos ensaios <i>RP2</i> e HUMARA é alta.....	36
6.3	Não há uma relação entre o polimorfismo do loco STR (GAAA) _n associado ao promotor e os níveis de expressão transcricional do gene <i>RP2</i>	37
8.	CONCLUSÃO	40
9.	REFERÊNCIAS.....	41

ÍNDICE DE FIGURA

Figure 1. Fórmula utilizada para calcular a proporção de ICX entre os alelos.	17
Figure 2. Perfis eletrofotográficos das 71 mulheres genotipadas..	20
Figure 3. Eletroferograma de uma mulher com o padrão inativação do cromossomo X aleatória.....	21
Figure 4. Eletroferograma de uma mulher com padrão de inativação do cromossomoX preferencial.....	21
Figure 5. Eletroferograma de uma mulher com o padrão inativação do cromossomo X levemente preferencial.....	22
Figure 6. Eletroferograma de análise de segregação de um núcleo familiar com a filha com inativação do cromossomo X preferencial com os ensaios HUMARA e RP2.	24
Figure 7. Escala alélica com os alelos encontrados nos homens genotipados.....	25
Figure 8. Gel da amplificação do cDNA das amostras.	26

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1. Descrição dos primers utilizados para o ensaio Real-Time PCR.	19
Tabela 2. Dados populacionais do marcador <i>RP2</i> na população de estudo.....	20
Tabela 3. Idades dos homens doadores de amostras para os ensaios da PCR em tempo real.	29
Tabela 4. Dados do padrão de inativação do cromossomo X das mulheres utilizadas neste estudo.	31

ÍNDICE DE GRÁFICO

Gráfico 1. Razão entre os alelos ativos e inativos distribuição pelo padrão de inativação do cromossomo X.	22
Gráfico 2. Comparação entre a razão dos alelos ativos e inativos nos tecidos embrionários de origens diferentes.	23
Gráfico 3. Dispersão da força de associação entre as porcentagens do alelo ativo pelo loco do marcador <i>RP2</i> e o do HUMARA.	25
Gráfico 4. Nível de expressão relativa para indivíduos com diferentes alelos encontrados para o marcador <i>RP2</i>	27
Gráfico 5. Nível de expressão relativa para o mRNA do gene <i>RP2</i> para os dois indivíduos com alelo 376.	28
Gráfico 6. Nível de expressão relativa para o mRNA do gene <i>RP2</i> para os cinco indivíduos com alelo 372.	28
Gráfico 7. Nível de expressão relativa para o mRNA do gene <i>RP2</i> para os três indivíduos com alelo 369.	29
Gráfico 8. Comparação entre os níveis de expressão em diferentes tempos de coleta de um mesmo indivíduo.	30
Gráfico 9. Nível de expressão de mRNA <i>RP2</i> em mulheres com diferentes padrões de inativação do cromossomo X.	32
Gráfico 10. Comparação dos perfis do nível de expressão relativa de todas amostras com o dois diferentes calibradores.	34

LISTA DE ABREVIATURAS

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

CpGs - Citosina-fosfato-Guanina

DNMTs - DNA metiltransferases

dNTPs- desoxirribonucleotídeos trifosfatos

ddNTPs- didesoxirribonucleotídeos trifosfatos

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

GAPDH - do inglês *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (Gene da Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase)

Hpa II - Enzima de restrição sensível à metilação

5HTT – do inglês *serotonin transporter* (Gene transportador de serotonina humana)

ICX - Inativação do cromossomo X

Kb - kilobase

ncRNA - do inglês *non-coding RNA* (RNA não codificador de proteína)

pb - Pares de bases

PAR – do inglês pseudoautosomal region (Região pseudo-autossômica)

PAX-6- do inglês *paired Box 6*

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

PCSK1N- do inglês *PCSK1N proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor*

RP2 - do inglês *retinitis pigmentosa* (Gene da retinite pigmentosa 2)

RFLP- do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*

SNPs - do inglês *Single-Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de nucleotídeo único)

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

SLITRK4- do inglês *SLIT and NTRK-like family, member4*

TSIX - Gene antissentido ao *XIST*

TSS – do inglês transcription start site (sítio de início de transcrição)

VNTRs – do inglês Variable Number Tandem Repeat

Xa - Cromossomo X ativo

Xi - Cromossomo X inativo

Xic - do inglês X-inactivation center (Centro de inativação do cromossomo X)

XIST - do inglês *X inactivation specific transcript*

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

ZDHHC15 – do inglês *zinc finger, DHHC-type containing 15*

RESUMO

A inativação aleatória de um dos cromossomos X (ICX) em mulheres ocorre a fim de equilibrar a dosagem gênica ligada ao X entre os sexos. A ICX é um processo natural que ocorre durante o desenvolvimento embrionário. É mantida por mecanismos epigenéticos como a metilação das ilhas CpG. Assim, mulheres são mosaicos hemizigóticos para a expressão da maioria dos genes ligados ao X, com uma população de células expressando alelos de origem materna e outra de origem paterna. No entanto em 10% dos casos a ICX é preferencial podendo estar correlacionada com a manifestação de doenças associadas ao X. O teste padrão ouro para análise indireta do estado da ICX está associado ao STR trinucleotídico (CAG)_n no éxon 1 do gene *receptor de andrógenos humano* (AR ou HUMARA). Tal análise se baseia em PCR e interroga o estado de metilação próximo ao STR. No entanto, as variáveis alélicas influenciam na expressão deste estando associadas com doenças como a doença de Kennedy e desenvolvimento de câncer de próstata. Além disso, na prática clínica ocasionalmente são encontrados casos em que este marcador não é informativo, exigindo ensaios alternativos. Em estudo prévio nosso grupo de pesquisa descreveu a identificação do STR (GAAA)_n associado à região promotora do gene *RP2* e sua alta informatividade na determinação do padrão de ICX. Polimorfismos em locos STR associados às regiões promotoras podem influenciar o nível de expressão gênica. Neste sentido, investigamos no presente trabalho se o polimorfismo do loco STR (GAAA)_n associado ao promotor do gene *RP2* está correlacionado com níveis diferenciados de expressão do gene *RP2*. Secundariamente avaliamos se o marcador *RP2* identifica a mesma origem parental do cromossomo X inativo que o ensaio HUMARA. O marcador *RP2* foi genotipado em amostras de DNA genômico de 71 mulheres. Como referência, o marcador HUMARA foi genotipado em 24 dessas amostras. O padrão de ICX foi determinado pela digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa de fluorescência - DESM-QFPCR. O nível de expressão transcricional do gene *RP2* foi determinado por PCR em Tempo Real em cDNA de 13 homens e 9 mulheres. O marcador *RP2* foi altamente informativo com taxa de heterozigose 0,97, apresentando 12 alelos. A distribuição das proporções de ICX em 69 mulheres heterozigotas foi de 0,52 ICX aleatória, 0,33 levemente preferencial e 0,15 ICX preferencial. O marcador *RP2* referiu à mesma origem parental no cromossomo X inativo que o marcador HUMARA. Com relação aos dados do nível de expressão do gene *RP2* em ambos os sexos pode se inferir que as variantes alélicas do loco STR (GAAA)_n não influenciam na expressão desse gene. Assim concluímos que o marcador STR (GAAA)_n do gene *RP2* é neutro, sendo assim marcador ideal para determinação do estado de metilação dos alelos ativos e inativos no cromossomo X.

Palavras Chaves: expressão gênica; inativação do cromossomo X; metilação; polimorfismo; STR.

ABSTRACT

The X chromosome inactivation (XCI) occurs in women in order to compensate X-linked gene dosage between the sexes. The XCI is a natural process that occurs during embryonic development. It is maintained by epigenetic mechanisms such as methylation of CpG islands. In each somatic cell in female mammals, one X-chromosome is inactivated at random. Thus, females are mosaic hemizygotic for the expression of most X-linked genes, with a population of cells expressing alleles of either the maternal or the paternal origins. However, in 10% of cases, XCI is not at random, and one of the X-chromosome is preferentially inactivated. Preferential XCI may be correlated with the manifestation of diseases associated with X. Currently, the gold standard for analysis of the state of XCI is based on the trinucleotide STR (CAG)_n in exon 1 of the human androgen receptor gene (*AR* or HUMARA). This analysis is based on PCR and interrogates the methylation state near the STR. However, the STR *AR* alleles influence the expression and are associated with diseases such as Kennedy and development of prostate cancer. In addition, in clinical practice there are cases in which this marker is uninformative, demanding alternative markers. A previous study described the identification of STR (GAAA)_n associated with the promoter region of the *RP2* gene and its high informativeness in determining the pattern of XCI. STR polymorphisms associated with the promoter regions influence the level of gene expression. In this regard, the present study investigated whether the polymorphism of STR locus (GAAA)_n associated with the promoter of the *RP2* gene is correlated with differential expression levels of the *RP2* gene. Secondarily we evaluated whether *RP2* marker identifies the same parental origin of the inactive X chromosome referred by that HUMARA assay. The *RP2* marker was genotyped in samples of genomic DNA of 71 women. As a reference, the HUMARA marker was genotyped in 24 of these samples. The pattern of ICX was determined by methylation-sensitive enzyme digestion associated with quantitative PCR fluorescence - DESM-QFPCR. The level of expression of the transcriptional gene was determined by Real-Time PCR on cDNA of 13 men and 9 women. The *RP2* core promoter STR was highly informative, with heterozygosity rate of 0.97, with 12 alleles. The distribution of the proportions of XCI in 69 heterozygous females was random XCI in 0.52, slightly preferential in 0.33 and preferential XCI in 0.15. The *RP2* marker pointed to the same parental origin of the inactive X chromosome that HUMARA marker. Regarding the data on the level of expression of the *RP2* gene in both sexes may be inferred that the allelic variants of locus STR (GAAA)_n does not influence the expression of this gene. It was concluded that the *RP2* core promoter STR marker (GAAA) is neutral, thus being ideal marker for determining the methylation status of the active and inactive alleles on chromosome X.

Key words: gene expression; methylation; polymorphism; STR; X-chromosome inactivation

1. INTRODUÇÃO

Mulheres têm duas cópias do cromossomo X, uma das quais passa por processo randômico de inativação para compensação de dose entre os sexos (Lyon, 1961; Beutler, Yeh *et al.*, 1962). A ICX ocorre através de mecanismos epigenéticos, ou seja, modificações que não alteram a sequência de nucleotídeos (Jaenisch e Bird, 2003; Tammen, Friso *et al.*, 2012). A metilação do DNA no contexto CpG é o mecanismo mais amplamente estudado (Teixeira e Colot, 2009; Laird, 2010; Tammen, Friso *et al.*, 2012) .

Devido a ICX, as mulheres exibem um mosaicismo somático para a população de cromossomos inativos (Beutler, Yeh *et al.*, 1962). Em cerca de 10% das mulheres clinicamente normais, entretanto, pode ocorrer inativação preferencial em um dos cromossomos X (Sharp, Robinson *et al.*, 2000) (Kristiansen, Knudsen *et al.*, 2005; Orstavik, 2009; Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011). É considerada preferencial se a proporção entre cromossomos X ativos para inativos da mesma origem parental for menor que 20% ou superior a 80% (Plenge, Stevenson *et al.*, 2002).

A ICX preferencial pode ser indicativa do estado de portador de muitos distúrbios associados ao cromossomo X, incluindo anormalidades citogenéticas e certas condições mendelianas (Brown e Robinson, 2000; Amos-Landgraf, Cottle *et al.*, 2006). Portanto é essencial investigar os padrões da ICX em membros do sexo feminino de famílias com distúrbios ligados ao X para fornecer um melhor aconselhamento genético (Orstavik, 2009; Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011)

Estudos empregando métodos de determinação do estado de inativação do cromossomo X têm crescido nas últimas décadas, auxiliando na determinação da origem parental de doenças ligadas ao X bem como sua etiologia (Mossner, Nolte *et al.*, 2012). A análise indireta baseia-se nos ensaios RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) utilizando enzimas de restrição sensíveis a metilação como a *HpaII* (Singer-Sam, Grant *et al.*, 1990; Singer-Sam, Lebon *et al.*, 1990), o que fornece uma avaliação global do estado de metilação das ilhas de CpG (Issa, Ottaviano *et al.*, 1994; Herman, Graff *et al.*, 1996).

Atualmente, o marcador mais utilizado para determinação do estado da ICX e da metilação pontual em diversos tipos de tumores está associado ao STR trinucleotídico (CAG) no éxon 1 do gene receptor de andrógenos humano (*AR* ou

HUMARA GenBank M21748JO4150) identificado por Allen e colaboradores em 1992 (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992).

A heterozigose do STR trinucleotídico no gene *receptor de andrógeno humano* varia de 82 a 90% quando testados em diferentes populações (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992; Busque e Gilliland, 1998; Sato, Hashiyada *et al.*, 2003; Kaupert, Billerbeck *et al.*, 2010; Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011). Embora altamente informativo, esse loco não é suficiente para avaliar o estado de inativação do X em uma parcela da população feminina, ocorrendo a necessidade de disponibilizar métodos alternativos (Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011). Além de se tratar de uma região não neutra, número de repetições do STR (CAG) presente no gene *AR* correlaciona-se com distúrbios como doença de Kennedy e desenvolvimento de câncer de próstata (Chu, Chang *et al.*, 2014; Fratta, Collins *et al.*, 2014). Assim, novas abordagens são necessárias para perfazer esses casos em que o teste do loco *AR* não seja informativo.

Neste sentido, foi identificado um marcador STR, localizado no gene *RP2* para avaliar com precisão o status de metilação dos alelos ativos e inativos no cromossomo X (Faria, 2013). No entanto, havia dois aspectos no marcador *RP2* que deveriam ser estudados. Primeiro, se o loco do marcador *RP2* é neutro, ou seja, que não haja interferência do número de repetições na expressão do gene, e segundo, se o X determina a mesma origem parental no cromossomo X inativo que o ensaio HUMARA.

1.1 Epigenética

Epigenética é a área de estudo que envolve as alterações potencialmente estáveis no DNA, que modificam a expressão gênica sem modificação na sequência de nucleotídeo, e das proteínas histonas (Jaenisch e Bird, 2003; Tammen, Friso *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).

As modificações epigenéticas incluem a metilação do DNA, as modificações covalentes na cauda N-terminal das proteínas histonas, o remodelamento da cromatina e o miRNA, embora ainda seja debatido se o miRNA pode ser classificado

como um fenômeno epigenético (Fackler, Mcveigh *et al.*, 2004; Rando, 2007; Turan, Katari *et al.*, 2010).

Apesar de ser determinado principalmente pelo seu perfil de expressão genética, o fenótipo de uma célula sofre também a influência ambiental, sem que ocorram mutações no genoma, sendo assim, um mecanismo especial de regulação da expressão gênica que se sobrepõe àquela associada à sequência do DNA (Laird, 2010; Tammen, Friso *et al.*, 2012). Estas mudanças ambientais para o epigenoma são tão robustas que mesmo gêmeos monozigóticos podem ser identificados através da análise de seus exclusivos padrões epigenéticos (Tammen, Friso *et al.*, 2012).

