Joana Carvalho Moreira de Mello

Estudo do padrão de inativação do
cromossomo X em tecido extra-embrionário
humano

São Paulo

2010

Joana Carvalho Moreira de Mello

Estudo do padrão de inativação do
cromossomo X em tecido extra-embriônico
humano

X-chromosome inactivation pattern in human
extra-embryonic tissue

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Ciências, na Área de
Biologia (Genética).

Orientadora: Profa. Dra. Lygia da Veiga
Pereira Carramaschi

São Paulo

2010

de Mello, Joana Carvalho Moreira

Estudo do padrão de inativação do cromossomo X em tecido extra-embrionário humano

110 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Descritores: 1. Placenta. 2. Inativação do cromossomo X. 3. Epigenética. 4. Expressão gênica alelo-específica

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Orientadora

Aos meus pais, pelo eterno apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho e com o meu desenvolvimento científico e intelectual, obrigada!

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Lygia Pereira, por me confiar esse projeto, sei do carinho especial que ela sente por este assunto; por agüentar pacientemente minhas insistências em querer terminar tudo e completar todas as gigantescas tabelas; mas principalmente, eu quero agradecê-la, por me iniciar no apaixonante campo da epigenética.

Faço um agradeco em particular à Dra. Anamaria Camargo pela pronta disponibilidade em discutir meus resultados, seu conhecimento foi fundamental para a interpretação em nossas análises; muito obrigada também aos, então alunos, hoje doutores, Daniel Vidal e Jorge Souza pela paciência em me explicar e me ensinar a como usar a bioinformática e a matemática. Somente assim foi possível ver sentido em resultados que teimavam em me desesperar.

Coloco aqui um agradecimento especial à Dra. Estela Bevilacqua, pela histologia de nosso material e também por contribuir com a dissecação de algumas amostras. Mas quero agradecê-la principalmente pelas portas sempre abertas em seu laboratório, pelas aulas particulares de anatomia e desenvolvimento dos tecidos extra-embrionários, e pelo apoio e incentivo em divulgar meu trabalho.

Agradeço também ao Dr. Paulo Otto e a muitos dos professores de nosso departamento pelos equipamentos emprestados e ajudas científicas. Em particular Dra. Sabine, por me tirar muitas vezes do mundinho da biologia molecular e me

mostrar a intrigante paleopatologia; e à Dra. Angela, que pelo seu interesse pelo meu trabalho, tanto me incentivou a discuti-lo em seus cursos de graduação e pós-graduação. Obrigada, meninas!

Sou muito grata à Silvana Teruel, por ter coletado com tanto cuidado e dedicação as minhas amostras; à Denilce Sumita, pelos microssatélites; ao Márcio Yamamoto, pela ajuda técnica no seqüenciamento.

Quero agradecer os companheiros do tortuoso curso da pesquisa em pós-graduação, Lilian, Fernando, Jacaré, Frank e por todo carinho, à Rafa. Agradeço também às queridas Mara e Fátima. Obrigada a todos vocês, sempre prontos a me amparar tecnicamente, intelectualmente e emocionalmente.

Aos meus colegas de laboratório, passados e presentes, principalmente às minhas pupilinhas Lys e Érica. Mas faço aqui um agradecimento especial à Ana Maria, Érica e Raquel, sem as quais, tenho certeza, meu cérebro teria fundido. Para vocês não tenho palavras, obrigada amigas!

Aos meus colegas de graduação, alguns já Mestres: Batata e Mônica; outra quase, Alice; e a minha, agora oficialmente comadre, Carol. Não posso deixar de agradecer às minhas amigas e mentoras: Camila, Sandra, Carol e Luciana. A todos vocês agradeço por fazerem desses últimos sete anos tão especiais.

E finalmente à minha família, toda ela! Sobretudo ao Ruggero, por seu carinho. Mas agradeço especialmente os meus pais, os quais admiro mais que tudo. Fico feliz quando, atentos, ouvem a tudo que eu tento explicar: minha mãe a mais nova amante da epigenética e ao meu pai que me deu tanto suporte a vida inteira. Sei que torceram, vibraram e se orgulharam a cada luta.

Lista de figuras.....	I
Lista de tabelas.....	III
Lista de abreviaturas.....	IV
1. Introdução.....	1
1.1. Determinantes sexuais.....	1
1.2. Surgimento dos cromossomos sexuais.....	2
1.3. Mecanismos de compensação de dose.....	4
1.3.1. Invertebrados.....	4
1.3.2. Mamíferos eutérios.....	6
1.4. Inativação do cromossomo X.....	7
1.5. Inativação “imprintada” e aleatória.....	12
1.5.1. Inativação “imprintada” em humanos.....	13
2. Objetivos.....	18
3. Materiais e métodos.....	19
3.1. Obtenção das amostras.....	19

3.2. Obtenção dos ácidos nucleicos.....	20
3.2.1. Parental.....	20
3.2.2. Extra-embrionário.....	20
3.2.2.1. DNA.....	20
3.2.2.2. RNA.....	21
3.2.3. Síntese de cDNA.....	21
3.3. Seleção dos polimorfismos e síntese dos iniciadores.....	22
3.4. Genotipagem do DNA genômico e verificação do alelo expresso pela análise de cDNA.....	24
3.4.1. Amplificação por técnica de PCR e RT-PCR.....	25
3.4.2. Reação de seqüenciamento direto.....	25
3.5. Análise a partir dos eletroferogramas.....	26
3.6. Controles.....	32
3.6.1. Caracterização histológica.....	32
3.6.2. Microssatélites.....	33
3.6.3. Controle de contaminação do RNA com DNA genômico.....	34
3.6.4. Comparação entre polimorfismos maternos e extra-embrionários....	34
3.6.5. Réplicas experimentais.....	35

4. Resultados.....	36
4.1. Controles.....	36
4.1.1. Caracterização das amostras.....	36
4.1.2. Genes selecionados.....	37
4.2. Análise do DNA genômico.....	38
4.3. Análise de expressão alelo-específica.....	39
4.4. Réplicas experimentais.....	53
5. Discussão.....	55
5.1. Importância da análise global da atividade gênica alelo-específica.....	55
5.2. Inativação aleatória em placenta humana.....	57
5.3. Processos evolutivos da ICX em mamíferos.....	59
6. Conclusão.....	62
Resumo.....	64
Abstract.....	66
Referências bibliográficas.....	67
Anexo 1.....	74

Anexo 2.....	76
Anexo 3.....	80
Anexo 4.....	102
Biografia.....	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferenciação dos cromossomos sexuais a partir de um par autossômico ancestral.....	3
Figura 2. Mecanismos de compensação de dose já descritos em invertebrados..	5
Figura 3. Mecanismos de compensação de dose em mamíferos.....	7
Figura 4. Exemplo de como visualizar os padrões esperados de ICX através do seqüenciamento de regiões codificadoras contendo polimorfismo de base única.....	27
Figura 5. Exemplo hipotético de casos de difícil classificação.....	28
Figura 6. Metodologia <i>in silico</i> para a definição do padrão de inativação do cromossomo X.....	31
Figura 7. Fotomicrografias de cortes histológicos de um fragmento de placenta coletado a termo.....	36
Figura 8. Eletroferogramas representativos de três dos nove genes analisados em linhagem de fibroblastos humanos com desvio total de inativação.....	40
Figura 9. Gráfico obtido dos valores atribuídos pelo programa <i>PeakPicker</i> para simulação de diferentes padrões de expressão alelo-específico.....	42
Figura 10. Quantificação de expressão alelo-específica pelo <i>PeakPicker</i> para o gene <i>ZFX</i>	43

Figura 11. Eletroferogramas representativos de três casos que revelam inativação completamente desviada e preferencial do cromossomo X paterno....	46
Figura 12. Eletroferogramas representativos de um caso de inativação desviada e outro de aleatória do cromossomo X.....	48
Figura 13. Quantificação da atividade gênica alelo-específica utilizando-se o programa <i>PeakPicker</i> para os genes <i>TCEAL4</i> e <i>GPC4</i>	49
Figura 14. Mosaicismo na placenta humana a termo em relação à escolha do X inativo.....	51
Figura 15. Consistência obtida através de réplica experimental.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão da literatura relacionada aos estudos sobre o padrão de ICX em tecidos extra-embrionários humanos.....	16
Tabela 2. Genes e SNPs selecionados.....	24
Tabela 3. Validade das amostras de placenta, quanto à presença de alelos heterozigotos em cada um dos genes analisados.....	39
Tabela 4. Sumário da expressão gênica alelo-específica em placenta humana...	45
Tabela 5. Caracterização do mosaicismos em placenta humana a termo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

