**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PADRÃO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO
X E EXPRESSÃO DE MICRORNAS X-
ESPECÍFICOS NA PRÉ-ECLÂMPSIA**

ADRIANE ARAÚJO DE OLIVEIRA

Ribeirão Preto

2009

ADRIANE ARAÚJO DE OLIVEIRA

**PADRÃO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO
X E EXPRESSÃO DE MICRORNAS X-
ESPECÍFICOS NA PRÉ-ECLÂMPsia**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências. Área de
Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Ribeirão Preto

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Adriane Araújo de

Padrão de Inativação do Cromossomo X e Expressão de Micrornas X-Específicos na Pré-eclâmpsia, 2009.

117: il.; 30 cm

Dissertação de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Genética.

Orientadora: Ramos, Ester Silveira

1-Pré Eclâmpsia. 2-Inativação do Cromossomo X. 3-Teste de *HUMARA*.
4-Metilação. 5-Expressão Gênica Diferencial. 6- PCR em Tempo Real.

FOLHA DE APROVAÇÃO

PADRÃO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X E EXPRESSÃO DE
MICRORNAS X-ESPECÍFICOS NA PRÉ-ECLÂMPsia

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências. Área de
Concentração: Genética

BANCA EXAMINADORA

Data da Defesa: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

E acima de tudo a **Deus** por estar sempre presente

Aos meus pais José Carlos e Sebastiana, que sempre
estiveram ao meu lado, apoiando e incentivando
na busca da realização de meus sonhos e são responsáveis por tudo que sou
.

Ao meu marido Luiz Francisco, que sempre esteve
presente, ajudando, incentivando e me
fortalecendo com seu amor incondicional.

Aos meus irmãos Renato, Rogério e Alexandre
pelo carinho e compreensão

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ester Silveira Ramos por ter me orientado e me ensinado a nunca desistir. Obrigada pela confiança, dedicação e amizade.

À Profa. Susana Lopes por ter me recebido em seu laboratório, com todo carinho, dedicação e amizade

Às amiga Paula pela grande ajuda e amizade incondicional

Às amigas Lisandra, Francielle, Karine, Cristiana, Juliana Meola, Flávia, Mariana, Juliana, Rita e Fernanda pelas importantes discussões e ajuda no laboratório e principalmente pelo companheirismo e incentivo sempre presentes.

Às amigas Hélida, Andréa e Adriana pela amizade

Aos amigos Jair, Marcus, Álvaro e Murilo pela atenção e grande ajuda na padronização e realização dos experimentos.

Ào amigo Lucas pela atenção

Ao Prof.Dr. Raysildo Barbosa Lôbo e à Profa.Dra. Lúcia Marteli pela atenção.

À Profa.Dra. Margareth de Castro e ao Prof.Dr.Sonir Antonini por terem me recebido no laboratório de Endócrinologia

Aos técnicos Reginaldo, Marli e Sílvio pela atenção e dedicação.

Aos técnicos Sílvio, Malu e Lucimar pelo carinho

À todos os colegas do bloco C do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP pelo companheirismo.

À equipe de ginecologia e obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pela conduta e atendimento aos pacientes.

As pacientes e às suas famílias por terem concordado em participar deste trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pesquisa (CNPq), da Fundação de Amparo ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Associação Nacional dos Criadores e Pesquisadores (ANCP).

RESUMO

OLIVEIRA, A.A. Padrão de Inativação do Cromossomo X e Expressão de MicroRNAs X-específicos na Pré-Eclâmpsia (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

As síndromes hipertensivas gestacionais estão entre as maiores causas de morte materna e fetal. Entre elas destaca-se a pré-eclâmpsia (PE), que caracteriza-se pelo aumento da pressão arterial e proteinúria, a partir da 20^a semana de gestação. Embora sua etiologia seja ainda discutida, o papel dos fatores genéticos é amplamente aceito. Alterações do padrão da inativação do cromossomo X, processo epigenético encontrado em mamíferos com placenta, têm sido encontradas em algumas doenças que ocorrem exclusivamente em mulheres. O *XIST* é um gene chave nesse processo. Por outro lado, muitos microRNAs (pequenos RNAs não codificantes) são expressos abundantemente na placenta humana e alguns estão mapeados no cromossomo X. O objetivo do presente trabalho foi a verificação do padrão de inativação do cromossomo X e da expressão dos genes *XIST* e dos microRNAs X-específicos *miR-221*, *miR-222* e *miR-223* em mulheres com PE. O ensaio de *HUMARA* (receptor de andrógeno humano) utilizando PCR convencional e digestão com a enzima sensível à metilação *HpaII* foi analisado de forma qualitativa (visualização em gel de poliacrilamida) e semi-quantitativa (sequenciamento), sendo realizado a partir de sangue periférico (todas as amostras) e de tecido placentário [apenas das placentas de fetos femininos (17 amostras)]. Para o estudo do padrão de expressão foi obtido cDNA por transcrição reversa, a partir de RNA total extraído do tecido placentário (30 amostras).. A análise foi realizada por meio de PCR em tempo real. Foram utilizados os testes de Qui-quadrado e de t-Student, além do modelo linear generalizado para a análise estatística. Não houve diferença estatisticamente significativa para o parâmetro de inativação do cromossomo X entre os grupos controle e de PE, independente do tipo de tecido estudado (sangue ou placenta) quando foram aplicados os ensaios de *HUMARA* qualitativo e semi-quantitativo. Para o gene *XIST* e o microRNA *miR-221* não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e de PE. O microRNA *miR-223* não apresentou transcritos detectáveis em nenhum dos grupos de estudo. Para o microRNA *miR-222*, houve diferença estatisticamente significativa, sendo que no grupo de PE a expressão foi mais elevada. Não foi encontrada associação entre o padrão de inativação do cromossomo X e a expressão do gene *XIST* e dos microRNAs estudados. Embora a inativação preferencial do cromossomo X tenha sido encontrada nos dois grupos, padrões de inativação preferencial extrema foram verificados em um número maior de casos com PE. Os resultados mostram que o *miR-222* apresenta potencial para ser utilizado como marcador molecular da PE, sugerindo também que exista uma diminuição na expressão de seus genes-alvo que devem ser estudados como candidatos na patogênese da doença.

Palavras-chave: Pré-eclâmpsia, Inativação do cromossomo X, ensaio de *HUMARA*, Expressão Gênica Diferencial, *gene XIST*, *MicroRNAs*

ABSTRACT

OLIVEIRA, A.A. X-chromosome inactivation pattern and of MicroRNAs X-specific Expression in Preeclampsia (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The gestational hypertensive syndromes are among the major causes of maternal and fetal death. The Preeclampsia (PE) is the most prevalent of those syndromes and it is characterized by the increase of blood pressure and proteinuria, which start from to 20th week of gestation. Although its ethiology is argued actually the genetics factors have been accepted. Alterations in pattern of chromosome X inactivation, epigenetic process of mammals with placenta have been found in some diseases that occur exclusively in women. *XIST* is a key gene in this process. On the other hand very microRNAs (small RNAs no coding) are overexpressed in human placenta and someones are located at X chromosome. The subject of this research was verify the patterns of chromosome X inactivation and the expression of the *XIST* gene and X-specific microRNAs in women affected by PE. In the *HUMARA* (human androgen receptor) assay was carried out with peripheral blood (all samples) and placental tissue [only female fetuses placentas (17 samples)]. The conventional PCR and digestion methodology with *HpaII* enzyme were employed and the result was analysed to qualitative (polyacrilamide gel) and semi quantitative (sequencing) form. The cDNA was obtained to gene expression study by reverse transcription reaction from placenta total RNA (30 samples). Gene expression assay was carried out with real time PCR. To statistical analyze was used the Qui-square and t-Student tests besides the widespread lineal model. There was not statistical significant differences to chormosome X inactivation parameter among the groups control and PE independently of the tissue studied (blood or placenta) when the qualitative and semi quantitative *HUMARA* assay were applied. To *XIST* and *miR-221* were not evidenced significant statistical differences among the groups control and of PE. The *miR-223* did not show detectable transcripts to any group studied. The *miR-222* expression was more elevated in the PE group than control group and this difference was significant statistically. In the present study was not found association among the chromosome X inactivation pattern and the gene expression of *XIST* and the microRNAs studied. Although the chromosome X inactivation have been found in the two groups the preferential chromosome X inactivation patterns were verified in a great number of cases in PE group. The results showed that *miR-222* has a potential to be employed as molecular marker of PE also suggesting the existence of a decrease in expression of its target genes which have to be investigated like candidates to disease pathogenesis.

Key words: Preeclampsia, Chromosome X Inactivation, *HUMARA* assay, Differential Gene Expression, *XIST*, *MicroRNAs*

LISTA DE ABREVIATURAS

(=) – bandas de mesma intensidade

(≠) – bandas de intensidades diferentes

AIG – adequado para a idade gestacional

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

Brx – do inglês *Brevis Radix*

C – controle

cDNA –DNA complementar

CDx – do inglês *Caudal Type Homeobox 2*

CO – monóxido de carbono

CONEP – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

C_T – do inglês Threshold Cycle

CTCF – do inglês *CCCTC-binding Factor* (Fator de Ligação CCCTC)

d (em idade gestacional) – dias

d (em teste de HUMARA) – digestão

DBD – do inglês *DNA-binding Domain* (Domínio de Ligação do DNA)

DGCR8 – do inglês *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*

DMR – do inglês *Diferentially Methylated Region* (Região Diferencialmente Metilada)

DNA – do inglês *Desoxi-Ribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

dNTP – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

E – eclâmpsia

EDTA – do inglês Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiaminotetracético)

Eed – do inglês *Embryonic Ectoderm Expression* (Expressão do Ectoderma Embrionário)

Exp5 – exportina 5

F – feminino

FA% - frequência do alelo A em porcentagem

FB% - frequência do alelo B em porcentagem

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

GIG – grande para a idade gestacional

H – homem normal

H19 – gene *H19*

H3 – histona H3

H3K27 – trimetilação da lisina 27 na histona H3

H4 – histona H4

HAT – do inglês *Histone Acetil Transferase* (Acetil Transferase de Histona)

HCFMRP-USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Hd – produto de PCR de homem normal digerido com *HpaII*

HpaII- – sem digestão com *HpaII*

HpaII+ – digestão com *HpaII*

HRE – do inglês *Hormonal Response Elements* (Elementos de Resposta Hormonal)

HUMARA – do inglês *Human Androgen Receptor* (Gene do Receptor de Andrógeno Humano)

Humara-AS – *primer antisense* para o gene do receptor de andrógeno humano

Humara-Q – Human Androgen Receptor Assay qualitativo

Humara-S – *primer sense* para o gene do receptor de andrógeno humano

Humara-SQ – Human Androgen Receptor Assay semi-quantitativo

ICRs – regiões controladoras de *imprinting*

IG – idade gestacional

IG – *imprinting* genômico

IgF2 – do inglês *Insulin-like Growth Factor 2* (Fator de Crescimento Semelhante a Insulina)

ISSHP – do inglês *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* (Sociedade Internacional para o Estudo da Hipertensão na Gravidez)

IX – inativação do cromossomo X

IXA – inativação aleatória do cromossomo X

IXP – inativação preferencial do cromossomo X

K – potássio

Kb – Kilobase

KH₂PO₄ – fosfato de potássio monobásico

LBD – do inglês *Ligand-binding Domain* (Domínio de Ligação do Hormônio)

Lin-4 – do inglês *Lineage – deficient-4* (Linhagem deficiente 4)

M – masculino

M – mulher normal

Mar (no gel) – marcador de pares de base

Md – produto de PCR de mulher normal digerido com *HpaII*

MgCl₂ – cloreto de magnésio

miRNAs – microRNAs

Na₂HPO₄ – fosfato de sódio monobásico

NaCl – cloreto de sódio

ncRNA – RNA não codificador de proteína

NHBPEP – do inglês *National High Blood Pressure Education Program* (Programa de Educação Nacional da Pressão Sangüínea Alta)

NI – não informativo

NO – óxido nítrico

NR – não realizado

p – braço curto

pb – pares de bases

PcG – do inglês *Policombs Protein Groups* (Grupos de Proteínas Policombinadas)

PCR – do inglês *Polimerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia de Polimerase)

PE – pré-eclâmpsia

PEip – pré-eclâmpsia de início precoce

PEit – pré-eclâmpsia de início tardio

PIG – pequeno para a idade gestacional

RCF – restrição de crescimento fetal

RISC – do inglês *RNA-Induced Silence Complex* (Complexo de Silêncio Induzido do RNA)

RN – recém-nascido

RNA – ácido ribonucléico

RNAi – RNA de interferência

RNA_m – RNA mensageiro

RQ – do inglês *Relative Quantification* (Quantificação Relativa)

s – semanas

SAS - do inglês *Statistical Analysis System* (Sistema de Análise Estatística)

SDS – Docecil Sulfato de Sódio

SH – síndromes hipertensivas

STOX1 – do inglês *Storkhead Box 1*

TAD – do inglês *Transactivation Domain* (Domínio de Transativação)

TBE – tampão Tris-Borato-EDTA

Tris – Hidroximetil Aminometano

Tsix – *Antisense de Xist*

TSPY – do inglês *Testis-Specific Protein in Y-encoded* (Proteína Testículo Específica no Cromossomo Y)

VA – valor da área do pico do alelo A

VB – valor da área do pico do alelo B

X – frequência do alelo A

X_a – cromossomo X ativo

Xce – do inglês *X Chromosome Controlling Element* (Elemento de Controle do Cromossomo X)

X_i – cromossomo X inativo

XIC – do inglês *X Inactivation Center* (Centro de Inativação de X)

XIST – do inglês *X Inactive-specific Transcript* (Transcrito Específico do Cromossomo X Inativo)

XITE – do inglês *X-Inactivation Intergenic Transcription Elements* (Elementos Intergênicos de Transcrição no Centro de Inativação do Cromossomo X)

X^m_a – cromossomo X materno ativo

X^m_i – cromossomo X materno inativo

X_p – braço curto do cromossomo X

X^p_a – cromossomo X paterno ativo

X^p_i – cromossomo X paterno inativo

Y - frequência do alelo B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Centro e etapas da inativação do cromossomo X	37
Figura 2. Esquema do modelo de regulação da expressão do gene <i>Xist</i> com CTCF como bloqueadora no processo de IX.....	40
Figura 3. Esquema do modelo de regulação da expressão do gene <i>Xist</i> com CTCF como ativadora direta da transcrição no processo de IX	41
Figura 4. Esquema do modelo de regulação da expressão do gene <i>Xist</i> com <i>Tsix</i> como antagonista	41
Figura 5. Inativação preferencial do cromossomo X (IXP) em fêmeas.....	43
Figura 6. Esquema do cromossomo X com o <i>locus</i> do gene <i>AR</i> e organização estrutural do gene e da proteína.....	45
Figura 7. Esquema do teste de <i>HUMARA</i>	46
Figura 8. Biogênese do microRNA	49
Figura 9. Calculo de Inativação preferencial (IXP)	62
Figura 10. Esquema dos ensaios de <i>HUMARA</i> qualitativo (Q) e semi-quantitativo (SQ) utilizados para detecção de inativação preferencial do cromossomo X (IXP).....	64
Figura 11. Resultado da eletroforese - pacientes 45,X[100] (1)	71
Figura 12. Resultado da eletroforese - pacientes 45,X[100] (2)	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pacientes do grupo controle.....	55
Tabela 2. Pacientes com pré-eclâmpsia	56
Tabela 3. Par de <i>primers</i> utilizado para o ensaio de <i>HUMARA</i>	61
Tabela 4. Resultados dos ensaios de <i>HUMARA</i> qualitativo(Q) e semi-quantitativo(SQ) em placentas e sangue materno provenientes de gestações normais (grupo controle) e recém-nascidos do sexo feminino	73
Tabela 5. Resultados dos ensaios de <i>HUMARA</i> qualitativo(Q) e semi-quantitativo(SQ) em sangue materno provenientes de gestações normais (grupo controle) e recém-nascidos do sexo masculino.....	74
Tabela 6. Resultados dos ensaios de <i>HUMARA</i> qualitativo(Q) e semi-quantitativo (SQ) em placentas e sangue materno provenientes de gestações com PE e recém-nascidos do sexo feminino.....	75
Tabela 7. Resultados dos ensaios de <i>HUMARA</i> qualitativo(Q) e semi-quantitativo(SQ) em sangue materno provenientes de gestações com PE e RNs do sexo masculino	76
Tabela 8. Resultados do perfil de expressão de microRNAs e do gene <i>XIST</i> em tecido placentário do grupo controle	81
Tabela 9. Resultados do perfil de expressão de microRNAs do gene <i>XIST</i> em tecido placentário do grupo PE	81

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico1. Resultados do ensaio de *HUMARA* semi-quantitativo (A, B, C e D). (A): porcentagem de inativação preferencial do cromossomo X (IXP) em sangue materno (grupo controle) (B) porcentagem de IXP X em tecido placentário (grupo controle); (C) porcentagem de IXP X em sangue materno (grupo controle); (D): porcentagem de inativação preferencial do cromossomo X em tecido placentário (grupo controle)78

Gráfico2. Resultados estatísticos do ensaio de *HUMARA* qualitativo (A, B, C e D). (A): frequência de Inativação preferencial do cromossomo X (IXP) e inativação aleatória do cromossomo X(IXA) em sangue materno e placenta (controle e pré-eclâmpsia); (B) Frequência de IXP e IXA em sangue materno (controle e pré-eclâmpsia); (C) frequência de IXP e IXA em placenta (controle e pré-eclâmpsia); D) Frequência de Inativação preferencial do cromossomo e IXA em sangue e placenta (controle e pré-eclâmpsia)79

Gráfico 3. Quantificação relativa dos microRNAs e do gene *XIST* em tecido placentário (A, B, C e D). (A): quantificação relativa do grupo controle e RN do sexo feminino (B): quantificação relativa grupo de PE e RN do sexo feminino; (C): quantificação relativa do grupo controle e RN do sexo masculino; (D): quantificação relativa do grupo controle e RN do sexo masculino82

Gráfico 4. Valor médio da quantificação relativa dos microRNAs e do gene *XIST* em tecido placentário (A e B). (A): quantificação relativa média do grupo controle (B): quantificação relativa média do grupo PE83

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	27
I.1 Síndromes Hipertensivas Gestacionais.....	28
I.2 Pré-eclâmpsia.....	28
I.2.1 Desenvolvimento Placentário Anormal e Pré-eclâmpsia.....	30
I.2.2 Aspectos Genéticos da Pré-eclâmpsia.....	31
I.3 Inativação do Cromossomo X.....	32
I.3.1 O Centro de Inativação do Cromossomo X (XIC).....	33
I.3.2 Etapas da Inativação do Cromossomo X	34
I.3.3 Placenta e Inativação do Cromossomo X.....	38
I.3.4 Metilação do DNA e Inativação do Cromossomo X.....	38
I.3.5 Proteína CTCF e Inativação do Cromossomo X	39
I.3.6 Inativação Preferencial do Cromossomo X e Pré-eclâmpsia	42
I.4 O Gene <i>AR</i>	43
I.5 Teste de <i>HUMARA</i> (<i>human androgen receptor assay</i>).....	45
I.6 MicroRNAs.....	47
I.6.1 Regulação Pós-transcricional dos MicroRNAs.....	47
I.6.2 Biogênese dos miRNAs.....	48
I.6.3 MicroRNAs e Pré-eclâmpsia.....	50
I.6.4 MicroRNAs e cromossomo X.....	50
 II. OBJETIVOS	 51
II.1 Objetivo geral.....	52
II.2 Objetivos específicos.....	52
 III. CASUÍSTICA.....	 53
III.1 Aspectos Éticos do Projeto.....	54
III.2 Pacientes	54
 IV. MATERIAIS E MÉTODOS	 57
IV.1 Coleta de Material	58
IV.1.1 Amostra de sangue periférico	58
IV.1.2 Amostra de tecido placentário (vilosidade coriônica).....	58
IV.2 Extração de RNA total.....	59
IV.3 Extração de DNA.....	59
IV.4 Análise Molecular	59

IV.4.1 Testes para exclusão de contaminação.....	59
IV.4.2 Análise do Padrão de Inativação do Cromossomo X.....	60
IV.4.2.1 Ensaio de <i>HUMARA</i> (<i>Human Androgen Receptor Assay</i>) (Qualitativo) (<i>HUMARA-Q</i>).....	60
IV.4.2.2 Ensaio de <i>HUMARA</i> (<i>Human Androgen Receptor Assay</i>) (Semi-quantitativo) (<i>HUMARA-SQ</i>)	61
IV.4.2.3 Detecção de Inativação Preferencial do Cromossomo X (IXP).....	62
IV.4.3 PCR em Tempo Real (<i>Real time PCR</i>)	65
IV.5 Análise Estatística	66
 V. RESULTADOS.....	68
V.1 Testes para exclusão de contaminação.....	69
V.2 Detecção de Inativação Preferencial do Cromossomo X (IXP).....	69
V.2.1 Análise estatística	76
V.3 Análise do perfil de expressão por PCR em tempo real	80
V.3.1 Análise estatística	84
 VI. DISCUSSÃO	85
VI.1 Ensaio de <i>HUMARA</i> e inativação preferencial do cromossomo X (IXP).....	86
VI.2 Gene <i>XIST</i>	90
VI.3 MicroRNAs	91
 VII. CONCLUSÕES	94
 VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
 APÊNDICES.....	111
 ARTIGO PUBLICADO	118

I. INTRODUÇÃO

I.1 Síndromes Hipertensivas Gestacionais

As síndromes hipertensivas (SH) são as complicações mais frequentes na gestação e constituem, no Brasil, a primeira causa de morte materna, principalmente quando se instalam em suas formas graves, como a eclâmpsia (E) e a síndrome HELLP (hemolysis; elevated liver enzymes; low platelets), que consiste em hemólise, elevação de enzimas hepáticas e plaquetopenia (WALKER, 1997). Globalmente, as doenças hipertensivas da gravidez são responsáveis pela morte de 50.000 mulheres por ano (CHAPPELL & MORGAN, 2006). Uma delas é a hipertensão arterial que se desenvolve no ciclo gravídico-puerperal que inclui a hipertensão gestacional (HG) e pré-eclâmpsia/eclâmpsia (PE/E), que atinge mulheres nos extremos de suas vidas reprodutivas, surge após a 20ª semana de gravidez e geralmente se reverte após o parto (SIBAI et al., 2008). A outra é a hipertensão arterial crônica que coincide com a gestação. Eventualmente, a PE pode se desenvolver em uma gestante hipertensa crônica, quadro este denominado PE sobreposta (NHBPEP, 2000; CHAPPELL & MORGAN, 2006).

Uma das principais dificuldades na investigação da PE/E é a ausência de uma causa inicial bem definida e, apesar do grande número de estudos, sua etiologia permanece desconhecida. A PE/E parece ter componentes genéticos (materno, fetal e ou paterno). Estudos familiares e epidemiológicos evidenciaram que a PE surge a partir de uma interação complexa entre suscetibilidade genética e fatores ambientais, mas o exato padrão de herança ainda é desconhecido (MORGAN et al., 2002; SIBAI, 2008).

I.2 Pré-eclâmpsia

A pré-eclâmpsia (PE) e suas variantes são consideradas doenças multifatoriais associadas à gravidez que formam o espectro da mesma patologia (BAXTER & WEINSTEIN, 2004; REDMAN & SARGENT, 2005; SIBAI et al., 2005).

Clinicamente, a PE está associada ao aumento da pressão arterial materna (pressão sistólica/diastólica $\geq 140/90$ mmHg) e proteinúria (quantidade de proteína ≥ 300 mg em urina de 24 horas) após a 20ª semana de gestação. A sua maior complicação é denominada de eclâmpsia (E) que atinge uma minoria de mulheres e inclui algumas ou todas as características da PE em associação com convulsões não atribuídas a outras causas, além de elevados níveis de enzimas hepáticas e redução do nível de plaquetas (SIBAI, 2005).

Esta doença ocorre apenas no período gravídico-puerperal, como resultado da resposta vascular alterada ao processo de formação da placenta, levando ao aumento da resistência vascular sistêmica, aumento da agregação plaquetária, ativação do sistema de coagulação e disfunção do sistema endotelial atingindo múltiplos órgãos (WGHP, 2000).

Apesar dos avanços da medicina neonatal, a PE ainda é o maior problema obstétrico mundial e sua incidência não tem se alterado com o passar do tempo. Atinge aproximadamente 3-5% das gestantes e apresenta taxas elevadas de mortalidade fetal e materna (15-20% em países desenvolvidos) (SIBAI et al., 2005; BAUMWELL & KARUMANCHI, 2007). A taxa de mortalidade de ambos está diretamente relacionada com a idade gestacional na época do desenvolvimento da doença, severidade, a qualidade do tratamento prestado e a associação com outras doenças (SIBAI, 2003).