Há um vasto número de modificação nas histonas, incluindo acetilação, metilação, fosforilação, e ubiquitinação (Cedar e Bergman, 2009). Essas alterações químicas alteram a densidade da cromatina e a acessibilidade ao DNA pela maquinaria celular, modulando assim, modifica o potencial transcricional da sequência de DNA subjacente (Fackler, Mcveigh *et al.*, 2004; Rando, 2007; Cedar e Bergman, 2009; Turan, Katari *et al.*, 2010).

O mecanismo mais estudado de regulação do genoma em eucariotos é a metilação do DNA (Teixeira e Colot, 2009; Laird, 2010; Tammen, Friso *et al.*, 2012) e tem sido considerada um regulador chave da expressão gênica (Bell, Pai *et al.*, 2011). Geralmente apenas um subconjunto das potenciais sequências alvo no genoma são metiladas, portanto esse perfil de marcas pode representar potencial de silenciamento ou de transcrição (Laird, 2010).

Metilação de citosina é amplamente conhecida por seu papel no silenciamento de elementos transponíveis e de alguns genes em plantas e mamíferos (Teixeira e Colot, 2009; Diamandis, Sidransky *et al.*, 2010; Lai, Fatemi *et al.*, 2010; Laird, 2010). A metilação ocorre nos resíduos de citosina do carbono na posição 5' (5^{me}C), sendo encontrada em ilhas CpG, ou ocorre em CpHpG, onde H pode ser adenina, timina ou citosina (Teixeira e Colot, 2009; Diamandis, Sidransky *et al.*, 2010; Lai, Fatemi *et al.*, 2010; Laird, 2010)

No DNA dos mamíferos, a metilação é mediada por DNA metiltransferases (DNMTs) que são responsáveis pela metilação *de novo* e manutenção dos padrões de metilação durante a replicação (Bell, Pai *et al.*, 2011). A adição de grupos metil para a posição 5' em resíduos de citosina no DNA é mediada pela família de DNA

metiltransferase (DNMT proteínas), incluindo DNMT1, DNMT3A, DNMT3B. A DNMT1 desempenha um papel importante na manutenção de padrões de metilação, exibindo um maior nível de atividade em DNA hemi-metilado, em comparação com o DNA não metilado. A metilação *de novo* é catalisada pela DNMT3A e DNMT3B (Potter, McKay *et al.*, 2013).

Os dinucleotídeos CpGs no genoma dos vertebrados estão predominantemente metilados, enquanto as regiões ricas em sequências dinucleotídicas CpGs ou ilhas CpGs geralmente se encontram desmetiladas (Deaton, Webb *et al.*, 2011). As ilhas CpGs, associadas com os promotores, englobam aproximadamente 60% dos genes humanos que codificam proteínas (Illingworth, Gruenewald-Schneider *et al.*, 2011), no entanto, normalmente não são metiladas (Lorincz e Groudine, 2001).

Além disso, 40% dos genes tecido-específicos são associados à ilhas CpG e 72% de todos os promotores para esses genes tem teor elevado de CpG, sendo que apenas 28% possuem baixo conteúdo de CpG (Saxonov, Berg *et al.*, 2006). A metilação aberrante de uma ilha CpG localizada próxima a um promotor está associada à processos patológicos devido a perda de expressão de genes essenciais (Lai, Fatemi *et al.*, 2010).

O delineamento dos padrões de metilação de regiões do DNA e, mais amplamente, os perfis de metilação do DNA, tem implicações importantes para a compreensão de como certas regiões do genoma podem ser expressas em contextos de desenvolvimento específicos e como mudanças epigenéticas podem permitir padrões aberrantes de expressão e doenças (Laird, 2010). Além disso, a metilação do DNA desempenha um papel importante no "*imprinting*" de genes nos quais o alelo não expresso (paterno ou materno) apresenta a sua região promotora metilada, na inativação do cromossomo X em fêmeas, e na repressão de elementos de sequências parasitárias (Lorincz e Groudine, 2001).

Portanto, o mapeamento dos padrões de metilação em ilhas CpG tornou-se uma ferramenta importante para a compreensão da expressão de genes envolvidos em eventos patológicos (Herman, Graff *et al.*, 1996).

1.2. Inativação do cromossomo X

Fêmeas de mamíferos possuem dois cromossomos X, enquanto os machos têm apenas um X e mais um cromossomo Y. O cromossomo Y de mamíferos machos contém apenas um pequeno número de genes, a maioria deles específico para características masculinas. O cromossomo X, em contraste, contém cerca de 1.000 genes, colocando um enorme número de cópias em desequilíbrio entre os sexos (Pontier e Gribnau, 2011).

Tal desequilíbrio de dosagem provavelmente seria deletério nos seres humanos, devido ao tamanho do cromossomo X. Mecanismos específicos evoluíram nos animais para compensar a dosagem gênica (Pessia, Engelstadter *et al.*, 2013).

A fim de equilibrar a dosagem gênica ligada ao X entre os sexos, um cromossomo X sofre inativação durante o desenvolvimento de embriões do sexo feminino (Yan e Mccarrey, 2009). Este processo tem sido chamado de inativação do cromossomo X, (ICX) proposto por Mary Lyon, há 50 anos (Lyon, 1961; Harper, 2011).

Ohno também propôs mecanismo de compensação de dosagem em mamíferos. E que este teria evoluído como um mecanismo de dois passos com (1) um aumento da expressão dos genes do cromossomo X em ambos os sexos, para equilibrar a dosagem gênica em relação a expressão dos genes dos cromossomos autossomos e (2) a inativação do cromossomo X nas fêmeas para equilibrar a dosagem entre os sexos (Pessia, Engelstadter *et al.*, 2013)

Nem todos os genes ligados ao X requerem compensação de dosagem, mas a maioria está sujeita à compensação (Migeon, 2011; Pessia, Engelstadter *et al.*, 2013). Compensação de dosagem em células humanas não ocorre aos poucos, pelo contrário, a maioria dos genes localizados no cromossomo X são submetidos ao silenciamento (Migeon, 2011). Esse silenciamento na maioria dos genes em um dos cromossomos X (célula somática feminina) e sua transição a um estado heterocromático (Carrel e Willard, 2005) é conhecido como corpo de Barr (Barr e Bertram, 1949).

Há um subconjunto de genes que escapam do silenciamento por inativação e continuam a ser expressos em ambos os cromossomos X (Carrel e Willard, 2005; Cooper, 2011). Alguns desses genes estão em uma região pseudo-autossômica (PAR), ou seja, uma região do cromossomo X que é homóloga ao Y e responsável

pelo emparelhamento de XY durante a meiose (Ellegren, 2011). Estima-se que no cromossomo inativo (Xi) 15-20% dos genes humanos localizados no X escapam completamente da inativação, e outros 10% escapam parcialmente (Carrel e Willard, 2005; Pontier e Gribnau, 2011).

A inativação do cromossomo X é um complexo exemplo de modificação e regulação epigenética que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, mais precisamente no estágio de blastocisto (Vickers, Canning *et al.*, 2006; Payer e Lee, 2008). Envolve uma série de diferentes mecanismos, como a metilação do DNA, o silenciamento de genes mediado por RNA e as mudanças na modificação ou na organização da cromatina (Cooper, 2011). A modificação inicia-se na cromatina, de modo que a maioria dos genes no cromossomo não são mais transcricionalmente ativos ou são muito menos ativos (Migeon, 2011).

Durante a embriogênese as células sofrem a ICX e se multiplicam por mitose dando origem a diferentes tecidos, assim células de tecidos embrionários diferentes podem apresentar padrões de ICX e origem parental do cromossomo inativo preferencialmente distintos (Lyon, 1961) .

O principal mediador da inativação do cromossomo X em humanos, como em outros mamíferos eutérios é um longo RNA não codificador (ncRNA) chamado *XIST* (*X-inactive specific transcript*) (Baumann e De La Fuente, 2009; Migeon, 2011; Pontier e Gribnau, 2011; Tattermusch e Brockdorff, 2011). O *XIST* é poliadenilado e condensado, durante o início da inativação do cromossomo X torna-se transcrito e se associa em *cis* apenas no futuro Xi desencadeando o amplo silenciamento do cromossomo (Brown, Hendrich *et al.*, 1992; Tattermusch e Brockdorff, 2011).

O gene *XIST* localizado na região Xq13.2 está dentro de uma região fundamental para o processo de inativação denominada centro de inativação do cromossomo X (Brown, Lafreniere *et al.*, 1991). Dentro do centro de inativação do cromossomo X encontram-se outros genes necessários para a inativação do X, como o gene antissentido ao *XIST*, o *TSIX* (*X (inactive)-specific transcript antisense*) e elementos de regulação (Lee, Davidow *et al.*, 1999; Cooper, 2011; Pontier e Gribnau, 2011).

Uma vez que o cromossomo X é inativado, ele tende a se manter neste estado por toda vida do organismo. O estado inativo é mantido por uma ação conjunta de mecanismos de metilação de suas ilhas CpG, com a constante

transcrição de XIST e modificações de histonas (Csankovszki, Nagy *et al.*, 2001).

Como resultado da ICX fêmeas são mosaicos hemizigóticos para a expressão da maioria dos genes ligados ao X, com uma população de células expressando alelos de origem materna e outra população expressando alelos de origem paterna (Migeon, 2006; Orstavik, 2009). Este mosaicismo tem implicações importantes para a expressão fenotípica de doenças ligadas ao X (Orstavik, 2009).

No entanto, a ICX pode não ser realmente igual em ambos os alelos do cromossomo X, havendo uma inativação preferencial de qualquer alelo paterno ou materno (Kristiansen, Knudsen *et al.*, 2005; Amos-Landgraf, Cottle *et al.*, 2006; Morey e Avner, 2011). A inativação preferencial é um processo que ocorre em 10% das mulheres clinicamente normais, porém esta porcentagem aumenta em mulheres com mais de 55 anos de idade (Sharp, Robinson *et al.*, 2000; Kristiansen, Knudsen *et al.*, 2005; Orstavik, 2009; Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011). A ICX enviesada em idosas tem sido observada no tecido sanguíneo e tecido epitelial. Sendo considerada uma consequência da idade avançada (Orstavik, 2009).

Em mulheres normais, a proporção de ICX de cada alelo não possui importância clínica, mas uma ICX preferencial muito alta pode ser indicativo do estado de portador de muitos distúrbios associados ao cromossomo X, incluindo anormalidades citogenéticas e certas condições mendelianas (Brown e Robinson, 2000; Amos-Landgraf, Cottle *et al.*, 2006). Portanto, é essencial investigar padrões ICX em membros do sexo feminino de famílias com distúrbios ligados X para fornecer um melhor aconselhamento genético (Orstavik, 2009; Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011).

1.3 Métodos convencionais de detecção do estado de metilação

O mapeamento das regiões metiladas no DNA por análise indireta iniciou-se no final de 1970. Tais análises dependiam principalmente de abordagens de hibridização (Southern Blot), com base na incapacidade de enzimas de restrição sensíveis a metilação para clivar sequências que contêm um ou mais locais de CpG metilados. Este método fornece uma avaliação do estado de metilação global das ilhas de CpG, incluindo algumas análises quantitativas, no entanto, requer grandes quantidades de DNA (Issa, Ottaviano *et al.*, 1994; Herman, Graff *et al.*, 1996).

A análise do padrão de metilação surgiu em 1990, com a modificação química de citosina para uracila por tratamento com bissulfito de sódio para o estudo de metilação de DNA. Nesta reação todas as citosinas são convertidas para uracila, mas aquelas que são metiladas (5-metilcitosina) são resistentes a esta modificação e permanecem como citosinas. Assim, o DNA modificado pode ser amplificado e sequenciado, proporcionando uma informação detalhada sobre o estado de metilação de todos os sítios de CpG da região amplificada (Frommer, McDonald *et al.*, 1992).

Dinucleotídeos CpG são locais comuns de polimorfismos, devido a desaminação de citosinas metiladas durante a evolução. O evento de desaminação pode estar presente no genoma de referência e no experimental e o polimorfismo é indistinguível da desaminação induzida por bissulfito em uma cadeia do genoma experimental. Logo, a alta frequência de polimorfismos CpG pode resultar em erros na medição da metilação do DNA por sequenciamento (Laird, 2010).

Um método mais sensível de detecção de metilação surgiu em 1990, publicado por Judith Singer-Sam e colaboradores, e combinava a utilização de enzimas sensíveis à metilação e PCR, com a aplicação de iniciadores flanqueando os locais digeridos com a enzima de restrição *Hpa* II (Singer-Sam, Grant *et al.*, 1990; Singer-Sam, Lebon *et al.*, 1990). Este método, de forma semelhante ao Southern Blot, permite o monitoramento da metilação CpG apenas nas sequências que contêm sítios de restrição sensíveis à metilação e é útil para amostras com uma percentagem considerável da região analisada metilada (Sulewska, Niklinska *et al.*, 2007).

O sequenciamento é aplicável para alguns estudos de locos específicos que requerem informações sobre estado da metilação do DNA, através de múltiplas kilobases, tanto entre CpGs ou entre CpG e um polimorfismo genético (Laird, 2010). Por exemplo, pode ser aplicado para analisar “*imprinting*” genômico e a inativação do cromossomo X (Herman, Graff *et al.*, 1996; Sulewska, Niklinska *et al.*, 2007), já que a presença de metilação em ilhas CpG em promotores ligados ao cromossomo Xa no Xi é classicamente associada a genes sujeitos a ICX (Cotton, Lam *et al.*, 2011).

A redução da expressão de um gene é o resultado direto do processo de inativação, com apenas algumas exceções, afetando todas as regiões do

cromossomo X (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992). O estado de ativação dos cromossomos é determinado diretamente por estudos de expressão gênica (Carrel e Willard, 1999).

A expressão alélica específica do gene tem sido estudada em *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X (Tycko, 2010). Assim, quando a expressão é vista a partir de um dos dois alelos, pode-se indicar que o gene está sujeito a ICX ou que os níveis de transcritos nascentes estão além do limiar de detecção (Swierczek, Piterkova *et al.*, 2012).

A análise quantitativa dos níveis de expressão alélica específica de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), pode ser útil para determinar o estado ICX (Brockdorff, 2011).

Em 1992, Allen e colaboradores desenvolveram o ensaio que hoje é o mais utilizado como teste padrão para análise do estado de metilação dos alelos ativos e inativos no cromossomo X. O ensaio baseado na PCR da região de um STR trinucleotídico (CAG) no éxon 1 do gene receptor de andrógeno humano (Ar ou HUMARA GenBank M21748JO4150) (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992; Busque e Gilliland, 1998). A análise da inativação do cromossomo X ocorre, pois a repetição polimórfica (CGA) localiza-se entre dois sítios de restrição da enzima (*HpaII*) sensível a metilação (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992; Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011).

A determinação do estado de ICX do ensaio HUMARA é baseada na interrogação do estado de metilação das ilhas CpGs presentes dentro da região amplificada pelo primers sentido e anti-sentido, as quais possuem são sítios para enzimas de restrição sensíveis a metilação. Desde modo, após a digestão enzimática os sítios que estiverem metilados não vão ser clivados e os que não estiverem metilados serão clivados. Assim quando amplificado, pode se calcular a proporção de inativação através da área dos alelos do produto digerido comparando com o controle não digerido.