AR – nome do gene em inglês, *Androgen receptor*

cDNA – DNA complementar

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

FMR1 – nome do gene em inglês, *Fragile X mental retardation 1*

G6PD – nome do gene em inglês, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*

IC – intervalo de confiança

ICX – inativação do cromossomo X

M – molar

Mb – megabase

MSY – do inglês, *Male specific Y-region*

mX – cromossomo X de origem materna

ncRNA – RNA nuclear não codificante

PAR – região pseudo-autossômica

PBS – solução tampão fosfato-salina

PCR – reação em cadeia de polimerase

PGK1 – nome do gene em inglês, *Phosphoglycerate kinase 1*

pX – cromossomo X de origem paterna

rcf – do inglês, *relative centrifugal force*

RNA – ácido ribonucléico

RT-PCR – reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa

SNP – polimorfismo de uma única base

SRY – nome do gene em inglês, S*ex* *determining* r*egion* Y

TAE – tampão Tris- Acetato- EDTA

TBE – tampão Tris-Borato EDTA

TDF – do inglês, T*estis-d*e*termining* f*actor*

TSIX/Tsix – nome do gene em inglês, *X (inactive)-specific transcript, antisense*

U – unidade

Xa – cromossomo X ativo

Xi – cromossomo X inativo

XIC – do nome em inglês, X *Inactivation* C*entre*

XIST/Xist – nome do gene em inglês, X-*inactive* s*pecific* t*ranscript*

1.1. DETERMINANTES SEXUAIS

No reino animal, a reprodução sexuada é encontrada de maneira predominante nos eucariontes multicelulares (revisto em Engelstadter, 2008). Esse modelo está diretamente relacionado à existência de gônadas sexuais masculinas e femininas, com os diferentes grupos de vertebrados tendo desenvolvido estratégias admiráveis e muito distintas de determinação sexual.

Os mecanismos para determinação sexual que conhecemos hoje podem ser tanto ambientais como estritamente genéticos. Vertebrados, como crocodilianos, algumas espécies de tartarugas, lagartos e peixes têm o sexo determinado ao longo do desenvolvimento embrionário e dependente das condições nas quais os ovos são incubados (revisto em Crews, 2003). Aves, mamíferos, muitos répteis e também alguns peixes têm o sexo determinado de forma genética; neles, o sexo é estabelecido no momento da fecundação e depende da presença de cromossomos sexuais ou mesmo de um único *locus* (revisto em Smith *et al.*, 2007 e em Graves, 2008). É possível ainda encontrar vertebrados capazes de combinar os dois mecanismos: existem alguns sapos cuja determinação do sexo cromossômico se dá no momento da fertilização, mas a diferenciação das gônadas e, portanto, o sexo gonadal pode ser influenciada pela temperatura da água na qual os girinos se desenvolvem (Nakamura, 2008).

O dimorfismo cromossômico é muito comum entre as espécies que possuem determinação sexual genética. Um dimorfismo bastante característico é aquele que ocorre em mamíferos, onde fêmeas têm dois cromossomos X e machos um

cromossomo X e um Y. Nesses organismos, o cromossomo X é em geral bem maior e contém mais genes que o Y, específico do sexo masculino. Nesse caso o sexo homogamético produz gametas que carregam sempre o mesmo cromossomo sexual, e o heterogamético produz dois tipos de gametas. Com esse sistema, o sexo do indivíduo será determinado no momento da fecundação e é dependente do gameta do sexo heterogamético (revisto em Graves, 2008).

1.2. SURGIMENTO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS

Nos mamíferos, a presença do gene determinante do sexo masculino, o *SRY*, localizado no cromossomo Y, parece estar diretamente relacionada com a evolução dos cromossomos sexuais. Essa é a hipótese mais aceita hoje, sendo que em 1914 H.J. Muller já havia proposto que os cromossomos sexuais derivaram de um par de autossomos, e mais tarde foi proposto que a aquisição do gene *SRY* pelo Y primitivo resultou na inibição da recombinação entre os futuros cromossomos sexuais (revisto em Graves, 2006). A aquisição do gene, determinante da formação de testículos, em combinação com o acúmulo de genes também específicos do sexo masculino, teria levado à diminuição de regiões recombinantes entre os dois homólogos (Rice, 1996; Charlesworth, 1991). A falta de recombinação na meiose levou a uma rápida degradação do cromossomo Y, restando apenas pequenas regiões com homologia no X, as regiões pseudo-autossômicas, importantes para o correto pareamento dos cromossomos sexuais no processo de meiose. Os cromossomos sexuais foram divergindo progressivamente (revisto em Graves, 2006) e, no homem moderno, o cromossomo X tem cerca de 155 Mb e aproximadamente 1.000 genes relacionados com as mais variadas funções (Ross *et al.*, 2005), enquanto que o Y com quase 60

Mb apresenta aproximadamente 100 genes (Skaletsky *et al.*, 2003), sendo a maioria relacionada com fertilidade e com características masculinas (Figura 1).

Figura 1. Diferenciação dos cromossomos sexuais a partir de um par autossômico ancestral. O processo tem início quando um dos pares adquire um *locus* de determinação sexual, no exemplo o TDF é o fator determinante de testículos (do inglês – *testis-determining factor*) no proto-Y. O acúmulo de alelos específicos de caracteres masculinos leva à diminuição de regiões recombinantes entre os dois homólogos (representadas pelas cruces), criando uma região específica do cromossomo X e outra específica dos machos no Y (MSY, do inglês – *male-specific region*). Tanto a exclusão da recombinação quanto o acúmulo de genes específicos do sexo masculino agravam as diferenças culminando na rápida degradação da MSY restando apenas uma pequena região pseudo-autossômica (PAR). A perda de recombinação está associada ao acúmulo de genes característicos dos machos. Este modelo leva em conta a diferença de tamanho e conteúdo dos cromossomos humanos X (à esquerda) e Y (à direita). Adaptado de Graves, 2006.

1.3. MECANISMOS DE COMPENSAÇÃO DE DOSE

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

1.3.1. INVERTEBRADOS

Dois modelos de estudo já foram bastante investigados, a mosca das frutas *Drosophila melanogaster* e o nemátoda *Caenorhabditis elegans*. Ambos têm seu sexo determinado de acordo com a relação entre o número de cromossomos X e o de autossomos, mas apresentam mecanismos distintos de compensação de dose.

A figura 2 mostra que, em drosófila, a compensação é alcançada pelo aumento da atividade transcricional do único cromossomo X dos machos (XY), podendo assim ser equiparada àquela observada nos dois cromossomos X presentes nas fêmeas (XX) (primeiramente descrito por Lakhotia e Mukherjee, 1970 e revisto em Cheng e Disteché, 2006).

Os machos de *C. elegans* apresentam um único cromossomo X enquanto que os hermafroditas possuem dois. Nesses últimos, a expressão dos dois cromossomos X é reprimida parcialmente chegando a níveis equivalentes à observada no único X dos machos. Análises globais de expressão gênica mostraram ainda que, em média, genes do cromossomo X transcrevem tanto quanto os dos pares de autossomos, sugerindo uma alta transcrição dos genes ligados ao X tanto nos hermafroditas quanto nos machos (Figura 2) (Gupta *et al.*, 2006).

Figura 2. Mecanismos de compensação de dose já descritos em invertebrados. Quando o nível de expressão nos autossomos é ajustado para 1 (blocos cinza), então o nível de expressão dos dois X do sexo homogamético e do único X do heterogamético também é igual a 1. Para que esse nível de compensação seja alcançado, o único cromossomo X nos machos de drosófila e *C. elegans* apresenta uma alta taxa de transcrição (indicado pelas setas ascendentes nos blocos azuis). Nas fêmeas de drosófila e hermafroditas de *C. elegans*, ambos os X são igualmente transcritos (blocos cor de rosa); entretanto, foi detectada uma alta na taxa transcritorial dos genes no cromossomo X também nos hermafroditas de *C. elegans* (setas ascendentes nos blocos cor de rosa). Adaptado de Cheng e Disteche, 2006.

1.3.2. MAMÍFEROS EUTÉRIOS

Os mamíferos placentários adquiriram dois intrincados mecanismos de compensação de dose. O mais estudado envolve a redução transcricional de um cromossomo sexual inteiro, fenômeno conhecido como inativação do cromossomo X (ICX). Esse mecanismo de inativação atua em nível cromossômico, e o silenciamento é estabelecido através de mudanças na cromatina do X que passa do estado ativo para o inativo, e assim permanece nos tecidos somáticos ao longo da vida da fêmea.