A etiologia das síndromes hipertensivas gestacionais não é clara, apesar de décadas de estudos, devido principalmente a um amplo espectro de manifestações clínicas apresentados por gestantes com PE e seus filhos. (SIBAI, 2008).

A incidência de PE em mulheres nulíparas saudáveis é de aproximadamente 6% (dos quais 93% se desenvolve tardiamente) (SIBAI et al., 2005). Aproximadamente 25% dos casos de crianças nascidas de gestações pré-eclâmpticas apresentam restrição do crescimento intra-uterino devido ao reduzido fluxo sanguíneo vascular na interface materno/fetal (SIBAI, 2005).

O grau de hipertensão materna, de proteinúria e presença ou não de anormalidades nos testes laboratoriais são variáveis (sendo de moderados a severos) e essas alterações surgem em períodos gestacionais também inconstantes (SIBAI, 2005). As manifestações da PE podem ocorrer antes da trigésima quarta semana (início precoce), depois dela (início tardio) durante o trabalho de parto, ou posterior a ele (SIBAI, 2008).

Recentemente, foi sugerido que as PEs de início precoce e tardio podem apresentar patofisiologia diferentes. A PE de início precoce (PEip) normalmente estaria associada com a restrição de crescimento fetal (RCF) e evidências de lesões isquêmicas nos exames placentários. A PE de início tardio (PEit) geralmente não está associada a estas alterações (MOLDENHAUER et al., 2003).

Considerando o período de surgimento das manifestações, origem, severidade, risco genético e herança, entre outras características, a PE foi sub-classificada em: prematura (Tipo I) e tardia (Tipo II) (DUCKIT & HARRINGTON, 2005; SIBAI, 2008); PE severa e moderada e síndrome materna e fetal (ACOG, 2002; VON DADELSZEN et al., 2003).

A PE com início tardio (PE *materna*) surge da interação entre a placenta normal e uma predisposição materna devido a uma hipertensão arterial já existente, diabetes ou outro distúrbio metabólico. Em termos de padrão de herança, seria resultante de uma predisposição genética materna devido à ação conjunta de alguns genes. Em contraste, o

início precoce da PE (PE *placentária*) começa com uma placentação anormal, tem um risco de recorrência aumentado e ocorre em famílias com um componente genético claro (recorrência através das gerações e ocorrência dentro das famílias) (RED MAN & SARGENT, 2005; SKLAERVEN et al., 2005).

I.2.1 Desenvolvimento Placentário Anormal e Pré-eclâmpsia

Embora a patogênese da PE não seja bem entendida, sabe-se que a presença da placenta é fundamental para seu desenvolvimento (PAGE, 1939). Os sinais da PE podem aparecer, na ausência do feto, em gravidezes de molas hidatiformes. Curiosamente, não ocorre PE espontaneamente em outros animais, inclusive primatas (WINN et al., 2009).

Na PE, a invasão trofoblástica superficial das artérias uterinas espiraladas leva à manutenção de suas propriedades contráteis e ao aumento da resistência vascular (GERRETSEN et al., 1981; KAUFMANN et al., 2003). Esta invasão inadequada ativa uma cascata de eventos que eventualmente acarreta o aparecimento dos sinais clínicos (ROBERTS & LAIN, 2002; REDMAN & SARGENT, 2005; ROBERTS & GAMMILL, 2005). As artérias espirais de uma gravidez pré-eclâmpsica apresentam apenas 40% do diâmetro das mesmas na gravidez normal. Como resultado tem-se a isquemia e uma menor perfusão placentárias (WILSON et al., 2003).

A placentação anormal pode ocorrer devido à diminuição dos níveis de O₂. Acredita-se que a oxigenação uteroplacentária insuficiente, presente na PE, seja responsável pelos eventos moleculares que provocam as manifestações clínicas desta doença. Outras evidências mostram que a disfunção endotelial, provavelmente, é causada por toxinas como *debris* celulares apoptóticos e fatores circulantes originários da placenta e estes acarretariam o mecanismo central na patogênese da síndrome materna na PE (ROBERTS, 1998).

Vários grupos de estudo observaram a secreção em excesso de moléculas anti-angiogênicas de origem placentária, como a tirosina kinase-1 fms solúvel (sflt-1) (TSATSARIS et al., 2003; CHAIWORAPONGSA et al., 2004; LEVINE et al., 2004). A sflt-1 atua antagonizando moléculas pró-angiogênicas. Portanto, a sflt-1 pode ser um dos fatores liberados pela placenta isquêmica para a circulação materna que causa disfunção endotelial disseminada e prejuízo da angiogênese (ZHOU et al., 2007). Recentemente, foi sugerido que o excesso de fatores anti-angiogênicos circulante (sFlt1 e sEng) pode ser uma ligação patofisiologia entre a placenta anormal e as manifestações sistêmicas maternas (MAYNARD et al., 2008; HEYDARIAN et al., 2009).

Uma variedade de moléculas angiogênicas e enzimas proteolíticas apresentam papéis críticos no estabelecimento da placentação e desenvolvimento do sistema circulatório (REYNOLDS et al., 2005). Por exemplo, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento da placenta (PIGF) são indispensáveis durante o período gestacional (REYNOLDS & REDMER, 2001; ZYGMUNT et al., 2003)

1.2.2 Aspectos Genéticos da Pré-eclâmpsia

O fato da PE diferir amplamente entre mulheres de acordo com fatores de risco específicos como: primiparidade, idade da mãe, tabagismo, hipertensão prévia, hipertensão na gravidez e história familiar entre outros, impede a identificação de todos os genes e fatores ambientais que contribuem para o surgimento de seus sinais e sintomas (DUCKITT & HARRINGTON, 2005).

Evidências de uma base genética para a PE surgiram da informação do aumento na frequência desta síndrome entre mães, filhas, irmãs e netas de mulheres que tiveram PE (SUTHERLAND et al. 1981; LAIVUORI et al., 2003, ARAUJO et al., 2007). Outros estudos propõem um componente fetal atuando para o aumento da suscetibilidade para PE, pois a correlação entre ela e anormalidades cromossômicas fetais, como as molas hidatiformes completas, que são exclusivamente de origem paterna, confirmam uma contribuição fetal para a etiologia da doença (GOLDSTEIN & BERKOWIZ, 1994; ESPLIN et al., 2001).

O aumento da incidência de PE também foi observado entre noras de casos-controle e verificou-se que homens nascidos de gestações pré-eclâmpticas têm maior probabilidade de serem pais em uma gravidez pré-eclâmptica quando comparados com os controles, fortalecendo a contribuição fetal/paterna (ESPLIN et al., 2001).

O papel dos fatores genéticos no desenvolvimento da PE não foi totalmente esclarecido e nenhum gene específico foi identificado. Até o momento não se sabe o padrão de herança da doença, mas foi descrito como mendeliana [autossômica recessiva (de origem materna) ou dominante com penetrância incompleta]. Outros autores propuseram que uma origem poligênica/multifatorial e mitocondrial ocorreria devido a uma interação complexa entre dois ou mais genes maternos, fatores ambientais e genótipo fetal e uma contribuição conjugada da genética materna, fetal e paterna (através do feto) ou interação materno-fetal (WILSON et al, 2002; NORIS et al., 2005; CHAPPELL & MORGAN, 2006).

Nos diversos estudos realizados foram identificados genes candidatos envolvidos com: trombofilia, hemodinâmica, citocinas, estresse oxidativo, metabolismo de lipídios,

angiogênese e invasão citotrofoblástica (LACHMEIJER et al., 2001; MOFFETT-KING, 2002; HIBY et al., 2004; ENQUOBAHRIE et al., 2008; OUDEJANS & VAN DIJK, 2008).

Estudos indicaram uma associação entre PE e genes polimórficos que controlam a pressão sanguínea, coagulação e metabolismo de radicais livres (DIZON-TOWNSON et al., 1996; ARNGRIMSSON et al., 1997; SOHDA et al., 1997). Outros trabalhos identificaram três *loci* envolvidos com a suscetibilidade à PE: 2p13, 2p25 e 9p13 (HARRISON et al., 1997; ARNGRIMSSON et al., 1999; LACHMEIJER et al., 2001). Um quarto *locus* para PE foi proposto em 10q22, onde foi encontrado o gene *STOX1* mutado em irmãs com PE. Mecanismos epigenéticos, como o imprinting genômico também foram associados com o desenvolvimento da PE (VAN DIJK et al., 2005).

I.3 Inativação do Cromossomo X

Diferentes estratégias de compensação de dose são empregadas através do espectro evolutivo para assegurar que os níveis de produto formado pelos genes ligados ao cromossomo X sejam equivalentes entre machos (XY) e fêmeas (XX) (CLERC & AVNER, 2006).

Em mamíferos, nas células de fêmeas normais (XX), a compensação de dose geralmente é observada a partir da inativação de um dos cromossomos X. Porém, ela pode acontecer em qualquer célula, masculina ou feminina que tenha mais de um cromossomo X (STARMER & MAGNUSON, 2009).

Barr e Bertram (1949) observaram, no núcleo de células nervosas de gatas, a existência de um corpúsculo heteropicnótico, ausente nas células dos machos. Esta estrutura passou a ser chamada corpúsculo de Barr. Em 1959, Ohno et al. demonstraram que este corpúsculo era formado a partir de um único cromossomo X condensado. (MIGEON, 2007).

Em 1961, Lyon propôs a hipótese da inativação do cromossomo X. Segundo ela, uma fêmea heterozigota para um determinado gene no cromossomo X possuiria duas populações celulares diferentes, devido ao fato de que cada uma expressaria um alelo, uma vez que em cada clone apenas um cromossomo X permaneceria ativo. Esse evento sempre ocorreria devido à inativação ser um processo clonal e irreversível. Com uma exceção, nas células da linhagem germinativa no início da oogênese, o cromossomo X inativo (Xi) é reativado. Entretanto, na espermatogênese, o único X ativo (Xa) torna-se inativo (RASTAN, 1994). Em mamíferos, a inativação do cromossomo X (IX) é um fenômeno regulatório nas células somáticas das fêmeas. Um dos dois cromossomos X é inativado geneticamente, resultando na compensação de dose para genes ligados ao X (LYON, 1993). Este silenciamento ocorre no

início do desenvolvimento embrionário e, uma vez estabelecido na célula, o estado inativo é mantido estável por meio de inúmeras divisões. Todos os descendentes clonais desta célula apresentam o mesmo Xi (SENNER & BROCKDORFF, 2009).

Na maioria dos mamíferos, na linhagem de células embrionárias, a taxa de células contendo cromossomo X materno inativado [X^m_i (X materno inativado) X^p_a (X paterno ativo)] em relação às com o X paterno inativado [X^m_a (X materno ativo) X^p_i (X paterno inativo)] é 1:1 (MONK & HARPER, 1979), ficando evidente que a escolha do futuro Xi ocorre aleatoriamente. Entretanto, em marsupiais (SHARMAN et al., 1971) e tecidos extra-embrionários de camundongos a IX ocorre de forma não aleatória e o X inativado é o paterno (IX por *imprinting*) (TAKAGI & SASAKI, 1975).

Em humanos, vários genes ligados ao cromossomo X não sofrem IX e são expressos em ambos os cromossomos X (X_a e X_i) (FRANCO BALLABIO, 2006). Ao longo do cromossomo X estão localizados diversos genes que escapam da IX, embora a maioria esteja situada no braço curto de X (X_p), especialmente na região pseudo-autossômica. O mecanismo de escape da IX pode ser incompleto, podendo variar entre tecidos e indivíduos. Uma ampla investigação da expressão de genes ligados ao X evidenciou que 15% escaparam da IX (CARREL & WILLARD, 2005). Esta variação na expressão de genes entre as fêmeas pode explicar a variação fenotípica entre as portadoras de desordens ligadas ao X (LYON, 2005).

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

Vários mecanismos estão envolvidos no fenômeno da IX e o fundamental é que ela ocorra por meio de um inibidor da transcrição de alguns genes e que esta inibição seja mantida *locus a locus* (CHAO et al., 2002; LATHAM, 2005; ERWIN & LEE, 2008).

I.3.1 O Centro de Inativação do Cromossomo X (XIC)

Os primeiros eventos da IX estão sob o controle de uma “chave reguladora”, o centro de inativação do cromossomo X (***X inactivation center***) [XIC (humano) e *Xic* (camundongo)] (AVNER & HEARD, 2001; MIGEON et al., 2006).

O processo de inativação é mediado pelo gene *XIST* (***X inactive-specific transcript***), localizado no XIC, presente no braço longo ($Xq13.2$), expresso somente no Xi (BALLABIO &

WILARD, 1992). Seu transcrito não codifica nenhuma proteína e deve atuar como RNA funcional possuindo várias seqüências repetitivas em *tandem*, a maioria localizada na extremidade 5', que se mostraram conservadas evolutivamente (BROWN et al., 1992).

Outro gene que também está envolvido no processo de IX é o *Tsix*, transcrito *antisense*, mapeado próximo ao *locus Xist*, também na região Xic, que atua principalmente para preservar a integridade e ativação do cromossomo X que escapa da inativação, reprimindo a expressão de *Xist* (CHAO et al., 2002). Este papel crucial do *antisense Tsix* a partir do promotor de *Xist* foi confirmado recentemente por Ohhata et al. 2008.

Na região 3' de *Xist*, no *locus Tsix*, foi identificado o DXPas34, um marcador de minissatélite, rico em dinucleotídeos CpGs, com um sítio para a enzima *SaII* e um conjunto de sítios vizinhos para a *HpaII* (SIMMLER et al., 1993; AVNER et al., 1998; PRISSETE et al., 2001, BOUMIL et al., 2006). Foi sugerido que neste *locus* ocorreriam regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre os alelos (Xa e Xi) (COURTIER et al., 1995). Entretanto, estas DMRs não foram encontradas em gametas e embriões no período inicial de desenvolvimento em camundongos (PRISSETE et al., 2001).

Dados de um mapeamento genético utilizando marcadores microsatélites identificaram o *locus Xce* (**X**-*chromosome-controlling element*) em uma região aproximadamente 150kb *upstream* da região promotora de *Tsix*. Em fêmeas heterozigotas para os alelos *Xce*, o cromossomo X com o alelo “forte” tem maior probabilidade de ser escolhido para permanecer ativo que o alelo “fraco”. *Xce* é considerado um modificador da escolha do cromossomo X (Figura 2) (AVNER & HEARD, 2001; BOUMIL & LEE, 2001, BOUMIL et al., 2006).

Outros genes têm sido encontrados próximos ou dentro de Xic, tais como *Tsix*, *Brx* e *CDx*, mas nenhum deles apresenta uma expressão padrão que os ajustem no papel de regulador da IX. Eles estão dentro da região proposta para o *locus Xce* e fora da suposta região de Xic (35-80Kb) (Figura 1a) (HORE et al., 2007).

I.3.2 Etapas da Inativação do Cromossomo X

O complexo mecanismo epigenético da inativação do cromossomo X pode ser geneticamente dividido em cinco etapas seqüenciais: contagem, escolha, início do silenciamento, estabelecimento e manutenção. Todas, com exceção da etapa de manutenção, parecem ser controladas pelo Xic (HEARD et al., 1999; BOUMIL & LEE, 2001) (Figura 1a e 1b).

No início da inativação aleatória do cromossomo X, o número de cromossomos X relativos ao número de autossomos é contado, permitindo que um X permaneça ativo por conjunto de cromossomos diplóides (HEARD & DISTECHE, 2006). Evidências genéticas apontam a região 3' do gene *Xist* para este papel (CLERC & AVNER, 1998; AVNER & HEARD, 2001, CLERC & AVNER, 2006).

Seqüências dentro de *Xist* e *Tsix* têm sido propostas como reguladoras do evento de escolha. Nele somente um cromossomo X é selecionado para escapar do processo de silenciamento (BOUMIL & LEE, 2001, CLERC & AVNER, 2006). Alguns estudos atribuem à região rica em CpG localizada 5' de *Tsix* (*locus* DPXas34) a responsabilidade pela escolha (COURTIER et al., 1995). Tal região quando não metilada, apresenta-se acessível à ligação da proteína isoladora denominada CTCF (*CCCTC-binding factor*), que funciona como uma barreira física, impedindo a expressão de *Xist* e, conseqüentemente, promovendo a expressão de *Tsix* no Xa (CHAO, 2002; BOUMIL et al., 2006). Um estudo envolvendo o mecanismo de ação de *Xist* e *Tsix* sugeriu que o balanço dos níveis de transcrição entre *sense* e *antisense* é importante para definição de qual X seria inativado nas células XX (OHHATA et al. 2008). Este mecanismo de balanço sugere a participação de RNAs dupla fita e do mecanismo de RNA de interferência (RNAi) (SENNER & BROCKDORFF, 2009).

Uma vez que a escolha tenha sido feita, a expressão de um longo RNA *Xist* é aumentada no cromossomo X a ser inativado (CHOW et al, 2005). Moléculas de *Xist*, então, se acumulam sobre o cromossomo e inicia-se o silenciamento. No entanto, o início do silenciamento pelo *Xist* é restrito aos estágios iniciais da diferenciação. Inicialmente, o silenciamento gênico é reversível e dependente de *XIST*, no entanto, em estágios mais tardios da diferenciação, a inativação de X torna-se independente de *XIST* e irreversível (CSANKOVSKI et al, 1999). Portanto, *Xist* é crucial para iniciar o silenciamento, mas tem um papel menor na manutenção do Xi (NG et al., 2007).

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

Em 1992, Brockdorff et al. propuseram um modelo para propagação da inativação envolvendo o transcrito RNA *Xist* (RNA funcional). Nele o RNA funcional interage com o cromossomo X de onde o *Xist* é transcrito, possivelmente em associação com proteínas utilizadas na formação de heterocromatina e induzem em *cis* o espalhamento da cromatina inativada.

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

A presença de *Xist* parece não ser necessária para a manutenção do processo de inativação (BROWN & WILLARD, 1994). O cromossomo X em que a deleção de *Xist* ocorre posteriormente ao início do período de desenvolvimento permanece inativado (RACK et al., 1994). Em parte, a manutenção da inativação é mediada pela metilação das ilhas CpG da região promotora dos genes. O *locus Tsix* seria o principal responsável pela manutenção do X ativo por competir com o *locus Xist* por *enhancers* localizados *downstream* em relação a esses dois genes e por regular a escolha dos cromossomos X (CHAO et al., 2002). Autores sugerem que *Tsix* silenciaria *Xist* por meio de modificação da estrutura da cromatina, particularmente a região promotora de *Xist* (OHHATA et al., 2008).

Estudos em múltiplos organismos sugerem que a modificação de histonas está diretamente envolvida no processo de regulação transcricional (JENUWEIN & ALLIS, 2001). Em embriões pré-implantação a propagação de *Xist* ao redor do cromossomo X, em *cis*, em regiões altamente enriquecida com elementos repetitivos LINE1 (L1s), é seguida pela associação transitória de grupos protéicos policombinados (PcG) como Eed/Ezh2, modificação das histonas H3 e H4 e associação de macroH2A, mantendo assim, o estado condensado da cromatina (O'NEIL et al., 2003; PLATH et al., 2003; SILVA et al., 2003; CHENG & DISTECHE, 2004; ROUGEULLE et al., 2004; HEARD & DISTECHE, 2006; LYON, 2006).

Células que sofreram IX são caracterizadas por apresentar modificação de histonas na região promotora de *Xist*. Navarro et al. (2005) demonstraram a existência de um alto nível de dimetilação de H3K4 no X inativado, mas não observaram nenhum envolvimento direto da trimetilação diferencial em H3K9 ou H3K27 na expressão assimétrica de *Xist*. Em contraste, outro estudo sugeriu que a trimetilação da lisina 27 na histona H3 (H3K27) teria um papel crucial na designação do alelo ativo de *Xist* (SADO et al. 2005). Entretanto ainda não está claro se estas modificações na cromatina estão envolvidas no estabelecimento da expressão monoalélica de *Xist* ou somente em sua manutenção (KANDURI et al., 2009).

Recentemente, Shibata et al. (2008) sugeriram que machos de camundongos podem manter *Xist* em um estado reprimido sem *Tsix*, indicando a participação de um fator (adicional) na proteção do único X da inativação e a metiltransferase de histona Eed estaria envolvida neste processo.

Em 2008, Zhao et al. propuseram um novo modelo de IX em camundongos, nele *Tsix* funciona como antagonista de *Xist*, se liga ao grupo protéico policombinado (PcG), PRC2, e compete com um RNA não codificador de proteína (cnRNA), localizado em *Xist*, chamado RepA e inibe a interação RepA-PRC2. Quando *Tsix* tem sua expressão reduzida no futuro Xi, ocorre a interação RepA-PRC2, tem-se a metilação da região promotora de *Xist* e sua trans-ativação é habilitada (Figura 4).

b)

Figura 1. Centro e etapas da inativação do cromossomo X. a) Esquema simplificado do Xic e seus elementos funcionais. Regiões verde, amarelo e laranja correspondem aos genes funcionais, com seus transcritos não traduzidos (linhas verdes, amarela e laranja). Regiões em azul correspondem aos genes que codificam proteína, mas não possuem relação funcional no Xic. A região candidata para o *locus Xce* está indicada com seta preta. (b) Prováveis elementos envolvidos em cada etapa (modificado de Heard, 2004).

I.3.3 Placenta e Inativação do Cromossomo X

Células embrionárias de mamíferos placentados sofrem inativação aleatória do cromossomo X, isto é, ora o cromossomo X paterno é inativado, ora o X materno é inativado. Este mecanismo de inativação aleatório é baseado no RNA não codificador (ncRNA) denominado *XIST*, que é único em mamíferos placentados e não foi encontrado em marsupiais (DURET et al., 2006, MIKKELSEN et al., 2007).

A força evolutiva entre a inativação aleatória do cromossomo X e a emergência da regulação do *XIST* não está clara, no entanto, este ncRNA poderia ter sido a combinação de circunstâncias ambientais e a pressão seletiva para os mamíferos placentados. Supõe-se que a expansão dos mamíferos placentados foi uma consequência da mudança nos níveis de oxigênio há 200 milhões de anos (FALKOWSKI et al, 2005).

O sistema placentário requer um ambiente com alta concentração de oxigênio devido ao seu transporte ineficiente da circulação materna para o desenvolvimento embrionário. Este sistema tornou-se mais eficiente com a elevação dos níveis globais de oxigênio e resultou em uma maior demanda reprodutiva nas fêmeas de mamíferos. Especula-se que, como consequência desta demanda aumentada nas fêmeas, a pressão seletiva para a evolução de características avançadas nos mamíferos tornou-se limitada para os machos (GRAVES, 2006).

A inativação aleatória do cromossomo X em fêmeas de mamíferos placentados gera um mosaico de células, mascarando o efeito de mutações deletérias e aumentando o desempenho reprodutivo (FRANCO & BALLABIO, 2006). Ng et al. (2007) postularam que o benefício obtido em proteger as fêmeas contra mutações potencialmente deletérias coloca a inativação aleatória do cromossomo X como uma vantagem seletiva para os mamíferos placentados.

I.3.4 Metilação do DNA e Inativação do Cromossomo X

A metilação do DNA é essencial para alguns dos processos envolvidos no desenvolvimento, incluindo a manutenção do estado inativado de um dos cromossomos X. Principalmente na região 5' aos genes dos dois cromossomos X o padrão de metilação apresenta-se diferente, de modo que no Xa as ilhas CpG encontram-se não metiladas e no Xi as mesmas regiões estão metiladas. Entretanto, os padrões globais de metilação no Xa e no Xi são desconhecidos (THURSTON et al., 2007).

Uma vez metilados, os dinucleotídeos são alvos específicos para ligação pela enzima MeCP2, promovendo o sinal inicial para a repressão da transcrição. A partir de sua ligação às seqüências promotoras CpGs metiladas, ocorre o reconhecimento por um complexo composto de um co-repressor de transcrição (Sin3a) e uma desacetilase de histona (HATs-histonas acetil-transferases). Esta irá retirar grupamentos acetil dos resíduos de lisina próximos aos N-terminais das histonas, modificando, assim, a conformação da molécula de DNA, tornando-a mais compacta e dificultando a transcrição (JAENISCH & BIRD, 2003).

I.3.5 Proteína CTCF e Inativação do Cromossomo X

O silenciamento transcricional de alguns genes por metilação do DNA pode ser mediado por fatores protéicos que se ligam especificamente em sítios metilados ou não. Estudos apontam a proteína ligadora CTCF, com ação isoladora (em *trans*), na regulação do mecanismo de *imprinting* dos genes *H19/Igf2* presentes no cromossomo 11 (BELL & FELSENFELD, 2000; CHAO et al., 2002; RIOS, 2003). Alguns autores acreditam que a proteína CTCF esteja também envolvida no processo da inativação do cromossomo X (CHAO et al., 2002; LEE, 2003).