O ensaio HUMARA é altamente informativo sendo utilizado em diversos estudos com diferentes populações, e sua heterozigose chega à 90% (Allen, Zoghbi *et al.*, 1992; Busque e Gilliland, 1998; Sato, Hashiyada *et al.*, 2003; Kaupert, Billerbeck *et al.*, 2010; Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011). Contudo, ainda há casos em que o loco *AR* não é suficiente para avaliar o estado de inativação do X (Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011).

Além disso, o número de repetições do STR (CAG) presente no gene *AR* correlaciona-se com distúrbios como doença de Kennedy (KD [MIM 313200]) (Fratta, Collins *et al.*, 2014) e desenvolvimento de câncer de próstata (Irvine, Yu *et al.*, 1995; Chu, Chang *et al.*, 2014). Portanto, trata-se de um marcador não neutro.

Em 2011, Bertelsen e colaboradores descrevem o uso de novos marcadores STR dinucleotídeos (*ZDHHC15*, *SLITRK4*, *PCSK1N*) para determinar o estado de metilação do cromossomo X, no entanto, tiveram dificuldade na determinação das proporções de metilação interrogado pelos três novos locos por apresentarem alelos separados por uma única repetição tendo interferência do *stutter* do alelo maior (Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011).

Os 3 locos novos propostos por Bertelsen não alcançaram a heterozigose do ensaio HUMARA e que ainda havia uma parcela da população em que ambos os ensaios poderiam não ser informativos. Nosso grupo identificou locos possivelmente neutros de repetições polimórficas para avaliar com precisão o status de metilação dos alelos ativos e inativos no cromossomo X.

Estudo prévio do nosso grupo de pesquisa descreveu a identificação do STR (GAAA)_n associado a região promotora do gene da retinite pigmentosa 2 (*RP2*) e sua alta informatividade na determinação do padrão de ICX (Machado *et al.* Manuscrito submetido).

1.4 Gene *RP2*

O gene *RP2* (OMIM 312600) é composto por cinco exons localiza-se no intervalo Xp11.3-11.2. do braço curto do cromossomo X (Schwahn, Lenzner *et al.*, 1998). Codifica um polipeptídeo de 350 aminoácidos, o qual é expresso ubiquamente nos tecidos humanos (Schwahn, Lenzner *et al.*, 1998; Chapple, Hardcastle *et al.*, 2000). A proteína *RP2* localiza-se principalmente na membrana plasmática voltada para a face citoplasmática (Schwahn, Lenzner *et al.*, 1998; Chapple, Hardcastle *et al.*, 2000).

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

Acredita-se que atue como ativador de GTPase (GAP) para o fator ribosilação ADP tipo 3 (Arl3) da superfamília Ras das pequenas proteínas G (Veltel, Gasper *et al.*, 2008; Holopainen, Cheng *et al.*, 2010).

Mutações no *RP2* são responsáveis por aproximadamente 20% de todos os casos de retinite pigmentar ligada ao cromossoma X (XLRP) (Jayasundera, Branham *et al.*, 2010; Patil, Hurd *et al.*, 2011; Schwarz, Novoselova *et al.*, 2011). Essas mutações levam a perda das proteínas RP2 e / ou a distribuição intracelular aberrante, que pode ser a base para a degeneração das células fotorreceptoras (Patil, Hurd *et al.*, 2011). Causando uma degeneração progressiva das células fotorreceptoras, perda progressiva de bastonetes e cones da retina, resultando em perda gradual da função visual ou cegueira noturna (Berson, 1996; Jayasundera, Branham *et al.*, 2010; Schwarz, Novoselova *et al.*, 2011).

A forma mais grave da XLRP (Schwahn, Lenzner *et al.*, 1998; Schwarz, Novoselova *et al.*, 2011) é caracterizada fenotipicamente pelo aparecimento de cegueira noturna na segunda década de vida, e evolui em geral para cegueira completa (Bird, 1975).

Pacientes do sexo masculino apresentam início precoce da doença e evolução rápida dos sintomas, com avançada deterioração, tornando o diagnóstico genético e o subsequente prognóstico da *RP2*, de particular importância para os pacientes e suas famílias (Gan, He *et al.*, 2011). As mulheres portadoras de mutações associadas à XLRP são mosaicos e apresentam despigmentação da retina (Tong, Yang *et al.*, 2006). Também apresentam anormalidades eletrorretinográficas que indicam uma perda modesta dos fotorreceptores (Berson, 1996).

No entanto, algumas mulheres portadoras possuem sinais e sintomas de exposição de degeneração da retina que são presumivelmente devido à inativação preferencial desfavorável do cromossoma X normal na maioria das suas células da retina (Berson, 1996).

1.5 Influência dos polimorfismos na expressão gênica

As variações presentes nas sequências do DNA em mais de 1% da população são definidas como polimorfismo. Os polimorfismos incluem as deleções e inserções de um ou mais nucleotídeos, rearranjos, polimorfismo de um único nucleotídeos (SNPs), as sequências curtas repetidas em tandem (STR) (de 1-6

repetições) e os minissatélites repetições mais longas (VNTRs) (Cargill, Altshuler *et al.*, 1999).

Os polimorfismos reguladores podem ser classificados em dois grupos: os que atuam na transcrição do gene em que se localiza, ou em locos próximos do gene que regulam (*cis-acting*). No segundo grupo estão aqueles polimorfismos que atuam em outros genes distantes (*trans-acting*) (Wray, Hahn *et al.*, 2003).

Os elementos mais ativos transcricionalmente são encontrados próximos a região promotora e em regiões a montante desta (Hoogendoorn, Coleman *et al.*, 2004). Os promotores estão envolvidos no início da transcrição e, portanto, estão entre elementos regulatórios importantes para a expressão gênica em *cis-acting* que devem estar protegidas da funcionalidade de polimorfismos relevantes (Hoogendoorn, Coleman *et al.*, 2003).

Há varias evidências que demonstraram que a distribuição genômica de repetições curtas em tandem (STRs) não é aleatória, provavelmente por causa de seus efeitos sobre a organização da cromatina. Embora tradicionalmente os STRs e outras repetições em tandem tem sido consideradas sem função ou marcadores neutros (Sawaya, Bagshaw *et al.*, 2013).

A presença de STRs em éxons, introns e regiões intergênicas prevê a possibilidade de modulação de uma variedade de processos moleculares. Estas repetições, por sua vez, podem conduzir a variabilidade funcionalmente significativa em níveis dos sistemas celulares (Comings, 1998).

Em leveduras, foi visto divergência nas taxas transcricionais, quando STRs presentes em promotores alteravam o número de cópias das repetições levando a uma alteração no comprimento do promotor afetando sua transcrição. Um processo semelhante pode ser encontrado em humanos (Sawaya, Bagshaw *et al.*, 2013).

Dados recentes sugerem que repetições em tandem podem aumentar a taxa de evolução das sequências dos promotores. Esses dados fornecem uma evidência adicional de que STR e VNTRs causam consequências funcionais e fornecem uma rica fonte de diversidade genética que pode facilitar os processos evolutivos, através de ações sobre o desenvolvimento, função biológica e comportamento (Hannan, 2010).

Variações no número de cópias das STR presentes em promotores vêm sendo associadas com uma gama de efeitos biológicos, incluindo alterações no nível

de expressão proteica, devido às alterações no espaçamento relativo e orientação posicional dos elementos promotores na hélice do DNA (Bayliss e Palmer, 2012; Trifonov, Volkovich *et al.*, 2012).

Devido à sua natureza altamente polimórfica e sua localização a montante do sítio de início de transcrição (TSS), os STRs associados a promotores que estejam próximos aos TSS tem sido denominados “*core promoter*” ou associados ao promotor (Darvish, Nabi *et al.*, 2011). Estes oferecem uma fonte inédita de variação inter-individual na expressão gênica e de características complexas (Darvish, Nabi *et al.*, 2011; Ohadi, Mohammadparast *et al.*, 2012). Genes cujos promotores contêm repetições apresentam maior variação nos níveis de transcrição devido a influencia do tamanho da repetição no processo transcrional (Valipour, Kowsari *et al.*, 2013).

Hoje já se tem descrito a função específica de alguns dos polimorfismos no DNA, como reguladores de expressão de genes, e assim potenciais contribuintes para características quantitativas associadas com doenças complexas como doenças cerebrais, bem como câncer, distúrbios metabólicos e cardiovasculares. (Comings, 1998; Hannan, 2010)

Como por exemplo, as variação alélicas do STR presente a ~1 Kb a montante do gene *PAX-6* comprova que o comprimento é um fator determinante na plasticidade e função cerebral (Okladnova, Syagailo *et al.*, 1998). Outras diversas doenças neurológicas, como a síndrome do X frágil, a doença de Huntington, Doença de Kennedy, várias formas de Ataxia e distrofia miotônica também estão associadas ao número de repetições de STRs trinucleotídeos (Lutz, 2007).

Variações no tamanho das repetições do tipo VNTRs também são associadas às características de um número complexo de doenças, como um VNTR encontrado aproximadamente 600 pb de distância do TSS do gene que codifica o fator de crescimento 2 semelhante a insulina - IGF2. O número de repetições deste pode definir o grau de diabetes do tipo I (Knight, 2005). Traços da personalidade como ansiedade pode estar ligada ao tamanho do alelo presente no promotor do gene transportador de serotonina humana (*5HTT*). Neste caso, o alelo menor confere uma redução na eficiência transicional (Gemayel, Vincas *et al.*, 2010).

STRs associados ao promotor podem levar a níveis de expressão diferenciados. Como evidenciados para o STR presente no promotor do gene *MECOM* que possui níveis de expressão diferenciada correlacionados com até 26

repetições. No gene *GABRA3*, o alelo de 25 repetições revelou níveis de expressão máxima do gene, enquanto que a atividade diminuiu com a expressão do alelo de 35 repetições (Gráfico 1). Já para o gene *SOX5* os diferentes níveis de expressão do gene é correlacionado com o tamanho da repetição GA associada ao seu promotor. (Heidari, Nariman Saleh Fam *et al.*, 2012).

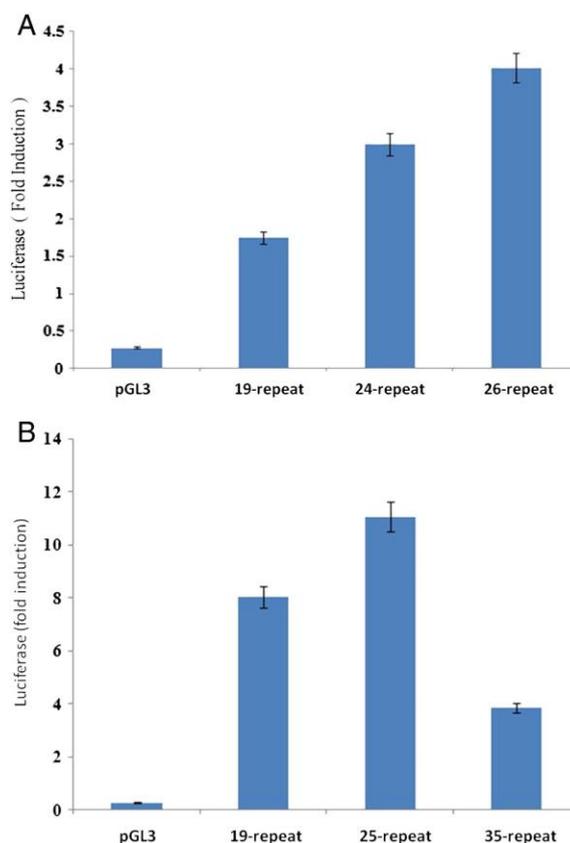


Gráfico 1. Nível de expressão relativa aos diferentes tamanhos de repetições. Em A é referente ao nível de expressão transcricional do gene *MECOM* no qual o nível de expressão foi influenciado pelo tamanho da repetição. Em B do gene *GABRA 3* também foi influenciado pelo tamanho da repetição.

O loco (GAAA)_n do marcador *RP2* está localizado à -582, -598, -630 dependendo de qual dos três possíveis sítios de início de transcrição se refere, assim trata se de um loco STR ao promotor (Bolton, Ross *et al.*, 2013). Como STRs associados a promotores podem influenciar na transcrição gênica é necessário analisar a influencia do loco (GAAA)_n para avaliar a neutralidade do marcador *RP2*. Uma vez que o loco (GAG)_n ensaio HUMARA esta associado a distúrbios devido ao número de repetições (Fratta, Collins *et al.*, 2014; Irvine, Yu *et al.*, 1995; Chu, Chang *et al.*, 2014).

2. HIPÓTESE

O polimorfismo do loco STR (GAAA)_n associado ao promotor do gene *RP2* está correlacionado com níveis diferenciados de expressão transcricional do gene *RP2*.

3. OBJETIVO

Investigar se o polimorfismo do loco STR (GAAA)_n promotor-associado está correlacionado com níveis diferenciados de expressão transcricional do gene *RP2* e adicionalmente investigar se os ensaios *RP2* e HUMARA referem as mesmas origens parentais dos cromossomos Xa e Xi.

3.1 Objetivos específicos

Genotipar mulheres geneticamente não correlacionadas para identificação das heterozigotas para o marcador STR *RP2*.

Determinar o estado de inativação do cromossomo X nas heterozigotas.

Correlacionar como o padrão de metilação ao redor da repetição (GAAA)_n localizada a montante do gene *RP2* se mantém em diferentes tecidos sanguíneo e epitelial, de mulheres saudáveis.

Demonstrar se os ensaios *RP2* e o HUMARA determinam a mesma origem parental no cromossomo X inativo.

Analisar o fator de correlação nessas amostras do perfil de inativação determinado pelo ensaio HUMARA e pelo *marcador RP2*.

Verificar se o número de repetições no promotor do gene *RP2* influencia o nível de expressão transcricional do gene *RP2*.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido a Comissão Regional de ética em seres humanos da Faculdade de Medicina de Campos. Todas as amostras foram coletadas de voluntários mediante assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. A coleta das amostras foi realizada no Laboratório da Biologia do Reconhecer (UENF).

4.2 Desenho de Iniciadores.

O par de iniciadores foram desenhados na região gênica do *RP2* usando programas livres e online: *OligoPerfect™ Designer* da *Invitrogen™* (<http://www.invitrogen.com/>) e o *OligoCalc - Oligonucleotide Properties Calculator* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>), e para avaliar a especificidade de cada par de iniciadores, foi utilizada a ferramenta online iPCR – UCSC (*in silico* PCR University of California Santa Cruz, USA).

4.3 Extração de DNA e RNA

As amostras de sangue e epitélio bucal coletadas foram submetidas ao método de extração do DNA genômico utilizando o kit *Illustra™ blood genomic Prep Mini Spin kit* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). A extração do RNA total foi realizada pelo método do *TRIZOL® Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a partir de linfócitos previamente isolados por meio de *Ficoll-Paque Plus™* GE Healthcare, Little Chalfont, UK) e conservados em *RNA later®* (Ambion). Após a extração, as amostras de DNA/RNA foram quantificadas em espectrofotômetro (NanoDrop2000).