Em relação aos autossomos, o equilíbrio é alcançado em ambos os sexos pela alta transcrição dos genes no cromossomo X ativo (Xa) das fêmeas e também pelo único X dos machos (Nguyen e Disteché, 2006), de modo que a razão entre a transcrição no X e nos autossomos permaneça igual a 1 (Figura 3).

Figura 3. Mecanismos de compensação de dose em mamíferos. Quando o nível de expressão nos autossomos é ajustado para 1 (blocos cinza), verifica-se que o nível de expressão dos dois X das fêmeas e do único X do macho também se apresenta igual a 1. Para se alcançar esse nível de compensação, o cromossomo X ativo das fêmeas (bloco rosa) e o único X dos machos (bloco azul) têm a sua expressão gênica aumentada (setas ascendentes). O outro X das fêmeas é transcricionalmente inativado (seta descendente no bloco branco). Adaptado de Cheng e Disteché, 2006.

1.4. INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Desde o final da década de 1940, já se sabia que o núcleo das células de fêmeas e machos de mamíferos apresentava uma alteração morfológica que poderia ser considerada uma espécie de dimorfismo sexual. É possível observar no núcleo da célula feminina um corpúsculo periférico que tem a propriedade de se corar mais fortemente. Este recebeu posteriormente o nome de corpúsculo de Barr, a cromatina sexual (observada e descrita por Barr e Bertram, 1949). Dez anos depois, o grupo de Susumu Ohno publicou dois trabalhos reportando que cada cromossomo X das fêmeas apresentava um comportamento distinto (Ohno *et al.*, 1959; Ohno e

Hauschka, 1960). Eles observaram que, nas fêmeas, um dos cromossomos sexuais se comportava como os autossomos, entretanto, o outro se apresentava sempre mais condensado e com propriedades heterocromáticas. Os autores relacionaram o X heterocromático com a cromatina sexual que havia recentemente sido descrita por Barr e Bertram (1949).

No ano seguinte, a renomada pesquisadora Mary Lyon publicou um curto trabalho no qual associava a cromatina sexual com o X inativo (Xi) (Lyon, 1961). Através da observação fenotípica da cor da pelagem de camundongos (uma característica ligada ao X), Lyon sugeriu que, em diferentes células somáticas de um mesmo organismo, a cromatina sexual pode ser tanto o cromossomo X herdado da mãe, como o do pai. Ela salientou ainda que a cromatina sexual é, na verdade, o cromossomo X geneticamente inativo. Em humanos, a primeira constatação de que a ICX ocorre também de maneira aleatória foi publicada apenas alguns meses depois do trabalho de Mary Lyon (Beutler *et al.*, 1962). Ao avaliarem o sangue de mulheres heterozigotas para a deficiência da enzima G6PD (transcrita por um gene presente no cromossomo X), os pesquisadores perceberam que existiam duas populações de células: uma população com atividade normal dessa proteína e outra sem atividade. Os autores propuseram que, por algum período no desenvolvimento, ocorre um processo aleatório de distribuição de células com atividade do X paterno (pX) ou materno (mX), tornando as mulheres, assim, um mosaico em relação à ICX. No mesmo ano, Lyon publicou um extenso trabalho no qual descreveu diversos exemplos fenotípicos derivados do padrão aleatório de inativação do cromossomo X, observados em fêmeas de camundongos, gatos e humanos (Lyon, 1962).

Nos últimos 50 anos, os fenômenos relacionados à ICX, bem como os mecanismos do processo de inativação, têm sido extensivamente estudados em camundongos, humanos e também em alguns animais domésticos. Entretanto, apesar dos esforços para elucidar os eventos iniciais responsáveis por esse processo, estes ainda não são completamente compreendidos.

A inativação do cromossomo X é um impressionante exemplo de modificação e regulação epigenética que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, e que pode ser estudada *in vitro* durante a diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongos (revisto em Payer e Lee, 2008). Uma vez iniciado o processo, sua estabilidade é mantida durante as sucessivas divisões celulares e, assim, células em uma população clonal terão sempre o mesmo Xi. A estabilidade durante as mitoses é resultado de um sinergismo entre múltiplos fatores epigenéticos que caracterizam o estado inativo do cromossomo X (Csankovszki *et al.*, 2001). Esse estado heterocromático do Xi se deve a um complexo processo de múltiplas etapas, que envolvem mecanismos de contagem (quando a célula identifica quantos cromossomos X estão presentes por genoma haplóide); de escolha do futuro Xi (que compromete todos menos um cromossomo X ao processo de inativação); de início do processo de silenciamento; e manutenção do estado inativo.

Um *locus* chave para a ICX é o Centro de Inativação do Cromossomo X (XIC – do inglês X Inactivation Centre) (primeiramente descrito em camundongos por Rastan e Cattanach, 1983 e em humanos por Brown *et al.*, 1991). Antes de se estabelecer a inativação, em cada célula do embrião, ocorre uma íntima interação entre os XICs homólogos (Xu *et al.*, 2006; Bacher *et al.*, 2006). Essa interação está diretamente relacionada aos processos de contagem, escolha e iniciação do

silenciamento, sendo que cada célula irá inativar todos menos um cromossomo X por genoma diplóide. Assim, espera-se que células femininas $2n$ tenham um Xi e um Xa e células $4n$ apresentem dois Xi e dois Xa. É interessante observar que as células de homens com a síndrome de Klinefelter (47, XXY) também apresentam um Xi e um Xa, já mulheres com a síndrome de Turner (45, X) possuem apenas um X ativo.

O início do silenciamento depende da expressão, durante a embriogênese, de um gene especial localizado dentro da região do XIC, o *XIST* em humanos (Xq13.2), *Xist* nos outros mamíferos (do inglês *X-inactive specific transcript*). Em um primeiro momento, o gene *XIST/Xist* tem sua expressão positivamente regulada e transcreve para um RNA nuclear não codificante (ncRNA) que se associa em *cis* ao longo de toda a extensão do futuro Xi (Brockdorff *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1992; Clemson *et al.*, 1996). Em camundongos, foi identificado um gene anti-sentido ao *Xist*, o *Tsix* (do inglês - *X (inactive)-specific transcript, antisense*) (Lee *et al.*, 1999). A sequência de *Tsix* se sobrepõe a toda a extensão de *Xist*, e sua expressão está relacionada à supressão de *Xist*, mantendo o X ativo (Lee e Lu, 1999). Apesar de o homólogo humano ter sido descrito em 2001 (Migeon *et al.*, 2001), estudos sobre sua existência e sua função continuam gerando controvérsias (Migeon, 2003; Lee, 2003). Em extensão, o *TSIX* humano não cobre a região promotora de *XIST* (fundamental para sua repressão), pois possui uma extremidade 3' truncada, e ainda, suas ilhas CpG (essenciais na expressão de *Tsix*) são incompletas se comparadas às de camundongos (Migeon *et al.*, 2001). Ao contrário do que se observa claramente em experimentos com células murinas, foi detectada a expressão de *TSIX* em células

humanas diferenciadas a partir do Xi, ou seja, do mesmo cromossomo que expressa *XIST* (Migeon *et al.*, 2002).

Uma vez que o cromossomo X é silenciado, ele é mantido neste estado nas células somáticas durante toda a vida do organismo de maneira estável, mesmo após as sucessivas mitoses. Em termos gerais, o estado inativo é mantido por uma ação conjunta de mecanismos como metilação de suas ilhas CpG, a constante transcrição de *XIST/Xist*, modificações das histonas (metilação e hipoacetilação), e a presença da variante de histona macroH2A (Csankovszki *et al.*, 2001; Mietton *et al.*, 2009).

Em humanos, ainda que a maioria dos genes no cromossomo Xi esteja silenciada, 15% deles permanecem transcricionalmente ativos e outros 10% apresentam padrões de atividade que podem variar até mesmo entre os indivíduos (Anderson e Brown, 1999; Carrel e Willard, 2005). Estes genes, incluindo muitos sem equivalentes funcionais no cromossomo Y, estão provavelmente relacionados com as diferenças entre os gêneros, mas também explicam as anormalidades clínicas reconhecidas em pacientes com aneuploidias do cromossomo X. Em camundongos, o fenótipo das fêmeas aneuplóides não é facilmente observado, pois a porcentagem de genes que escapa à ICX é bem menor do que aquela observada em humanos (Disteche, 1999; Tsuchiya e Willard, 2000). Assim, as fêmeas murinas com monossomia do X apresentam um fenótipo praticamente normal quando comparado às inúmeras características apresentadas pelas mulheres que possuem a síndrome de Turner. Da mesma maneira, os produtos transcricionais dos genes que escapam à ICX devem ter papel nos fenótipos encontrados em indivíduos com a síndrome de Klinefelter.