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

Em 2002, Chao et al. propuseram a existência de um fator bloqueador em zigotos e outro fator protetor materno, os quais atuam através da CTCF para promover a expressão do *Tsix* no Xa. No Xi, a ligação da CTCF é excluída do *Tsix*, possivelmente por metilação, promovendo a expressão do *Xist* (Figura 2).

Em 2003, Lee propôs outro modelo de ligação da CTCF ao futuro Xa, prevenindo a transcrição de *Xist*, bloqueando a comunicação de *Xist* com um proposto *enhancer* localizado *downstream* em relação a este gene. Dada à posição de CTCF na região 5' de *Tsix*, é considerada a possibilidade da atuação de CTCF como um ativador transcricional direto ou como *enhancer* do gene *Tsix* (Figura 3).

Estudos tem identificado múltiplos sítios de ligação de CTCF dentro das ilhas CpG de *Tsix*, região que corresponde às repetições anteriormente chamadas de DXPas34, as quais afetam o silenciamento de maneira dependente de metilação em um dos dois cromossomos X. *In vitro*, a metilação dos sítios *Tsix* previne a ligação de CTCF (CHAO et al., 2002; LEE,

2003; LATHAM, 2005; BOUMIL et al., 2006) e os sítios de ligação de CTCF podem bloquear a ação do *enhancer* sobre o promotor do gene, sugerindo que os sítios em *Tsix* também tenham atividade de isolar a cromatina (LEE, 2003). Também foram encontrados sítios de ligação em *Xite* (XU et al., 2006, 2007). Interessantemente, a presença de *loops* intracromossômicos foram observados especificamente entre *Tsix* e *Xite* no Xi durante os eventos de contagem e escolha por contar (TSAI et al., 2008). Nos domínios genômicos responsáveis pela interação e formação dos *loops* foram encontrados sítios de ligação de CTCF sugerindo seu envolvimento (PHILLIPS & CORCES, 2009).

Figura 2. Esquema do modelo de regulação da expressão do gene *Xist* com CTCF como bloqueadora no processo de IX. Neste modelo um fator bloqueador em zigoto e outro fator protetor materno atuam através da CTCF (bloqueador) para promover a expressão do *Tsix* no X ativo. Nele é formada uma fronteira isoladora, através da ligação de CTCF nos sítios não metilados presentes em *Tsix*. Isso impede o acesso de *enhancers* (não identificados) ao *Xist*, localizados *downtream* em relação a este, gene e conseqüentemente é promovida a expressão de *Tsix* no Xa, que impede o acúmulo de RNA *Xist* no mesmo. No Xi a ligação da CTCF é excluída do gene *Tsix*, possivelmente por metilação, promovendo então a expressão do *Xist* através do acesso de *enhancers* localizados *downtream* de *Xist* (modificado de Chao et al., 2002).

Figura 3. Esquema do modelo de regulação da expressão do gene *Xist* com CTCF como ativadora direta da transcrição no processo de IX. Neste modelo a proteína CTCF se liga na região 5' de *Tsix* do futuro Xa e atua como ativador direto da transcrição deste gene, prevenindo assim, a transcrição de *Xist*. No Xi é excluída a ligação da proteína na região 5' de *Tsix*, não se sabe se por metilação ou não, ocorrendo assim a transcrição do gene *Xist*. Ainda não foram encontrados elementos compartilhados do *enhancer* para *Xist/Tsix* (modificado de Lee, 2003).

Figura 4. Esquema do modelo de regulação da expressão do gene *Xist* com *Tsix* como antagonista. *Tsix* e RepA (amarelo) competem para se ligarem ao grupo proteico policombinado (PRC2) (círculos vermelhos) e *Tsix* é reprimido no futuro Xi. Em seguida RepA recruta PRC2 para *Xist* ativando-o. Este inicia a distribuição de PRC2 em cis e a inativação do cromossomo X é estabelecida (modificado de Jing Zhao, 2008).

1.3.6 Inativação Preferencial do Cromossomo X e Pré-eclâmpsia

A decisão de qual cromossomo X deve ser inativado (materno ou paterno) ocorre no início do desenvolvimento, próximo ao momento de implantação do embrião (MIGEON, 2007). Uma divergência da porcentagem normal de IX (50% de cada alelo), é conhecida como inativação preferencial (IXP) e é determinada quando observa a inativação do mesmo alelo em 75%-80% das células (e inativação preferencial “extrema” quando 90-95% das células apresentam o mesmo alelo ativo) (MINKS et al., 2008).

O padrão de IXP foi relatado em tecidos somáticos de indivíduos saudáveis (GALE et al., 1994a; 1994b; RACCHI et al., 1998; SHARP, 2000) e em algumas famílias normais (NAUMOVA et al., 1996; PLENGE et al., 1997). Alguns pesquisadores verificaram que o padrão de IX é tecido-específico (GALE et al., 1994; 1994b; ROBINSON & JACOBS, 2000). Existe uma associação de IXP com idade avançada (BUSQUE et al., 1996; KASSAR et al., 1998; ROBINSON & JACOBS, 2000). Pouco é conhecido sobre a IX em tecidos embrionários no início do desenvolvimento (ZENG & YANKOWITZ, 2003).

A IXP pode resultar de uma seleção celular (IXP secundária ou adquirida) que ocorre após a IX ou ao acaso (IXP primária). Além disso, podem existir variantes controlando a escolha inicial do futuro X inativado, resultando na IXP, como, por exemplo, o *locus Xce* em camundongos (AMOS-LANDGRAF et al., 2006; CLERC & AVNER, 2006). Embora o mecanismo exato responsável por este efeito ainda tenha que ser elucidado foi sugerido que alelos *XCE* similares possam existir em humanos (NAUMOVA et al., 1998) (Figura 5).

A IXP pode refletir ou resultar em consequências biológicas nas fêmeas. Na maioria dos casos a razão para IXP “extrema” é a seleção celular após a inativação devido a uma anormalidade de um dos cromossomos X afetando a proliferação em todas as células do embrião ou agindo de maneira tecido-específica. Na maioria das fêmeas portadoras de translocação balanceada envolvendo cromossomos X/autossomo, o X normal é preferencialmente inativado, devido à inviabilidade de células monossômicas para autossomos, enquanto que para translocações não balanceadas o X geralmente inativado é o anormal (DISTECHE, 1984; SCHMIDT & DU SART, 1992).

Recentemente, a IXP foi associada com vários diagnósticos, incluindo falência ovariana precoce, aborto espontâneo recorrente, várias doenças autoimunes e alguns cânceres (KRISTIANSEN, et al., 2002; BRETHERICK et al., 2005; OZBALKAN et al., 2005)

Uz et al. (2006), estudando um grupo de mulheres com PE, evidenciaram o padrão preferencial de IX. Até o momento, a causa da IXP em mulheres com PE não é conhecida. Possivelmente, o mecanismo inclui a IXP como causa da doença ou ,alternativamente, a causa da PE também originou a IXP.

Figura 5. Inativação preferencial do cromossomo X (IXP) em fêmeas. A IXP pode ser resultado de uma inativação não aleatória primária ou de uma IX adquirida. Há dois cromossomos X ativos no embrião feminino, um de cada pai (materno e paterno; X^m e X^p , respectivamente). Na IX, um dos cromossomos X é inativado (círculos pretos). Subseqüentemente, o crescimento aleatório ou seletivo de uma população de células, com o X paterno ou o X materno inativados (círculos rosas ou azuis, respectivamente), conduz à IXP. Porém, se o processo de IX fosse influenciado por um alelo (análogo ao alelo de camundongo, X^{ce}) então a IX poderia ser dirigida preferencialmente para um dos alelos (paterno ou materno) (modificado de Minks et al, 2008).

I.4 O Gene AR

O receptor de andrógeno (AR) é membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição ativados por hormônios (ZHOU et al., 1994; CALLEWAERT et al., 2003; ROBINSON-RECHAVI et al., 2003). Os esteróides desempenham um importante papel no controle da expressão gênica, por meio de sua união com receptor específico. Uma vez ativado, os receptores agem controlando a transcrição, ligando-se em sequências

específicas do DNA chamadas elementos de resposta hormonal (HREs) (LUKE & COFFEY, 1994).

A ação androgênica da testosterona e da dihidrotestosterona se faz através da ligação de um único receptor, o AR, que regula vários genes necessários ao desenvolvimento e diferenciação do fenótipo masculino e manutenção das funções reprodutivas normais (LUKE & COFFEY, 1994; HIORT, 2000). Nas fêmeas, o AR é expresso no ovário, principalmente as células da granulosa, sugerindo seu envolvimento na foliculogênese (KIMURA et al., 2007).

O gene do receptor de andrógeno humano (*HUMARA*) está localizado na região Xq11.12 (LUBAHN et al., 1988), possui oito exons e tem aproximadamente 70-90 Kb (QUIGLEY et al., 1995). Somente 17% é traduzido, o restante (83%) é utilizado para o controle da transcrição e no processamento do RNA. Como outros membros da família de receptores nucleares, o AR apresenta três domínios principais. Sua estrutura inclui um domínio N-terminal de transativação (TAD), codificado em sua maior parte pelo éxon 1, um domínio central de ligação ao DNA (DBD) codificado pelos exons 2 e 3, e o domínio C-terminal de ligação ao homônimo (LBD) codificado pelos exons 4 a 8 (FERLIN et al., 2004; BROOKE & BEVAN, 2009) (Figura 6).

O receptor possui duas regiões de repetições em *tandem*, caracterizadas como microsatélites, polimórficas no éxon 1, caracterizadas por números diferentes de repetições CAG e GGC resultando em tamanhos variados de poliglutamina e poliglicina, variando em homens normais de 10 a 35 aminoácidos (com uma média de 21-23) e 4 a 24 aminoácidos (com uma média de 16-17), respectivamente. As repetições mais longas de AR resultam em uma atividade transcricional reduzida do mesmo, tanto *in vivo* como *in vitro* (CHOONG et al., 1996; BEILIN et al., 2000; DING et al., 2004; 2005). Palazzolo et al. 2008, investigando repetições (CAG)_n, sugeriram que o aumento ou a diminuição destas seqüências interfeririam na regulação transcricional em tecidos específicos.

O domínio de ligação ao DNA do AR possui uma região rica em cisteína que forma alças representando o domínio “dedos de zinco” (*zinc-finger*). Este domínio liga-se a seqüências específicas do DNA, as HREs, levando à ativação de genes pelo andrógeno (Figura 5d) (CHANG et al., 1988, FERLIN et al., 2004).

Figura 6. Esquema do cromossomo X com o *locus* do gene *AR* e organização estrutural do gene e da proteína. Em (a) gene *AR* está localizado em Xq11.12; (b) o gene *AR* apresenta 8 exons separados por introns. (c) cDNA com 8 exons; (d) estrutura da proteína do receptor inclui três domínios principais, um domínio N-terminal de transativação (TAD), um domínio central de ligação ao DNA (DBD), e o domínio C-terminal de ligação ao hormônio (LBD) (modificado de Quigley et al., 1995).

1.5 Teste de *HUMARA* (*human androgen receptor assay*)

O teste de *HUMARA* original foi descrito por Allen et al. (1992) e modificado por Yorifuji et al. (1997). Baseia-se no polimorfismo de CAG repetitivo no gene *HUMARA*, o qual possui dois sítios de restrição para a enzima *HpaII* sensíveis à metilação (Figura 7).

Antes da amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), DNAs genômicos são digeridos pela *HpaII*. Quando um cromossomo X está ativado os sítios *HpaII* não estão metilados e são susceptíveis à digestão pela enzima, não ocorrendo assim, a amplificação pela da PCR, do produto resultante da digestão. Por outro lado, quando um cromossomo X está inativado, esses sítios são metilados e resistem à digestão. Subsequentemente são produzidos produtos de PCR do tamanho esperado (ARAÚJO & RAMOS, 2008) (Figura 7).

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

Essa região de CAG repetitivo presente no exon 1 confere uma heterozigiosidade de aproximadamente 87% e dessa forma, a chance do segundo cromossomo X ter alelo diferente do primeiro é alta; permitindo que ambos os alelos sejam diferenciados após a amplificação por PCR (EDWARDS et al., 1991; YORIFUJI et al., 1997).

Figura 7. Ensaio de *HUMARA*. Quando o cromossomo X está inativado, os sítios de restrição para *HpaII* estão metilados (círculos vermelhos) e resistentes à digestão e a PCR produz fragmentos do tamanho esperado (lado esquerdo da figura). Porém, quando o cromossomo X está ativado os sítios *HpaII* não estão metilados (triângulo invertido) e são susceptíveis à digestão pela enzima, não ocorrendo assim, a amplificação através da PCR, do produto resultante da digestão (lado direito da figura) (Modificou de Araújo & Ramos, 2008).

I.6 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA fita simples de 19–25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (KIM, 2005). Lee et al. (1993) descobriram o primeiro miRNA chamado de Lin-4 (*Lineage-deficient-4*) associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans*. Esta descoberta revelou uma nova dimensão para a complexidade do controle traducional (BOREL & ANTONARAKIS, 2008).

A maioria dos miRNAs é evolutivamente conservada em espécies relacionadas e alguns são conservados entre invertebrados e vertebrados (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LEE & AMBROS, 2001). Muitos apresentam padrão de expressão tecido-específico bem definido (WIENHOLDS & PLASTERK, 2005). Em mamíferos, a especificidade de expressão de muitos deles ainda não foi investigada (LANDGRAF et al., 2007).

Apesar de suas funções não estarem totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs atraiu muitas pesquisas nesta área pelas evidências sugestivas de que estas moléculas apresentam um papel fundamental em diversos processos biológicos. Em mamíferos, estes pequenos RNAs foram associados à regulação da proliferação, apoptose, diferenciação, hematopoiese, entre outras funções (ESAU et al., 2004; CHEN et al., 2005; PARK & PETER, 2008).

Até 2008, 678 miRNAs diferentes foram identificados em humanos, e estudos bioinformáticos estimam que este número supere 1000 miRNAs, constituindo uma das maiores classes de reguladores gênicos. Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida de RNAs mensageiros (RNAm)-alvo. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis protéicos de seus genes-alvo (BOREL et al., 2008).

Baseado na localização genômica os miRNAs foram classificados em três grupos: (1) miRNA exônico, presentes em regiões de unidades transcricionais não codificadoras de proteínas; (2) miRNA intrônico, localizados em genes que codificam proteínas; (3) miRNA intrônico, presentes em genes não codificadores. Alguns miRNAs apresentam sobreposição entre *introns* e *exons* dependendo do padrão de *splicing* alternativo (KONG & HAN, 2005; KIM, 2005). Em 2001, Lee & Ambros revelaram que 70% dos miRNAs estão localizados em *introns* e *exons*, o restante (30%) encontram-se em regiões intergênicas.

I.6.1 Regulação Pós-transcricional dos MicroRNAs

A regulação exercida pelos miRNAs na região 3' não traduzida depende do grau de complementaridade com o RNAm-alvo, podendo ocorrer por inibição da tradução ou

degradação do RNAm. O pareamento imperfeito com o RNAm ocasiona a inibição traducional do alvo, sendo o mecanismo principal de atuação dos miRNAs em mamíferos (LEWIS & SHIH, 2003).

Em função dos miRNAs possuírem sequências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos RNAm-alvo, contrariamente, vários miRNAs diferentes podem se ligar a um único alvo e regulá-lo de forma cooperativa (LEWIS & SHIH, 2003; BRENNECKE et al., 2005).

Alguns estudos indicam que um miRNA pode regular 200 RNAs apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória de sinalização celular. Em plantas, a regulação dos miRNAs ocorre principalmente através de sua interação perfeita com o RNAm, levando-o à degradação [mecanismo de RNA de interferência (RNAi)]. No entanto, já se têm exemplos da ocorrência deste silenciamento gênico também em mamíferos (VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006).

1.6.2 Biogênese dos miRNAs

Em um primeiro momento o gene do miRNA é transcrito pela RNA polimerase II, gerando um longo transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) contendo cap 5' e cauda poli(A) (LEE et al., 2004). Ele apresenta uma estrutura *hairpin* em seu arcabouço que é clivada ainda no núcleo pela RNase III, Drosha, e seu cofator DGCR8 (**DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8**), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA, com aproximadamente 60-70 nucleotídeos. Em seguida, o pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5), proteína de exportação nuclear que utiliza Ran-GTP como cofator (BASYUK et al., 2003; LEE et al., 2003). No citoplasma, o pré-miRNA é submetido a um segundo processamento realizado pela enzima Dicer, outra RNase III, gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos (BERNSTEIN et al., 2001). Este produto é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (**RNA-Induced Silence Complex**), que inclui as proteínas Argonautas como principais componentes. Esse *duplex* de miRNA (miRNA: miRNA*), que contém tanto a fita de miRNA maduro quanto sua fita *anti-sense* (miRNA*), é então separado e uma das fitas permanece no complexo RISC e é selecionada como miRNA maduro para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo (KIM, 2005). O miRNA maduro modula a expressão gênica através da ligação por complementariedade ao RNAm alvo de dois modos: provocando sua degradação (pareamento total) ou inibindo sua tradução (pareamento parcial) (LEWIS & SHIH, 2003) (Figura 8).

Figura 8. Biogênese do microRNA. Inicialmente os genes de microRNAs são transcritos pela RNA polimerase II para gerar um transcrito primário (pri-mirRNA). Posteriormente, o pri-MiRNA, é processado pela enzima Drosha conduzindo a formação do pré- Mirna, que apresenta uma estrutura *hairpin*. Em seguida, a exportina 5 transporta o pré-miRNA para o citoplasma. Nele o pré-miRNA é processado pela Dicer que produz o microRNA fita simples maduro que é incorporado ao complexo RISC (RNA-induced silencing complex). Este complexo dirige o MicroRNA ao mRNA alvo que conduz a degradação do RNAm alvo ou a repressão da tradução (modificado de Urbich et al., 2008)

I.6.3 MicroRNAs e Pré-eclâmpsia

Muitos miRNAs são expressos abundantemente na placenta humana (LIM et al., 2005). Pineles et al. (2007) estudando a expressão de miRNAs em placentas de mulheres com pré-eclâmpsia (PE), detectaram um padrão alterado de expressão de dois miRNAs (miR-210 e *miR-182*). A expressão aumentada de miRNA na PE sugere uma diminuição na expressão de potenciais genes-alvo, os quais podem contribuir para a patogênese desta doença.

A hipóxia placentária após o primeiro trimestre de gestação foi associada com: dano do trofoblasto viloso, impactos no transcriptoma do trofoblasto, diferenciação, função metabólica e apoptose, que provavelmente contribuem para patofisiologia da restrição do crescimento fetal (RCF) ou da PE (VAIMAN et al., 2005). O comprometimento da angiogênese é uma das características fundamentais da PE, e os miRNAs estão fortemente envolvidos neste processo (PINELES et al., 2007).

I.6.4 MicroRNAs e cromossomo X

A expressão de miRNAs é controlada e parece ser específica em diferentes órgãos e tipos celulares. Os miRNAs *miR-221* e *miR-222*, mapeados no cromossomo X, estão altamente expressos em células endoteliais de cordão umbilical humano (KUEHBACHER et al., 2007; KIM et al., 2008). Eles atuam diminuindo os níveis de c-kit, um receptor para o fator de células tronco, mas não os níveis de RNAm, indicando que miR-221 e miR-222 afetam a expressão de c-kit a partir do bloqueio da tradução da proteína. Conseqüentemente ocorre a diminuição da atividade angiogênica normalmente induzida por este ligante, fator de células-tronco. (POLISENO et al., 2006).

O *miR-223*, também ligado ao cromossomo X, mostrou-se altamente expresso nas membranas corio-amniótica. Em humanos elas estão envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos durante a gravidez, tais como acomodação e proteção fetal e resposta a infecção intra-amniótica na gravidez (MONTENEGRO et al., 2007).

Por estarem mapeados no cromossomo X os microRNAs *miR-221*, *miR-222* e *miR-223* estão sujeitos ao mecanismo de inativação do cromossomo X (POLISENO et al., 2006).

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo geral

Estudar o padrão de inativação do cromossomo X e da expressão do gene *XIST* e de microRNAs mapeados no cromossomo X na pré-eclâmpsia

II.2 Objetivos específicos

1. Verificar o padrão de inativação do cromossomo X [presença de inativação preferencial do cromossomo X (IXP)] em sangue periférico de pacientes com pré-eclâmpsia (PE) e tecido placentário provenientes de gestações com feto do sexo feminino pelo ensaio de *HUMARA* qualitativo e semi-quantitativo.

2. Verificar o perfil de expressão do gene *XIST* em tecido placentário de pacientes com PE a partir da metodologia de PCR em tempo real.

3. Verificar o perfil de expressão dos microRNAs miR-221, miR-222 e miR-223 mapeados no cromossomo X em tecido placentário de pacientes com PE e do grupo controle a partir da metodologia de PCR em tempo real.

III. CASUÍSTICA

III.1 Aspectos Éticos do Projeto

Este projeto faz parte de outro trabalho, mais amplo, envolvendo pacientes com síndromes hipertensivas gestacionais, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) de acordo com o Processo HCRP nº 4628/2004 e pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o número 25000.080992/2004-11.(Anexos A e B).

III.2 Pacientes

As pacientes foram recrutadas durante sua internação na enfermaria, onde foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .

Foram selecionadas 18 pacientes com diagnóstico de PE (Tabela 2), realizado pela Equipe Médica do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP, segundo a classificação proposta pela *International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy* (ISSHP) (Brown *et al.*, 2001) e os critérios do *National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy* (NHBPEP, 2000).

O grupo controle foi composto por 40 mulheres da população geral (Tabela 1), internadas na mesma enfermaria, voluntárias, sem história de PE/E durante a gravidez ou gravidezes anteriores (ou em parentes de primeiro grau), sadias, sem hipertensão e/ou proteinúria alta, com idade similar ao grupo principal (+ou- 5 anos) e sem relação biológica com o grupo de estudo.

Os dados sobre a gravidez (idade gestacional, idade, etc) e dos recém-nascidos (peso, sexo, etc) foram obtidos por entrevista com as pacientes e pelos prontuários médicos.

Os recém-nascidos foram classificados em AIG (recém-nascido adequado para a idade gestacional), GIG (recém-nascido grande para a idade gestacional) e PIG (recém-nascido pequeno para idade gestacional) utilizando-se a curva de peso relacionado a idade gestacional considerado $\geq p10$ e $\leq p90$ (JUDITH HALL, 2006).

Tabela 1: Pacientes do grupo controle.

nº caso	nº registro laboratorial	Idade (anos)	IG	Sexo RN	Classificação RN
1	496	23	37s 3d	F	AIG
2	776	26	40s4d	M	AIG
3	778	35	40s3d	M	AIG
4	779	19	41s3d	M	AIG
5	782	34	38s4d	F	AIG
6	784	20	40s4d	F	AIG
7	787	35	40s4d	M	AIG
8	789	38	40s4d	F	AIG
9	791	32	39s6d	M	AIG
10	848	25	34s3d	F	AIG
11	968	23	41s	M	AIG
12	1129	26	39s2d	M	GIG
13	1135	22	41s1d	M	AIG
14	1136	29	41s1d	M	AIG
15	1138	25	39s6d	M	AIG
16	1139	29	40s2d	M	AIG
17	1142	40	39s	M	AIG
18	1155	33	40s	F	AIG
19	1156	23	40s1d	M	AIG
20	1160	32	41s3d	F	AIG
21	1161	38	37s1d	F	AIG
22	1165	25	37s6d	F	AIG
23	1170	30	40s1d	M	AIG
24	1172	18	40s5d	F	GIG
25	1174	22	37s2d	M	AIG
26	1178	42	38s5d	F	AIG
27	1179	16	37s1d	F	PIG
28	1182	23	41s4d	M	AIG
29	1206	25	38s1d	M	AIG
30	1209	20	38s1d	M	AIG
31	1213	22	41s3d	M	AIG
32	1281	27	38s5d	M	AIG
33	1282	16	34s2d	F	AIG
34	1287	31	40s5d	M	AIG
35	1289	28	38s3d	M	AIG
36	1294	37	40s4d	F	AIG
37	1300	18	39s5d	F	PIG
38	1302	23	41s1d	M	AIG
39	1303	37	38s1d	F	PIG
40	1304	30	40s4d	F	GIG

(IG): idade gestacional; (s): semanas; d: dias; (RN): recém-nascido; (F): feminino; (M): masculino; (AIG): recém-nascido adequado para a idade gestacional; (GIG): grande para a idade gestacional; (PIG): pequeno para a idade gestacional.