4.4 Genotipagem do marcador *RP2*.

Para PCR quantitativa fluorescente (QF-PCR) do marcador *RP2* foram utilizados 10 pmol cada primer (*sense* e *antisense*), 20ng de DNA e PCR Mix (ddH₂O; 10x RT-Buffer; 100mM dNTP; 2.0 mM de MgCl₂; 0,25µL *AmpliTaq Gold DNA Polimerase* (Applied Biosystems) As condições da PCR foram 95 °C x 11 minutos etapa inicial 94 °C x 1 min; 59 °C x 1 min; 72 °C x 1 min (28 ciclos) e 60 °C x 60 min (1ciclo) no Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para a montagem da escala alélica foi realizada a PCR contendo um mix com os diferentes produtos de PCR . Este mix foi diluído mil vezes para não inibir a re-amplificação destes.

4.5 Digestão enzimática sensível à metilação associada à PCR quantitativa de fluorescência - DESM-QFPCR

A digestão foi realizada com 50ng de DNA com 2U da enzima de restrição sensível à metilação *HpaII* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 37°C por 4 horas. As amostras possuíam um tubo de simulação de digestão, na qual havia todos componentes da reação da digestão exceto a enzima. Na PCR quantitativa

fluorescente (QF-PCR) para o *marcador RP2* e o HUMARA foram utilizados o produto da digestão e da simulação, foi adicionada betaína na concentração final de 2M na PCR, para facilitar a separação das fitas de DNA na desnaturação aumentando assim o rendimento e a especificidade dos produtos da PCR (Frackman, Kobs *et al.*, 1998).

4.6 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 LIZTM (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 dos eletroferogramas foram analisados utilizando os programas GeneScanTM e GenotyperTM (Applied Biosystems).

4.7 Frequências alélicas para o marcador *RP2*.

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).

4.8 Quantificação das proporções de inativação

Para determinar o padrão de ICX das amostras utilizou-se a estatística empregada no trabalho de (Busque, Paquette *et al.*, 2009) utilizando as áreas de cada alelo. A fórmula gera como resultado a porcentagem de células com o alelo maior (B) ativo (**Figura 1**).

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

Figure 1. Fórmula utilizada para calcular a proporção de ICX entre os alelos. Na fórmula a letra 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, Paquette *et al.*, 2009)

4.9 Transcrição reversa

Foram utilizados aproximadamente 900 ng de RNA total o qual foi digerido com 1U de *DNase I* (Invitrogen), à 37°C por 15 min e inativada por adição de 1 ul de EDTA (25 mM) e incubados a 75 ° C durante 10 min num volume final de 10 ul . O RNA tratado com *DNase I*, foi transcrito de forma inversa para cDNA, utilizando as especificações do protocolo do fabricante *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*.

4.10 Reação de Cadeia de Polimerase – PCR

Logo após a transcrição reversa foi feito uma PCR para comprovação de que houve a completa conversão de RNA para cDNA. Como controle positivo, as amostras 2µL de cDNA aproximadamente 500ng por reação e os simuladores RNA tratado com *DNAase I* / 2µL. A PCR foi realizada em um volume final de 10µL [5,85µL ddH₂O; 1,0µL 10x RT-Buffer; 150mM de cada primer (*Sense* e *antisense*); 100mM dNTP; 1,5mM de MgCl₂; 0,05µL AmpliTaq Gold DNA Polimerase (Applied Biosystems); 2,0µL de cDNA]. As condições de ciclagem foram: 95°C x 10 min, 40 ciclos de 95°C x 30 seg, 60°C x 30 seg e 72°C x 30 seg, com extensão final de 72°C x 10 minutos.

4.11 Quantificação da expressão por PCR em Tempo Real.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o marcador fluorescente para DNA dupla fita, SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems). Para análise do nível de expressão de transcritos do gene *RP2* foi desenhado um par de primers onde o primer sentido está localizado em um éxon 1 e antissentido no éxon do gene *RP2* certificando que apenas o cDNA fosse amplificado com um produto de 119 pb. As condições da qPCR foram realizados em um volume final de 10 µL (5,0 µL PCR Mastermix; 2,7 µL água; 0,15 µL de primer). A ciclagem foi realizada da seguinte maneira: 95°C por 10 min, 50 ciclos de 95°C por 30 seg e 60°C por 1 min. Toda distribuição das amostras de cDNA (1:4) e as alíquotas de mix de qPCR foram realizadas utilizando um micropipetador eletrônico monocanal da marca Gilson. Para comparar os resultados de cada análise, os níveis relativos de *GAPDH* foram calculados em cada reação de qPCR. A reação foi

realizada em duplicata utilizando o controle *GAPDH* descrito na literatura (Winer, Jung *et al.*, 1999; Livak e Schmittgen, 2001; Barber, Harmer *et al.*, 2005; Yuan, Reed *et al.*, 2006)(**Tabela 1**). As porcentagens dos transcritos do cDNA de cada amostra foram calculadas segundo a fórmula $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Livak e Schmittgen, 2001), utilizando os valores do mix de cDNA para a calibração das amostras. Foram excluídas as amostras que possuíam um desvio no número ciclo no nível limiar de fluorescência baseado em log (Ct) das replicatas maiores que 0,5, ou seja, que o número de cópias de transcritos entre as replicatas ultrapassasse meio ciclo da PCR.

Tabela 1. Descrição dos primers utilizados para o ensaio Real-Time PCR.

Gene	Primer sense	Primer antissentido	Fragmento
<i>RP2</i>	CGAGGAGGAGCGGCCAAAGC	CTGCTACCGTCCCAGGTAAG	119 pb
<i>GAPDH</i>	AGATCCCTCCAAAATCAAGTG	GGCAGAGATGATGACCCTTT	130 pb

5. RESULTADOS

5.1 Extensão do polimorfismo do loco STR (GAAA)_n associado ao promotor *RP2*.

A fim de se obter mais dados populacionais do *marcador RP2* foram coletadas e genotipadas 71 amostras de mulheres saudáveis geneticamente não correlacionadas. Nessa população a heterozigose observada foi de 97%, distribuídos em 12 alelos diferentes (**Figura 2**), sendo os alelos 362, 365, 369 e 372 os mais frequentes, representando 70% dos perfis alélicos (**Tabela 2**).

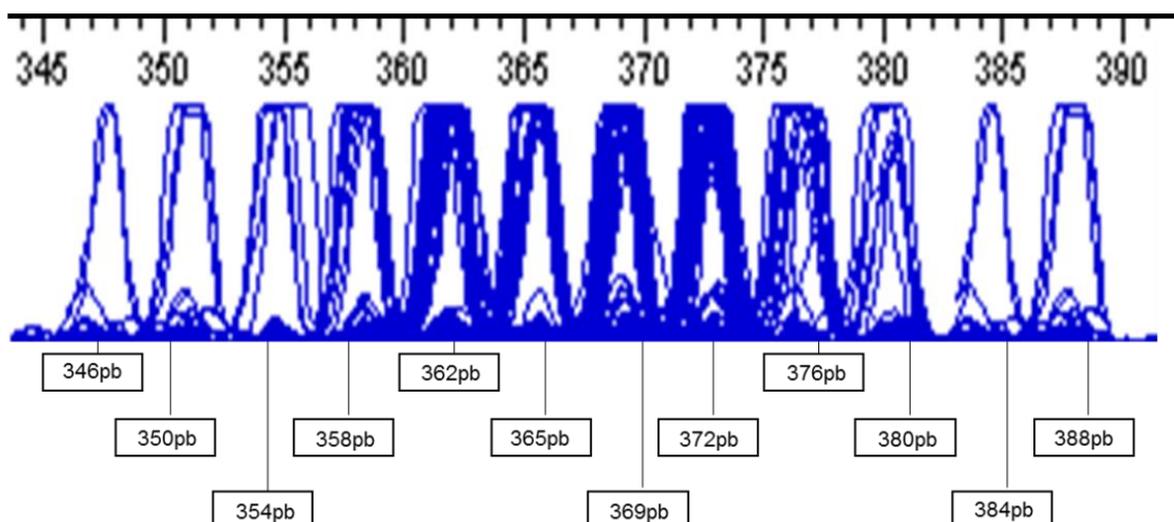


Figure 2. Perfis eletrofotográficos das 71 mulheres genotipadas. Os alelos 362, 365, 369 e 372 foram os mais frequentes representando 70% de todos os alelos. O nome de cada alelo é referente ao número de pares de bases (pb), que cada um apresenta.

Tabela 2. Dados populacionais do marcador *RP2* na população de estudo.

Frequência alélica		Triângulo da distribuição genotípica											
		346	350	354	358	362	365	369	372	376	380	384	388
0,014	346	0											
0,021	350	0	0										
0,028	354	0	0	0									
0,063	358	0	0	0	0								
0,162	362	0	0	2	3	0							
0,141	365	1	0	0	2	1	1						
0,183	369	1	0	0	3	3	7	0					
0,225	372	0	2	2	1	8	2	8	1				
0,092	376	0	1	0	0	3	4	3	2	0			
0,056	380	0	0	0	0	1	1	1	5	0	0		
0,007	384	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	
0,007	388	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Heterozigose	0,970												

5.2 Perfis de inativação do cromossomo X referidos pelo ensaio de metilação no polimorfismo do loco STR (GAAA)_n associado ao promotor *RP2*.

O padrão de inativação do cromossomo X foi analisado nas 69 heterozigotas a partir de DNA de células sanguíneas, onde 52% aleatória (**Figura 3**), 15% possuía inativação altamente preferencial (14:86-01:99) (**Figura 4**), 33% levemente preferencial (35:65-15:85) (**Figura 5**) e (**Gráfico 2**). Concomitantemente houve uma análise comparativa entre o padrão de inativação em células de um segundo tecido,

assim duas origens embrionárias mesoderme (células sanguíneas) e ectoderme (células do epitélio bucal) foram analisadas. Observou-se diferenças no padrão de inativação do cromossomo X quando comparamos um mesmo indivíduo para as duas origens embrionários (**Gráfico 3**). As amostras 1135, 1242, 1164 e a 1229 foram as que tiveram a menor diferenças entre os dois tecidos ~4%. Já a amostra 1155 nas células sanguíneas o alelo menor houve uma maior queda na amplificação ou seja estava menos metilado (ativo), já em células bucais o alelo maior foi o menos digerido estando mais ativo invertendo o padrão de inativação.

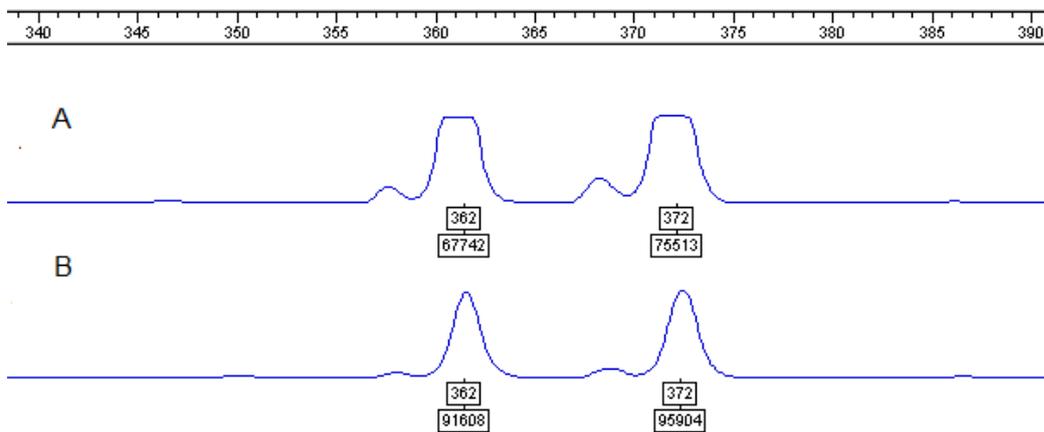


Figure 3. Eletroferograma de uma mulher com o padrão inativação do cromossomo X aleatória. Na figura A é a amostra 1128 não digerida e em B digerida com a enzima *Hpa*II, os números abaixo de cada alelo são referentes ao número de pares de base (nome do alelo) e a área do pico. O perfil eletroferográfico é um modelo clássico de inativação do cromossomo X aleatório.

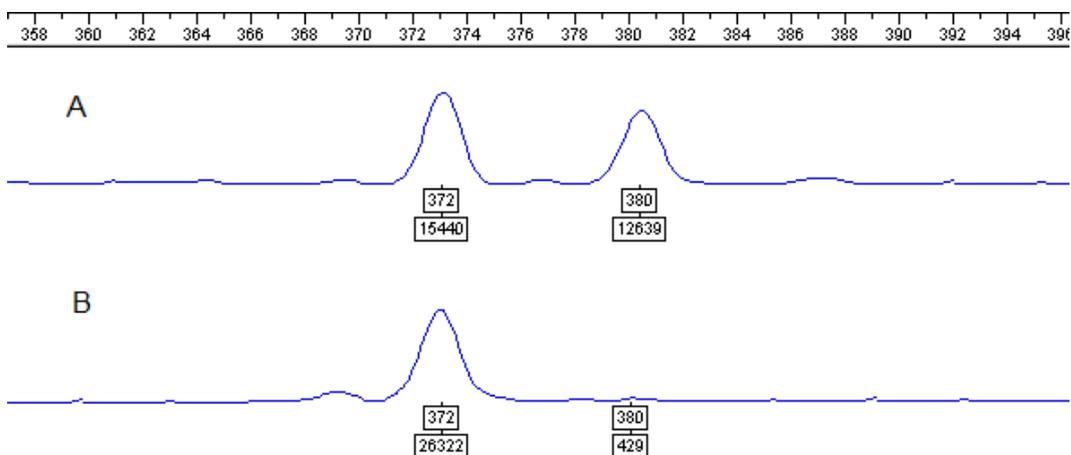


Figure 4. Eletroferograma de uma mulher com padrão de inativação do cromossomo X preferencial. Na figura A é a amostra 1150 não digerida e em B digerida com a enzima *Hpa*II, os números abaixo de cada alelo são referentes ao número de pares de base (nome do alelo) e a área do pico. O alelo 372 foi o que sofreu menos digestão, ou seja, está mais metilado estando 98% inativo. O alelo 380 sofreu digestão quase total, ou seja, não está metilado estando ativo.

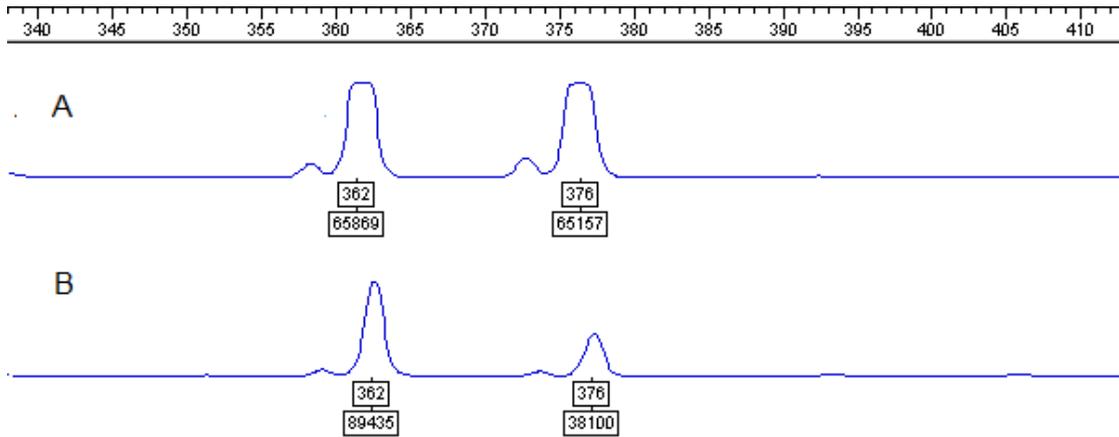


Figure 5. Eletroferograma de uma mulher com o padrão inativação do cromossomo X levemente preferencial. Na figura A é a amostra 1130 não digerida e em B digerida com a enzima *HpaII*, os números abaixo de cada alelo são referentes ao número de pares de base (nome do alelo) e a área do pico. O alelo 362 foi o que houve uma menor queda da amplificação do produto digerido, ou seja, está mais metilado estando 69% inativo. O alelo 376 houve uma queda maior na amplificação do produto digerido houve, sendo o alelo mais ativo.