1.5. INATIVAÇÃO “IMPRINTADA” E ALEATÓRIA

Em mamíferos, a ICX pode ocorrer basicamente de duas maneiras: aleatória, onde cada célula escolhe ao acaso qual será o cromossomo Xi, paterno ou materno; ou de modo dependente da origem parental, também referida como “imprintada” (adaptado do termo em inglês *imprinted*). As células somáticas das fêmeas dos mamíferos eutérios são exemplos clássicos de herança aleatória, onde qualquer um dos seus dois cromossomos X pode estar inativo, como visto no item anterior. Assim, as fêmeas são um mosaico de diferentes populações celulares em relação ao X ativo (Xa).

Em 1971, o pesquisador G. B. Sharman analisou o padrão de ICX em células somáticas obtidas de fêmeas híbridas F1 de marsupiais. Apesar da morfologia dos cromossomos X de algumas espécies de cangurus ser visivelmente distinta, o seu cruzamento ainda é capaz de gerar descendentes. Assim, Sharman pôde distinguir entre os cromossomos X herdados da mãe ou do pai e percebeu que, em fêmeas de canguru, os cromossomos X de origem paterna apresentavam padrão de replicação tardia (uma característica atribuída ao cromossomo Xi). Com os seus resultados, e baseado em outras publicações da época, ele concluiu que em tecidos somáticos de marsupiais o Xi é predominantemente o paterno. Historicamente, o padrão “imprintado” observado nos cangurus é o primeiro exemplo de expressão gênica dependente de origem parental (Sharman, 1971; Cooper *et al.*, 1971 e recentemente revisto em Deakin *et al.*, 2009).

Assim como em marsupiais, o padrão “imprintado” de ICX é encontrado em ratos e camundongos; entretanto, nesses animais esse mecanismo preferencial de inativação do pX está restrito aos tecidos extra-embrionários (Takagi e Sasaki, 1975;

Wake *et al.*, 1976; West *et al.*, 1977). Em camundongos, a ICX ocorre em pelo menos dois momentos durante o desenvolvimento embrionário: o primeiro acontece na fase de pré-implantação, ainda no estágio de 4 células (Huynh e Lee, 2003; Okamoto *et al.*, 2004; Patrat *et al.*, 2009), quando o pX é preferencialmente inativado, permanecendo assim nas células que compõem a trofoectoderme, que darão origem aos trofoblastos e sinciciotrofoblastos da placenta. Mais tarde, no estágio de blastocisto, as células da massa celular interna sofrem um processo de desmetilação global e reativam o pX; posteriormente passam por um segundo processo de inativação onde, dessa vez, o cromossomo X será inativado de maneira independente da origem parental (Mak *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2004). Como o padrão “imprintado” de inativação é encontrado de forma dominante em marsupiais, e por ser a inativação aleatória exclusiva de mamíferos eutérios, acredita-se, hoje, que o mecanismo ancestral de compensação de dose gênica entre machos e fêmeas de mamíferos seja o processo de inativação preferencial do pX (Boumil e Lee, 2001; Deakin *et al.*, 2009). Por ter sido demonstrado que em murinos a ICX “imprintada” persiste apenas nos tecidos extra-embrionários, é conferido à esses animais o papel de representantes atuais de um estágio intermediário entre a evolução da inativação “imprintada” e da aleatória.

1.5.1. INATIVAÇÃO “IMPRINTADA” EM HUMANOS

Estudos sobre o padrão de ICX em tecidos extra-embrionários humanos datam do final dos anos de 1970. Nessa época, uma técnica muito utilizada para se acessar a origem parental do Xa, ou Xi, era a verificação da presença de duas isoformas protéicas produzidas a partir do gene *G6PD*. Mas o que se observa é que

as conclusões tiradas com esse tipo de análise em amostras de placenta a termo são contraditórias. Em 1978, Ropers e colaboradores publicaram um estudo sobre o padrão de expressão do cromossomo X utilizando essa técnica em amostras de placenta de meninas recém-nascidas. Os autores observaram que das 22 amostras informativas, 13 haviam inativado preferencialmente o pX, e assim concluíram que, em humanos, há um desvio de inativação em relação ao pX em tecidos extra-embrionários (Ropers *et al.*, 1978). Ainda em 1978 e também no ano seguinte, Migeon e Do publicaram dois estudos com amostras de vilosidade coriônica isoladas de placenta a termo e coletadas de material de aborto no primeiro trimestre de gestação. Apesar do significativo número de casos de desvio de ICX nesse material, os autores concluíram haver ICX aleatória (Migeon e Do, 1978; Migeon e Do, 1979) (Tabela 1).

Dos principais estudos sobre o padrão de ICX em placenta a termo, quatro o fizeram verificando a presença das isoformas de G6PD. Desses, três concluíram que ocorre inativação preferencial do pX (Ropers *et al.*, 1978; Harrison e Warburton, 1986; Harrison, 1989), e apenas um concluiu que ela se dá de maneira aleatória (Migeon e Do, 1978) (Tabela 1).

Somando-se os estudos que empregaram outras tecnologias aplicadas à detecção de produtos de diferentes genes, os trabalhos que utilizaram vilosidades coriônicas coletadas durante o primeiro e o segundo trimestre de gestação também obtiveram conclusões contraditórias (Migeon e Do, 1979; Mohandas *et al.*, 1989; Goto *et al.*, 1997; Uehara *et al.*, 2000; Zeng e Yankowitz, 2003) (Tabela 1). Por exemplo, três estudos que analisaram o padrão de metilação do gene *AR* descrevem cenários discrepantes: Goto e colaboradores (1997), ao estudarem amostras de

vilosidades coriônicas retiradas para exame no primeiro trimestre de gestação, definiram que o normal em humanos é inativar preferencialmente o pX. Já Looijenga e colaboradores (1999) apresentaram um resultado bastante complexo e concluíram que há inativação aleatória em amostras de placenta a termo. Em 2003, Zeng e Yankowitz, apesar de analisarem 55 amostras, não conseguiram definir o padrão de ICX em citotrofoblastos, isolados de vilosidades coriônicas de aborto eletivo realizados no primeiro e segundo trimestre de gestação, e concluíram que ambos os padrões podem ser observados.

Outros três trabalhos publicados utilizaram técnicas de detecção da expressão alelo-específica dos genes *PGK1* e *FMR1*. Uehara e colaboradores (2000), ao estudarem o padrão de atividade do gene *PGK1* em trofoblastos humanos isolados de vilosidades coriônicas, coletadas de aborto eletivo realizado no primeiro trimestre de gestação, concluíram ICX preferencial do pX, mesmo tendo reportado casos de ICX aleatória. Já os dois trabalhos envolvendo a expressão de *FMR1* concluíram: (1) padrão de mosaico e processo aleatório de ICX, em dois vilos coletados para exame pré-natal de portadoras da mutação responsável pela síndrome de Duchenne (Willemsen *et al.*, 2002); e (2) ICX “imprintada”, ao se observar que células-tronco embrionárias humanas quando diferenciadas em trofoblastos escolhiam sempre o mesmo X para ser o inativo (Dhara e Benvenisty, 2004) (Tabela 1).

A tabela 1 foi elaborada de modo a resumir, de maneira esquemática, todos os trabalhos publicados sobre padrão de ICX em tecidos extra-embrionários humanos. Ela evidencia a discutida falta de concordância entre as conclusões tomadas pelos autores e a complexidade dos resultados gerados.

Tabela 1. Revisão da literatura relacionada aos estudos sobre o padrão de ICX em tecidos extra-embrionários humanos.