Tabela 2: Pacientes com pré-eclâmpsia.

nº caso	nº registro laboratorial	Idade (anos)	IG	Sexo RN	Classificação do RN
41	517	15	33s 6d	M	GIG
42	567	32	35s 3d	M	AIG
43	623	34	34s	F	PIG
44	638	30	32s2d	M	AIG
45	639	33	41s3d	F	GIG
46	696	27	32s	F	AIG
47	810	17	39s6d	M	AIG
48	909	35	33s5d	F	AIG
49	971	25	40s5d	F	AIG
50	973	28	34s1d	F	AIG
51	1144	31	39s	M	AIG
52	1147	36	37s6d	F	AIG
53	1148	31	40s3d	M	AIG
54	1152	40	39s3d	M	AIG
55	1215	26	33s6d	F	AIG
56	1284	33	39s	F	PIG
57	1301	24	35s4d	M	AIG
58	1321	25	40s3d	F	AIG

(IG): idade gestacional; (s): semanas; d: dias; (RN): recém-nascido; (F): feminino; (M): masculino; (AIG): recém-nascido adequado para a idade gestacional; (GIG): grande para a idade gestacional; (PIG): pequeno para a idade gestacional.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Grupo de Genética de Reprodução do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo (FMRP-USP), em colaboração com o Departamento de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, e com apoio do Laboratório de Endocrinologia Molecular do Departamento de Clínica Médica da mesma faculdade.

IV.1 Coleta de Material

A coleta de sangue periférico e tecido placentário (vilosidade coriônica) foi realizada após o esclarecimento as pacientes sobre a pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .

IV.1.1 Amostra de sangue periférico

Foram coletadas amostras (3 a 10mL) de sangue periférico materno, à vácuo, em tubos estéreis contendo EDTA para as análises moleculares.

IV.1.2 Amostra de tecido placentário (vilosidade coriônica)

As amostras de tecido placentário (vilosidade coriônica) foram obtidas imediatamente após o parto com auxílio de bisturi estéril sendo retirados seis fragmentos (quatro para extração de RNA total e dois para extração de DNA) de aproximadamente 3cm³. Os fragmentos foram rigorosamente lavados com solução fisiológica (NaCl 0,9%), permanecendo apenas as vilosidades coriônicas. Este material foi imediatamente colocado em microtubos cônicos (tipo “*eppendorff*”) contendo 50µL de solução RNA/*lateral*[®](Ambion) para extração de RNA, que permaneceram a 4°C por uma noite facilitando a ação do criopreservador e, posteriormente, foram estocadas a -80°C. Para a extração de DNA os fragmentos foram colocados em tubos contendo 50µL de solução fisiológica (NaCl 0,9%) que permaneceram a -80°C até o seu processamento.

IV.2 Extração de RNA total

As amostras foram lavadas por três vezes em solução de PBS (1X) (NaCl 8,50g/L; Na₂HPO₄ 1,11g/L; Na₂HPO₄12H₂O 2,81g/L; KH₂PO₄ 0,20g/L pH7,0) a 7.000rpm por 5 minutos para retirar o criopreservador dos tecidos. Inicialmente, o tecido foi macerado em nitrogênio líquido. Em seguida, extraiu-se o RNA total (50mg de tecido) com TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen Life Technologies, Paisley, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA total permaneceu armazenado a -80°C para procedimentos posteriores.

IV.3 Extração de DNA

Para a extração do DNA [sangue periférico materno e tecido placentário (porção fetal) macerado em nitrogênio líquido] foi realizada uma modificação no protocolo de extração e precipitação de DNA em NaCl (OLERUP & ZETTERQUIST, 1992). Na extração, as amostras de vilosidade coriônica foram lavadas por três vezes em NaCl 0,9% e centrifugadas a 14.000rpm por 20 segundos e duas vezes em tampão de lise celular [Sacarose 0,32M; Tris HCl (pH 7,5) 12mM; MgCl₂ 5,0M; Triton X 1,0%] a 13.000rpm por 20 segundos. A seguir, as amostras foram incubadas a 55°C por 16 horas com 80μL de tampão de proteinase K (5X) [NaCl 0,375M; EDTA (pH8,0) 0,12M], 7,0μL de proteinase K (25ng/mL), 10μL de SDS 20% e 283,3μL de água destilada. A precipitação em etanol ocorreu em 1,0mL de etanol a -20°C, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 13.000rpm a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* restante desidratado. O *pellet* foi ressuspensionado em 50μL de água deionizada.

IV.4 Análise Molecular

IV.4.1 Testes para exclusão de contaminação

Foram realizadas análises dos polimorfismos (*IGF2/ApaI* e *H19/RsaI*) (GOMES, 2003) para todas as amostra [sangue periférico materno e tecido placentário (vilosidade coriônica) para confirmação da origem do tecido placentário coletado como sendo da porção

fetal, excluindo assim, uma possível contaminação com tecido materno [sangue periférico e/ou placenta (porção materna)]. Nos casos não informativos, para os dois polimorfismos estudados (*IGF2/ApaI* e *H19/RsaI*), provenientes de placentas de gestações com recém-nascidos (RN) do sexo masculino, também foram realizadas a pesquisa da seqüência Y-específica (gene *TSPY*) para confirmação da presença do cromossomo Y no tecido placentário. O restante dos casos (tecido placentário proveniente de gestações com recém-nascidos do sexo feminino) a contaminação foi excluída a partir da confirmação da origem parental de cada um dos cromossomos X [X paterno (Xp) e X materno (Xm)].

IV.4.2 Análise do Padrão de Inativação do Cromossomo X

Para análise molecular do padrão de inativação do cromossomo X foram utilizadas duas metodologias: os ensaios de *HUMARA* qualitativo (*HUMARA-Q*) e semi-quantitativo (*HUMARA-SQ*).

IV.4.2.1 Ensaio de *HUMARA* (*Human Androgen Receptor Assay*) (Qualitativo) (*HUMARA-Q*)

Digestão com Enzima de Restrição

Para detecção da presença de inativação preferencial do cromossomo X (IXP) nas pacientes com PE, foi utilizada a enzima de restrição sensível à metilação *HpaII* que reconhece e cliva o sítio polimórfico de restrição CCGG.

Foram utilizadas alíquotas de 2µL dos DNAs genômicos (0,1µg/µL), digeridos com *HpaII* (20U), em 10µL de uma reação contendo 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, por 15 horas a 37°C. Foram usadas alíquotas (5µL) dos DNAs digeridos, para amplificar o segmento contendo CAG repetitivos no gene *HUMARA*. A PCR foi padronizada para os *primers*: *HUMARA-S* e *HUMARA-AS* (Tabela 3). (ALLEN, 1992; YORIFUJI et al., 1997).

PCR (Reação em cadeia da Polimerase)

As reações de amplificação de DNA foram realizadas em aparelho termociclador programável T-gradiente (Biometra). A PCR foi desenvolvida em um volume de 25µL, contendo 10 mM Tris HCl (pH 8,3); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; dNTP (0,1mM de cada nucleotídeo); 10pmol de cada *primer*, 1U de *Taq* DNA polimerase e 0,1µg de DNA genômico (Tabela 3). Os produtos da PCR foram observados em eletroforese de gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, utilizando TBE 1X (0,045 M de Tris-borato e 0,001M de EDTA) como tampão de corrida (INNIS et al., 1990). Para comparação do padrão de bandas obtido em cada caso, foram aplicados lado a lado, no gel de eletroforese, os DNAs de cada paciente (tecido placentário e sangue periférico sem e com a digestão com a enzima *Hpa*II). Para o controle no gel, juntamente com as amostras, foram aplicados DNAs não digeridos de dois homens normais e DNAs sem e com digestão com a enzima de uma mulher normal simultaneamente.

Tabela 3. Par de *primers* utilizado para o ensaio de *HUMARA*

<i>Primers</i>	Sequências	Tamanho dos fragmentos amplificados (pb)
<i>HUMARA-S</i>	5'- GTGCGCGAAGTGATCCAGAA-3'	211-292
<i>HUMARA-AS</i>	5'-CCAGGACCAGGTAGCCTGTG-3'	(245)*

(*HUMARA-S*): *primer sense*; (*HUMARA-AS*): *primer antisense*; (pb): pares de bases;

* média de tamanho do fragmento amplificado.

IV.4.2.2 Ensaio de *HUMARA* (Human Androgen Receptor Assay) (Semi-quantitativo) (*HUMARA-SQ*)

Para a detecção de IXP utilizando a eletroforese capilar foram realizados os mesmos procedimentos [digestão com enzima de restrição (*Hpa*II) e PCR] e sequência de *primers* (Tabela 3) realizados no ensaio de *HUMARA* qualitativo. Entretanto, o *primer sense* (*HUMARA-S*) utilizado para o ensaio semi-quantitativo foi marcado com fluoróforo 6-FAM (fluorescência azul) na extremidade 5' (*HUMARA-S**).

Caracterização dos alelos amplificados

Aos produtos PCR realizada com *HUMARA-S** e *HUMARA-AS* (1µL) foram adicionados 8,7µL de formamida (Hi-Di Formamida, *Applied Biosystems*) e 0,3µL do padrão de massa molecular LIZ 500, marcado com o fluorocromo LIZ™ (fluorescência laranja) (*Applied Biosystems*). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese capilar com o polímero POP7 (*Applied Biosystems*), utilizando a plataforma ABI Prism™ 3130 *Genetic Analyzer*. Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando o programa *GeneMapper*^M (*Applied Biosystems*). Para a detecção da presença da inativação preferencial do cromossomo X (IXP) foram analisados os produtos da PCR de todas as amostras [sangue periférico materno e tecido placentário (vilosidade coriônica)] digeridos com a enzima sensível à metilação *HpaII* e não digeridos. A IXP foi calculada a partir da somatória das áreas e posterior divisão dos valores dos picos isoladamente. Foram considerados informativos para IXP somente os casos em que foi possível observar a frequência ≥70% de um alelo em relação ao outro (Figura 9).

Figura 9. Calculo de Inativação preferencial (IXP)

(VA): Valor da área do pico do alelo A; (VB): Valor da área do pico do alelo B; X: Frequência do alelo A; (Y): Frequência do alelo B, obtidos por eletroferograma.

IV.4.2.3 Detecção de Inativação Preferencial do Cromossomo X (IXP)

Ensaio de *HUMARA* qualitativo (*HUMARA-Q*)

Como o previsto, quando o ensaio de *HUMARA* qualitativo (*HUMARA-Q*), visualizado após eletroforese em gel de poliacrilamida, foi realizado com DNA extraído de sangue

periférico de mulheres normais, o resultado obtido na maioria dos casos foi a presença de duas bandas de intensidade similar com ou sem a digestão pela enzima (*HpaII*) (Figura 10a). O mesmo padrão de bandas deve ser encontrado em DNA extraído de tecido placentário (porção fetal) proveniente de gestações normais e com RNs do sexo feminino.

No caso de inativação preferencial do cromossomo X (IXP) observa-se o aparecimento de duas bandas de diferentes intensidades. Quando é visualizada apenas uma banda ou duas de diferentes intensidades no gel, fica evidente a presença de inativação. Nos homens normais e em placentas provenientes de gestações de RNs do sexo masculino o resultado esperado após a digestão com a enzima sensível à metilação (*HpaII*) é a ausência de bandas (Figura 10b).

Para comparação do padrão de bandas obtidos em cada caso no ensaio de *HUMARA* (qualitativo) (*HUMARA-Q*), foram aplicado lado a lado, no gel de eletroforese, os DNAs de cada amostra [(sangue periférico materno e tecido placentário (porção fetal))] sem e com a digestão com a enzima *HpaII*. Para o controle no gel, juntamente com os pacientes, foram aplicados DNAs não digeridos de dois homens normais e DNAs sem e com digestão com a enzima (respectivamente) de uma mulher normal.

Ensaio de *HUMARA* semi-quantitativo (*HUMARA-SQ*)

Na eletroforese Capilar, ensaio de *HUMARA-SQ*, é possível quantificar a frequência de inativação de um alelo, em relação ao outro a partir do cálculo da área dos picos. Na maioria dos casos, de sangue periférico de mulheres normais e placenta originária de gestações com fetos do sexo feminino, são visualizados dois picos de áreas similares, e após a digestão com a enzima *HpaII* a razão entre as áreas dos picos se mantém (aproximadamente 50:50) podendo ocorrer pequenas variações (Figura 10c).

Quando é visualizado apenas um pico ou dois de áreas diferentes e razão entre elas é maior ou igual a 70:30 fica evidente a presença IXP no ensaio semi-quantitativo (Figura 10d). Nos homens normais e nas placentas provenientes de gestações com RNs do sexo masculino o resultado esperado após a digestão com a enzima sensível à metilação (*HpaII*) é a ausência de picos.

Figura 10. Esquema dos ensaios de *HUMARA* qualitativo (Q) e semi-quantitativo (SQ) utilizados para detecção de inativação preferencial do cromossomo X (IXP). Geis de poliacrilamida com resultados esperados após a digestão com a enzima *HpaII* (*HUMARA*-Q) comparado com os picos obtidos no ensaio semi-quantitativo (*HUMARA*-SQ) em homem (sem digestão) e mulher (com digestão) normais. (a) resultado de uma mulher normal sem (M) e com (Md) digestão com *HpaII* no ensaio qualitativo. (b) resultado de um homem normal sem (H) e com (Hd) digestão (ensaio qualitativo). (c) resultado de uma mulher normal com digestão com *HpaII* no ensaio semi-quantitativo (d) resultado de um homem normal sem digestão (ensaio semi-quantitativo) (FAM)= fluoróforo utilizado para marcar os primers utilizados no ensaio semi-quantitativo.

IV.4.3 PCR em Tempo Real (*Real time PCR*)

Após a extração de RNA total todas as amostras foram tratadas com DNase I (*Invitrogen Life Technologies*, Paisley, UK). Em seguida, 500ng de RNA total de cada amostra foi transcrito reversamente usando *High Capacity cDNA Archive Kit* (*Applied Biosystems*) segundo as instruções do fabricante. Das 58 amostras coletadas (18 com diagnóstico de PE e 40 controles), somente 30 (13 com diagnóstico de PE e 17 controles) foram submetidas à análise de quantificação relativa (QR) da expressão dos genes selecionados no aparelho *Step One* (*Applied Biosystems*).

As reações foram realizadas utilizando o sistema *TaqMan® Gene Expression Assays* (*TaqMan® MGB probes*, *FAM™ dye-labeled*) da *Applied Biosystems*. As sondas e os *primers* para os genes *XIST* (Hs01046125_m1) e *GAPDH* (Hs99999905_m1) (controle endógeno) e para os microRNAs, *miR-221* (4395207), *miR-222* (4395208) e *miR-223* (4395209) e *miR-16* (ABM000008) (controle endógeno), foram obtidos usando o *Assay-on-Demand™ Gene Expression Products* (*Applied Biosystems*). Para testar a eficiência das sondas e *primers* na reação de amplificação dos genes foram construídas curvas de calibração a partir de diluições seriadas [não diluído (concentração 100ng), 1/3, 1/9, 1/27], em triplicata. A curva-padrão foi construída a partir da curva de calibração. Foram consideradas as curvas-padrão com *slope* entre -3,6 e -3,1.

A PCR em tempo real foi realizada para cada amostra em triplicata seguindo as seguintes condições: 5µL do *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (2x) (*Applied Biosystems*), 0.5µL do *TaqMan® Gene Expression Assay Mix* (20X) (*Applied Biosystems*) e 2µL de cDNA diluído 25ng/µL [genes *XIST* (alvo) e *GAPDH* (controle endógeno), 20 ng/µL [*miR-222* (alvo) e *miR-16* (controle endógeno)] e 100ng/µL [*miR-221* e *miR-223* (alvos) e *miR-16* (controle endógeno)] em volume final de 10µL reação. As condições da reação foram 50°C por 2 minutos, então 95°C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A expressão do gene *XIST* tendo o gene *GAPDH* como controle endógeno e dos microRNAs *miR-221*, *miR-222* e *miR-223* (*miR-16* como controle endógeno) foi quantificada em amostras de tecido placentário (porção fetal) em mulheres normais e com PE a partir da técnica de PCR quantitativo (PCR em tempo real ou *Real time PCR*). Os dados coletados foram analisados pelo método de quantificação relativa do C_T comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_T}$), onde C_T significa ciclo limiar (*Threshold Cycle*). O primeiro delta desse índice representa a diferença entre o C_T do gene de interesse e o C_T do gene utilizado como controle endógeno da reação. O segundo delta representa a diferença entre o primeiro delta da amostra utilizada como “normalizador” e o da amostra analisada pelo método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK

& SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL et.al, 2001). Os valores foram normalizados com uma amostra de tecido placentário (porção fetal) proveniente de uma gestação normal, com idade gestacional de 40 semanas e 4 dias, sem histórico familiar de pré-eclâmpsia (PE) e RN do sexo feminino com peso adequado para idade gestacional.

IV.5 Análise Estatística

Ensaio de *HUMARA* (qualitativo) (*HUMARA -Q*)

Os dados para detecção do padrão de inativação do cromossomo X foram analisados por meio do Teste do Qui-quadrado (χ^2) utilizando-se planilha Excel for Windows e χ^2 . tabelado para 1 g.l. a $P < 0,05$.

As tabelas A - F mostram o resultado do ensaio de *HUMARA* para a detecção de inativação preferencial ou aleatória do cromossomo X nos grupos e tecidos estudados. Os dados foram analisados por meio do Teste do Qui-quadrado (χ^2), considerando como inativação positiva o resultado IXP e como inativação negativa o resultado IXA (tabelas A - F, Apêndice)

As análises foram realizadas entre os dois grupos de estudos e os diferentes tecidos (Gráfico 2)

Ensaio de *HUMARA* (quantitativo) (*HUMARA -SQ*)

Utilizou-se modelo linear generalizado (Proc glm do SAS), considerando como efeitos fixos sexo do RN, tecido (sangue materno ou placenta) e classificação do peso do RN em relação à idade gestacional (AIG, PIG, GIG), para verificar o efeito destas fontes sobre as frequências dos alelos A e B (FA% e FB%), em cada um dos grupos estudados (Controle e PE). O mesmo procedimento (Proc glm) foi aplicado para cada um dos tecidos (sangue materno e placenta), considerando-se como efeitos fixos sexo do RN, grupo (controle e PE) e classificação de idade gestacional (AIG, PIG e GIG), para as respostas FA%, FB%, A e B. Excetuando-se que o modelo para placenta não continha efeito fixo de sexo, já que todas as amostras eram de RN do sexo feminino.

Análise do perfil de expressão do gene *XIST* e microRNAs (*mir-221*, *mir-222* e *mir223*)

Para a análise da expressão relativa do *miR-221* e *miR-222* foi utilizado o modelo linear generalizado (Proc glm do pacote *Statistical Analysis System* - SAS), considerando como efeitos fixos sexo do RN e grupo, para verificar o efeito destas fontes de variação e posterior comparação de médias pelo teste t-Student. Além disso, realizou-se a análise de correlação de Spearman (Proc corr) no SAS, com o objetivo de verificar se as amostras de maior expressão relativa para *miR-221* também eram as de maior expressão relativa para *mir-222*, em cada um dos grupos analisados (Controle e PE).

A comparação de médias para o gene *XIST* foi realizada por meio do Teste t-Student, somente em amostras de placenta com RN do sexo feminino. Como o resultado encontrado para o perfil de expressão do *miR-223* foi zero em todas as amostras, a comparação de médias pelo teste t-Student não pode ser realizada.

V. RESULTADOS

V.1 Testes para exclusão de contaminação

As análises dos polimorfismos (*IGF2/ApaI* e *H19/RsaI*) foram realizadas em parte das amostras (47 casos) de sangue periférico materno e tecido placentário (porção fetal) envolvidas no estudo (GOMES, 2003). Dos casos analisados para o polimorfismo *IGF2/ApaI*, 18 foram informativos para presença de genótipos diferentes (por exemplo: GG e GA) entre as amostras de sangue periférico materno e tecido placentário. Vinte e dois casos foram informativos (por exemplo: AB e BB) para o polimorfismo *H19/RsaI* confirmando a origem do tecido placentário coletado como sendo fetal e excluindo uma possível contaminação com tecido materno [sangue periférico e/ou placenta (porção materna)]. Nos casos não informativos, por presença de homozigose ou por falha na digestão, para os dois polimorfismos estudados (*IGF2/ApaI* e *H19/RsaI*) a exclusão de contaminação foi realizada a partir da análise do tamanho dos alelos provenientes do X paterno e do X materno fornecidos pela eletroforese capilar. Para os casos de tecido placentário provenientes de gestações com RNs do sexo masculino foram realizados testes para confirmação da presença do cromossomo Y (pesquisa do gene Y-específico *TSPY*). Todos os casos confirmaram a presença do gene *TSPY* (Tabelas C e D, Apêndice 1). Em 9 casos de placenta provenientes de gestações com RNs do sexo masculino não foi possível a exclusão da contaminação com tecido materno (Tabelas 4a, 5a e 6a e 7a, Apêndice).

V.2 Detecção de Inativação Preferencial do Cromossomo X (IXP)

Na Tabela 4 é estabelecida uma comparação entre os resultados obtidos a partir do ensaio de *HUMARA-Q* e a eletroforese capilar (ensaio de *HUMARA-SQ*) em tecido placentário e sangue periférico de gestantes (grupo controle) que tiveram filhos do sexo feminino. Nas amostras de sangue periférico testadas utilizando o ensaio qualitativo (17 casos), oito (casos 1, 18, 20, 22, 26, 33 e 36) foram informativos para presença de inativação aleatória do cromossomo X (IXA); enquanto os casos 5, 6, 8, 21, 27, 37 e 39 (sete casos) foram informativos para presença de inativação preferencial (IXP). Os casos 10, 24 e 40 não foram informativos. Entretanto, o ensaio de *HUMARA-SQ*, realizado nos mesmos casos, mostrou-se informativo para IXA [razão da frequência entre os alelos $\leq 70:30$] nos casos 5, 18, 20, 24, 27, 33, 36 e 39 (oito casos), informativo para IXP em 8 casos (1, 6, 6, 8, 21, 22, 26, 37 e 40) e não foi informativo no caso em que foi observada a presença de homozigose (caso 10).

Nas amostras de tecido placentário (17 casos) (Tabela 4), no ensaio qualitativo (*HUMARA-Q*), seis casos (5, 21, 22, 33, 36 e 37) foram informativos para presença de IXA. O mesmo número de casos (6, 8, 10, 20, 27 e 39) foi informativo para IXP e cinco casos (1, 18, 24, 26 e 40) não foram informativos. Na eletroforese capilar, seis casos evidenciaram dois picos de áreas similares (IXA) (razão da frequência entre os alelos $< 70:30$) (casos 5, 8, 21, 33, 36 e 37). A presença de dois picos com áreas diferentes (razão $\geq 70:30$) foi observada nos casos 6, 10, 18, 20, 22, 26, 27, 39 e 40 (nove casos) e não foi informativo em dois casos (1 e 24).

Nos sangues maternos provenientes de gestações normais (grupo controle) e RNs do sexo masculino (Tabela 5), no ensaio qualitativo, os casos 3, 4, 12, 13, 16, 25, 29, 30, 34 e 38 (10 casos) foram informativos para presença de IXA; enquanto os casos 2, 15, 19, 23, 32 e 35 foram informativos para presença de IXP. Os casos 7, 9, 11, 14, 17, 28 e 31 não foram informativos. Na eletroforese capilar, 12 casos foram informativos para presença de dois picos similares (IXA) (razão entre as frequências $< 70:30$) e 8 casos apresentaram picos de áreas desiguais (razão $\geq 70:30$) evidenciando a presença de IXP. O restante dos casos (três casos) (casos 7, 11 e 28) não foi informativos. Os ensaios qualitativo e semi-quantitativo não foram realizados nas amostras de placenta resultante de gravidezes com recém-nascidos do sexo masculino pois o resultado esperado é igual de um homem normal evidenciando uma banda no gel de poliacrilamida ensaio qualitativo) e após a digestão com a enzima *HpaII* ela desaparece, sendo assim na eletroforese capilar na amostra não digerida com a enzima sensível a metilação fica evidente a presença de um pico e após ação da enzima o pico deixa de ser visualizado.