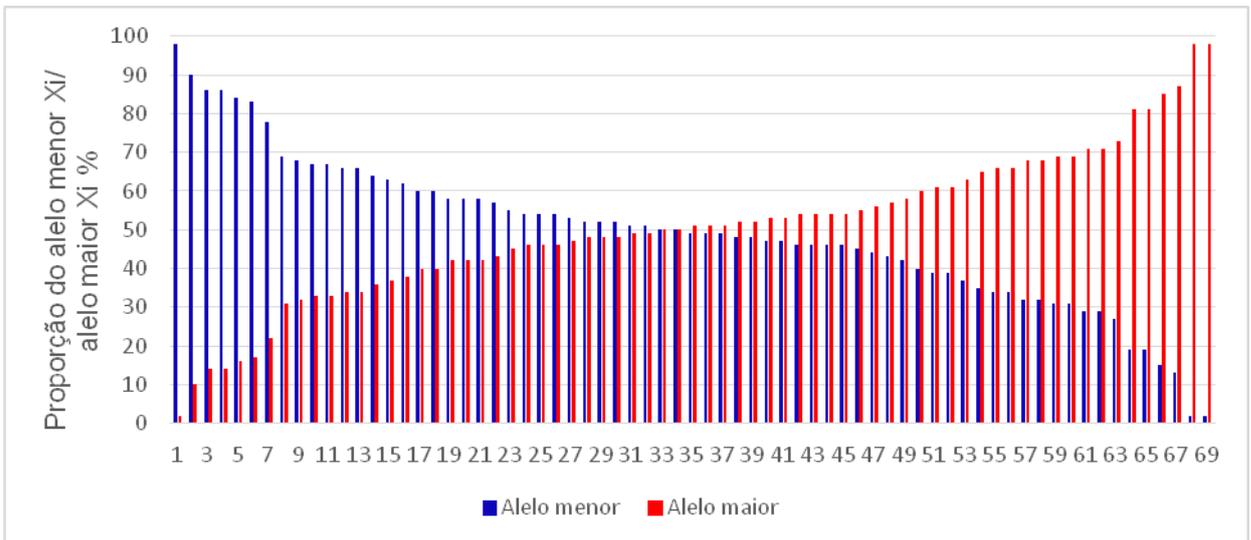


Gráfico 2. Proporção entre os alelos inativos em cada mulher. No gráfico as amostras foram colocadas em ordem crescente para porcentagem de células com o maior alelo inativo em vermelho e em azul a porcentagem de células inativas para o menor.

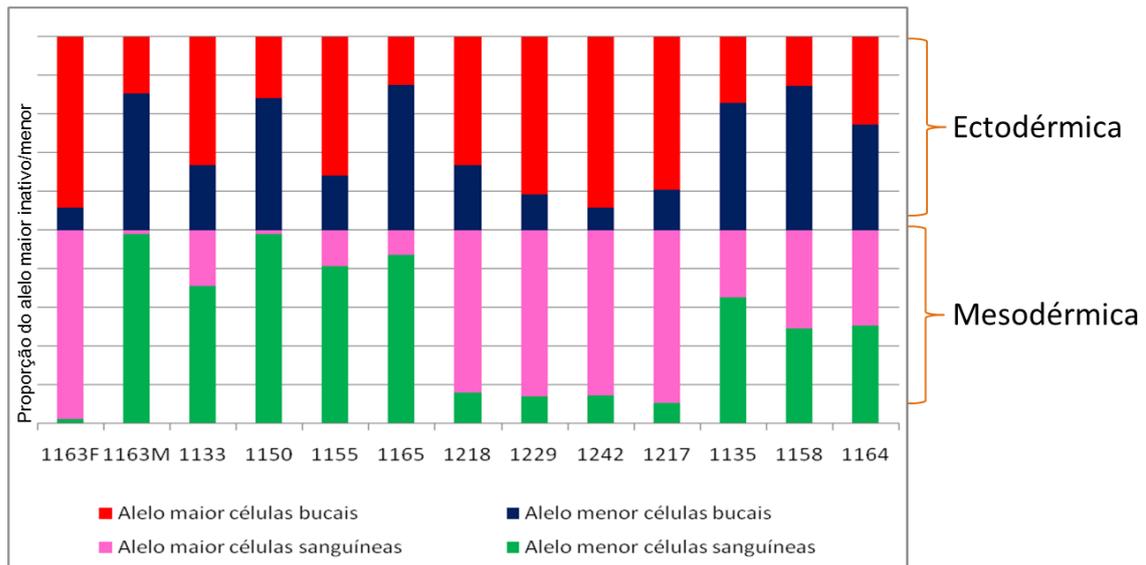


Gráfico 3. Comparação entre a razão dos alelos ativos e inativos nos dois tecidos de embrionária diferentes. As barras em rosa e verde são referentes ao padrão de ICX das células sanguíneas, as azuis e vermelhas ao padrão de ICX em células de epitélio bucal.

5.3 Os ensaios *RP2* e *HUMARA* referem à mesma origem parental dos cromossomos Xa e Xi

Para determinar se o cromossomo inativo e ativo identificado pelo loco do ensaio *RP2* eram os mesmos interrogados pelo loco do ensaio *HUMARA*, foi realizada uma análise de ligação quanto a origem parental para os dois ensaios para uma filha normal com inativação altamente preferencial (**Figura 6**). A análise da segregação demonstrou que o loco do ensaio *RP2* e o loco do ensaio *HUMARA* identificavam a mesma origem parental (materna) para o cromossomo X preferencialmente inativo .

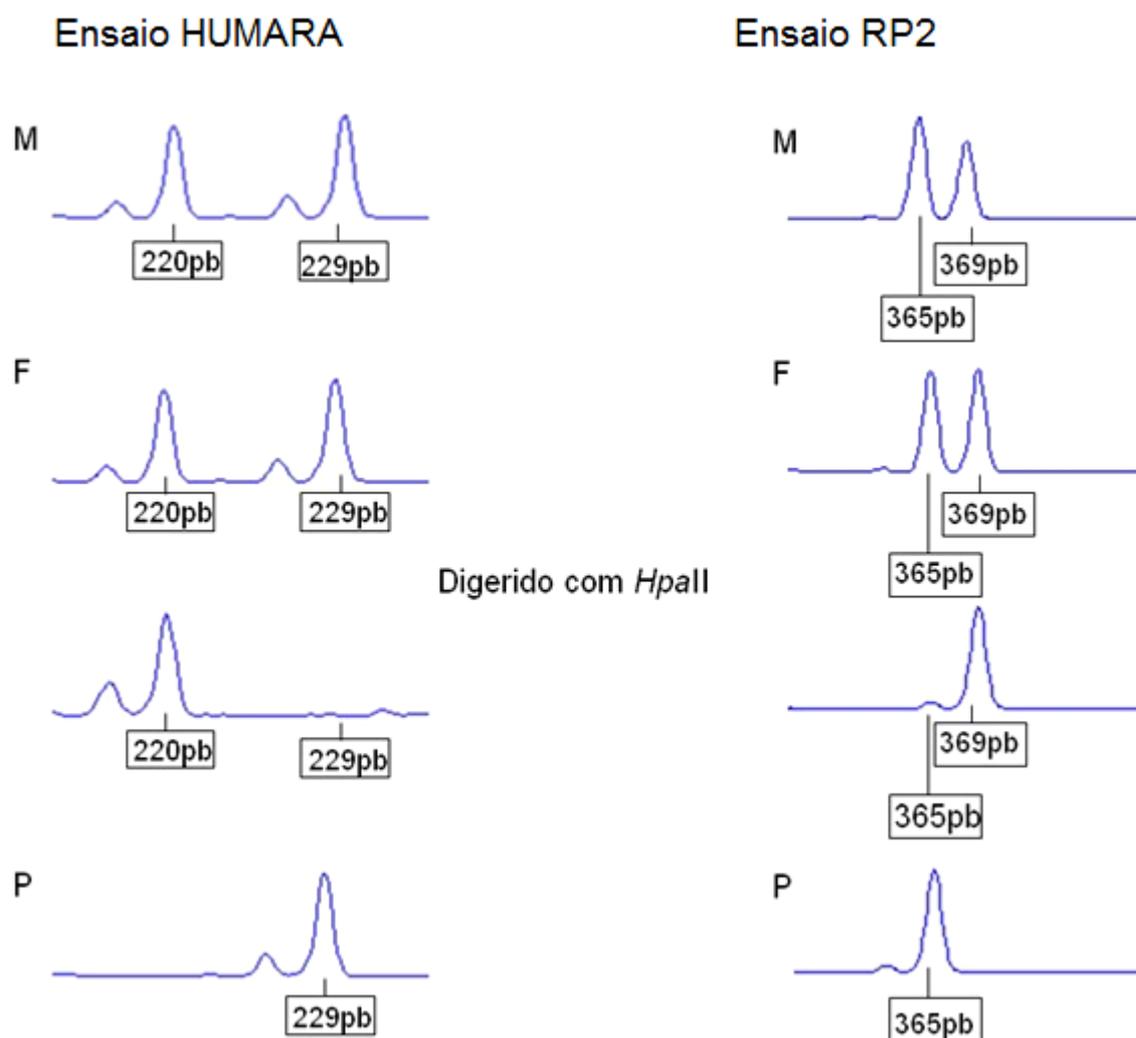


Figure 6. Eletroferograma de análise de segregação de um núcleo familiar com a filha com inativação do cromossomo X preferencial com os ensaios HUMARA e RP2. No gráfico P é referente ao pai, M a mãe e F a filha. Ambas as mulheres são heterozigotas para os dois ensaios e compartilham os mesmos alelos 220 e 229 para HUMARA e 365 e 369 para o RP2. O produto da digestão com a enzima *HpaII* foi amplificado para os dois marcadores, onde notamos os alelos de origem paterna houve uma maior queda na amplificação do produto digerido, enquanto o alelo de origem materna houve uma queda pequena na amplificação do produto digerido. Assim infere-se que o alelo de origem materna está preferencialmente inativo.

5.4. Correlação entre o estado de metilação interrogado pelos ensaios RP2 e HUMARA

Para o ensaio HUMARA também foram determinadas o padrão de metilação de 24 amostras, e foram correlacionadas com o padrão de metilação interrogado no loco do ensaio RP2. O coeficiente de correlação foi $r= 0,94$, obtido a partir das porcentagens dos alelos mais ativos e inativos para os dois locos (**Gráfico 4**). Esse resultado demonstra o estado de metilação interrogado nos sítios da enzima *HpaII* que nos dois ensaios demonstram o mesmo estado de ICX.

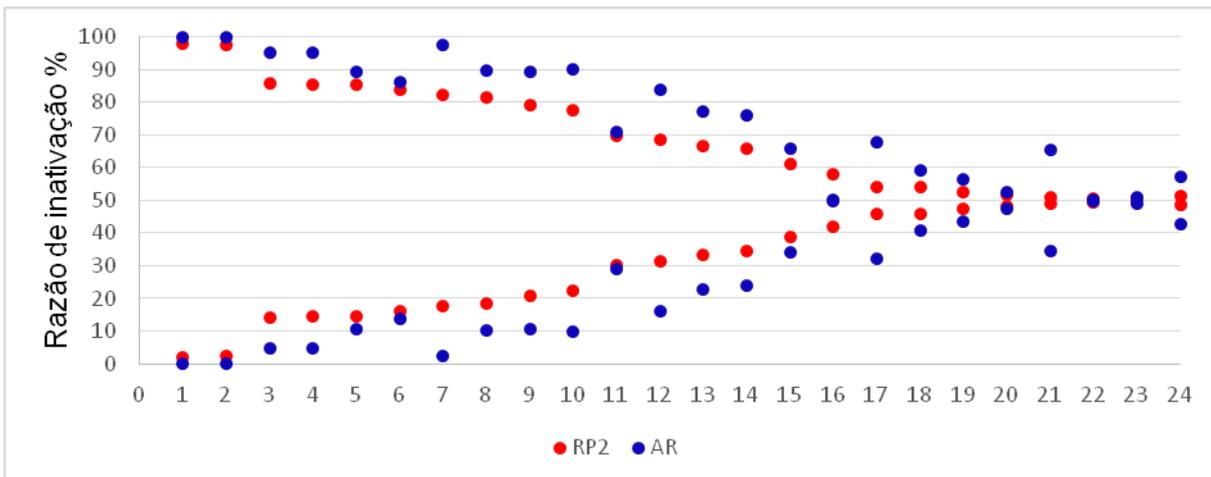


Gráfico 4. Dispersão da força de associação entre as porcentagens do alelo ativo pelo loco do marcador *RP2* e o do *HUMARA*. Os pontos representam a razão entre o cromossomo X ativo e inativo interrogados pelos ensaios *HUMARA* em azul e o marcador *RP2* em vermelho. A distância entre os pontos azuis e vermelhos para uma mesma amostra demonstra o quanto os padrões de ICX pelos dois ensaios se diferenciaram. Os ensaios são altamente concordantes ($0,94038p < 0,0001$).

5.5 Relação entre o polimorfismo do loco STR (GAAA)_n associado ao promotor e os níveis de expressão transcricional do gene *RP2*.

Para verificar se o STR com repetição GAAA associado ao promotor loco do ensaio *RP2* influencia os níveis de expressão transcricional deste gene foram genotipados homens, que são hemizigotas para o cromossomo X, para permitir determinar o nível de expressão de transcrição referente a cada alelo. Já que nas mulheres genotipadas neste estudo apenas duas eram homozigotas. A princípio foram genotipados 20 homens não correlacionados sendo identificados 9 alelos diferentes. Os quais também utilizados para a criação de um escala alélica com os alelos mais frequentes para o ensaio *RP2* (**Figura 7**). Para obter a escala alélica final foi necessário analisar amplificação de cada alelo e então adicionar a quantidade de produto da PCR de cada um conforme sua amplificação.