Material (origem)	Linagem celular extra-embrionária	Locus	Resultados (*)	Conclusão dos autores	Citações
Placenta (a termo)	Membranas placentárias homogeneizadas	G6PD	13 com desvio (pX inativo); 9 aleatórios	Preferencial	Ropers <i>et al.</i> , 1978
Placenta (a termo)	Vilo coriônico	G6PD	9 aleatórios; 3 com desvio (pX inativo)	Aleatório	Migeon & Do, 1978
Vilosidade coriônica [#] (aborto eletivo)	Vilidade coriônica [#] (aborto eletivo)	G6PD	8 com algum grau de desvio (6 pX inativo e 2 mX inativo); 1 aleatório	Aleatório	Migeon & Do, 1979
		G6PD	8 com desvio (7 pX inativo e 1 mX inativo); 3 aleatórios	Preferencial	Harrison & Warburton, 1986
			22 com desvio (16 pX inativo e 6 mX inativo); 10 aleatórios		
			11 aleatórios; 9 com desvio (8 pX inativo e 1 mX inativo)		
Placenta (a termo)	Vilidade coriônica [#] (aborto eletivo)	G6PD	21 com desvio (16 pX inativo e 5 mX inativo); 11 aleatórios	Preferencial	Harrison & Warburton, 1986
			16 com desvio (15 pX inativo e 1 mX inativo); 10 aleatórios		
			7 com algum grau de desvio (5 pX inativo e 2 mX inativo); 5 com desvio total (pX inativo)		
			4 aleatórios		
Placenta (a termo)	Cultura de citotroblastos isolados de diversos cotilédones	G6PD		Preferencial	Harrison, 1989
Vilosidade coriônica (aborto eletivo)	Vilo fresco e em cultura	G6PD e HPRT		Aleatório	Mohandas <i>et al.</i> , 1989
Vilidade coriônica [#] (exame diagnóstico)	Células trofoblásticas frescas	AR	2 com desvio (pX inativo)	Preferencial	Goto <i>et al.</i> , 1997
Placenta (a termo)	2 fragmentos adjacentes isolados de um mesmo cotilédono	AR	5 com algum grau de desvio (2 pX inativo; 2 mX inativo; 1 tanto pX como mX); 2 completamente desviados (1 pX inativo e 1 tanto pX como mX); 1 aleatório	Aleatório	Looljenga <i>et al.</i> , 1999
	9 fragmentos não adjacentes isolados da mesma placenta		Padrão heterogêneo que variava dependendo do cotilédono		
Vilidade coriônica [#] (aborto eletivo)	Vilo de ancoragem fresco	PGK1	5 com algum grau de desvio (sempre com maior frequência do pX inativo); 1 aleatório	Não aleatório	Uehara <i>et al.</i> , 2000
	Trofoblastos isolados de vilos de ancoragem		19 com desvio (13 pX inativo e 6 mX inativo); 11 aleatórios		
	Trofoblastos isolados de um eixo viloso		17 com desvio (14 pX inativo e 3 mX inativo); 21 aleatórios		
Vilidade coriônica [#] (exame diagnóstico)		FMR1	2 aleatórios	Aleatório	Willemsen <i>et al.</i> , 2002
Vilidade coriônica ^{#,†} (aborto eletivo)	Citotrofoblastos	AR	37 aleatórios; 17 com algum grau de desvio; 1 com desvio total	Ambos: aleatório e preferencial	Zeng & Yankowitz, 2003
Células-tronco embrionárias humanas (linhagem H9)	Células-tronco diferenciadas em trofoblastos (passagens 45-48)	FMR1	Não aleatório	Não aleatório	Dhara & Benvenisty, 2004

(*) pX, X paterno; mX, X materno.

(#) Vilo de 1º trimestre

(†) Vilo de 2º trimestre

Alguns fatores podem ter contribuído para a falta de concordância entre as interpretações dos resultados expostos na tabela 1, incluindo a análise de diferentes tecidos, o pequeno número de amostras em alguns estudos, e a possível contaminação com material materno. É muito importante ressaltar que todos esses trabalhos têm sua metodologia baseada na observação da expressão alelo-específica de apenas um ou no máximo dois genes, o que é inadequado para esse tipo de estudo, visto que alguns autores sugerem que genes no Xi em células de trofoblastos estão sujeitos à reativação (Migeon *et al.*, 1986; Migeon *et al.*, 2005), e ainda qualquer alteração individual na expressão do gene pode desviar os resultados, dificultando a interpretação.

O presente trabalho utiliza, pela primeira vez em estudos envolvendo a busca pelo padrão de ICX em tecidos extra-embrionários humanos, uma metodologia que permite acessar, de maneira simples, o padrão de expressão alelo-específico de um número considerável de genes localizados ao longo do cromossomo X. Nesse estudo, aproveitou-se da existência de polimorfismos de uma única base (SNPs) situados em regiões codificadoras de genes do X para detectar a expressão alelo-específica no Xa, e assim determinar a origem parental do alelo expresso.

A publicação da seqüência completa do cromossomo X (Ross *et al.*, 2005) e de um importante estudo que define o perfil de atividade de mais de 600 genes no Xi localizados fora da região pseudo-autossômica em humanos (Carrel e Willard, 2005), possibilitaram o desenvolvimento de ferramentas e estratégias para uma análise sensível da atividade alelo-específica de genes localizados no X. Assim, no presente estudo essas ferramentas foram utilizadas para se avaliar, de um modo mais completo, o padrão de ICX em placenta humana a termo.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista os resultados contraditórios de estudos já publicados, o objetivo geral deste trabalho foi o de reavaliar a questão do padrão de inativação do cromossomo X em tecido extra-embriônico humano, utilizando ferramentas de análise robustas. Mais especificamente:

- construir um painel de polimorfismos de uma única base presentes em regiões codificadoras de genes distribuídos ao longo de todo o cromossomo X humano, fora da região pseudo-autossômica;
- identificar em amostras de placenta coletadas a termo, a presença de heterozigose para cada polimorfismo selecionado;
- verificar o padrão de expressão alelo-específico nas amostras de placenta;
- determinar a origem parental do alelo inativado.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de placenta humana a termo (pl.) foram coletadas na maternidade pública Amparo Maternal, localizada à Rua Loefgreen, nº 1901, Vila Clementino, São Paulo, SP, sempre com o consentimento informado da mãe e com a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências (Protocolo nº 039/2006). Foram incluídas neste estudo apenas placentas resultantes de partos normais de meninas saudáveis nascidas a termo.

Segmentos de não mais que 0,5 cm de espessura foram extraídos da porção fetal de 22 placentas, lavados em solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4 (para remoção do sangue), e imediatamente submersos em 3 mL de solução estabilizadora de RNA total (RNA*later*™ QIAGEN). De acordo com as indicações do fabricante, os fragmentos imersos nessa solução foram mantidos de um dia para o outro em tubos plásticos estéreis mantidos em ambiente refrigerado entre 2 e 8 °C, e posteriormente estocados a -70 °C. Nos casos das pl.01 a pl.30, apenas um fragmento por placenta foi coletado de região próxima à inserção do cordão umbilical; para os casos das pl.31 a pl.33, foram separados três fragmentos de regiões fetais não adjacentes, e acondicionados em tubos individuais.

A fim de se obter o DNA genômico parental, amostras de células da mucosa oral da mãe, e sempre que possível de ambos os pais, foram coletadas raspando-se por alguns instantes a parede interna da bochecha com o auxílio de uma escova cervical estéril. As células aderidas às cerdas foram estabilizadas imergindo

imediatamente a ponta da escova em tubos plásticos estéreis com tampa de rosca contendo 500 µL de solução hidróxido de sódio 50 mM, para posterior extração do material genômico.

3.2. OBTENÇÃO DOS ÁCIDOS NUCLÉICOS

3.2.1. PARENTAL

O DNA genômico dos pais foi extraído de acordo com protocolo descrito por Richards e colaboradores (1993) a partir das amostras de mucosa oral, e estocado a -20 °C. De forma resumida, os tubos com a solução de hidróxido de sódio contendo a ponta da escova cervical com as células aderidas às cerdas foram agitados e mantidos em banho-maria a 96 °C por 5 min. Posteriormente, as escovas foram removidas e ao conteúdo do tubo foram adicionados 80 µL de solução Tris-HCl 1,0 M com pH 8,0. As amostras foram então submetidas à centrifugação de 17900 rcf por 6 min (Richards *et al.*, 1993). O sobrenadante, contendo o DNA dos pais, pôde então ser removido para um novo tubo estéril e estocado sob refrigeração de -20 °C.

3.2.2. EXTRA-EMBRIONÁRIO

3.2.2.1. DNA

O DNA genômico das amostras de placenta foi obtido a partir de fragmentos de aproximadamente 25 mg de tecido. Os fragmentos foram inicialmente digeridos em 360 µL de solução de lise celular (Amersham Biosciences, GE) aos quais foram adicionados 40 µL de proteinase K (20 mg/mL). Após o período de aproximadamente 16 h em banho-maria a 55 °C, o DNA foi purificado com o auxílio do artigo comercial

GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Biosciences, GE) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi estocado sob refrigeração a 4 °C.