Na Tabela 6 são comparados os resultados obtidos utilizando os ensaios de *HUMARA-Q* e *HUMARA-SQ* entre o tecido placentário (porção fetal) e sangue periférico de gestantes com PE que tiveram filhos do sexo feminino (dez casos). Nas amostras testadas (sangue periférico materno), os casos 43, 45, e 52 indicaram a presença de IXA, os casos 46 e 55 indicaram que um alelo está sendo inativado preferencialmente (IXP) e os casos 48, 49, 50, 56 e 58 não foram informativos. No teste semi-quantitativo, nos casos 46 e 48 ficou clara a presença de dois picos com diferentes áreas (presença de IXP) (razão $\geq 70:30$) o caso 50 não foi informativo. O restante das amostras apresentou IXA (casos 43, 45, 49, 52, 55, 56 e 58). Nas amostras de placenta (porção fetal) originárias de gestações pré-eclâmpicas observou-se a presença de bandas de mesma intensidade após a digestão com a enzima (*HpaII* nos casos 46, 48, 52, e 58) utilizando o ensaio qualitativo. A presença de bandas de intensidades diferentes foi visualizada nos casos 43, 45, e 49 e os casos 50, 55 e 56 não foram informativos. Na eletroforese capilar a diferença das áreas entre os alelos (razão $< 70:30$) não foi observada nos casos 43, 45, 46, 48, 49, 55 e 56, no entanto ela foi vista nos casos 50, 52 e 58.

Na tabela 7 são mostrados os resultados do ensaio qualitativo e semi-quantitativo em sangue periférico de gestantes com PE que tiveram filhos do sexo masculino. Nas amostras testadas utilizando o ensaio de HUMARA-Q, os casos 41, 42, 47 e 51 foram informativos para presença de IXA; enquanto nos casos 44 e 57 a presença de duas bandas de intensidade diferente ficou evidente. Os casos 53 e 54 não foram informativos. Quando as mesmas amostras foram submetidas à eletroforese capilar os diferentes picos (razão $\geq 70:30$) observados nos casos 44, 53 e 57 não ficaram evidentes no restante dos casos onde foi confirmada a presença de IXA (casos 41, 42, 47, 51, e 54).

No gráfico 1 são mostrados os resultados do padrão de inativação do cromossomo X entre os grupos (controle e PE) e os sexos masculino e feminino (em porcentagem).

A Figura 11 mostra os resultados encontrados em gel de poliacrilamida para o ensaio de HUMARA-Q e eletroforese capilar do HUMARA-SQ em amostras de sangue periférico materno (grupo controle). Resultados não informativos (NI) para inativação preferencial do cromossomo X (IXP) dos casos 10 (grupo controle) e 54 (grupo PE) (Tabela 4 e 7).

Figura 11. Resultado da eletroforese do produto da PCR em gel de poliacrilamida (A e B, à esquerda) e eletroforese capilar (A e B, à direita) em amostras de sangue periférico materno; (d) = DNA digerido com a enzima *HpaII*; (sg)= amostras de sangue periférico materno; (pb)= pares de bases; (números 241, 224, 227)= tamanho dos alelos dos casos 10 e 54 respectivamente, estimados pela área da curva do eletroferograma.

A Figura 12 mostra os resultados encontrados em gel de poliacrilamida (*HUMARA-Q*) e eletroforese capilar (*HUMARA-SQ*) em amostras de sangue periférico materno (grupo controle). Os resultados dos casos 23 (grupo controle) e 46 (grupo PE) não foram informativos (NI) para inativação preferencial do cromossomo X (IXP) (Tabelas 5 e 6).

Figura 12. Resultado da eletroforese do produto da PCR em gel de poliacrilamida (A e B, à esquerda) e eletroforese capilar (A e B, à direita) em amostras de sangue periférico materno; (d) = DNA digerido com a enzima *Hpa*II; (sg)= amostras de sangue periférico materno; (pb)= pares de bases; (números 218, 241, 230 e 244)= tamanho dos alelos dos casos 10 e 54 respectivamente, estimados pela área da curva do eletroferograma.

Tabela 4. Resultados dos ensaios de *HUMARA* qualitativo(Q) e semi-quantitativo(SQ) em placentas e sangue materno provenientes de gestações normais (grupo controle) e recém-nascidos do sexo feminino.

nº Caso	Ensaio de <i>HUMARA</i> -Q/Sangue			Ensaio de <i>HUMARA</i> -SQ/Sangue		Ensaio de <i>HUMARA</i> -Q/Placenta			Ensaio de <i>HUMARA</i> -SQ/Placenta	
	<i>H</i> pall-	<i>H</i> pall+	Resultado	FA	FB	<i>H</i> pall-	<i>H</i> pall+	Resultado	FA	FB
1	2(=)	2(=)	IXA	78,7	21,34	1	1	NI	H	H
5	2(=)	2(≠)	IXP	57,9	42,1	2(=)	2(=)	IXA	58,03	41,97
6	2(=)	2(≠)	IXP	81,4	18,6	2(=)	2(≠)	IXP	14,62	85,38
8	2(=)	2(≠)	IXP*	79,1	20,9	2(=)	2(≠)	IXP	38,56	61,44
10	1	1	NI	H	H	2(=)	2(≠)	IXP	80,36	19,64
18	2(=)	2(=)	IXA	67,9	32,12	1	1	NI	89,89	10,11
20	2(=)	2(=)	IXA	61,7	38,28	2(=)	2(≠)	IXP	29,02	70,98
21	2(=)	2(≠)	IXP*	85,5	14,53	2(=)	2(=)	IXA	61,98	38,02
22	2(=)	2(=)	IXA	78,7	21,26	2(=)	2(=)	IXA	73,41	26,59
24	1	1	NI	50,8	49,24	1	1	NI	H	H
26	2(=)	2(=)	IXA	70	30	1	1	NI	77	23
27	2(=)	2(≠)	IXP	67,6	32,44	2(=)	2(≠)	IXP	11,85	88,15
33	2(=)	2(=)	IXA	66,7	33,3	2(=)	2(=)	IXA	40,2	59,8
36	2(=)	2(=)	IXA	59,2	40,83	2(=)	2(=)	IXA	46,29	53,71
37	2(=)	2(≠)	IXP	88,5	11,5	2(=)	2(=)	IXA	40,73	59,27
39	2(=)	2(≠)	IXP	42,4	57,63	2(=)	2(≠)	IXP	83,58	16,42
40	2(=)	2(=)	NI	17,8	82,2	1	1	NI	21,69	78,31

Ensaio de *HUMARA* [Q e SQ]= análises moleculares utilizadas para verificara presença de IXP; (IXP)= inativação preferencial de X; (IXA)= inativação aleatória de X (*H*pall -) = sem digestão com *H*pall; (*H*pall +) = digestão com *H*pall; NI = não informativo para inativação preferencial do cromossomo X; (IXP) = inativação preferencial do cromossomo X; (=) = bandas de mesma intensidade; (≠) = bandas de intensidade diferente; (1-2 nas colunas de *H*pall) = número de bandas; (FA)= frequência do alelo A; (FB)= frequência do alelo B.

Tabela 5. Resultados dos ensaios de *HUMARA* qualitativo(Q) e semi-quantitativo(SQ) em sangue materno provenientes de gestações normais (grupo controle) e recém-nascidos do sexo masculino.

nº Caso	Ensaio de <i>HUMARA</i> -Q/Sangue			Ensaio de <i>HUMARA</i> -SQ/Sangue	
	<i>H</i> pall-	<i>H</i> pall+	Resultado	FA	FB
2	2(=)	2(≠)	IXP	29,8	70,22
3	2(=)	2(=)	IXA	67,1	32,89
4	2(=)	2(=)	IXA	64,5	35,49
7	1	1	NI	H	H
9	1	1	NI	70,9	29,08
11	1	1	NI	H	H
12	2(=)	2(=)	IXA	43,7	56,3
13	2(=)	2(=)	IXA	57,5	42,53
14	1	1	NI	90,1	9,9
15	2(=)	2(≠)	IXP	84,7	15,26
16	2(=)	2(=)	IXA	61,4	38,65
17	1	1	NI	79,4	20,6
19	2(=)	2(≠)	IXP	38,5	61,54
23	2(=)	2(≠)	IXP*	93,5	6,55
25	2(=)	2(=)	IXA	47,4	52,6
28	1	1	NI	H	H
29	2(=)	2(=)	IXA	48,5	51,46
30	2(=)	2(=)	IXA	43,3	56,71
31	1	1	NI	83,3	16,67
32	2(=)	2(≠)	IXP	25,5	74,49
34	2(=)	2(=)	IXA	55,2	44,76
35	2(=)	2(≠)	IXP	36,9	63,1
38	2(=)	2(=)	IXA	65,8	34,22

Ensaio de *HUMARA* [Q e SQ]= análises moleculares utilizadas para verificar a presença de IXP; (IXP)= inativação preferencial de X; (IXA)= inativação aleatória de X (*H*pall -) = sem digestão com *H*pall; (*H*pall +) = digestão com *H*pall; NI = não informativo para inativação preferencial do cromossomo X; (IXP) = Inativação Preferencial do cromossomo X; (=) = bandas de mesma intensidade; (≠) = banda de intensidade diferente; (1-2 nas colunas de *H*pall) = número de bandas; (FA)= frequência do alelo A; (FB)= frequência do alelo B; (H)= indivíduo homozigoto.

Tabela 6. Resultados dos ensaios de *HUMARA* qualitativo(Q) e semi-quantitativo (SQ) em placentas e sangue materno provenientes de gestações com PE e recém-nascidos do sexo feminino.

nº Caso	Ensaio de <i>HUMARA</i> -Q/ Sangue			Ensaio de <i>HUMARA</i> -SQ/ Sangue		Ensaio de <i>HUMARA</i> - Q/Placenta			Ensaio de <i>HUMARA</i> - SQ/Placenta	
	<i>Hpall</i> -	<i>Hpall</i> +	Resultado	FA	FB	<i>Hpall</i> -	<i>Hpall</i> +	Resultado	FA	FB
43	2(=)	2(≠)	IXA	36,2	63,82	2(=)	2(≠)	IXP	42,5	57,5
45	2(=)	2(=)	IXA	44,1	55,9	2(=)	2 (≠)	IXP	57,51	42,49
46	2(=)	1	IXP	7,77	92,23	2(=)	2(=)	IXA	51,87	48,13
48	1	1	NI	78,7	21,34	2(=)	2(=)	IXA	41,66	58,34
49	1	1	NI	41,3	58,7	2(=)	2 (≠)	IXP	53,23	46,77
50	1	1	NI	H	H	1	1	NI	96,6	3,4
52	2(=)	2(=)	IXA	41,7	58,27	2(=)	2(=)	IXA	79,7	20,3
55	2(=)	2(≠)	IXP	40,9	59,1	1	1	NI	57	43
56	1	1	NI	62,5	37,5	1	1	NI	64,5	35,5
58	1	1	NI	61,6	38,38	2(=)	2(=)	IXA	90,2	9,8

Ensaio de *HUMARA* [Q e SQ)= análises moleculares utilizadas para verificara presença de IXP; (IXP)= inativação preferencial de X; (IXA)= inativação aleatória de X (*Hpall* -) = sem digestão com *Hpall*; (*Hpall* +) = digestão com *Hpall*; NI = não informativo para inativação preferencial do cromossomo X; (IXP) = Inativação Preferencial do cromossomo X; (=) = bandas de mesma intensidade; (≠) = banda de intensidade diferente; (1-2 nas colunas de *Hpall*) = número de bandas; (FA)= frequência do alelo A; (FB)= frequência do alelo B; (H)=indivíduo homozigoto.

Tabela 7. Resultados dos ensaios de *HUMARA* qualitativo(Q) e semi-quantitativo(SQ) em sangue materno provenientes de gestações com PE e RNs do sexo masculino.

nº Caso	Ensaio de <i>HUMARA</i> -Q/Sangue			Ensaio de <i>HUMARA</i> -SQ/Sangue	
	<i>H</i> pall-	<i>H</i> pall+	Resultado	FA	FB
41	2(=)	2(=)	IXA	52,1	47,88
42	2(=)	2(=)	IXA	69	31
44	2(=)	2(≠)	IXP	29,5	70,49
47	2(=)	2(=)	IXA	42,3	57,69
51	2(=)	2(=)	IXA	54,5	45,48
53	1	1	NI	76,3	23,66
54	1	1	NI	48,1	51,93
57	2(=)	2(≠)	IXP	79	21

Ensaio de *HUMARA* (Q e SQ)= análises moleculares utilizadas para verificar a presença de IXP; (IXP)= inativação preferencial de X; (IXA)= inativação aleatória de X (*H*pall -) = sem digestão com *H*pall; (*H*pall +) = digestão com *H*pall; NI = não informativo para inativação preferencial do cromossomo X; (IXP) = Inativação Preferencial do cromossomo X; (=) = bandas de mesma intensidade; (≠) = banda de intensidade diferente; (1-2 nas colunas de *H*pall) = número de bandas; (FA)= frequência do alelo A; (FB)= frequência do alelo B.

V.2.1 Análise estatística

Ensaio de *HUMARA* (qualitativo)

As diferenças entre os grupos quanto à proporção de detecção de inativação do cromossomo X pelo ensaio de *HUMARA* (qualitativo) não foram significativas a $\alpha=0,05$, no total estudado e por tipo de tecido analisado (sangue e placenta) (gráfico 2) (Tabelas A – C, Apêndice).

A detecção de inativação do cromossomo X também foi analisada em relação ao sexo dos RNs nos grupos e tecidos estudados. O χ^2 mostrou que as diferenças entre os sexos quanto à proporção de detecção de inativação de X pelo ensaio de *HUMARA* não foram significativas a $\alpha=0,05$ (gráfico 2) (Tabelas D – E, Apêndice).

As diferenças entre os tecidos estudados quanto à proporção de detecção de inativação do cromossomo X pelo teste de *HUMARA* não foram significativas a $\alpha=0,05$. Tabela F.

Ensaio de HUMARA (semi-quantitativo)

Foram considerados informativos para IXP somente os casos em que foi possível observar a frequência $\geq 70\%$ de um alelo em relação ao outro.

A análise dos efeitos fixos: sexo (civil) do RN, tecido (sangue materno ou placenta) e classe de idade gestacional (AIG, PIG, GIG), para verificar o efeito destas fontes sobre as frequências dos alelos A e B (FA% e FB%), em cada um dos grupos estudados (Controle e PE) foi significativa ($P < 0,03$) e controlou 22% da variação existente nas respostas FA% e FB%, no grupo Controle. Para o grupo PE, o modelo mostrou-se inadequado ($P = 0,42$) para a FA% e para FB% ($R^2 = 0,16$), ou seja, outros efeitos atuam sobre a frequência dos alelos A e B e não foram controlados no experimento do grupo PE.

Gráfico1. Resultados do ensaio de *HUMARA* semi-quantitativo (A, B, C e D). (A): porcentagem de inativação preferencial do cromossomo X (IXP) em sangue materno (grupo controle) (B) porcentagem de IXP X em tecido placentário (grupo controle); (C) porcentagem de IXP X em sangue materno (grupo controle); (D): porcentagem de inativação preferencial do cromossomo X em tecido placentário (grupo controle).

A) Frequência de IXP e IXA em sangue materno e placenta (controle e PE)

B) Frequência de IXP e IXA em sangue materno (controle e PE)

C) Frequência de IXP e IXA em placenta (controle e PE)

D) Frequência de IXP e IXA em sangue e placenta (controle + PE)

Gráfico2: Resultados estatísticos do ensaio de *HUMARA* qualitativo (A, B, C e D). (A): frequência de Inativação preferencial do cromossomo X (IXP) e inativação aleatória do cromossomo X (IXA) em sangue materno e placenta (controle e pré-eclâmpsia); B) Frequência de IXP e IXA em sangue materno (controle e pré-eclâmpsia); (C) frequência de IXP e IXA em placenta (controle e pré-eclâmpsia); D) Frequência de Inativação preferencial do cromossomo e IXA em sangue e placenta (controle e pré-eclâmpsia).

V.3 Análise do perfil de expressão por PCR em tempo real

As tabelas 8 e 9 mostram a correlação entre a idade gestacional, a classificação dos RNs pelo peso em relação à idade gestacional [adequado, pequeno ou grande para a idade gestacional (AIG, PIG e GIG respectivamente)] entre os sexos (feminino e masculino) e quantificação relativa dos microRNAs (*miR-221*, *miR-222* e *miR-223*) do gene *XIST* quando realizada. O microRNA *miR-221* foi expresso nos casos 5, 6, 10, 18, e 20 (grupo controle e RN do sexo feminino) e nos casos 13 e 15 (grupo controle e RN do sexo). No grupo de PE a expressão do *miR-221* foi observada nos casos 48, 51, 52, e 60 (RN do sexo feminino) e nos casos 49, 53, 55, e 56 (RN do sexo masculino). A expressão do *miR-222* foi observada em todos os casos estudados. O *miR-223* não expressou em nenhum dos casos e o gene *XIST* teve sua expressão evidenciada em todos os casos com exceção do caso 696 (grupo PE e RN do sexo feminino).

O gráfico 3 mostra o resultado da quantificação relativa dos microRNAs (*miR-221*, *miR-222* e *miR-223*) do gene *XIST* quando realizada.

O gráfico 4 mostra o resultado do valor médio da quantificação relativa dos microRNAs (*miR-221*, *miR-222* e *miR-223*) do gene *XIST*.

Tabela 8. Resultados do perfil de expressão de microRNAS e do gene *XIST* em tecido placentário do grupo controle.

nº caso	Sexo RN	IG	Classif.	RQ			
				<i>miR221</i>	<i>miR222</i>	<i>miR223</i>	<i>XIST</i>
5	F	38s4d	AIG	1,670753	0,0205	0	0,991443
6	F	40s4d	AIG	0,015	0,03976	0	0,273742
10	F	34s3d	AIG	0,015886	0,01817	0	0,501651
18	F	40s	AIG	0,012502	0,04741	0	0,966742
20	F	41s3d	AIG	1,346026	0,02901	0	1,796414
21	F	37s1d	AIG	0	0,03766	0	0,843223
22	F	37s6d	AIG	0	0,0273	0	0,804845
26	F	38s5d	AIG	0	1,695	0	1,42527
33	F	34s2d	AIG	0	0,72099	0	0,80477
3	M	40s3d	AIG	0	0,06312	0	NR
9	M	39s6d	AIG	0	0,34008	0	NR
11	M	41s	AIG	0	0,15423	0	NR
13	M	41s1d	AIG	0,19851	0,08503	0	NR
15	M	39s6d	AIG	1,059466	0,02734	0	NR
17	M	39s	AIG	0	1,06065	0	NR
34	M	40s5d	AIG	0	0,587	0	NR
38	M	41s1d	AIG	0	1,03973	0	NR

(IG): idade gestacional; (Classif): classificação do recém-nascido pelo peso em relação à idade gestacional (s): semanas; (d): dias; (RN): recém-nascido; (F): feminino; (AIG): adequado para a idade gestacional; (RQ): quantificação relativa; (NR): não realizado

Tabela 9. Resultados do perfil de expressão de microRNAS do gene *XIST* em tecido placentário do grupo PE

nº caso	Sexo RN	IG	Classif.	RQ			
				<i>miR221</i>	<i>miR222</i>	<i>miR223</i>	<i>Xist</i>
48	F	32s	AIG	1,44	0,242378	0	0
50	F	33s5d	AIG	0	3,894	0	1,311287
51	F	40s5d	AIG	0,095349	9,236	0	0,006823
52	F	34s1d	AIG	0,040266	19,414	0	2,118825
54	F	37s6d	AIG	0	0,352	0	1,065532
58	F	39s	PIG	0	5,924	0	1,34556
60	F	40s3d	AIG	0,045836	2,13	0	1,862426
44	M	35s 3d	AIG	0	9,838	0	NR
49	M	39s6d	AIG	0,039	2,154	0	NR
53	M	39s	AIG	0,00909	2,728	0	NR
55	M	40s3d	AIG	0,15049	0,295	0	NR
56	M	39s3d	AIG	0,54003	0,63616	0	NR
59	M	35s4d	AIG	0	0,633	0	NR

(IG): idade gestacional; (Classif): classificação do recém-nascido pelo peso em relação à idade gestacional (s): semanas; (d): dias; (RN): recém-nascido; (F): feminino; (AIG): adequado para a idade; (NR): não realizado

A) Grupo controle RN sexo feminino

B) Grupo PE RN sexo feminino

C) Grupo controle RN sexo masculino

D) Grupo PE RN sexo masculino

Gráfico 3. Quantificação relativa dos microRNAs e do gene *XIST* em tecido placentário (A, B, C e D). (A): quantificação relativa do grupo controle e RN do sexo feminino (B): quantificação relativa grupo de PE e RN do sexo feminino; (C): quantificação relativa do grupo controle e RN do sexo masculino; (D): quantificação relativa do grupo controle e RN do sexo masculino

A) Valor médio grupo controle

B) Valor médio grupo PE

Gráfico 4. Valor médio da quantificação relativa dos microRNAs e do gene *XIST* em tecido placentário (A e B). (A): quantificação relativa média do grupo controle (B): quantificação relativa média do grupo PE.:

V.3.1 Análise estatística

O Teste t-Student para o gene *XIST* não foi significativo para os dois grupos de estudos ($P > 0,30$).

O modelo de análise não foi adequado ($P = 0,65$) para *miR-221* ($R^2 = 0,03$), ou seja, outros efeitos atuam sobre sua expressão e não foram controlados no experimento. Para *miR-222*, no entanto, o modelo considerado foi significativo ($P < 0,02$) e controlou cerca de 27% da variação ($R^2 = 0,269$). Realizando-se um teste de comparação de médias ajustadas (t-Student) foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão relativa do *miR-222* entre os grupos Controle e PE ($P < 0,01$).

VI. DISCUSSÃO

A potencialidade da pré-eclâmpsia (PE) para complicações, a exemplo da eclâmpsia, faz dela uma das maiores causas de morte materna e fetal. Uma das particularidades marcantes dessa doença é o fato de sua etiologia não ter sido ainda determinada (SIBAI, 2008).

Para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na PE, alguns autores testaram a hipótese do envolvimento da inativação preferencial do cromossomo X (IXP) na etiologia da PE (UZ et al., 2007). A inativação do cromossomo X (IX) tem sido usada como uma ferramenta para identificar doenças genéticas envolvendo este cromossomo ou como um teste diagnóstico para detectar mulheres portadoras de certas doenças ligadas ao cromossomo X (VAN DEN VEYVER, 2001). Os testes de inativação são utilizados para distinguir entre um Xa e um Xi e determinar se os genes são diferentemente expressos no Xa. As citosinas dos nucleotídeos CpGs presentes nas ilhas próximas da região regulatória 5' dos genes que sofrem IX são metiladas no Xi, que leva à sua repressão transcricional. Os mesmos nucleotídeos não são metilados no Xa. Atualmente, o ensaio amplamente usado para avaliar a metilação diferencial entre o Xa e o Xi é o ensaio de *HUMARA* (AMOS-LANDGRAF et al., 2006).

A patogênese da PE envolve a invasão citotrofoblástica anormal das artérias espiraladas, que transforma a circulação útero-placentária em um sistema de baixa resistência com pouca sensibilidade a vasopressores resultando em prejuízo à perfusão útero-placentária. Sendo assim, a perfusão diminuída, o estresse oxidativo aumentado, a alteração do metabolismo da endotelina ou a disfunção endotelial também podem estar envolvidos em sua patogênese (DAVISON et al., 2004). A incapacidade do citotrofoblasto em invadir normalmente as artérias espiraladas na PE desperta cada vez mais o interesse científico.

VI.1 Ensaio de *HUMARA* e inativação preferencial do cromossomo X (IXP)

Em mamíferos, a compensação de dosagem dos genes ligados ao cromossomo X é estabelecida a partir da IX nas fêmeas (XX). Uma vez estabelecida a inativação, o estado condensado da heterocromatina do cromossomo inativado (Xi) é transmitido de maneira estável para as células filhas por mitoses subsequentes. Em humanos qualquer um dos dois cromossomos X (paterno ou materno) pode ser inativado. Como consequência, as mulheres apresentam um padrão de mosaico de duas populações celulares distintas, uma que expressa os genes ligados ao cromossomo X materno e a outra expressando os genes ligados ao X paterno. A relação de inativação do cromossomo X (IX) (ou padrão de IX)

corresponde à proporção relativa de cada linhagem celular. Quando esta relação esperada de 1:1 não é respeitada de maneira significativa tem-se a inativação preferencial do cromossomo X (IXP) (BOLDUC et al., 2008). Uma estratégia muito utilizada para determinação desta relação é o ensaio de *HUMARA* baseado no polimorfismo de CAG repetitivo no gene de receptor de andrógeno humano (*HUMARA*), localizado em Xq12 que possui dois sítios de restrição para *HpaII* sensíveis à metilação (PETTIGREW et al., 1991).