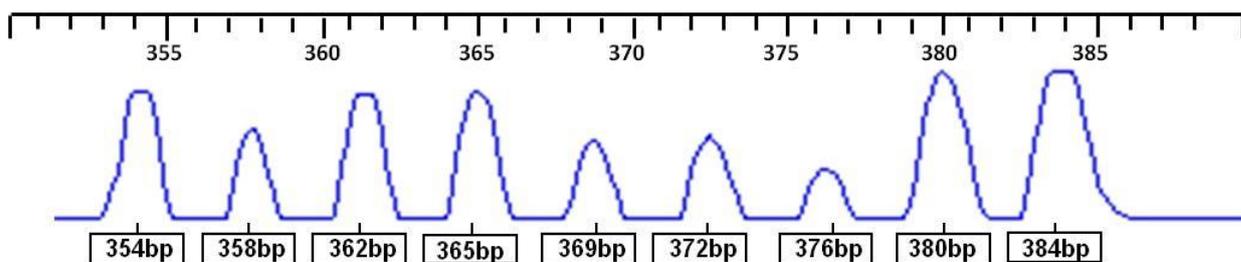


Figure 7. Escala alélica com os alelos encontrados nos homens genotipados. A escala alélica foi montada com os produtos da PCR dos diferentes alelos encontrado nos homens genotipados.

Para verificar se os diferentes números de repetições da STR (GAAA)_n, ou seja os diferentes alelos do STR do loco do ensaio *RP2* influenciam na expressão do gene *RP2* foi desenvolvido um ensaio da PCR em tempo real para quantificar a expressão de indivíduos com diferentes alelos. Os cDNAs dos indivíduos com os alelos diferentes foram amplificados pela PCR com primers para o gene *GAPDH* primeiramente, para certificar que o RNA não estava contaminado com DNA genômico. Utilizou-se RNA não transformado em cDNA referente as amostras como controle negativo (**Figura 8**). Os primers para o gene *GAPDH* amplificam também os pseudogenes que não são transcritos, assim quando as amostras de cDNA estiverem contaminadas com DNA teríamos duas bandas uma a aproximadamente 130pb e outra a aproximadamente 200pb. A maior banda seria a amplificação desses pseudogenes, foram excluídas as amostras de cDNA em que havia contaminação com DNA. Só foram utilizadas as amostras para os ensaios PCR em tempo real em que o controle negativo não amplificou.

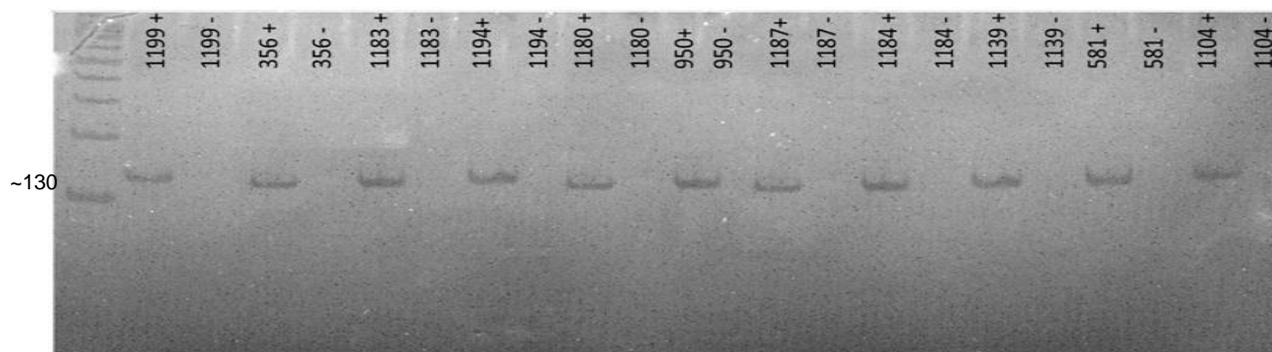


Figure 8. Gel da amplificação do cDNA das amostras. A eletroforese em gel de poliacrilamida da PCR com amostras de cDNA (+) e o RNA tratado com *DNase I* como controle (-) mostram a pureza da amostras. As amostras analisadas possuíam o fragmento de 130 pares de base em cDNA mostrando que se houvesse amplificação do negativo seriam observados duas bandas uma 130pb cDNA e ~200pb dos pseudogenes do *GAPDH*.

No primeiro ensaio de expressão por tempo real foram utilizadas 9 amostras relativa aos homens com diferentes alelos para o ensaio *RP2*. Das 9 amostras analisadas duas foram excluídas das análises por apresentarem um desvio entre as replicatas superior a 0,5 evitando os falsos resultados. O nível de expressão de transcritos do *RP2* relativos ao *GAPDH*/normalizador e o mix de cDNAs/calibrador foram calculados por $2^{\Delta\Delta Ct}$, onde os indivíduos para os alelos 362, 369, 372, 384 obtiveram aproximadamente 1 de expressão relativa, os indivíduos com os alelos 365, 380 obtiveram aproximadamente 0,7 e o indivíduo para o alelo 376

aproximadamente 1,4 (**Gráfico 5**). Como havia quatro diferentes alelos que não variavam muito entre si, não foi possível determinar se a diferença observada entre o alelo 376 e os demais era devido à influência do seu número de repetições ou se era uma variação do indivíduo. Já que não havia diferenças significativas entre os indivíduos para os quatro alelos (362, 369, 372, 384), levando a acreditar que não teria influência do tamanho da repetição, ou seja, dos diferentes alelos e sim que poderia ser uma característica intrínseca do indivíduo.

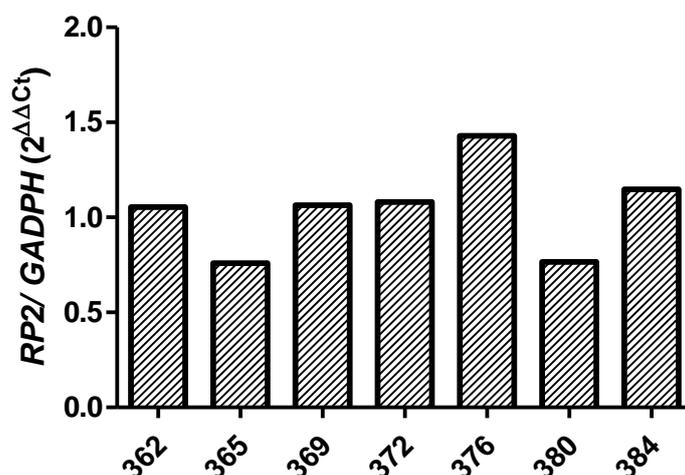


Gráfico 5. Nível de expressão relativa para indivíduos com diferentes alelos encontrados para o marcador *RP2*. Os números representam os alelos dos indivíduos analisados e as barras são referentes ao nível de expressão observada para o gene *RP2* em relação ao *GADPH*. A amostra para o alelo 376 foi a que obteve um maior nível de expressão em relação aos demais alelos.

Para verificar se o desvio entre as amostras para diferentes alelos era referente ao indivíduo ou ao alelo foram coletados e genotipados mais amostras de homens. Assim pode-se analisar diferentes indivíduos com o mesmo alelo. Para o alelo 376 dois indivíduos tiveram seus níveis de expressão relativa para o gene *RP2* analisado, sendo observado um desvio padrão entre as amostras de 0,15 não havendo uma diferença significativa entre elas (**Gráfico 6**). Para o alelo mais frequente, o 372, foram analisados cinco diferentes indivíduos. A amostra 1372 foi a que teve a maior expressão entre as demais amostras (**Gráfico 7**), as quais possuem faixa etária diferente (**Tabela 3**). O indivíduo 950 tem um desvio de 2,9 em comparação ao nível de expressão do indivíduo 1372, ou seja, tem mais 0,4 vezes menos expressão que 1372. No entanto, o maior desvio observado foi 3,2 entre os indivíduos 1180 e 1194 para o alelo 369 (**Gráfico 8**), onde indivíduo 1194 teve o nível de expressão relativa dentro da média observada para os demais alelos.

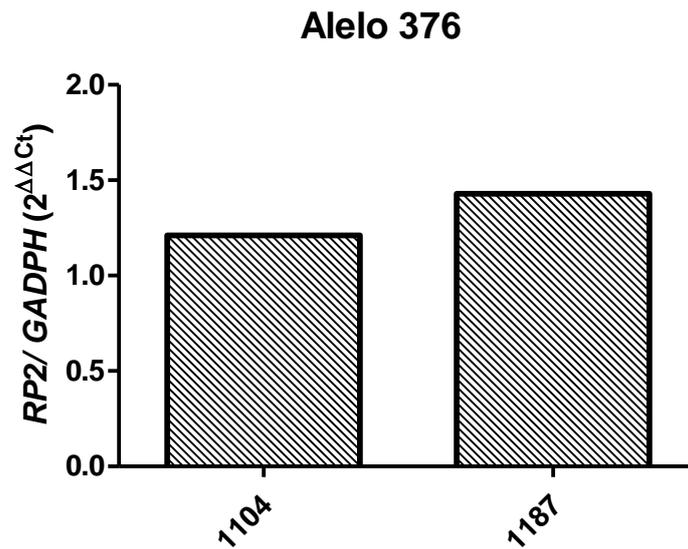


Gráfico 6. Nível de expressão relativa para o mRNA do gene *RP2* para os dois indivíduos com alelo 376. As amostras 1104 e 1187 tiveram o nível de expressão para o gene *RP2* próximos, tendo um desvio entre elas de apenas 0,15.

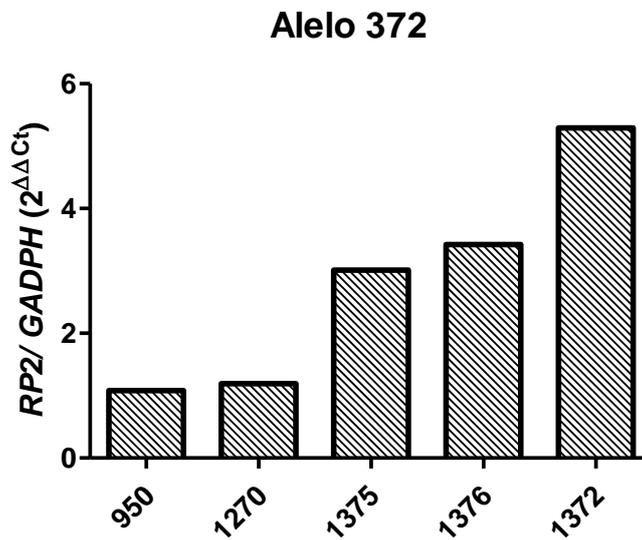


Gráfico 7. Nível de expressão relativa para o mRNA do gene *RP2* para os cinco indivíduos com alelo 372. Os números referentes aos códigos das amostras dos indivíduos analisados. Houve diferentes perfis de expressão para o gene *RP2* nos indivíduos portadores do alelo 372.

Tabela 3. Idades dos homens doadores de amostras para os ensaios da PCR em tempo real.

Amostra	Idade (anos)
356	29
950	52
1104	23
1180	26
1185	24
1183	30
1184	24
1187	33
1194	28
1199	28
1270	20
1372	45
1374	32
1376	23

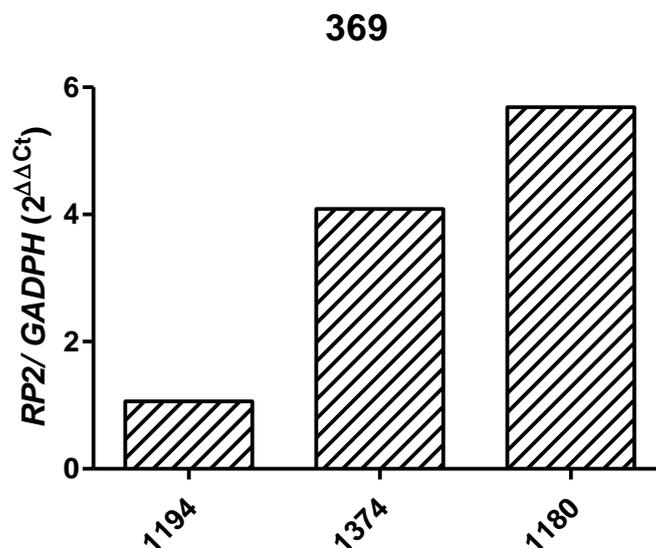


Gráfico 8. Nível de expressão relativa para o mRNA do gene *RP2* para os três indivíduos com alelo 369. Foram quantificados os níveis de expressão do gene *RP2* em três diferentes indivíduos com o alelo 369. O indivíduo 1180 expressa ~4 vezes a mais que o 1194 e ~1 vez mais que o indivíduo 1374.

Devido a variação no nível de expressão relativa dentro de um mesmo alelo ser muito discrepante entre os indivíduos estudados, foram analisados os níveis de expressão relativa um mesmo indivíduo em diferentes tempos (1^o coleta em maio de 2013 e 2^o coleta em novembro de 2013) para verificar se o nível de expressão para o mRNA do gene *RP2* eram constantes ou se variavam em um mesmo indivíduo dependendo da época da coleta de material. O resultado dessa comparação levou a desvios 0,12 a 0,34, mostrando que para esses indivíduos o nível de expressão aumentou com o tempo (**Gráfico 9**). Esse fato leva a crer que diferenças entre os níveis de expressão relativa dos diferentes alelos analisados que estiverem um desvio menor ou igual a 0,34 não poderia ser considerada como diferença do alelo e sim variação do indivíduo .

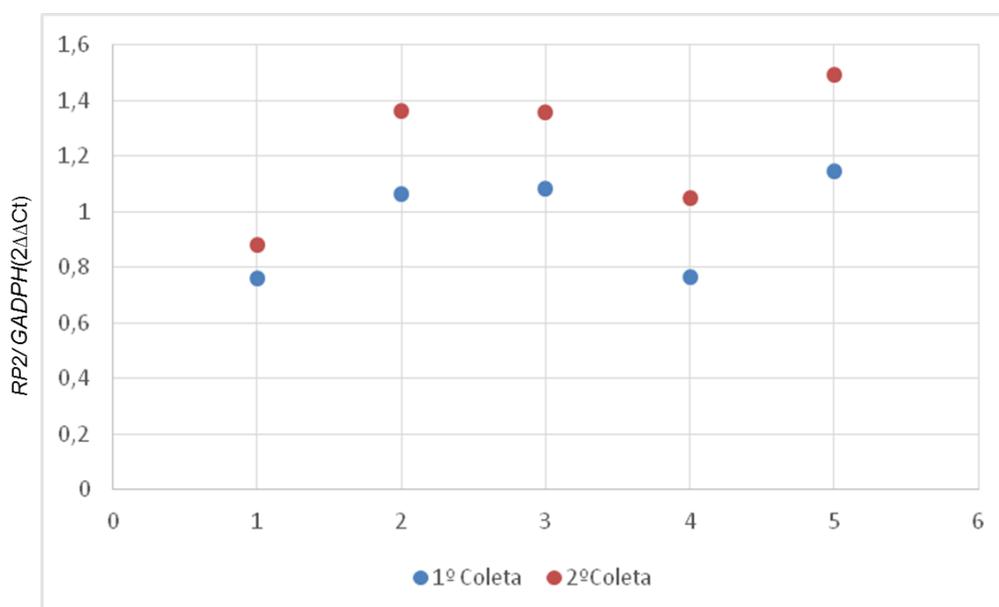


Gráfico 9. Comparação entre os níveis de expressão em diferentes tempos de coleta em um mesmo indivíduo. Os pontos nos gráficos são referentes as amostras dos indivíduos 1183, 1194, 950,1199 e 1184 respectivamente, quais foram analisadas para dois tempos de coleta. Na primeira coleta realizada em maio foi observada uma menor expressão para todos os indivíduos do que para segunda coleta em novembro.