3.2.2.2. RNA

Para se ter acesso ao RNA total das amostras de placenta, fragmentos de aproximadamente 100 mg (4 a 8 mm³ de tecido) foram triturados em almofariz de porcelana adicionando-se nitrogênio líquido. Ao pó gerado foi adicionado 1,5 mL do reagente comercial TRIzol® (Invitrogen) com 20 µL de proteinase K (20 mg/mL). O material em solução foi deixado por 30 min em banho-maria a 55 °C, e a purificação do RNA total prosseguiu de acordo com o protocolo indicado pelo fornecedor. O RNA obtido foi estocado a -70 °C.

Para se evitar qualquer possibilidade de contaminação com material genômico, todas as amostras de RNA foram tratadas com a enzima Turbo DNA-free, utilizando o protocolo rigoroso sugerido pelo fabricante (Ambion®).

3.2.3. SÍNTESE DE cDNA

A partir de 1 a 2 µg do RNA total previamente tratado com DNase, foi sintetizado cDNA utilizando-se iniciadores aleatórios (*random primers*) e a transcriptase reversa M-MLV de acordo com as especificações do fabricante da enzima (Invitrogen). Para se verificar eventual resistência de contaminação com DNA genômico mesmo após tratamento com DNase, o protocolo também foi seguido com uma alíquota da amostra onde apenas a transcriptase reversa não era adicionada (RT-). As amostras de cDNA (RT+), bem como as de RT-, foram mantidas sob refrigeração a -20 °C.

3.3. SELEÇÃO DOS POLIMORFISMOS E SÍNTESE DOS INICIADORES

Primeiramente foram estabelecidos três critérios imprescindíveis para a escolha dos SNPs:

- o polimorfismo deveria estar presente em região codificadora de gene localizado no cromossomo X (verificado em “*The Vertebrate Genome Annotation (VEGA) database*”, <http://vega.sanger.ac.uk/> em agosto de 2005);
- o gene contendo o SNP deveria ser expresso em placenta humana (verificado no banco de dados “UniGene, *Organized View of Transcriptome*”, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene> em agosto de 2005);
- a frequência de heterozigotos na população deveria ser maior que 0,3 (de acordo com o sugerido por Carrel & Willard, 2005).

Seguindo essas restrições, foram selecionados 28 SNPs em 23 genes. Seus nomes e identidades estão apresentados no Anexo 1, juntamente com a sequência dos pares de iniciadores para a amplificação e o tamanho dos fragmentos que os contêm.

A sequência de cada iniciador teve origem diversa, a grande maioria foi baseada no trabalho de Carrel e Willard (2005) sendo que, dentre estes, alguns foram modificados antes da síntese; outro par de oligonucleotídeos, veio do trabalho de Brown e colaboradores (1997). Em nosso laboratório, a aluna Mariana Klöckner, durante seu Mestrado, já havia desenhado iniciadores para três SNPs que satisfaziam essas condições; outros quatro no gene *XIST* foram selecionados durante o trabalho de Doutorado da aluna Raquel Stabellini também do nosso laboratório (Stabellini, 2008). Os oligonucleotídeos foram desenhados evitando-se polimorfismos na região de hibridação com a sequência alvo, e de maneira que pelo

menos um deles estivesse a no mínimo 100 bases de distância do polimorfismo. Todos foram sintetizados pela empresa IDT.

Na tabela 2 estão listados, em ordem citogenética, os 28 SNPs escolhidos de acordo com os critérios estabelecidos, bem como a sigla do nome dos genes que os contêm, a identidade do SNP e sua variante alélica. A atividade de cada gene no Xi, de acordo com o observado por Carrel e Willard (2005), é listada como o número de fibroblastos humanos primários que expressavam cada gene a partir do Xi pelo número de fibroblastos testados. Para os genes *XIST* e *IL13RA1* essas informações estavam disponíveis apenas como o número de células híbridas camundongo/humano que expressavam o gene pelo número de híbridos testados (Carrel e Willard, 2005). Dentre os 23 genes selecionados é importante ressaltar a escolha de um em particular, o *ZFX*. Este gene tem a propriedade de escapar à inativação permanecendo ativo nos dois homólogos, sendo que sua utilização tem importância na validação da metodologia.

Tabela 2. Genes e SNPs selecionados.				
Ordem Citogenética [#]	Gene	SNP*	Alelos*	Exp. no Xi [£]
Xp22.31-22.2	<i>TBL1X</i>	rs7256	A/G	0 / 5
Xp22.2	<i>PIGA</i>	rs11448948	-/A	0 / 7
Xp22.2	<i>PIGA</i>	rs3087965	A/T	0 / 7
Xp22.11	<i>ZFX</i>	rs5949242	C/T	11 / 11
Xp21.1	<i>TSPAN7</i>	rs10333	A/G	0 / 13
Xp11.4	<i>DYNLT3</i>	rs12849	A/T	0 / 10
Xp11.3	<i>MAOA</i>	rs3027407	A/G	3 / 7
Xp11.23	<i>TIMP1</i>	rs4898	C/T	0 / 10
Xp11.23	<i>EBP</i>	rs3048	G/T	0 / 11
Xp11.23	<i>SUV39H1</i>	rs3373	C/T	0 / 9
Xq12	<i>OPHN1</i>	rs492933	C/T	1 / 12
Xq13.2	<i>XIST</i>	rs1894271	A/G	9 / 9 [§]
Xq13.2	<i>XIST</i>	rs16992443	C/A	9 / 9 [§]
Xq13.2	<i>XIST</i>	rs1794213	T/G	9 / 9 [§]
Xq13.2	<i>XIST</i>	rs1620574	C/T	9 / 9 [§]
Xq13.2	<i>XIST</i>	rs16992436	A/G	9 / 9 [§]
Xq21.1	<i>ATRX</i>	rs3088074	C/G	0 / 14
Xq21.1	<i>ATP7A</i>	rs2227291	C/G	0 / 11
Xq21.1	<i>SH3BGRL</i>	rs1044828	C/T	0 / 10
Xq22.1	<i>SYTL4</i>	rs8780	C/G	0 / 9
Xq22.2	<i>TCEAL4</i>	rs11010	C/T	0 / 12
Xq24	<i>IL13RA1</i>	rs2254672	G/T	0 / 9 [§]
Xq26.2	<i>GPC4</i>	rs1048369	C/T	2 / 16
Xq26.3	<i>ZNF75D</i>	rs1129093	G/A	0 / 12
Xq28	<i>G6PD</i>	rs2230037	C/T	0 / 8
Xq28	<i>MPP1</i>	rs1126762	G/T	0 / 10
Xq28	<i>VBP1</i>	rs11887	A/G	0 / 7
Xq28	<i>CLIC2</i>	rs559165	T/G	1 / 11

[#] Vega Human View, v35 (http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/index.html);

* NCBI dbSNP BUILD129 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>);

£ Expressão no Xi em fibroblastos humanos ou (§) em híbridos somáticos (Carrel e Willard, 2005).

3.4. GENOTIPAGEM DO DNA GENÔMICO E VERIFICAÇÃO DO ALELO EXPRESSO PELA ANÁLISE DE cDNA

Para a genotipagem das amostras de placenta, a região do DNA genômico compreendendo cada polimorfismo foi amplificada por PCR e posteriormente seqüenciada. Técnicas de RT-PCR, das amostras de placenta, e PCR do material genômico parental, combinadas com seqüenciamento direto, permitiram a verificação da origem parental do alelo expresso.

3.4.1. AMPLIFICAÇÃO POR TÉCNICA DE PCR E RT-PCR

De 50 a 100 ng de DNA ou cDNA foram amplificados usando 1,0 U de Taq DNA Polimerase (Amersham), 1X de tampão (Amersham), 200 μ M de dNTPs (Invitrogen), 150 nM de cada iniciador, em volume final de 15 μ L. Para alguns pares de iniciadores a reação foi realizada na presença de 1 M betaína ou 10% DMSO.

Os produtos amplificados a partir de DNA foram separados por eletroforese a 100 V por cerca de 20 min em gel de agarose 1% 1X TAE (5,5 x 6,0 cm), em solução 1X TAE, corados com 0,5 μ g/mL de brometo de etídio (Invitrogen) e observados sob luz ultravioleta.