A IXP pode refletir ou resultar em consequências biológicas nas fêmeas. Na maioria dos casos a razão para IXP “extrema” (>90%) é a seleção celular após a inativação devido a uma anormalidade de um dos cromossomos X afetando a proliferação em todas as células do embrião ou agindo de maneira tecido-específica. Muitas vezes, os parâmetros para determinar a porcentagem de células que expressam o mesmo cromossomo X são definidos arbitrariamente, como maior ou igual a 75% e os valores maiores ou iguais a 90% a IXP é considerada “extrema” (AMOS-LANDGRAF et al., 2006; BOLDUC et al., 2008).

O padrão de inativação preferencial “extrema” do cromossomo X é comum em mulheres que apresentam cromossomo X estruturalmente alterado ou mutação nos genes ligados ao X. Nesses casos, o padrão preferencial é uma das consequências da seleção secundária, favorecendo as células que apresentam o melhor balanço genético. Entretanto, a IXP também pode ser observada entre mulheres clinicamente normais (MIGEON, 2007).

No presente estudo, o ensaio de *HUMARA* qualitativo (*HUMARA-Q*) em sangue materno evidenciou um número elevado de IXP (13 em 40 casos, 32,5%). No ensaio semi-quantitativo (*HUMARA-SQ*) foram confirmados oito casos com IXP (20%). Entretanto, a avaliação da frequência de cada alelo só foi possível a partir da eletroforese capilar, sendo que nenhum caso apresentou IXP “extrema” (>90%) no grupo controle. Embora a porcentagem de IXP tenha se mantido no ensaio de *HUMARA-SQ* no grupo, quando os dois ensaios são comparados em relação a cada paciente individualmente, nota-se a presença de IXP em alguns casos antes não detectados pelo teste qualitativo, mostrando que uma das limitações do *HUMARA* visualizado em gel de poliacrilamida é a qualidade de suas bandas, podendo mascarar possíveis casos informativos, que não foram evidenciados ou por falha na qualidade ou ainda por não ser suficientemente capaz de discriminar alelos com diferença de repetições muito reduzida. Quando os testes foram realizados no tecido placentário (grupo controle com RNs do sexo feminino) a porcentagem encontrada nos dois ensaios foi compatível com os resultados obtidos no sangue. Entretanto o ensaio de *HUMARA-SQ* detectou um caso com IXP “extrema”.

A causa da IXP, em mulheres normais geralmente não é conhecida. Acredita-se que o padrão de inativação preferencial extrema seja reflexo da influência genética no processo de inativação ou de uma seleção secundária contra um cromossomo X em particular (MIGEON, 2007).

Padrões de IXP, em que mais de 75% ou mais de 90 % das células apresentam o mesmo cromossomo X ativo, são observados com maior frequência em mulheres mais velhas do que em jovens. Isto levou muitos autores a concluir que a IXP pode ser adquirida com a idade (BUSQUE *et al.*, 1996; GALE *et al.*, 1997; EL KASSAR *et al.*, 1998; CHRISTENSEN *et al.*, 2000; SHARP *et al.*, 2000). Uma provável explicação para isto é a perda alelo-específica da metilação nos sítios *HpaII* associada à idade (ALLEN *et al.*, 1992).

Sandovici *et al.* (2004), com o objetivo de determinar se a taxa de IX muda continuamente em função do tempo ou se as mudanças descontínuas são mais frequentes de ocorrer em mulheres mais velhas, analisaram 178 amostras, coletadas em um período de vinte anos, de mulheres normais heterozigotas para região altamente polimórfica de CAG repetitivo no gene *HUMARA*. Neste estudo não foram observadas diferenças significantes. Entretanto outros autores as observaram (HATAKEYAMA *et al.*, 2004).

Segundo Bolduc *et al.* 2007, existe uma grande variabilidade entre os estudos (por exemplo, em recém-nascidos a IXP varia de 0.5% a 2.7% da população avaliada), alguns dos quais podem ser atribuídos a diferentes metodologias utilizadas em cada um. Entretanto, uma variação da porcentagem de preferência ainda maior é evidenciada quando a idade dos indivíduos e o tipo celular estudados são diferentes. A preferência vista em grande parte das células adultas hematopoiéticas não é observada nas células dos recém-nascidos. Quando comparam a IXP em mulheres de diferentes idades e suas filhas verificaram que a porcentagem de inativação das mães era o dobro da IXP de sua prole. Este aumento na porcentagem de IXP parece se tornar ainda mais pronunciada em mulheres com idade avançada (BOLDUC *et al.*, 2008).

No presente trabalho, no ensaio qualitativo (*HUMARA-Q*) a diferença entre os grupos (controle e pré-eclâmpsia), quanto à proporção de detecção de IXP não foram significativas estatisticamente ($X^2_{\text{calculado}} = 0,388$) quando foi considerado o total de amostras estudada por tipo de tecido analisado. Entretanto quando o grupo de PE foi analisado isoladamente entre os tecidos (sangue periférico e tecido placentário) verificou-se que o ensaio de *HUMARA-Q* ficou comprometido pela presença de muitos indivíduos não informativos e que o teste não conseguiu discriminar os alelos devido à presença de apenas uma banda no gel. Dos casos não informativos, 50% foram evidenciados em sangue materno e recém-nascido do sexo feminino, 25% em sangue materno e RN do sexo masculino, e 30% em placentas provenientes de gestações com RN do sexo feminino. Esta alta taxa de homozigose estava ausente no ensaio de *HUMARA-SQ* que evidenciou a presença de heterozigose, com diferença reduzida de repetições CAG entre os alelos, em todos os casos não informativos no teste de *HUMARA-Q*.

Para a avaliação de IXP ser usada como uma ferramenta clínica é preciso entender as fontes biológicas que determinam esta preferência de inativação. Para isto, vários

estudos em larga escala têm sido realizados num esforço de estabelecer o nível basal de preferência, sendo que o maior estudo realizado neste sentido utilizou uma amostra de 1.005 mulheres (AMOS-LANDGRAF et al., 2006).

No presente estudo, o nível basal estabelecido para determinação da presença da IXP foi primeiramente de 70:30. A distribuição dos casos estudados dentro de cada frequência possibilitou a avaliação do perfil de IX nas amostras estudadas. Os indivíduos do grupo controle que apresentavam uma razão entre os alelos de 60:40 a 70:30 (60-70%). Na placenta o número maior de indivíduos está em torno de 70-80% (razão entre os alelos de 60:40 a 70:30). No grupo de PE, o maior número de casos apresentou 50-60% tanto no sangue quanto na placenta, mas nota-se principalmente na placenta. Embora não tenha sido evidenciada uma diferença estatisticamente significativa quanto à distribuição de IX entre os grupos controle e de PE quando considerados valores de 70% para a IPX, um maior número de casos com IXP “extrema” (90%) foi encontrado no grupo de PE (1/10 no sangue e 2/10 na placenta de fetos do sexo feminino), em relação ao grupo controle (1/17 apenas em tecido placentário). A maior razão entre os alelos (90-100%) parece estar associada com a manifestação clínica de algumas doenças. A alta frequência de IXP foi observada em abortos recorrentes, deficiência mental ligada ao X e câncer (BOCKLAND et al, 2006). A manifestação de algumas doenças com padrão de herança ligada ao cromossomo X em fêmeas poderia estar sendo influenciada pela inativação do X anômala (LYON, 2002).

O teste estatístico utilizado para analisar os resultados do ensaio de HUMARA-SQ evidenciou que outros fatores que não os de sexo do recém nascido (RN) e classificação do peso do RN em relação a idade gestacional (AIG, PIG e GIG) atuam na frequência da inativação dos alelos. Vários estudos mostraram um significativo componente genético ou adquirido que atuariam promovendo a IXP (VICKERS et al, 2001; KRISTIENSEN, et al, 2005). Contudo, existem poucos estudos, em humanos, preocupados em responder a questão da existência de um fator primário que influencia na escolha de qual cromossomo X será inativado. Interessados nesse assunto, Bolduc et al. (2008) pesquisaram a concordância entre mãe e filha quanto à presença de IXP. Nos tipos celulares estudados, bucais e hematopoiéticas, os autores não observaram nenhuma evidência que neonatos com IXP têm maior chance de apresentar mães com IXP.

No presente trabalho, em 2% dos casos do grupo controle houve concordância entre a presença de IXP nos diferentes tecidos (sangue materno e tecido placentário fetal) e nos dois ensaios de HUMARA (qualitativo e semi-quantitativo), favorecendo a idéia da existência de um fator genético promotor da IXP (transmissão materna), entretanto, no grupo de PE esta relação (mãe-filha) não foi observada.

Outros autores examinaram o polimorfismo presente no gene *XIST* para determinar a existência de uma possível correlação entre um alelo específico ou haplótipo (combinação de alelos) e a prevalência de IXP, mas novamente nenhuma evidência para um componente genético envolvendo a IXP foi observada.

Interessantemente, o ensaio de *HUMARA-SQ* mostrou uma tendência na IXP do alelo materno no tecido placentário (100%) e no sangue materno (100%) do grupo de PE, enquanto no grupo controle a frequência de inativação entre o alelo paterno e materno foram equivalentes. A correlação de um alelo específico e a tendência em apresentar IXP fortalece a idéia de um fator primário que influenciaria na escolha de qual cromossomo X é inativado.

VI.2 Gene *XIST*

Em camundongos, foi identificado o *locus Xce* (*X-chromosome-controlling element*) próximo à região promotora de *Tsix*. Em fêmeas heterozigotas para os alelos *Xce*, o cromossomo X com o alelo “forte” tem maior probabilidade de ser escolhido para permanecer ativo que o alelo “fraco”, sendo o *Xce* considerado um modificador da escolha do cromossomo X (Figura 1) (AVNER & HEARD, 2001; BOUMIL & LEE, 2001, BOUMIL et al., 2006). Embora o mecanismo exato responsável por este efeito ainda tenha que ser elucidado, foi sugerido que alelos *XCE* similares possam existir em humanos (NAUMOVA et al., 1998) .

Múltiplos sítios de ligação de CTCF dentro das ilhas CpG de *Tsix*, região corresponde à DXPas34, afetariam o silenciamento de maneira dependente de metilação em um dos dois cromossomos X. Metilação dos sítios *Tsix* previne a ligação de CTCF (CHAO et al., 2002; LEE, 2003; LATHAM, 2005; BOUMIL et al., 2006). Outros autores acreditam que *Tsix* funciona como antagonista de *Xist*, que se liga ao grupo protéico policombinado (PcG), PRC2, e compete com um RNA não codificador de proteína (cnRNA), localizado em *Xist*, chamado RepA e inibe a interação RepA-PRC2. Quando *Tsix* tem sua expressão reduzida no futuro Xi, ocorre a interação RepA-PRC2, tem-se a metilação da região promotora de *Xist* e sua trans-ativação é habilitada (ZHAO, 2008).

A expressão do *XIST* não foi estatisticamente significativa no grupo da PE, pois apresentou uma expressão muito reduzida quando comparado com a expressão do mesmo no grupo controle. Sua expressão pode estar sendo reprimida por algum fator envolvido na escolha da IXP.

VI.3 MicroRNAs

Os estudos sobre o genoma humano revelam dados surpreendentes, dentre os quais pode ser destacado a identificação de um número de genes codificadores de proteínas menores do que o esperado pela comunidade científica. Verificou-se que apenas 1,4% do genoma humano é utilizado na produção de transcritos codificadores de proteínas (MATTICK, 2001, 2003). Estes estudos têm despertado um grande interesse sobre os transcritos não codificadores de proteínas [*non-coding RNAs (ncRNAs)*] que representam aproximadamente 98% dos transcritos produzidos pela célula humana e que devem desempenhar um papel relevante nos estudos do genoma funcional (MATTICK, 2003, COSTA, 2008).

Os ncRNAs são basicamente divididos em dois grupos. No primeiro, estão incluídos os transcritos que são expressos constitutivamente e participam de processos celulares normais (por exemplo, os RNAs ribossômicos). No segundo grupo, estão os transcritos que são expressos em fases específicas do desenvolvimento de um organismo e podem regular a expressão de outros genes em nível transcricional e traducional. Sendo assim, estes transcritos não codificadores de proteínas são chamados de RNAs reguladores por regularem funções celulares importantes em eucariotos (MATTICK, 2004). A maioria do ncRNAs com uma função estabelecida, estão envolvidos em mecanismos epigenéticos (MATTICK, 2004, 2007). Dentro do grupo de RNAs reguladores estão os microRNAs (COSTA, 2008).

Apesar de não terem suas funções totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs atraiu a comunidade científica pelas evidências sugestivas de que estas moléculas apresentam papel fundamental em diversos processos biológicos. Em mamíferos, estes pequenos RNAs foram associados à regulação da proliferação, apoptose, diferenciação, hematopoiese, entre outras funções (COSTA, 2008).

Apesar do empenho em caracterizar o padrão de expressão dos microRNAs em tumores, muitos escapavam constantemente das técnicas usuais tais como clonagem e *Northern blot* (LIM, 2003). As análises por *microarray* também têm sido muito utilizadas para avaliar a expressão de em câncer e outras doenças. Entretanto, este método é limitado quanto à sensibilidade e especificidade (LIU *et al.*, 2004).

A técnica de PCR em tempo real é conhecida como uma metodologia sensível e específica para avaliação da expressão gênica. Contudo, sua aplicação é limitada para a avaliação da expressão de microRNAs pela dificuldade de amplificar moléculas pequenas como essas. Em 2005, Chen *et al.* desenvolveram um oligonucleotídeo em forma de *stem-loop* que quando usado durante a reação de transcrição reversa produz um DNA longo o

suficiente para permitir o pareamento dos dois oligonucleotídeos e a sonda (*taqMan* - *Applied Biosystems*) durante a reação de PCR em tempo real. Uma das extremidades desse oligonucleotídeo pareia-se ao microRNA por complementaridade formando um *loop*. Outras características deste método que devem ser consideradas são a sua sensibilidade e a necessidade de uma quantidade reduzida de RNA para sua execução. Diante das características do sistema *TaqMan*, o método desenvolvido por Chen et al. foi utilizado no presente trabalho para avaliar a expressão de microRNAs mapeados no cromossomo X e que sofreriam inativação (*miR-221*, *miR-222*, *miR-223*) em tecidos placentários (porção fetal) coletados em diferentes idades gestacionais (IG) de mulheres com PE.

Os perfis de expressão dos microRNAs, nos diferentes períodos, apresentaram grande diversidade. De acordo com Pineles *et al.* (2007), uma alteração de duas ou mais vezes da expressão de um microRNA é considerada significativa. Adotando este critério, verificamos no presente trabalho que o microRNA (*miR-222*) (Figura 8) apresentou um perfil de expressão aumentado (aproximadamente duas vezes) quando comparado com o calibrador. Quando são comparados os sexos dos RNs nota-se um aumento na expressão do *miR-222* no grupo de PE nas placentas provenientes de gestações com RN do sexo feminino.

Apenas um trabalho na literatura estudou o envolvimento de microRNAs no desenvolvimento de PE (PINELES *et al.*, 2007). Nele foi pesquisado o perfil de expressão de 157 microRNAs em placentas de mulheres com gestações normais e mulheres com PE que tiveram filhos pequenos para idade gestacional (PIG), sendo verificado que a expressão do microRNA, *miR-210* estava aumentada em placentas de pacientes com PE, com e sem filhos PIG. Pela análise de seus genes-alvo, os autores hipotetizaram um envolvimento da resposta imune, apoptose e metabolismo de lipídeos no desenvolvimento da PE.

No presente trabalho, os casos em que o perfil de expressão do *miR-222* foi avaliado por PCR tempo real não foi possível estabelecer nenhuma relação entre a classificação do peso do recém-nascido em relação a idade gestacional (AIG, PIG e GIG) e idade gestacional com expressão elevada do *miR-222*.

Neste estudo, o perfil de expressão do *miR-221* não foi estatisticamente significativo no grupo da PE, pois apresentou uma expressão muito reduzida quando comparada com o perfil do grupo controle. Entretanto, quando verificamos o valor médio de expressão, entre os grupos (controle e PE) notou-se a diminuição de sua expressão nos casos de PE favorecendo a hipótese de uma possível ligação entre microRNAs ligados ao cromossomo X e PE. Analisando os casos isoladamente verifica-se que o caso 20 do grupo controle apresentou IXP detectada pelo ensaio semi-quantitativo (*HUMARA-SQ*) com relação entre alelos de 71:29, entretanto é difícil estabelecer alguma relação entre a expressão do *miR-221* e a IXP por ser apenas um caso isolado do grupo controle.

No presente trabalho também não foi possível estabelecer nenhuma ligação entre a presença de IXP e PE e miR-223 por não apresentar expressão evidente em nenhum dos casos estudados.

Analisando os dados fornecidos pelos ensaios de *HUMARA* (*qualitativo e semi quantitativo*) e pelo perfil de expressão do gene *XIST* e microRNAs X-específicos realizados por PCR em tempo real, não foi possível estabelecer nenhuma relação direta entre a expressão dos microRNAs (*miR-221*, *miR-222*, *miR-223*) e do gene *XIST* e a presença de inativação preferencial do cromossomo X.

VII. CONCLUSÕES

1. Não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa quando comparados os resultados de *HUMARA-Q* e *HUMARA-SQ* para verificação de inativação do cromossomo X nos grupos controle e de pacientes com PE, se considerados valores maiores ou iguais a 70% para a IPX. Entretanto, quando considerada a IXP maior ou igual a 90% foram encontrados no grupo de PE 3/28 e apenas 3/57 no grupo controle, o que mostraria que quando considerados valores mais extremos, a IPX poderia apresentar um valor como marcador de PE. Há portanto necessidade de verificar uma população maior para confirmar estes resultados.

2. Não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa quanto ao perfil de expressão do gene *XIST* em tecido placentário de pacientes com PE e do grupo controle quando utilizada PCR em Tempo Real.

3. A avaliação do perfil de expressão dos microRNAs (*miR-221*, *miR-222* e *miR-223*) ligados ao cromossomo X em tecido placentário de pacientes com PE e do grupo controle mostrou variação estatisticamente significativa (maior expressão no grupo de PE) do *miR-222* a partir da metodologia de PCR em Tempo Real. Esse achado indica um possível papel desse microRNA na etiologia da PE, bem como sua utilização como marcador molecular para esta doença.

4. Não foi possível estabelecer nenhuma relação direta entre a expressão dos microRNAs (*miR-221*, *miR-222*, *miR-223*) e do gene *XIST* realizada por tempo real e a presença de inativação preferencial do cromossomo X pelos ensaios de *HUMARA* qualitativo e semi- quantitativo.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN COLLEGE OF OBSTETRICIANS AND GYNECOLOGISTS. Hypertension in pregnancy. Washington, DC: The College, 1-8. (ACOG Technical Bulletin n° 219), 2002.
- ALLEN RC, ZOGHBI HY, MOSELEY AB, ROSENBLATT HM, BELMONT JW 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.*, 51(6), 1229-39, 1992.
- AMOS-LANDGRAF JM, COTTLE A, PLENGE RM, FRIEZ M, SCHWARTZ CE, LONGSHORE J, WILLARD HF. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am. J. Hum. Genet.*, 79(3):493-99, 2006.
- ARAUJO FM, DUARTE G, NOMELINI J, LOBO RB, RAMOS ES. Familial occurrence of gestational hypertensive disorders in a Brazilian population. *Hypert. Preg.*, 26:357-62, 2007.
- ARAÚJO A & RAMOS ES. Cryptic mosaicism involving a second chromosome X in patients with Turner syndrome. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 41(5):368-72, 2008.
- ARNGRIMSSON R, HAYWARD C, NADAUD S, BJARNADO TTIR RI, BROCK DJ, GEIRSSON RT, CONNOR JM, SOUBRIER F. Evidence for a familial pregnancy-induced hypertension locus in the eNOS-gene region. *Am. J. Hum. Genet.*, 61:354-62, 1997.
- ARNGRIMSSON R, SIGURARD TTIR S, FRIGGE ML, BJARNAD TTIR RI, JONSSON T, STEFANSSON H, BALDURSDO TTIR A, EINARSDO TTIR AS, PALSSON B, SNORRADO TTIR S, LACHMEIJER AM, NICOLAE D, KONG A, BRAGASON BT, GULCHER JR, GEIRSSON RT, STEFANSSON K. A genome-wide scan reveals a maternal susceptibility locus for pre-eclampsia on chromosome 2p13. *Hum. Mol. Genet.*, 8:1799-805, 1999.
- AVNER, P. & HEARD, E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat. Rev. Genet.*, 2(1), 59-67, 2001.
- AVNER P, PRISSETTE M, ARNAUD D, COURTIER B, CECCHI C, HEARD E. Molecular correlates of the murine *Xce* locus. *Genet. Res.*, 72:217-24, 1998.
- BALLABIO, A. & WILLARD, H.F. Mammalian X-chromosome inactivation and the *XIST* gene. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2(3), 439-47, 1992.
- BARR ML & BERTRAM LF. A morfological distinction between neurones of the male and female and the behavior of the nuclear satellite during accelerated nucleiprotein syntesis. *Nature*, 63:676-77, 1949.

- BASYUK E, SUAVET F, DOGLIO A, BORDONNÉ R, BERTRAND E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucl. Acids RES.*, 31(22):6593-97, 2003.
- BAUMWELL S & KARUMANCHI SA. Pre-Eclampsia: Clinical Manifestations and Molecular Mechanisms. *Nephron Clin Pract*, 106:c72–c81, 2007.
- BAXTER JK, WEINSTEIN L. HELLP syndrome: the state of the art. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 59(12):838-45, 2004.
- BEILIN J, BALL EM, FAVALORO JM, ZAJAC JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J. Mol. Endocrinol*, 25(1):85-96, 2000.
- BELL AC & FELSENFELD G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *IGF2* gene. *Nature*, 405:482-85, 2000.
- BERNSTEIN E, CAUDY AA, HAMMOND SM, HANNON GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818):363-66, 2001.
- BOLDUC V, CHAGNON P, PROVOST S, DUBÉ MP, BELISLE C, GINGRAS M, MOLLIKA L, BUSQUE L. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):333-41.
- BOREL C, ANTONARAKIS SE. Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences. *Mamm. Genome*. 19(7-8):503-9, 2008.
- BOUMIL RM & LEE JT. Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.*, 10(20):2225-32, 2001.
- BOUMIL RM, OGAWA Y, SUN BK, HUYNH KD, LEE JT. Differential methylation of Xite and CTCF sites in Tsix mirrors the pattern of X-inactivation choice in mice. *Mol. Cell Biol*. 26(6):2109-17, 2006.
- BRENNECKE J, STARK A, RUSSELL RB, COHEN SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.*, 3(3):e85, 2005.
- BREThERICK K, GAIR J, ROBINSON WP. The association of skewed X chromosome inactivation with aneuploidy in humans. *Cytogenet Genome Res.*, 111(3-4):260-65, 2005.
- BROCKDORFF N, ASHWORTH A, KAY GF, MCCABE VM, NORRIS DP, COOPER PJ, SWIFT S, RASTAN S. The product of the mouse *Xist* gene is a 15 kb inactive X-

specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell*, 71(3):515-26, 1992.

BROWN CJ, HENDRICH BD, RUPERT JL, LAFRENIÈRE RG, XING Y, LAWRENCE J, WILLARD HF. 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*, 71(3):527-42, 1992.

BROWN CJ & WILLARD, HF. The human X inactivation center is not required for maintenance of X chromosome inactivation. *Nature*, 368(6467):154-56, 1994.

BROWN MA, LINDHEIMER MD, DE SWIET M, VAN ASSCHE A, MOUTQUIN JM. The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). *Hypert. Pregnan.*, 20(1):IX-XIV, 2001.

BUSQUE L, MIO R, MATTIOLI J, BRAIS E, BLAIS N, LALONDE Y, MARAGH M, GILLILAND DG. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*, 88(1):59-65, 1996.

CALLEWAERT L, CHRISTIAENS V, HAELENS A, VERRIJDT G, VERHOEVEN G, CLAESSENS F. Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun.*, 306(1):46-52, 2003.

CARREL L & WILLARD HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 434:400-04, 2005.

CHANG CS, KOKONTIS J, LIAO ST. Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science*, 240(4850):324-26, 1988.

CHAO W, HUYNH KD, SPENCER RJ, DAVIDOW LS, LEE JT. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science*, 295(11):345-47, 2002.

CHAPPELL S & MORGAN L. Searching for genetic clues to the causes of pre-eclampsia. *Clin. Sci. (Lond.)*, 110:443-58, 2006.

CHEN CP, BAJORIA R, APLIN JD. Decreased vascularization and cell proliferation in placentas of intrauterine growth-restricted fetuses with abnormal umbilical artery flow velocity waveforms. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 187(3):764-69, 2002.