Concomitantemente, foram analisados os níveis de expressão relativa de mRNA para o gene *RP2* em mulheres heterozigotas com os três tipos de padrão de inativação do cromossomo X sendo três para cada padrão de ICX(**Gráfico 10**). Para observar o comportamento do nível de expressão do gene *RP2* em mulheres, já que possuem dois diferentes alelos e diferentes padrões da ICX (**Tabela 4**). Nessa análise foi observada uma menor expressão para as amostras com padrão de ICX preferencial em relação ao padrão aleatório aproximadamente 0,5 e

aproximadamente 0,2 em relação as mulheres com padrão levemente preferencial. Os desvios entre as amostras de cada padrão aproximadamente 0,1 a 0,5, sendo o maior desvio observado no grupo de padrão aleatório o que demonstra que entre esses indivíduos houve níveis de expressão mais variados tendo expressão semelhante as observadas no grupo preferencial (**Gráfico 10**).

Embora o pequeno número de amostras analisadas, realizamos o teste T para verificar se as diferenças observadas eram significativas já que tínhamos um gráfico tendencioso. Ao compararmos os perfis aleatório e levemente preferencial $P=0,5157$ (-0,9674 – 1,635), perfil aleatório com preferencial $P=0,1630$ (-0,4134 – 1,734) e levemente preferencial $P=0,3780$ (-0,5881 – 1,241) não havendo resultado significativo ($p>0,05$).

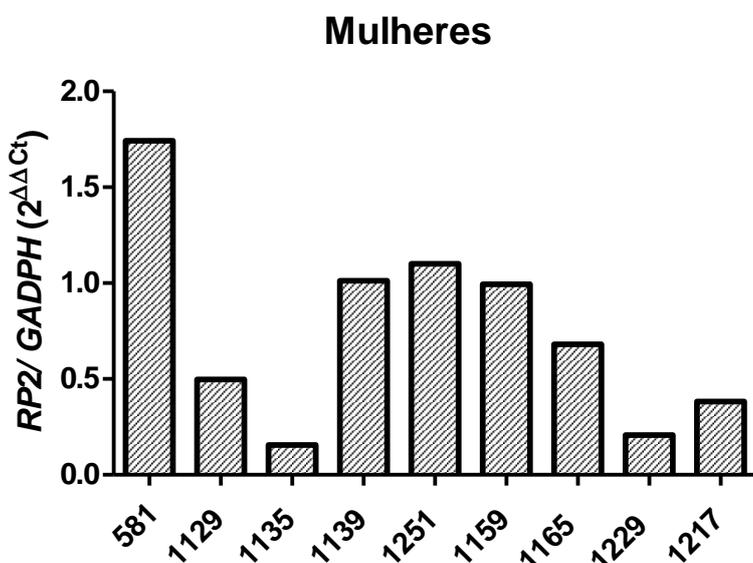


Gráfico 10. Nível de expressão das diferentes mulheres analisadas. As mulheres 1139, 1251 e 1159 tiveram o nível de expressão similares embora fossem de perfil de ICX diferentes.

Tabela 4. Dados do padrão de inativação do cromossomo X das mulheres utilizadas neste estudo.

Amostra	Alelo 1	Alelo 2	Razão de inativação (%)	Padrão de ICX
581	372	376	47:53	Aleatório
1129	354	362	44:56	Aleatório
1139	365	369	46:54	Aleatório
1135	369	372	35:65	Levemente preferencial
1251	358	369	78:22	Levemente preferencial
1159	362	380	32:68	Levemente preferencial
1165	365	369	13:87	Preferencial
1229	365	376	82:18	Preferencial
1217	354	365	90:10	Preferencial

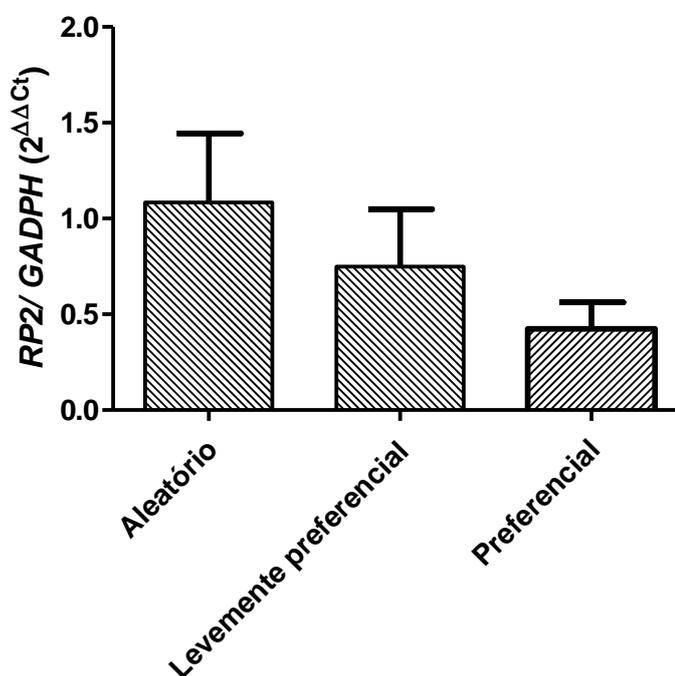


Gráfico 10. Nível de expressão de mRNA *RP2* em mulheres com diferentes padrões de inativação do cromossomo X. Perfil aleatório (Amostras 581, 1129 e 1135); levemente preferencial (1139, 1251e 1159) e preferencial (1165, 1229 e 1217).

Comparando os níveis de expressão relativa das mulheres com as dos homens foi possível notar que a delas era mais baixa que a média observada para os homens é $2,29(2^{\Delta\Delta C_t})$. No entanto não se pode dizer que nos homens há expressão maior que as mulheres, pois houveram homens que possuíam níveis

semelhantes aos observado nas mulheres, além disso o número de indivíduos é pequeno.

Adicionalmente, especulamos o comportamento dos níveis de expressão para as amostras com os diferentes alelos, exceto 372 se fossem inferidos através da média dos ΔCt dos 5 indivíduos com o alelo 372. Os padrões dos níveis de expressão se mantiveram de forma geral para as amostras, porém com um menor nível de expressão relativa quando comparadas com os níveis de expressão observados utilizando o mix como calibrador (**Gráfico 11**). Este efeito se deve aos altos níveis de expressão relativa observada para os indivíduos com alelo 372.

O loco (GAAA)_n associado ao promotor do gene *RP2* é neutro no sentido de não influenciar no nível de expressão de transcrição em relação aos diferentes alelos. Já que não há uma relação clara dos níveis de transcritos e os diferentes alelos.

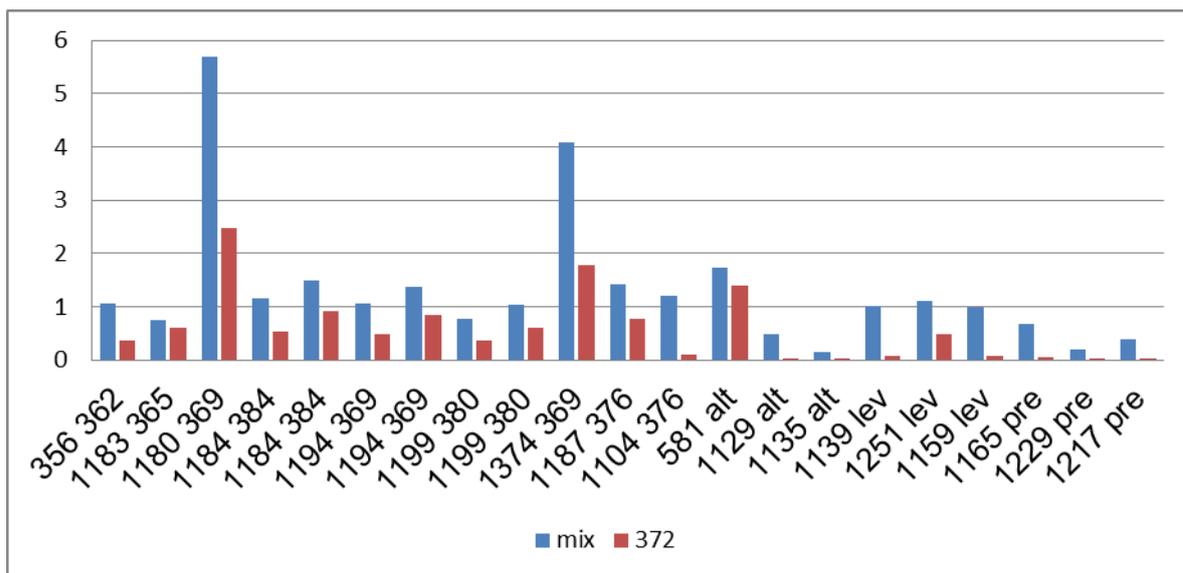


Gráfico 11. Comparação dos perfis do nível de expressão relativa de todas as amostras com os dois diferentes calibradores. As barras em azul são referente aos níveis de expressão do gene *RP2* nas amostras tendo como calibrador o mix feito com os diferentes cDNAs e as barras em vinho são referentes aos níveis de expressão das amostras tendo calibrador a média dos Δ Cts para os indivíduos com alelo 372. Note que houve um mesmo padrão de expressão das amostras com os dois calibradores e que utilizado a média dos Δ Cts do alelo 372 haviam uma menor expressão.

6. DISCUSSÃO

6.1 Extensão do polimorfismo do loco STR (GAAA)_n associado ao promotor *RP2* e os níveis de expressão transcricional do gene *RP2*.

A determinação do padrão de inativação do cromossomo X é clinicamente importante para as avaliações do estado portador de doenças ligadas ao cromossomo X, a clonalidade em tumores e a variação genética presente em genes ligados ao cromossomo X (Jones, 2014). Há mais de duas décadas de descrição do ensaio HUMARA por Allen e colaboradores, este continua sendo o método mais utilizado na determinação do padrão de ICX (Mossner, Nolte *et al.*, 2013; Jones, 2014)

Embora se saiba que este ensaio não é informativo em todos os casos (Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011) e que os diferentes números de repetições CAG deste está associado a distúrbios como a doença de Kennedy (Fratta, Collins *et al.*, 2014) e câncer de próstata (Chu, Chang *et al.*, 2014). Em 2011, três novos locos *ZDHHC15*, *SLITRK4*, *PCSK1N* foram propostos por Bertelsen e colaboradores. No entanto, tiveram dificuldade na determinação das proporções de metilação interrogado pelos três novos locos por apresentarem alelos separados por uma única repetição tendo interferência do *stutter* do alelo maior (Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011).

O presente trabalho utilizou o ensaio *RP2* para ampliar o conhecimento e esclarecer questões que ainda não haviam sido elucidadas sobre este marcador. Nas amostras genotipadas neste trabalho com o marcador *RP2* foi observado 0,97 de heterozigose, sendo superior a todos os outros ensaios de determinação indireta do estado de metilação do cromossomo X descritos anteriormente. A alta heterozigose do marcador *RP2* já foi relatada em outros trabalhos, sendo a heterozigose observada de 0,84 (Faria, 2013). Além disso, por se tratar de STR tetranucleotídeo facilitou a designação alélica já que a formação de *stutter* é baixa (Machado, Alves Da Silva *et al.*, 2011) quando comparados com os marcadores dinucleotídicos.

Na determinação do padrão de inativação do cromossomo X interrogado pelo ensaio *RP2* em células sanguíneas foi observado 0,52 dos alelos com perfil aleatório, 0,33 com perfil levemente preferencial e 0,15 com perfil altamente preferencial, havendo diferenças entre a distribuição dos perfis encontrados por

Faria em 2013 (0,75 perfil de ICX aleatório, 0,20 levemente preferencial e 0,5 preferencial).

O perfil de ICX preferencial observado foi 5% maior do que o descrito na literatura para mulheres normais (Sharp, Robinson *et al.*, 2000; Kristiansen, Knudsen *et al.*, 2005; Orstavik, 2009; Bertelsen, Tumer *et al.*, 2011). Este aumento poderia ser esperado se a população em estudo fosse composta por mulheres idosas, mas não é o caso já que se trata de mulheres jovens 20-40 (Knudsen, Neilson *et al.*, 2006).

Comparando os resultados obtidos para padrão ICX com o ensaio *RP2* em células do epitélio bucal (ectoderme) e as células sanguíneas (mesoderme) foi possível observar que nem sempre as porcentagens de inativação para cada alelo se mantinha. Além disso, foi observada a troca do alelo mais ativo entre os dois tecidos de origem embrionária distinta, como a amostra 1155. Isso ocorreu, pois células de tecidos de origens embrionárias distintas podem apresentar o cromossomo materno ou paterno preferencialmente ativo (Lyon, 1962; Cotton, Lam *et al.*, 2011). Inagaki e colaboradores relatam que o máximo de diferença observada por eles na comparação do estado de metilação em tecidos de origens embrionárias diferentes foi de 95%. (Inagaki, Wakita *et al.*, 2001).

6.2 Os ensaios *RP2* e HUMARA referem à mesma origem parental dos cromossomos Xa e Xi e a correlação entre o estado de metilação interrogado pelos ensaios *RP2* e HUMARA é alta.

Foi demonstrado que o ensaio *RP2* identifica a mesma origem parental do cromossomo X inativo em uma filha com ICX preferencial que o ensaio HUMARA (**Figura 6**). E que o coeficiente de relação entre o padrão de ICX vista pelo ensaio *RP2* e do ensaio HUMARA é de $r = 0,94$. Demonstrando que o ensaio *RP2* poderia substituir o ensaio HUMARA sem haver perda da eficiência em diferentes populações. Além disso, não haveria a problemática de ser um loco associado com doenças como loco do ensaio HUMARA (Chu, Chang *et al.*, 2014; Fratta, Collins *et al.*, 2014). Se estes ensaios fossem utilizados em conjunto teríamos uma alta informatividade.

6.3 Não há uma relação entre o polimorfismo do loco STR (GAAA)_n associado ao promotor e os níveis de expressão transcricional do gene *RP2*.

O marcador *RP2* está localizado a aproximadamente -582, -598 ou a -630 pb dependendo de qual dos três sítio de início de transcrição (TSS) se refere. Em 2013, a localização do STR do marcador *RP2* também foi identificada por Bolton e colaboradores estando a -575 do TSS, sendo considerado um STR em região regulatório, entretanto não especificam qual dos três possíveis TSS se refere (Bolton, Ross *et al.*, 2013). Assim pode ser dito como STR associado ao promotor ou do inglês “*core promoter*” (Darvish, Nabi *et al.*, 2011; Ohadi, Mohammadparast *et al.*, 2012; Valipour, Kowsari *et al.*, 2013), sendo um adicional para a variação inter-individual na expressão (Heidari, Nariman Saleh Fam *et al.*, 2012).

No primeiro ensaio para analisar o nível de expressão do gene *RP2* realizado havia uma pequena diferença entre seis dos sete alelos analisados. No entanto o alelo 376 apresentou 40% a mais de expressão relativa, levando a duas hipóteses a considerar: primeira, o maior nível de expressão do indivíduo para o alelo 376 poderia ser devido a uma influencia das variantes alélicas influenciando a expressão do gene *RP2*, e segunda, o maior nível de expressão do indivíduo para o alelo 376 poderia ser uma diferença do nível de expressão de cada indivíduo.