O material amplificado a partir de cDNA foi submetido à eletroforese a 100 V por 1 h em gel de poliacrilamida 10 % 1X TBE (10 x 10 cm), em solução 1X TBE. Após a eletroforese, procedeu-se a coloração por impregnação por nitrato de prata (protocolo levemente modificado de Santos *et al.*, 1993): mergulhando-se o gel em solução fixadora (10% de etanol; 0,5% de ácido acético) por 10 min, seguindo-se com imersão em solução corante (nitrato de prata 2 g/L) por 10 min, breve enxágüe e imersão em solução reveladora (hidróxido de sódio 30 g/L e 0,002% de formaldeído 37%) até a visualização das bandas. Por fim, o gel era mergulhado novamente em solução fixadora por 10 min.

3.4.2. REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO DIRETO

A reação de seqüenciamento direto foi empregada para se genotipar as amostras de DNA e também de cDNA. Para tanto, utilizou-se iniciador correspondente, F ou R, de acordo com a distância em relação à posição do SNP ($\geq$ 100 bases). Os produtos de PCR foram diluídos em água bidestilada autoclavada,

em proporção de 1:5, dessa diluição foi usado 1,0 µL em reação com 1,0 µL BigDye® Terminator v3.1 do Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), 1X tampão, 120 nM de iniciador, num volume final de 15 µL. O programa para a reação de seqüenciamento consistia em 40 ciclagens de 96 °C por 10 seg; 52 °C por 20 seg e 60 °C por 4 min, cada (recomendado pela Applied Biosystems).

Para a remoção dos terminadores, o produto da reação de seqüenciamento foi precipitado acrescentando-se 90 µL de isopropanol 75%, submetido à agitação moderada por 10 seg para homogeneização, e em seguida deixado no escuro à temperatura ambiente por 15 min. A amostra foi então centrifugada por 30 min a 20.800 rcf e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se ao precipitado 150 µL de isopropanol 70% e submeteu-se a nova centrifugação por 14 min a 20.800 rcf. O sobrenadante foi descartado e o tubo deixado aberto no escuro para evaporação total do álcool por até 16 h ou por 10 min em estufa a 37 °C. A eletroforese capilar das amostras foi realizada em seqüenciador ABI3100 Prism Genetic Analyzer, do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas USP, de acordo com as configurações do fabricante (Docente Responsável: Profa. Dra. Alda Maria Backx Noronha Madeira; Técnico Responsável: Marcio Massao Yamamoto).

3.5. ANÁLISE A PARTIR DOS ELETROFEROGRAMAS

Através do seqüenciamento de regiões que possuam SNP é possível fazer um paralelo entre o padrão observado em eletroferogramas de um gene com expressão monoalélica com aquele esperado para ICX preferencial, e de expressão bialélica com ICX aleatória (Figura 4).

Na figura 4 estão representados exemplos hipotéticos dos dois padrões esperados. Das amostras de placenta geneticamente informativas (*i.e.* heterozigotas, representadas no quadro superior da figura 4) seqüenciou-se também o respectivo cDNA. Quando analisando-se visualmente os eletroferogramas deste último verificava-se apenas uma das bases atribuídas ao polimorfismo, inferia-se inativação preferencial (Figura 4, quadro inferior esquerdo); se na posição do polimorfismo, fossem identificadas as duas bases, classificava-se padrão de ICX aleatório (Figura 4, quadro inferior direito).

Figura 4. Exemplo de como visualizar os padrões esperados de ICX através do seqüenciamento de regiões codificadoras contendo polimorfismo de base única. Acima, amostra informativa de DNA genômico de placenta revelando alelos polimórficos [A/T]. Abaixo: lado esquerdo, o seqüenciamento do cDNA revela padrão de inativação preferencial; lado direito, padrão aleatório. O *locus* polimórfico está evidenciado com um retângulo amarelo.

Sempre que uma amostra informativa apresentasse apenas um dos alelos no seqüenciamento do cDNA, demonstrando expressão monoalélica, e o DNA materno indicasse homozigose para o mesmo *locus* seria possível determinar a origem parental do alelo expresso.

No caso da classificação visual (qualitativa) necessitar de complementação por uma metodologia mais exata (quantitativa), foi feita uma análise *in silico* em colaboração com o Grupo de Bioinformática do Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, e para tanto foi empregado o programa *PeakPicker*. Essa metodologia foi aplicada, sempre que possível, na tentativa de serem esclarecidos aqueles casos onde os picos referentes ao polimorfismo apresentavam, nitidamente, tamanhos distintos (Figura 5). A diferença entre a altura dos picos referentes à expressão gênica alelo-específica não é compatível com aquelas por vezes visualizadas nas amostras de DNA heterozigoto, e indicam que a diferença não foi gerada por um artefato da reação de PCR e/ou de seqüenciamento (Souza, 2008).

Figura 5. Exemplo hipotético de casos de difícil classificação. À esquerda, amostra de DNA genômico de placenta revelando alelos polimórficos [A/G]. À direita, os seqüenciamentos dos cDNAs revelam, na posição do SNP, dois picos com tamanhos visivelmente distintos. O *locus* polimórfico está evidenciado com um retângulo amarelo.

Antes de serem analisadas no *PeakPicker*, a qualidade de cada seqüenciamento foi avaliada pelo doutor em bioinformática Jorge de Souza através de uma estratégia de bioinformática que utiliza o programa *phred* (Ewing *et al.*, 1998;

Ewing e Green, 1998). Este programa é capaz de extrair dos eletroferogramas gerados pelo seqüenciador um valor referente a cada base das seqüências. Como as alturas dos picos entre os eletroferogramas podem variar dependendo da amostra e da posição do SNP na seqüência, foram avaliadas, para cada seqüenciamento, as 21 bases ao redor do polimorfismo (10 para cada lado mais a base do SNP). As seqüências foram consideradas de boa qualidade apenas quando apresentavam valor de *phred* acima de 20 em pelo menos 70% das 21 bases.

A maior vantagem do *PeakPicker* é que este programa estima a altura dos picos na posição de um dado polimorfismo de diversos eletroferogramas ao mesmo tempo, de DNA e cDNA, normalizando os valores de acordo com picos de referência em posições não polimórficas em torno da posição do SNP. Este aplicativo foi desenvolvido e disponibilizado com o objetivo de facilitar análises quantitativas de expressão diferencial a partir de material heterozigoto para polimorfismos de base única presentes em regiões expressas (Ge *et al.*, 2005).

Para cada polimorfismo foram escolhidos cinco picos de referência dentro da janela de qualidade *phred* >20 (de acordo com o sugerido em Souza, 2008). A razão entre a altura dos picos na região do polimorfismo é calculada e normalizada pelo programa. Os criadores do aplicativo sugerem que alturas com valores abaixo de 50 sejam desconsideradas, pois podem ser produto de ruído gerado pelo seqüenciador (Ge *et al.*, 2005).

No final do processo, o aplicativo gera um arquivo com as razões normalizadas dos picos que representam o SNP em questão. Quando a razão em uma amostra for maior que 1, significa que um dos alelos apresenta um pico maior

que o outro. Entretanto, para que todas as razões ficassem na escala entre 0 e 1, quando uma razão fosse maior do que 1, aplicou-se a fórmula: $1/\text{razão}$.

Espera-se que a razão entre a altura dos picos nas amostras de DNA heterozigotos seja igual a 1. Entretanto, devido a variações na fluorescência inerente aos quatro diferentes corantes utilizados na reação de seqüenciamento, o método está sujeito a interpretar amostras genômicas heterozigotas como tendo expressão diferencial entre os alelos, o que não se aplica, visto que são esperadas contribuições equivalentes dos dois alelos no genoma. O DNA genômico e o cDNA das mesmas amostras foram seqüenciados em paralelo e analisados em conjunto. Ao contrário do que ocorre com o DNA, as diferenças entre as razões dos picos no seqüenciamento do cDNA não são necessariamente artefatos, mas sim produto da real detecção de produção transcricional desigual gerada pelos dois alelos no conjunto heterogêneo de células que compõem o fragmento analisado.

Com o propósito de se determinar quando a diferença entre as razões dos picos no seqüenciamento do cDNA era biologicamente real ou produto de artefato experimental, as razões normalizadas do DNA genômico de amostras heterozigotas e homozigotas foram utilizadas no intuito de se estimar a variabilidade metodológica e de se estabelecer um intervalo de confiança (IC) de 99% em cada gene individualmente. O IC gerado pelas amostras heterozigotas e homozigotas determinou os intervalos referentes às razões esperadas para 50:50 e 0:100, respectivamente, entre os alelos expressos. O IC de 99% foi calculado pelo Dr. Jorge, assumindo-se que os picos normalizados das amostras de DNA apresentavam distribuição normal de acordo com o teste de Anderson-Darling. Para cada gene foi calculado também um valor teórico para a representação da razão

20:80. Assim, quando o valor da razão normalizada fosse maior do que 20:80, este indicaria ICX aleatória (Amos-Landgraf *et al.*, 2006); aqueles entre 20:80 e 0:100 apontavam um desvio de ICX (Amos-Landgraf *et al.*, 2006); e apenas quando a razão fosse menor ou igual ao valor esperado para 0:100 as amostras foram classificadas como apresentando desvio total de ICX.