CHEN CZ, LODISH HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin. Immunol.*, 17(2):155-65, 2005.

- CHENG MK & DISTECHE CM. Silence of the fathers: early X inactivation. *Bioessays*, 26(8): 821-24, 2004.
- CHOONG CS, KEMPPAINEN JA, ZHOU ZX, WILSON EM. Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol. Endocrinol.*, v.10(12), p.1527-35, 1996.
- CHOW JC, YEN Z, ZIESCHE SM, BROWN CJ. Silencing of the mammalian X chromosome. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.*, 6: 69–92, 2005.
- CLERC P & AVNER P. Role of the region 3' to *Xist* exon 6 in the counting process of X-chromosome inactivation. *Nat. Genet.*, 19(3):249-53, 1998.
- CLERC P, AVNER P. Random X-chromosome inactivation: skewing lessons for mice and men. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16(3):246-53, 2006.
- COURTIER B, HEARD E, AVNER P. *Xce* haplotypes show modified methylation in a region of the active X chromosome lying 3' to *Xist*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(8):3531-35, 1995.
- CSANKOVSKI G, PANNING B, BATES B, PEHRSON JR, JAENISCH R. Conditional deletion of *Xist* disrupts histone macroH2A localization but not maintenance of X inactivation. *Nat. Genet.*, 22:323–24. 1999
- DING D, XU L, MENON M, REDDY GP, BARRACK ER. Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate*, 62(2):133-39, 2005.
- DING D, XU L, MENON M, REDDY GP, BARRACK ER. Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. *Prostate*, 1;58(1):23-32, 2004.
- DISTECHE CM, SWISSHELM K, FORBES S, PAGON RA. X-inactivation patterns in lymphocytes and skin fibroblasts of three cases of X-autosome translocations with abnormal phenotypes. *Hum. Genet.*, 66(1):71-6, 1984.
- DIZON-TOWNSON DS, NELSON LM, EASTON K, WARD K. The factor V Leiden mutation may predispose women to severe preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 175(4 Pt 1):902-05, 1996.
- DUCKITT K, HARRINGTON D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ.*, 330(7491):549-50, 2005.

- DURET L, CHUREAU C, SAMAIN S, WEISSENBAACH J, AVNER P. The Xist RNA gene evolved in eutherians by pseudogenization of a protein-coding gene. *Science*, 312:1653–55, 2006.
- EDWARDS A, CIVITELLO A, HAMMOND HA, CASKEY CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.*, 49(4):746-56, 1991.
- EL KASSAR N, HETET G, BRIÈRE J, GRANDCHAMP B. X-chromosome inactivation in healthy females: incidence of excessive lyonization with age and comparison of assays involving DNA methylation and transcript polymorphisms. *Clin Chem.* 1998 Jan;44(1):61-7.
- ENQUOBAHRIE DA, MELLER M, RICE K, PSATY BM, SISCOVICK DS, WILLIAMS MA. Differential placental gene expression in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 199:566.e1-566.e11, 2008
- ERWIN JA & LEE JT. New twists in X-chromosome inactivation. *Current Opinion in Cell Biology*, 20:349-55, 2008.
- ESAU C, KANG X, PERALTA E, HANSON E, MARCUSSEON EG, RAVICHANDRAN LV, SUN Y, KOO S, PERERA RJ, JAIN R, DEAN NM, FREIER SM, BENNETT CF, LOLLO B, GRIFFEY R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, 279(50):52361-65, 2004.
- ESPLIN MS, FAUSETT MB, FRASE RA, KERBER R, MINEAU G, CARRILLO JV, ARNER MW. Paternal and maternal components of the predisposition to preeclampsia. *N. Engl. J. Med.*, 344(12):867-72, 2001.
- FALKOWSKI PG, KATZ ME, MILLIGAN AJ, FENNEL K, CRAMER BS, AUBRY MP, BERNER RA, NOVACEK MJ, ZAPOL WM. The rise of oxygen over the past 205 million years and the evolution of large placental mammals. *Science*, 309: 2202–04, 2005.
- FERLIN A, BARTOLONI L, RIZZO G, ROVERATO A, GAROLLA A, FORESTA C. Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility. *Mol. Hum. Reprod.*, 10(6):417-21, 2004.
- FRANCO B & BALLABIO A. X-inactivation and human disease: X-linked dominant male-lethal disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 16: 254–59, 2006.
- GALE RE, LINCH DC. Interpretation of X-chromosome inactivation patterns. *Blood*, 15:83(4):931-38, 1994.

- GALE RE, WHEADON H, BOULOS P, LINCH DC. Tissue specificity of X-chromosome inactivation patterns. *Blood*, 83(10):2899-905, 1994.
- GOLDSTEIN DP & BERKOWITZ RS. Current management of complete and partial molar pregnancy. *J. Reprod. Med.*, 39(3):139-46, 1994.
- GOMES MV & RAMOS ES. Beckwith-Wiedemann syndrome and isolated hemihyperplasia. *São Paulo Med. J.*, 121(3):133-38, 2003.
- GRAVES, JA . Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell*, 124: 901–14, 2006.
- HALL J, ALLANSON J, GRIPP K, SLAVOTINEK A. *Handbook of Physical Measurement*. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2006
- HARRISON GA, HUMPHREY KE, JONES N, BADENHOP R, GUO G, ELAKIS G, KAYE JA, TURNER RJ, GREHAN M, WILTON AN, BRENECKE SP, COOPER DW. A genomewide linkage study of preeclampsia/eclampsia reveals evidence for a candidate region on 4q. *Am. J. Hum. Genet.*, 60(5):1158-67, 1997.
- HEARD E & DISTECHE CM. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Gen. Dev.*, 20:1848–67. 2006.
- HEARD, E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16(3):247-55, 2004.
- HEARD E, MONGELARD F, ARNAUD D, CHUREAU C, VOURCH C, AVNER P. Human *XIST* yeast artificial chromosome transgenes show partial X inactivation center function in mouse embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(12):6841-46, 1999.
- HIBY SE, WALKER JJ, O'SHAUGHNESSY KM, REDMAN CW, CARRINGTON M, TROWSDALE J, MOFFETT A. Combinations of maternal KIR and fetal HLA-C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success. *J. Exp. Med.*, 200(8):957-65, 2004.
- HORE TA, RAPKINS RW, GRAVES JA. Construction and evolution of imprinted loci in mammals. *Trends Genet.* 2007 Sep;23(9):440-8. Epub 2007 Aug 1. Review
- INNIS MA, GELFAND D.H, SNISSKY HJ, WHITE TJ. *PCR Protocols; a guide to methods and applications*. San Diego; Academic Press, 1990.
- JAENISCH R & BIRD A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.*, 33:245-54, 2003.

JENUWEIN T & ALLIS CD. Translating the histone code. *Science*, 293:1074-80, 2001.

KANDURI C, WHITEHEAD J, MOHAMMAD F. The long and the short of it: RNA-directed chromatin asymmetry in mammalian X-chromosome inactivation. *FEBS Lett.* 2009 Mar 4;583(5):857-64. Epub 2009 Feb 8. Review

KIM VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 6(5):376-85, 2005.

KIM TH, ABDULLAEV ZK, SMITH AD, CHING KA, LOUKINOV DI, GREEN RD, ZHANG MQ, LOBANENKOV VV, REN B. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell* 128: 1231-45. 2007.

KIMURA S, MATSUMOTO T, MATSUYAMA R, SHIINA H, SATO T, TAKEYAMA K, KATO S. Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. *Trends Endocrinol Metab*, 18:183-89, 2007.

KONG Y, HAN JH. MicroRNA: biological and computational perspective. *Genom. Proteom. Bioinf.*, 3(2):62-72, 2005.

KUEHBACHER A, URBICH C, ZEIHNER AM, DIMMELER S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ. Res.*, 101(1):59-68, 2007.

KRISTIANSEN M, LANGEROD A, KNUDSEN GP, WEBER BL, BORRESEN-DALE AL, ORSTAVIK KH. High frequency of skewed X inactivation in young breast cancer patients. *J. Med. Genet.* 39(1):30-3, 2002.

LACHMEIJER AM, ARNGRIMSSON R, BASTIAANS EJ, FRIGGE ML, PALS G, SIGURDARDO TTIR S, STEFANSSON H, PALSSON B, NICOLAE D, KONG A, AARNOUDSE JG, GULCHER JR, DEKKER GA, TEM KATE LP, STEFANSSON K. A genome-wide scan for preeclampsia in the Netherlands. *Eur. J. Hum. Genet.*, 9(10): 758-64, 2001.

LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W., TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294:853–58, 2001.

LANDGRAF P et al. A mammalian microRNA expression atlas based on Small RNA library sequencing. *Cell*, 129:1401–14, 2007.

LATHAM KE. X chromosome imprinting and inactivation in preimplantation mammalian embryos. *Trends Genet*, 21(2):120-27, 2005.

LEE JE, PINTAR I.; EFSTRATIADIS, A. Pattern of the insulin-like growth factor II gene expression during early mouse embryogenesis. *Development*, 110:151-59, 1990.

- LEE JT. Targeted mutagenesis of *Tsix* leads to nonrandom X inactivation. *Cell*, 99(1):47-57, 1999.
- LEE JT. Funcional intergenic transcription: a case study of the X-inactivation center. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B*, 358:1417-23, 2003.
- LEE RC & AMBROS V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, 862–64, 2001.
- LEE Y, KIM M, HAN J, YEOM KH, LEE S, BAEK SH, KIM VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J*. 23(20):4051-60, 2004.
- LEWIS BP, SHIH IH, JONES-RHOADES MW, BARTEL DP, BURGE CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7):787-98, 2003.
- LIM LP, LAU NC, GARRETT-ENGELE P, GRIMSON A, SCHELTER JM, CASTLE J, BARTEL DP, LINSLEY PS, JOHNSON JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433:769-73, 2005.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta CT). *Methods*, 25:402-08, 2001.
- LUBAHN DB, JOSEPH DR, SULLIVAN PM, WILLARD HF, FRENCH FS, WILSON EM. Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science*, 240(4850):327-30, 1988.
- LUKE MC & COFFEY DS. Human androgen receptor binding to the androgen response element of prostate specific antigen. *J. Androl.*, 15(1):41-51, 1994.
- LYON MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus*). *Nature*, 190:372-73, 1961.
- LYON MF. Epigenetic inheritance in mammals. *Trends Genet.*, 9:123-28, 1993.
- LYON MF. X-chromosome inactivation and human genetic disease. *Acta Paediatr*, 91:107-12, 2002.
- LYON MF. No longer 'all-or-none'. *Eur J Hum Genet*, 13:796-97, 2005.
- LYON MF: Do LINEs have a role in X-chromosome inactivation? *J Biomed Biotechnol* 2006:59746, 2006.

- MIGEON BR. The role of X inactivation and cellular mosaicism in women's health and sex-specific diseases. *J Am Med Assoc* 295:1428-33, 2006.
- MIGEON BR. Why females are mosaics, X-chromosome inactivation, and sex differences in disease. *Gend Med.*, 4(2):97-105, 2007.
- MIKKELSEN TS, Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveal innovation in non-coding sequences. *Nature*, 447:167-77, 2007. Corrigir+ autores
- MINKS J, ROBINSON WP, BROWN CJ. A skewed view of X chromosome inactivation. *J. Clin. Invest.*, 118(1):333-41, 2008.
- MOFFETT-KING A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat. Rev. Immunol.*,9:656-63, 2002.
- MOLDENHAUER JS, STANEK J, WARSHAK C, KHOURY J, SIBAI B. The frequency and severity of placental findings in women with preeclampsia are gestational age dependent. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 189(4):1173-7, 2003.
- MONK M & HARPER MI. Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. *Nature*, 281(5729): 311-13, 1979.
- MONTENEGRO D, ROMERO R, PINELES BL, TARCA AL, KIM YM, DRAGHICI S, KUSANOVIC JP, KIM JS, EREZ O, MAZAKI-TOVI S, HASSAN S, ESPINOZA J, KIM CJ. Differential expression of microRNAs with progression of gestation and inflammation in the human chorioamniotic membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 197:289.e1-289.e6, 2007.
- NAVARRO P, PAGE DR, AVNER P, ROUGEULLE C. Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program. *Genes Dev.*, 20:2787-92, 2006.
- NG K, PULLIRSCH D, LEEB M, WUTZ A. Xist and the order of silencing. *EMBO* 8(1): 34-39, 2007.
- NAUMOVA AK, PLENGE RM, BIRD LM, LEPPERT M, MORGAN K, WILLARD HF, SAPIENZA C. Heritability of X chromosome--inactivation phenotype in a large family. *Am. J. Hum. Genet.*,58(6):1111-9, 1996.
- NHBPEP: NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM (NHBPEP). Report of the national high blood pressure education program working group on high blood pressure in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*,183: SI-S22, 2000.
- NORIS M, PERICO N, REMUZZI G. Mechanisms of disease: Pre-eclampsia. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* 1(2):98-114; quiz 120, 2005.

- OHATA T, HOKI Y, SASAKI H, SADO T. Crucial role of antisense transcription across the Xist promoter in Tsix-mediated Xist chromatin modification. *Development*. 135(2):227-35, 2008.
- OLERUP O & ZETTERQUIST H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39(5):225-35, 1992.
- ORSTAVIK KH. X chromosome inactivation in clinical practice. *Hum Genet*. 2009 Sep;126(3):363-73. Epub 2009 Apr 25
- OUDEJANS CBM, VAN DIJK M. Placental Gene Expression and Pre-eclampsia. *Placenta*, 22: S78-S82, 2008.
- OZBALKAN Z, BAGIŞLAR S, KIRAZ S, AKYERLI CB, OZER HT, YAVUZ S, BIRLIK AM, CALGÜNERİ M, OZÇELİK T. Skewed X chromosome inactivation in blood cells of women with scleroderma. *Arthritis Rheum.*, 52(5):1564-70, 2005.
- PALAZZOLO, I. et al. (2008) *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 108:245–253
- PARK SM & PETER ME. microRNAs and death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Jun-Aug;19(3-4):303-11. Epub 2008 May 19. Review.
- PETTIGREW AL, MCCABE ER, ELDER FF, LEDBETTER DH. Isodicentric X chromosome in a patient with Turner syndrome--implications for localization of the X-inactivation center. *Hum. Genet.*, 87(4):498-502, 1991.
- PHILLIPS JE & CORCES VG. CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell*, 137,1193-1211, 2009.
- PINELES BL, ROMERO R, MONTENEGRO D, TARCA AL, HAN YM, KIM YM, DRAGHICI S, ESPINOZA J, KUSANOVIC JP, MITTAL P, HASSAN SS, KIM CJ. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 196:261.e1-6, 2007.
- PLATH K, FANG J, MLYNARCZYK-EVANS SK, CAO R, WÖRRINGER KA, WANG H, DE LA CRUZ CC, OTTE AP, PANNING B, ZHANG Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*, 300(5616):131-5, 2003.
- PLENKE RM, HENDRICH BD, SCHWARTZ C, ARENA JF, NAUMOVA A, SAPIENZA C, WINTER RM, WILLARD HF. A promoter mutation in the *XIST* gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat. Genet.*, 17(3):353-56, 1997.

- POLISENO L, TUCCOLI A, MARIANI L, EVANGELISTA M, CITTI L, WOODS K, MERCATANTI A, HAMMOND S, RAINALDI G. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*. 108(9):3068-71, 2006.
- QUIGLEY CA, DE BELLIS A, MARSCHKE KB, EL-AWADY MK, WILSON EM, FRENCH FS. Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr. Rev.*, 3: 271-321, 1995.
- RACCHI O, MANGERINI R, RAPEZZI D, ROLFO M, GAETANI GF, FERRARIS AM. X chromosome inactivation patterns in normal females. *Blood Cells Mol. Dis.* 24(4):439-47, 1998.
- RACK K, CHELLY J, GIBBONS RJ, RIDER S, BENJAMIN D, LAFRENIÉRE RG, OSCIER D, HENDRIKS RW, CRAIG IW, WILLARD HF. Absence of the *XIST* gene from late-replicating isodicentric X chromosome in leukaemia. *Hum. Mol. Genet.* 3:1053-59, 1994.
- RASTAN S. X chromosome inactivation and the *Xist* gene. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4(2):292-97, 1994.
- REDMAN CW, SARGENT IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 308(5728):1592-94, 2005.
- RIOS AFL. Expressão do gene CTCF em embriões do período pré-implantação e na maturação dos oócitos em bovinos. Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2003.
- ROUGEULLE C, CHAUMEIL J, SARMA K, ALLIS CD, REINBERG D, AVNER P, HEARD E. Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Mol. Cell Biol.*, 24(12):5475-84, 2004.
- RUSSELL LB, MONGOMERY CS. The use of x-autosome translocations in locating the x-chromosome inactivation center. *Genetics*, 52:470, 1965.
- SADOWSKI PD. et al. *Genomics* 2006; 87:46-56.
- SANDOVICI I, LEPPERT M, HAWK PR, SUAREZ A, LINARES Y, SAPIENZA C. Familial aggregation of abnormal methylation of parental alleles at the IGF2/H19 and IGF2R differentially methylated regions. *Hum Mol Genet.* 2003 Jul 1;12(13):1569-78. Erratum in: *Hum Mol Genet.* 2004 Apr 1;13(7):781
- SCHMIDT M, DU SART D. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocations: a review of 122 cases. *Am J Med Genet.*, 42(2):161-69, 1992.

- SENNER C & BROCKDORFF N. Xist gene regulation at the onset of X inactivation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19:122-26, 2009.
- SHARMAN GB. Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature*, 230(5291):231-32, 1971.
- SHARP A, ROBINSON D, JACOBS P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum. Genet.*, 107(4):343-49, 2000.
- SIBAI BM. Diagnosis and management of gestational hypertension/preeclampsia. *Obstet. Gynecol.*, 103:181-92, 2003.
- SIBAI BM & BARTON JR. Dexamethasone to improve maternal outcome in women with hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 193:1587-90, 2005.
- SIBAI BM, DEKKER G, KUPFERMINC M. Pre-eclampsia. *Lancet*, 365:785-99, 2005.
- SIBAI BM. Maternal and Uteroplacental Hemodynamics for the Classification and Prediction of Preeclampsia. *Hypertension*. 52;805-6, 2008.
- SIBAI BM; KOCH MA; FREIRE S; SILVA JLP; RUDGE MVC; MARTINS-COSTA S, MD; BARTZ J; SANTOS CB; CECATTI JG; COSTA R; RAMOS JG; SPINNATO JA. Serum inhibin A and angiogenic factor levels in pregnancies with previous preeclampsia and/or chronic hypertension: are they useful markers for prediction of subsequent preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol*, 199:268.e1-268.e9, 2008
- SILVA J, MAK W, ZVETKOVA I, APPANAH R, NESTEROVA TB, WEBSTER Z, PETERS AH, JENUWEIN T, OTTE AP, BROCKDORFF N. Establishment of histone H3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. *Dev. Cell.*, 4(4):481-95, 2003.
- SIMMLER MC, CATTANACH BM, RASBERRY C, ROUGEULLE C, AVNER P. Mapping the murine *Xce* locus with (CA)_n repeats. *Mamm. Genome*, 4(9): 523-30, 1993.
- SKJAERVEN R, VATTEN LJ, WILCOX AJ, RØNNING T, IRGENS LM, LIE RT. Recurrence of pre-eclampsia across generations: exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ*. 2005 Oct 15;331(7521):877. Epub 2005 Sep 16.
- SOHDA S, ARINAMI T, RAMADA HY, AMADA N, RAMAGUCHI H, KUBO T. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J. Med. Genet.*, 34:525-6, 1997.

- STARMER J, MAGNUSON T. A new model for random X chromosome inactivation. *Development*. 2009 Jan;136(1):1-10. Epub 2008 Nov 26.
- SUTHERLAND A, COOPER DW, HOWIE PW, LISTON WA, MACGILLIVRA YL. The incidence of severe pre-eclampsia amongst mothers and mothers-in-law of pre-eclamptics and controls. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, 88:785-91, 1981.
- TAKAGI N, SASAKI M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, 256(5519): 640-42, 1975.
- THURSTON A, LUCAS ES, ALLEGRUCCI C, STEELE W, YOUNG LE. Region-specific DNA methylation in the preimplantation embryo as a target for genomic plasticity. *Theriogenology*. 2007 Sep 1;68 Suppl 1:S98-106. Epub 2007 May 4.
- TAI CL, ROWNTREE RK, COHEN DE, LEE JT. Higher order chromatin structure at the X-inactivation center via looping DNA. *Dev Biol*, 319, 416-25, 2008.
- URBICH C, KUEHBACHER A, DIMMELER S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc. Research.*, 79(4):581-8, 2008.
- UZ E, DOLEN I, AL AR, OZCELIK T. Extremely skewed X-chromosome inactivation is increased in pre-eclampsia. *Hum. Genet.*, 121(1):101-05, 2007.
- VAIMAN D, MONDON F, GARCES-DURAN A, MIGNOT TM, ROBERT B, REBOURCET R, JAMMES H, CHELBI ST, QUETIN F, MARCEAU G, SAPIN V, PIUMI F, DANAN JL, RIGOURD V, CARBONNE B, FERRE F. Hypoxia-activated genes from early placenta are elevated in preeclampsia, but not in Intra-Uterine Growth Retardation. *BMC Genom.*, 6, 111, 2005.
- VALENCIA-SANCHEZ MA, LIU J, HANNON GJ, PARKER R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.*,20(5):515-24, 2006.
- VAN DIJK M, MULDER J, POUTSMA A, KÖNST AA, LACHMEIJER AM, DEKKER GA, BLANKENSTEIN MA, OUDEJANS CB. Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat. Gen.*, 37(5):514-19, 2005.
- VON DADELSZEN P, MAGEE LA, ROBERTS JM. Subclassification of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 22:143–148, 2003.
- XU N, TAI CL, LEE JT. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science*, 311:1149-52, 2006.

- XU N, DONOHOE, ME, SILVA SS, LEE JT. Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctf protein. *Nat, Genet*, 39:1390-96, 2007
- WALKER SR, WELLS AD, RANDALL J. Right upper quadrant pain peculiar to pregnancy. *Br J Hosp Med.*, 58(8):411-12, 1997.
- WIENHOLDS E., KLOOSTERMAN WP., MISKA E., ALVAREZ-SAAVEDRA E., BEREZIKOV E., DE BRUIJN E., HORVITZ RH., KAUPPINEN S., PLASTERK RH. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 309: 310–11, 2005.
- WILSON ML, GOODWIN TM, PAN VL, INGLES SA., Molecular Epidemiologia of Preeclampsia. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 58(1):39-66, 2003.
- YORIFUJI T, MUROI J, KAWAI M, SASAKI H, MOMOI T, FURUSHO K. PCR-based detection of mosaicism in Turner Syndrome patients. *Hum. Genet.*, 99:62-5, 1997.
- ZENG SM, YANKOWITZ J. X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta*. 24(2-3):270-75, 2003.
- ZHAO J, SUN BK, ERWIN JA, SONG JJ, LEE JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*. 2008 Oct 31;322(5902):750-6.
- ZHOU ZX, SAR M, SIMENTAL JA, LANE MV, WILSON EM.. A ligand-dependent bipartite nuclear targeting signal in the human androgen receptor. Requirement for the DNA-binding domain and modulation by NH2-terminal and carboxyl-terminal sequences. *J. Biol. Chem.*, 269(18):13115-23, 1994.