Para validar uma das duas hipóteses para a diferença no nível de expressão de indivíduo para o alelo 376 foram analisados mais indivíduos para os alelos com maior frequência na população e assim comparados entre si, sendo observados diferentes níveis de expressões. Isso mostrou que mesmo para um alelo poderia haver diferentes níveis de expressão. Um estudo comparativo entre a expressão três indivíduos mostrou que as diferenças globais entre eles eram tão grandes quanto as diferenças entre os seres humanos e os chimpanzés (Enard, Khaitovich *et al.*, 2002; Brawand, Soumillon *et al.*, 2011), o que corrobora com a segunda hipótese.

A análise comparativa dos indivíduos portadores do alelo 372 indicou que o indivíduo 1372 exibiu um nível maior de expressão. Esse maior nível de expressão poderia ser devido a idade de o indivíduo ser superior as idades dos indivíduos 1270, 1375 e 1376. Estudo recente que incluiu análise de 11000 genes revelou uma mudança significativa na expressão relacionada com a idade (cerca de 1,5 vezes ou mais) em indivíduos com idade mais 40 anos (Glass, Vinuela *et al.*, 2013). No

entanto, no presente estudo o indivíduo 950 de mesma faixa etária teve o nível de expressão mais baixo entre todos os analisados demonstrando assim que não poderia ser influencia de idade.

A hipótese que as variantes alélicas influenciam a expressão do gene *RP2* não foi validada, pois foi constatado que a expressão transcricional do gene *RP2* em indivíduos portadores do mesmo alelo variava consideravelmente. Também não foi observada associação clara entre o tamanho do alelo e o nível de expressão do gene *RP2*. Embora os níveis de expressão para amostras coletadas em diferentes meses variaram, atenta-se ao fato que para todas as amostras esses níveis foram consistentemente maiores. Neste último sentido, Buckland e colaboradores (2004) notaram que a variação na expressão gênica é comum e deve ser vista como diferenças nos níveis de expressão entre indivíduos (Buckland, 2004).

Adicionalmente estudamos nove mulheres; três para cada tipo de padrão de ICX. Foi observada uma diminuição, porém não significativa ($p > 0,05$), no nível de expressão das mulheres com perfil preferencial e levemente preferencial em relação às com perfil aleatório quando as amostras de um mesmo perfil de ICX foram analisadas juntas. Contudo, dentro do próprio grupo das mulheres com ICX com perfil aleatório houve diferenças entre os níveis de expressão do gene *RP2* tendo mulheres expressando igual àquelas com perfil ICX preferencial. Com os resultados deste ensaio não pode se dizer que a diferença entre os padrões de inativação influenciam no nível de expressão do gene *RP2*, pois analisamos somente três mulheres para cada perfil de ICX. Além disso, houve diferenças no nível de expressão entre as mulheres de um mesmo perfil de ICX, essas diferenças poderiam ser vistos como diferença entre os indivíduos (Buckland, 2004).

Ainda na hipótese que os alelos *RP2* influenciam o nível de expressão do gene *RP2* cabe considerar que sendo o alelo 372 o mais frequente na população estudada, os níveis de expressão do gene *RP2* em portadores deste alelo sejam os prevalentes da população. Assim sendo, os níveis de expressão observados dos 5 portadores do alelo 372 foram utilizados para calibrar as demais amostras através da média dos ΔCt destes.

Nesse exercício foi observada uma diminuição geral no nível de expressão para todos os demais alelos quando comparada com o mix como calibrador. Essa diminuição no nível de expressão dos alelos ocorreu pois o mix possuía um valor

menor que a média dos ΔCt do alelo 372. O padrão no nível de expressão das variantes alélicas se mantiveram como pode ser observado no gráfico 10. Não foi observado nenhum efeito biológico quanto o tamanho do alelo, ou seja, não houve relação entre os níveis de expressão dos alelos menores nem dos maiores que o alelo 372.

Embora as análises tenham sido feitas com apenas 13 homens e 9 mulheres os resultados são um indicativo que os variados níveis de expressão do gene *RP2* estariam correlacionadas com as diferenças entre os indivíduos e não com o número de repetições do STR (GAAA)_n, sendo assim o STR associado ao promotor do gene *RP2* considerado neutro.

8. CONCLUSÃO

O polimorfismo do loco STR (GAAA)_n associado ao promotor não está correlacionado com níveis diferenciados de expressão transcricional do gene *RP2*. O estudo permite inferir que esse polimorfismo STR é neutro.

O ensaio *RP2* refere à mesma origem parental dos cromossomos X inativos ou ativo estabelecida pelo o ensaio HUMARA.

Na amostra populacional estudada as proporções de inativação aleatória, levemente preferencial e preferencial dos cromossomos X foram diferentes do que já foi previamente relatado em amostra populacional correlacionada.

9. REFERÊNCIAS

Allen, R. C., H. Y. Zoghbi, *et al.* Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. Am J Hum Genet, v.51, n.6, Dec, p.1229-39. 1992.

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

Barber, R. D., D. W. Harmer, *et al.* GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol Genomics, v.21, n.3, May 11, p.389-95. 2005.

Barr, M. L. e E. G. Bertram. 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.

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

Bayliss, C. D. e M. E. Palmer. Evolution of simple sequence repeat-mediated phase variation in bacterial genomes. Ann N Y Acad Sci, v.1267, Sep, p.39-44. 2012.

Bell, J. T., A. A. Pai, *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.

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

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

Beutler, E., M. Yeh, *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.

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

Bolton, K. A., J. P. Ross, *et al.* STaRRRT: a table of short tandem repeats in regulatory regions of the human genome. BMC Genomics, v.14, p.795. 2013.

Brawand, D., M. Soumillon, *et al.* The evolution of gene expression levels in mammalian organs. Nature, v.478, n.7369, Oct 20, p.343-8. 2011.

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

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

Buckland, P. R. Allele-specific gene expression differences in humans. Hum Mol Genet, v.13 Spec No 2, Oct 1, p.R255-60. 2004.

Busque, L. e D. G. Gilliland. X-inactivation analysis in the 1990s: promise and potential problems. Leukemia, v.12, n.2, Feb, p.128-35. 1998.

Busque, L., Y. Paquette, *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.

Cargill, M., D. Altshuler, *et al.* Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nat Genet, v.22, n.3, Jul, p.231-8. 1999.

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

Chapple, J. P., A. J. Hardcastle, *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.

Chu, M., Y. Chang, *et al.* Androgen receptor is negatively correlated with the methylation-mediated transcriptional repression of miR-375 in human prostate cancer cells. Oncol Rep, v.31, n.1, Jan, p.34-40. 2014.

Comings, D. E. Polygenic inheritance and micro/minisatellites. Mol Psychiatry, v.3, n.1, Jan, p.21-31. 1998.

Cooper, D. N. Lyonizing Lyonization 50 years on. Hum Genet, v.130, n.2, Aug, p.167-8. 2011.

Cotton, A. M., L. Lam, *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., A. Nagy, *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.

Darvish, H., M. O. Nabi, *et al.* Exceptional human core promoter nucleotide compositions. Gene, v.475, n.2, Apr 15, p.79-86. 2011.

Deaton, A. M., S. Webb, *et al.* Cell type-specific DNA methylation at intragenic CpG islands in the immune system. Genome Res, v.21, n.7, Jul, p.1074-86. 2011.

Diamandis, E. P., D. Sidransky, *et al.* Epigenomics-based diagnostics. Clin Chem, v.56, n.8, Aug, p.1216-9. 2010.

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

Enard, W., P. Khaitovich, *et al.* Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. Science, v.296, n.5566, Apr 12, p.340-3. 2002.

Fackler, M. J., M. Mcveigh, *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.

Faria, 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. Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2013. 74 p.

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

Fratta, P., T. Collins, *et al.* Sequencing analysis of the spinal bulbar muscular atrophy CAG expansion reveals absence of repeat interruptions. Neurobiol Aging, v.35, n.2, Feb, p.443 e1-3. 2014.

Frommer, M., L. E. McDonald, *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.

Gan, D. K., C. L. He, *et al.* Novel RPGR-ORF15 mutations in X-linked retinitis pigmentosa patients. Neurosci Lett, v.500, n.1, Aug 1, p.16-9. 2011.

Gemayel, R., M. D. Vincens, *et al.* Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. Annu Rev Genet, v.44, p.445-77. 2010.

Glass, D., A. Vinuela, *et al.* Gene expression changes with age in skin, adipose tissue, blood and brain. Genome Biol, v.14, n.7, Jul 26, p.R75. 2013.

Hannan, A. J. Tandem repeat polymorphisms: modulators of disease susceptibility and candidates for 'missing heritability'. Trends Genet, v.26, n.2, Feb, p.59-65. 2010.

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

Heidari, A., Z. Nariman Saleh Fam, *et al.* Core promoter STRs: novel mechanism for inter-individual variation in gene expression in humans. Gene, v.492, n.1, Jan 15, p.195-8. 2012.

Herman, J. G., J. R. Graff, *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., C. L. Cheng, *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.

Hoogendoorn, B., S. L. Coleman, *et al.* Functional analysis of human promoter polymorphisms. Hum Mol Genet, v.12, n.18, Sep 15, p.2249-54. 2003.

Hoogendoorn, B., S. L. Coleman, *et al.* Functional analysis of polymorphisms in the promoter regions of genes on 22q11. Hum Mutat, v.24, n.1, Jul, p.35-42. 2004.

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

Inagaki, H., A. Wakita, *et al.* Clonality assay of hematopoietic disorders: significance of the buccal epithelium as non-hematopoietic control and of 95% rejection limit as a novel criterion for monoclonality. Jpn J Cancer Res, v.92, n.12, Dec, p.1305-12. 2001.

Irvine, R. A., M. C. Yu, *et al.* The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. Cancer Res, v.55, n.9, May 1, p.1937-40. 1995.

Issa, J. P., Y. L. Ottaviano, *et al.* Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. Nat Genet, v.7, n.4, Aug, p.536-40. 1994.

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

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

Jones, J. R. Nonrandom x chromosome inactivation detection. Curr Protoc Hum Genet, v.80, p.9 7 1-7. 2014.

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

Knight, J. C. Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. J Mol Med (Berl), v.83, n.2, Feb, p.97-109. 2005.

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

Kristiansen, M., G. P. Knudsen, *et al.* Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation. Eur J Hum Genet, v.13, n.5, May, p.599-606. 2005.

Lai, A. Y., M. Fatemi, *et al.* DNA methylation prevents CTCF-mediated silencing of the oncogene BCL6 in B cell lymphomas. J Exp Med, v.207, n.9, Aug 30, p.1939-50. 2010.

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

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

Livak, K. J. e T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods, v.25, n.4, Dec, p.402-8. 2001.

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

Lutz, R. E. Trinucleotide repeat disorders. Semin Pediatr Neurol, v.14, n.1, Mar, p.26-33. 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., A. F. Alves Da Silva, *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.

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

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

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

Mossner, M., F. Nolte, *et al.* Skewed X-inactivation patterns in ageing healthy and myelodysplastic haematopoiesis determined by a pyrosequencing based transcriptional clonality assay. J Med Genet, v.50, n.2, Feb, p.108-17. 2012.

Ohadi, M., S. Mohammadparast, *et al.* Evolutionary trend of exceptionally long human core promoter short tandem repeats. Gene, v.507, n.1, Oct 1, p.61-7. 2012.

Okladnova, O., Y. V. Syagailo, *et al.* A promoter-associated polymorphic repeat modulates PAX-6 expression in human brain. Biochem Biophys Res Commun, v.248, n.2, Jul 20, p.402-5. 1998.

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

Patil, S. B., T. W. Hurd, *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 J. T. Lee. X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. Annu Rev Genet, v.42, p.733-72. 2008.

Pessia, E., J. Engelstadter, *et al.* The evolution of X chromosome inactivation in mammals: the demise of Ohno's hypothesis? Cell Mol Life Sci, Oct 31. 2013.

Pontier, D. B. e J. Gribnau. Xist regulation and function explored. Hum Genet, v.130, n.2, Aug, p.223-36. 2011.

Potter, C., J. Mckay, *et al.* Influence of DNMT genotype on global and site specific DNA methylation patterns in neonates and pregnant women. PLoS One, v.8, n.10, p.e76506. 2013.

Rando, O. J. Chromatin structure in the genomics era. Trends Genet, v.23, n.2, Feb, p.67-73. 2007.

Sato, K., M. Hashiyada, *et al.* CpG dinucleotide methylation patterns in the human androgen receptor gene and X-chromosome inactivation in peripheral blood leukocytes of phenotypically normal women. J Hum Genet, v.48, n.7, p.374-9. 2003.

Sawaya, S., A. Bagshaw, *et al.* Microsatellite tandem repeats are abundant in human promoters and are associated with regulatory elements. PLoS One, v.8, n.2, p.e54710. 2013.

Saxonov, S., P. Berg, *et al.* A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.5, Jan 31, p.1412-7. 2006.

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

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

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

Singer-Sam, J., M. Grant, *et al.* Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the P_{gk}-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. Mol Cell Biol, v.10, n.9, Sep, p.4987-9. 1990.

Singer-Sam, J., J. M. Lebon, *et al.* A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells. Nucleic Acids Res, v.18, n.3, Feb 11, p.687. 1990.

Sulewska, A., W. Niklinska, *et al.* Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. Folia Histochem Cytobiol, v.45, n.4, p.315-24. 2007.

Swierczek, S. I., L. Piterkova, *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., S. Friso, *et al.* Epigenetics: The link between nature and nurture. Mol Aspects Med, Aug 10. 2012.

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

Teixeira, F. K. e V. Colot. 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.

Tong, Z., Z. Yang, *et al.* A novel locus for X-linked retinitis pigmentosa. Ann Acad Med Singapore, v.35, n.7, Jul, p.476-8. 2006.

Trifonov, E. N., Z. Volkovich, *et al.* Multiple levels of meaning in DNA sequences, and one more. Ann N Y Acad Sci, v.1267, Sep, p.35-8. 2012.

Turan, N., S. Katari, *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.

Valipour, E., A. Kowsari, *et al.* Polymorphic core promoter GA-repeats alter gene expression of the early embryonic developmental genes. Gene, v.531, n.2, Dec 1, p.175-9. 2013.

Veltel, S., R. Gasper, *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.

Vickers, M. A., S. J. Canning, *et al.* X inactivation patterns of closely, but not distantly, related cells are highly correlated: little evidence for stem cell plasticity in normal females. Stem Cells, v.24, n.11, Nov, p.2398-405. 2006.

Winer, J., C. K. Jung, *et al.* Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. Anal Biochem, v.270, n.1, May 15, p.41-9. 1999.

Wray, G. A., M. W. Hahn, *et al.* The evolution of transcriptional regulation in eukaryotes. Mol Biol Evol, v.20, n.9, Sep, p.1377-419. 2003.

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

Yuan, J. S., A. Reed, *et al.* Statistical analysis of real-time PCR data. BMC Bioinformatics, v.7, p.85. 2006.