APÊNDICES

Tabela 4a. Resultados da genotipagem e dos tamanhos dos fragmentos produzidos pela eletroforese capilar em placentas e sangue materno provenientes de gestações normais (grupo controle) e recém-nascidos do sexo feminino.

nº Caso	Genot./Sangue		Ensaio de <i>HUMARA</i> -SQ/Sangue		Genot./Placenta		Ensaio de <i>HUMARA</i> -SQ/Placenta	
	<i>IGF2</i>	<i>H19</i>	Alelo A	Alelo B	<i>IGF2</i>	<i>H19</i>	Alelo A	Alelo B
1	AG	BB	238	241	AA	BB	241	241
5	GG	AB	230	241	GG	BB	230	241
6	AG	AB	235	241	GG	AA	230	241
8	AG	AB	221	241	GG	BB	235	241
10	GG	AB	241	241	GG	AB	230	241
18	AG	AA	224	230	GG	AA	224	227
20	GG	BB	235	240	AG	BB	224	235
21	GG	AB	216	235	GG	BB	224	235
22	GG	BB	218	232	GG	S/D	227	232
24	AG	AB	227	247	GG	BB	227	227
26	AG	BB	221	238	GG	AB	221	224
27	AG	AB	230	255	GG	BB	230	235
33	GG	AB	227	241	GG	BB	227	241
36	GG	AB	230	249	AG	AB	230	238
37	GG	AB	216	249	GG	AB	230	249
39	GG	BB	221	252	AG	AB	230	252
40	GG	AA	224	227	GG	BB	224	227

(Genot): genotipagem

Tabela 5a. Resultados da genotipagem e dos tamanhos dos fragmentos produzidos pela eletroforese capilar em sangue materno provenientes de gestações normais (grupo controle) e recém-nascidos do sexo masculino

nº Caso	Gene <i>TSPY</i>	Genot./ Placenta		Genot./Sangue		Ensaio de <i>HUMARA-SQ</i> /Sangue	
		<i>IGF2</i>	<i>H19</i>	<i>IGF2</i>	<i>H19</i>	Alelo A	Alelo B
2	+	AG	AB	AG	BB	218	235
3	+	GG	BB	GG	BB	227	241
4	+	GG	AB	AG	AB	210	227
7	+	ND	ND	GG	ND	235	235
9	+	ND	ND	AA	AB	232	235
11	+	GG	ND	GG	BB	224	224
12	+	AG	ND	GG	AB	224	230
13	+	AG	AA	AG	AA	224	241
14	+	GG	ND	AG	BB	230	233
15	+	GG	ND	GG	BB	210	224
16	+	ND	ND	GG	AB	218	244
17	+	GG	AB	ND	ND	224	227
19	+	GG	AB	AG	BB	218	230
23	+	ND	BB	GG	AB	218	241
25	+	GG	BB	ND	ND	232	238
28	+	GG	ND	GG	BB	230	230
29	+	GG	AB	GG	BB	216	238
30	+	AG	BB	AG	AB	230	237
31	+	AG	BB	GG	BB	227	230
32	+	GG	AB	GG	AB	238	247
34	+	GG	ND	GG	AB	221	230
35	+	GG	ND	GG	AB	227	241
38	+	GG	BB	GG	BB	205	230

(+): resultado positivo para o gene *TSPY*

Tabela 6a. Resultados da genotipagem e dos tamanhos dos fragmentos produzidos pela eletroforese capilar em placentas e sangue materno provenientes de gestações com PE e recém-nascidos do sexo feminino

nº Caso	Genot./Placenta		Ensaio de <i>HUMARA-SQ</i> /Placenta		Genot./Sangue		Ensaio de <i>HUMARA-SQ</i> /Sangue	
	<i>IGF2</i>	<i>H19</i>	Alelo A	Alelo B	<i>IGF2</i>	<i>H19</i>	Alelo A	Alelo B
43	GG	AB	221	235	GG	BB	221	235
45	ND	BB	230	241	GG	AB	232	241
46	AG	AB	244	249	GG	AB	230	244
48	GG	AA	230	241	GG	AB	230	244
49	GG	BB	231	235	GG	BB	231	235
50	GG	AB	224	227	GG	BB	224	224
52	AG	AB	221	226	GG	BB	221	244
55	GG	AB	241	244	GG	AB	221	241
56	GG	AB	224	227	GG	AB	224	244
58	AG	BB	218	258	GG	AB	218	244

Tabela 7a. Resultados da genotipagem e dos tamanhos dos fragmentos produzidos pela eletroforese capilar em sangue materno provenientes de gestações com PE e RNs do sexo masculino.

nº Caso	Gene <i>TSPY</i>	Genot./Placenta		Genot./Sangue		Ensaio de <i>HUMARA-SQ</i> /Sangue	
		<i>IGF2</i>	<i>H19</i>	<i>IGF2</i>	<i>H19</i>	Alelo A	Alelo B
41	+	GG	ND	GG	AB	221	227
42	+	GG	BB	GG	BB	224	244
44	+	AG	BB	AG	AB	210	229
47	+	AG	BB	AG	BB	230	246
51	+	AG	AB	AG	AB	232	238
53	+	GG	ND	GG	ND	221	224
54	+	GG	BB	GG	BB	224	227
57	+	GG	BB	AG	BB	218	224

(+): resultado positivo para o gene *TSPY*

Tabela A. IXP e IXA em sangue e placenta nos grupos Controle e PE

Grupo	positiva (IXP)	negativa (IXA)	total
Controle	19	23	42
PE	7	11	18
Total	26	34	60

χ^2 calculado = 0,388^{ns}

IXP: inativação preferencial do cromossomo X; IXA: inativação aleatória do cromossomo X;
PE: pré-eclâmpsia

Tabela B. IXP e IXA em sangue nos grupos Controle e PE

Grupo	positiva (IXP)	negativa (IXA)	total
Controle	14	16	30
PE	4	7	11
	18	23	41

χ^2 calculado = 0,347^{ns}

IXP: inativação preferencial do cromossomo X; IXA: inativação aleatória do cromossomo X;
PE: pré-eclâmpsia

Tabela C: IXP e IXA em placenta nos grupos Controle e PE

Grupo	positiva (IXP)	negativa (IXA)	total
Controle	6	6	12
PE	3	4	7
	9	10	19

χ^2 calculado = 0,091^{ns}

IXP: inativação preferencial do cromossomo X; **IXA:** inativação aleatória do cromossomo X; **PE:** pré-eclâmpsia

Tabela D: IXP e IXA em sangue de recém-nascido masculino e feminino do grupo Controle

Sexo	positiva (IXP)	negativa (IXA)	total	t
M	6	10	16	
F	8	6	14	
	14	16	30	

χ^2 calculado = 1,158^{ns}

IXP: inativação preferencial do cromossomo X; IXA: inativação aleatória do cromossomo X; RN: recém-nascido; M: masculino; F: feminino

Tabela E: IXP e IXA em sangue de recém-nascido masculino e feminino do grupo PE

Sexo	positiva (IXP)	negativa (IXA)	total	t
M	2	4	6	
F	2	3	5	
	4	7	11	

χ^2 calculado = 0,052^{ns}

IXP: inativação preferencial do cromossomo X; IXA: inativação aleatória do cromossomo X
PE: pré-eclâmpsia; M: masculino; F: feminino

Tabela F: IXP e IXA em sangue e placenta

Tecido	positiva (IXP)	negativa (IXA)	total	t
sangue	18	23	1	4
placenta	9	10	9	1
	27	33	0	6

χ^2 calculado = 0,063^{ns}

IXP: inativação preferencial do cromossomo X; **IXA:** inativação aleatória do cromossomo X

ARTIGO PUBLICADO

Cryptic mosaicism involving a second chromosome X in patients with Turner syndrome

A. Araújo and E.S. Ramos

Grupo de Epigenética e Reprodução, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

Correspondence to: E.S. Ramos, Departamento de Genética, FMRP, USP, Av. Bandeirantes, 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil
E-mail: esramos@genbov.fmrp.usp.br

The high abortion rate of 45,X embryos indicates that patients with Turner syndrome and 45,X karyotype could be mosaics, in at least one phase of embryo development or cellular lineage, due to the need for the other sex chromosome presence for conceptus to be compatible with life. In cases of structural chromosomal aberrations or hidden mosaicism, conventional cytogenetic techniques can be ineffective and molecular investigation is indicated. Two hundred and fifty patients with Turner syndrome stigmata were studied and 36 who had female genitalia and had been cytogenetically diagnosed as having "pure" 45,X karyotype were selected after 100 metaphases were analyzed in order to exclude mosaicism and the presence of genomic Y-specific sequences (*SRY*, *TSPY*, and *DAZ*) was excluded by PCR. Genomic DNA was extracted from peripheral blood and screened by the human androgen receptor (*HUMARA*) assay. The *HUMARA* gene has a polymorphic CAG repeat and, in the presence of a second chromosome with a different *HUMARA* allele, a second band will be amplified by PCR. Additionally, the CAG repeats contain two methylation-sensitive *HpaII* enzyme restriction sites, which can be used to verify skewed inactivation. Twenty-five percent (9/36) of the cases showed a cryptic mosaicism involving a second X and approximately 14% (5/36), or 55% (5/9) of the patients with cryptic mosaicism, also presented skewed inactivation. The laboratory identification of the second X chromosome and its inactivation pattern are important for the clinical management (hormone replacement therapy, and inclusion in an oocyte donation program) and prognostic counseling of patients with Turner syndrome.

Key words: Turner syndrome; X-inactivation; *HUMARA* assay; DNA methylation; Cryptic mosaicism

Research supported by CNPq (#408856/2006-8 and #133215/2003-2), FAEPA, CAPES, PRONEX and FAPESP (#2005/00616-5).

Received November 8, 2007. Accepted April 24, 2008

Introduction

The Ullrich-Turner syndrome or Turner syndrome (TS) is defined as the combination of phenotypic features and complete or partial absence of one of the X chromosomes, frequently accompanied by cell line mosaicism, in women. About 99% of the cases where 45,X is present at the time of human conception, a natural miscarriage occurs in the first stages of embryonic development (1). This has led to the widely held hypothesis that, in order to be viable, a 45,X conceptus must possess another cell line, at least in some

critical organs or at a critical period during embryogenesis (1,2). For this reason, many females with TS stigmata who have been ascribed a non-mosaic 45,X karyotype after cytogenetic analysis of a limited number of cells may, in fact, be mosaics (3). In addition to occult mosaicism, other factors affecting the phenotype have not yet been fully elucidated, including genomic imprinting or anomalous X inactivation, leading to difficulties in diagnosis and genetic counseling (4).

In mammals, X-inactivation (XI) silences one of the two female X chromosomes and is associated with a series of

epigenetic modifications in the inactive X, including DNA methylation, and histone modifications (5,6). In addition, the inactive X chromosome condenses into the Barr body and becomes late replicated during the S phase. At the initiation of XI in early embryogenesis, *XIST* RNA (*XIST* in human and *Xist* in mouse) becomes stable and coats the inactive X in *cis* (7,8). Adding further to the curiosities of XI is the discovery that *Xist* is regulated in *cis* by an antisense gene (*Tsix*) expression, which blocks the accumulation of *Xist* RNA along the future active X (Xa). Studies have shown the presence of an insulator and transcription factor, CTCF, as a candidate *trans*-acting factor for X chromosome selection in the mouse (9). If both X chromosomes are intact in a female, the choice of which one becomes inactivated is usually random. However, if one chromosome is structurally abnormal, it is typically inactivated in a majority of cells in the adult. If one X containing *XIST* is involved in a balanced translocation with an autosome, the normal X is usually inactivated, whereas the abnormal X is inactivated in some unbalanced translocations (10). Structural defects that delete *XIST* result in the failure of X inactivation (7).

Understanding the inactivation process makes it possible to study the existence or absence of a second X

chromosome in patients with 45,X karyotype (11). The human androgen receptor (*HUMARA*) gene, mapped on Xq12, has a polymorphic CAG repeat with 87% heterozygosity. In the presence of a second chromosome with a different *HUMARA* allele, the second band will be amplified by PCR. The CAG repeats contain two methylation-sensitive *HpaII* enzyme restriction sites. In the *HUMARA* assay, prior to PCR amplification, genomic DNAs are digested with *HpaII* (Figure 1) (11). The *HUMARA* assay was used to detect low-level mosaicism involving X chromosomes in 45,X patients.

Patients and Methods

Patients

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Clinical Hospital of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. The medical records from 1991 to 2005 of 250 patients with TS stigmata and female genitalia were reviewed, and the cases with 45,X karyotype were selected, after 100 metaphases were analyzed in order to exclude mosaicism (12). These patients were investigated for Y-specific sequences (*SRY*, *TSPY* and *DAZ*) in peripheral blood by Bartmann et al. (13) and by us (data not shown) and 36 patients were considered 45,X and Y-negative. In addition, four normal men (negative controls) and four normal women (positive controls) were included.

Molecular genetic analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood (14). A modified *HUMARA* assay from Yorifuji et al. (11) was carried out to detect X chromosome mosaicism. Prior to PCR, the DNA samples were digested with *HpaII* in 10 μ L, overnight at 37°C. Aliquots (1 μ L) of the digested DNA were used to amplify the segment spanning the CAG repeats in the *HUMARA* gene. The sequences of the primers were as follows: forward primer (*HUMARA*-1) 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3'; reverse primer (*HUMARA*-2) 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCTCAT-3'. The PCR products were diluted 1000-fold in distilled water and 1- μ L aliquots were used for the second cycle of nested PCR. The second set of primers was: 5'-GTGCGCGAAGT GATCCAGAA-3' (*HUMARA*-3) and 5'-CCAGGACCAGG TAGCCTGTG-3' (*HUMARA*-4). For band pattern comparison, the results with and without *HpaII* digestion were run side by side on electrophoresis gel for each patient. The DNA of normal men and women was also used. PCR was performed in 25 μ L and the products were analyzed by electrophoresis through 10% polyacrylamide gels and stained with silver nitrate.

Figure 1. *HUMARA* assay. When an X chromosome is inactive, these *HpaII* sites are methylated (oblong circles) and are resistant to digestion, and subsequent PCR yields products of the expected size (left side of the figure). However, when an X chromosome is active, these *HpaII* sites are not methylated (inverted triangles without oblong circles) and are susceptible to *HpaII* digestion and, consequently, PCR amplification fails to yield products (right side of the figure) (Modified from Ref. 11).

Results

The data for mosaicism involving a second X chromosome indicate that 25% (9/36) had a second X chromosome and 14% (5/36), or 55% (5/9) of the patients with cryptic mosaicism, also presented skewed inactivation (Table 1).

Discussion

Several studies have been carried out to detect X cryptic mosaicism in cytogenetically 45,X cases. The frequency reported varies from 0-75% (Table 2) (1,3,11,15-23) and in most cases a second X chromosome was detected, but skewed inactivation is not. Although peripheral blood may not represent the rest of the tissues of the body, analysis of samples of other tissues usually depends on invasive procedures. In the study of Yorifuji et al. (11), 11% (2/18) of the patients with 45,X karyotype were positive for X chromosome mosaicism using the HUMARA assay. For these authors, the detection limit was one in 960 cells (11), and we have used the same detection limit.

Different numbers of metaphases have been analyzed to identify the karyotype as a "pure" 45,X (Table 2). It should be noted that in our study 100 metaphases from each patient were analyzed by conventional cytogenetics, in order to detect chromosomal mosaicism equal or superior to 3% with a confidence interval of 0.90 or 5% with a confidence interval of 0.99 (12). The number of cells ana-

lyzed by us was greater than reported for other studies, in which the maximum number of metaphases analyzed was usually up to 50 cells. Therefore, the sample used in the present study was very carefully selected and a very small number of informative cases were considered. Nevertheless, in 25% (9/36) of these cases the HUMARA assay revealed the presence of X cryptic mosaicism (Figure 2).

The choice of which X chromosome becomes inactivated is usually a random process. However, if one X chromosome is structurally abnormal it is skewed inacti-

Table 1. Results of the molecular analysis of 36 patients with karyotype 45,X [100].

Number of patients	X molecular analysis		
	Without <i>Hpa</i> II	With <i>Hpa</i> II	Results
20	1	1	NI
7	1	0	NI
4	1	2 (=)	XM
3	1*	1*	XM/SI
1	1	2 (> <)	XM/SI
1	2 (< >)	1 (>)	XM/SI

One hundred metaphases of each patient were analyzed. NI = not informative for mosaicism and skewed inactivation; SI = skewed inactivation; XM = X chromosome mosaicism; *with and without digestion giving different band patterns; 0, 1, and 2 in the columns *Hpa*II show the number of bands; (>) = band of greater intensity; (<) = band of lower intensity; (=) = bands of equal intensity.

Table 2. Reports of cryptic mosaicism involving a second X chromosome in patients with Turner syndrome.

Reference	Method	Cells analyzed/patient (N)	Subjects with 45,X studied	Second X (%)
Hassold et al. (1)	Cytog/PCR	4 to 120	31 abortions, 5 liveborns	5.5
Mathur et al. (15)	Cytog/Southern blot	≥25	25 patients	0
Gicquel et al. (16)	Cytog/Southern blot	4 to 50	29 patients	3.5
Hassold et al. (17)	Cytog/Southern blot	3 to 80	27 abortions, 10 liveborns	10.8
Larsen et al. (3)	Cytog/Southern blot	≥50	40 patients	15
Jacobs et al. (18)	Cytog/PCR	100	84 patients	2.4
Yorifuji et al. (11)	Cytog/HUMARA	>20	18 patients	11
Nazarenko et al. (19)	Cytog/FISH	≥29 (Cytog) 200 to 1007 (FISH)	21 patients	42.8
Fernández-García et al. (20)	Cytog/FISH	30 (Cytog) 254 to 1326 (FISH)	16 patients	75
Hanson et al. (21)	Cytog/FISH	10 to 68 (Cytog) 161 to 313 (FISH)	23 patients	43
Monroy et al. (22)	Cytog/PCR	100	10 patients	0
Wiktor and Van Dyke (23)	Cytog/FISH	≥30 (Cytog) 500 (FISH)	22 patients	14
Present study	Cytog/HUMARA	100	36 patients	25

Cytog = conventional cytogenetics analysis; HUMARA = human androgen receptor assay; FISH = fluorescence *in situ* hybridization analysis; PCR = polymerase chain reaction with other X chromosome markers; Second X (%) = cases with a second X chromosome.

vated in the majority of cells in the adult (19). Although it is a semi-quantitative test in the way that it was carried out here (an automated sequencer for the analysis was not used), 55% (5/9) of the cases of X cryptic mosaicism also revealed the presence of skewed inactivation, showing the possible presence of a second structurally altered X chromosome that was selectively inactivated and amplified (Figure 2).

We used the *HUMARA* assay for the detection of low-level mosaicism in TS for several reasons. First, the locus is located at Xq12 (between the centromere and the X-inactivation center at Xq13) and a structurally abnormal X chromosome would probably retain the locus. Second, since the locus is highly polymorphic (percentage heterozygosity is about 87-90%), the chance of the second X chromosome having a different allele is high. Third, it has been shown in TS that the structurally abnormal X chromosome is inactivated selectively and will be amplified selectively. Even in patients with 45,X/46,XX karyotype, the allele of the second X will be more efficiently amplified, since X chromosomes in 46,XX cells are randomly inactivated; therefore, both alleles will be equally amplified, even in the presence of a large excess of 45,X cells (11).

Figure 2. Results of *HUMARA* nested PCR amplification visualized on a 10% polyacrylamide gel electrophoresis stained with silver nitrate. M1 and M2 = Normal men DNA without prior digestion with *HpaII* (only one band corresponding to the presence of one X chromosome); W = normal woman DNA without prior digestion with *HpaII* (two bands corresponding to the presence of two X chromosomes); Wd = DNA from a normal woman with prior digestion with *HpaII* (two bands corresponding to the presence of two X chromosomes inactivated, showing the female natural mosaicism for the X-inactivation); P = DNA from a patient with karyotype 45,X [100] (a strong and a very weak band, showing a positive result for cryptic X chromosome mosaicism); Pd = DNA from a patient (P) treated with *HpaII* (only one band showing a skewed inactivation); Mar = molecular marker (100 bp). One hundred metaphases of each patient were analyzed.

In the remaining patients (27/36), the allele of a second X chromosome was not detected by the *HUMARA* assay. In seven (7/27) of these cases no band was visualized after enzyme digestion, possibly due to the complete digestion of the material by the restriction enzyme. This indicated that these patients could be "pure" 45,X in peripheral blood, with the probability of other lineages in other tissues, or of being mosaics 45,X/46,XY. The last hypothesis was excluded (Araújo A, Ramos ES, unpublished data) and Bartmann et al. (13), at least in peripheral blood, using PCR for Y-specific sequences. Twenty cases (20/27) were not informative, because they all presented the same band after digestion with *HpaII*. The reason for this phenomenon could be due to incomplete digestion with the enzyme *HpaII* (11). Another explanation is the presence of homozygote individuals in the sample studied or the presence of alleles with a very close band pattern, due to a small difference in the number of repetitive CAG between them. However, these samples could be "pure" 45,X in peripheral blood, with other lineages in different tissues, or 45,X/46,XY, excluded in the blood by PCR using Y-specific sequences. Some other cases which are not informative could be explained by uniparental isodisomy of the original X chromosome (both of the X chromosomes would have the same allele and therefore would not be identified) (11).

The reagents and equipment used in the present study can be found in the majority of hospitals and the *HUMARA* test could be included in routine clinical investigation. The sensitivity was high and the *HUMARA* assay, as used here, could be used in association with the PCR (using Y-specific sequences) and cytogenetic analysis (conventional and molecular). The laboratory identification of the presence of the second X chromosome and its pattern of inactivation, associated with the exclusion of the Y chromosome, are important for the clinical management and prognostic counseling of patients with TS.

Acknowledgments

The authors are grateful to the patients and their families, Lisandra Cristina Caetano, Marli Aparecida Vanni Galerani, and the staff of the Cytogenetic Laboratory and the Multidisciplinary Sex Determination and Differentiation Team of the University Hospital of the Medicine School of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

References

1. Hassold T, Benham F, Leppert M. Cytogenetic and molecular analysis of sex-chromosome monosomy. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 534-541.
2. Kalousek DK, Dill FJ, Pantzar T, McGillivray BC, Yong SL, Wilson RD. Confined chorionic mosaicism in prenatal diagnosis. *Hum Genet* 1987; 77: 163-167.
3. Larsen T, Gravholt CH, Tillebeck A, Larsen H, Jensen MB, Nielsen J, et al. Parental origin of the X chromosome, X chromosome mosaicism and screening for "hidden" Y chromosome in 45,X Turner syndrome ascertained cytogenetically. *Clin Genet* 1995; 48: 6-11.
4. Chu CE, Connor JM. Molecular biology of Turner's syndrome. *Arch Dis Child* 1995; 72: 285-286.
5. Lucchesi JC, Kelly WG, Panning B. Chromatin remodeling in dosage compensation. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 615-651.
6. Bantignies F, Cavalli G. Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 275-283.
7. Avner P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 59-67.
8. Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* 2003; 300: 131-135.
9. Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Davidow LS, Lee JT. CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science* 2002; 295: 345-347.
10. Disteche CM, Swisshelm K, Forbes S, Pagon RA. X-inactivation patterns in lymphocytes and skin fibroblasts of three cases of X-autosome translocations with abnormal phenotypes. *Hum Genet* 1984; 66: 71-76.
11. Yorifuji T, Muroi J, Kawai M, Sasaki H, Momoi T, Furusho K. PCR-based detection of mosaicism in Turner syndrome patients. *Hum Genet* 1997; 99: 62-65.
12. Hook EB. Exclusion of chromosomal mosaicism: tables of 90%, 95% and 99% confidence limits and comments on use. *Am J Hum Genet* 1977; 29: 94-97.
13. Bartmann AK, Caetano LC, Rios AF, Vila RA, Ramos ES. TSPY detection in blood, buccal, and urine cells of patients with 45,X karyotype. *Am J Med Genet A* 2004; 130: 320-321.
14. Olerup O, Zetterquist H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 1992; 39: 225-235.
15. Mathur A, Stekol L, Schatz D, MacLaren NK, Scott ML, Lippe B. The parental origin of the single X chromosome in Turner syndrome: lack of correlation with parental age or clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 682-686.
16. Gicquel C, Cabrol S, Schneid H, Girard F, Le Bouc Y. Molecular diagnosis of Turner's syndrome. *J Med Genet* 1992; 29: 547-551.
17. Hassold T, Pettay D, Robinson A, Uchida I. Molecular studies of parental origin and mosaicism in 45,X conceptuses. *Hum Genet* 1992; 89: 647-652.
18. Jacobs P, Dalton P, James R, Mosse K, Power M, Robinson D, et al. Turner syndrome: a cytogenetic and molecular study. *Ann Hum Genet* 1997; 61: 471-483.
19. Nazarenko SA, Timoshevsky VA, Sukhanova NN. High frequency of tissue-specific mosaicism in Turner syndrome patients. *Clin Genet* 1999; 56: 59-65.
20. Fernandez-Garcia R, Garcia-Doval S, Costoya S, Pasaro E. Analysis of sex chromosome aneuploidy in 41 patients with Turner syndrome: a study of 'hidden' mosaicism. *Clin Genet* 2000; 58: 201-208.
21. Hanson L, Bryman I, Barrenas ML, Janson PO, Wahlstrom J, Albertsson-Wikland K, et al. Genetic analysis of mosaicism in 53 women with Turner syndrome. *Hereditas* 2001; 134: 153-159.
22. Monroy N, Lopez M, Cervantes A, Garcia-Cruz D, Zafra G, Canun S, et al. Microsatellite analysis in Turner syndrome: parental origin of X chromosomes and possible mechanism of formation of abnormal chromosomes. *Am J Med Genet* 2002; 107: 181-189.
23. Wiktor AE, Van Dyke DL. Detection of low level sex chromosome mosaicism in Ullrich-Turner syndrome patients. *Am J Med Genet A* 2005; 138: 259-261.