A figura 6 representa um exemplo gráfico de como os resultados obtidos a partir de DNA homozigoto e heterozigoto devem ser utilizados na delimitação dos ICs para a posterior interpretação e classificação do padrão de ICX a partir do cDNA das amostras de placenta.

Figura 6. Metodologia *in silico* para a definição do padrão de inativação do cromossomo X. O gráfico representa um exemplo do que pode se observar com a genotipagem de amostras de DNA. No eixo Y à esquerda, estão os valores normalizados para a razão entre os alelos. Linhas sólidas são definidas pelo IC das razões normalizadas das amostras heterozigotas (50:50) e homozigotas (0:100). A linha pontilhada (20:80) é calculada para se determinar o limite entre padrão aleatório e desviado de ICX (de acordo com o sugerido por Amos-Landgraf *et al.*, 2006).

Para apresentar relevância estatística, foram submetidos a essas análises apenas *loci* polimórficos com, no mínimo, cinco amostras informativas.

Com o intuito de se verificar a sensibilidade da metodologia *in silico* aplicada na detecção dos casos de expressão diferencial, foram produzidas amostras artificiais com diferentes padrões de expressão previamente conhecidos. Os cDNAs obtidos de duas amostras homozigotas para os diferentes alelos do polimorfismo rs1044828 (presente no gene *SH3BGRL*) foram amplificados, como descrito no sub-item 3.4.1. Seus produtos de RT-PCR foram quantificados em espectrofotômetro (Gene Quant Pro - GE Healthcare) e depois combinados de modo a simular sete diferentes padrões de expressão diferencial entre os alelos C/T nas proporções: 0:100; 20:80; 40:60; 50:50; 60:40; 80:20 e 100:0. Os produtos misturados foram seqüenciados nas mesmas condições de todos os outros experimentos (sub-item 3.4.2).

3.6. CONTROLES

Neste trabalho, os rígidos controles foram de extrema importância na validação dos resultados, e por isso são apresentados em um item a parte.

3.6.1. CARACTERIZAÇÃO HISTOLÓGICA

Para se determinar se o método de coleta era eficaz em evitar a decídua materna, realizou-se a caracterização histológica de um fragmento coletado na porção fetal da placenta a termo. Os procedimentos histológicos foram realizados no laboratório de Citofisiologia do Trofoblasto no Instituto de Ciências Biomédicas I da

Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade da Prof.^a Dra. Estela Bevilacqua, que gentilmente confeccionou as lâminas e dirigiu a análise das imagens.

O fragmento designado à caracterização histológica foi coletado seguindo-se rigorosamente a mesma metodologia de coleta dos fragmentos destinados à genotipagem (sub-item 3.1.). Assim, este também teve origem na porção fetal da placenta, próximo ao cordão umbilical tendo sido lavado em PBS pH 7,4 para remoção do sangue e fixado em 4% paraformaldeído em PBS, por 24 h e, então, incluído em Histosec® (Germany). Foram obtidos cortes de aproximadamente 4 µm, dispostos em lâminas contendo poli-L-lisina e seguiram os procedimentos rotineiros de desparafinização (xilol 60 °C por 30 min; xilol temperatura ambiente por 40 min) e reidratação em uma série de concentrações decrescentes de etanol.

3.6.2. MICROSSATÉLITES

Em colaboração com a Dra. Denilce Ritsuko Sumita (Genomic, São Paulo, SP), o conjunto de cada família foi analisado para fim de confirmação da maternidade e também de possíveis contaminações das amostras com a decídua materna. O DNA de cada conjunto placenta/mãe, na concentração de 30 ng/µl, foi enviado à Genomic Engenharia Molecular onde a Dra. Denilce realizou os ensaios. O protocolo do teste, por eles mesmos desenvolvido, utiliza 17 marcadores autossômicos nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 21 e a amelogenina, *locus* polimórfico entre os cromossomos sexuais X e Y. As amostras foram separadas por eletroforese capilar no seqüenciador ABI 3130XL, e os resultados analisados pelo programa GeneMapper®.

3.6.3. CONTROLE DE CONTAMINAÇÃO DO RNA COM DNA GENÔMICO

A cada síntese de cDNA, uma mesma quantidade de RNA foi submetida às mesmas condições e exposta a todos os reagentes com exceção da enzima transcriptase reversa (RT-). A cada reação de PCR, além do controle negativo sem adição de ácidos nucleicos, o respectivo RT- era também submetido às condições de amplificação. O material amplificado era então submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e a coloração realizada com solução de nitrato de prata (2 g/L) como descrito no sub-item 3.4.1. Esse corante é bastante sensível e pode revelar quantidades muito reduzidas de material amplificado.

Assim, havendo qualquer indício de material amplificado no controle de RT-, o cDNA era excluído e o RNA correspondente passava por um novo ciclo de tratamento com DNase.

3.6.4. COMPARAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS MATERNOS E EXTRA-EMBRIONÁRIOS

Para cada conjunto placenta/mãe, procurou-se identificar a presença de placentas homozigotas onde a respectiva mãe fosse heterozigota para o determinado polimorfismo. A presença de heterozigose no material materno e homozigose no da placenta indica que não há contaminação de DNA materno.

3.6.5. RÉPLICAS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho foram gerados três tipos de réplicas experimentais: primeiro, o RNA de uma mesma amostra foi isolado mais de uma vez, seguido de síntese de cDNA, RT-PCR e seqüenciamento; segundo, foram realizadas repetidas sínteses de cDNA a partir de um mesmo RNA, também seguido de RT-PCR e seqüenciamento; e ainda diferentes reações de RT-PCR e de seqüenciamento foram realizadas a partir de uma mesma amostra de cDNA.

4.1. CONTROLES

4.1.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

A análise histológica revelou que os fragmentos coletados apresentavam a morfologia normal esperada para a porção fetal da placenta a termo (Fox, 1997), como pode ser verificado na figura 7. É importante notar também a ausência de decídua, indicando que pela maneira como as amostras foram coletadas, elas estavam livres de contaminação com material de origem materna.

Figura 7. Fotomicrografias de cortes histológicos de um fragmento de placenta coletado a termo. a - Porção cortical do fragmento; **b** - Porção mais central em maior aumento; **c** – detalhe. Os símbolos denotam: (*) espaço interviloso; (v) vilo; (pc) placa coriônica; (A) âmnio; (vf) veia fetal; (af) artéria fetal; (ev) eixo viloso; (Sc) sincitiotrofoblasto; (cf) capilar fetal; (m) mesoderma extra-embriônico. Em cada fotomicrografia o aumento é indicado junto à barra de escala. Coloração, hematoxilina-eosina.

Ao se verificar a maternidade por ensaio envolvendo microssatélites dos pares placenta/mãe, percebeu-se que em uma família (referente à pl.05) o DNA materno não era de pessoa geneticamente aparentada com a criança, pois foram observadas 10 discrepâncias em relação aos polimorfismos analisados. Por esse motivo, para essa amostra em particular, não foi possível determinar a origem parental do alelo expresso. Entretanto, o material da placenta participou da análise global de ICX, pois a falta de material parental não impede a observação do padrão de inativação.

A análise pôde revelar ainda que não havia qualquer contaminação de material genômico materno com o filial, concordando com as análises histológicas.

Foram identificados, para cada conjunto placenta/mãe, ao menos dois polimorfismos em heterozigose no DNA materno e homozigose no material extra-embriônico. Se houvesse contaminação materna em algum dos fragmentos de placenta não teria sido possível identificar SNP em homozigose no processo de genotipagem de filhas com mães heterozigotas.

Em conjunto, todos os três controles demonstram o sucesso em se coletar exclusivamente a parte fetal da placenta a termo, fundamental para o desenvolvimento desse estudo.

4.1.2. GENES SELECIONADOS

Para fazer parte desse estudo, os genes escolhidos deveriam ser expressos em placenta humana (item 3.3 de materiais e métodos). O sucesso na amplificação a partir de cDNA (RT-PCR) de todos os genes em todas as amostras confirmou

experimentalmente os dados obtidos no NCBI com relação à expressão dos mesmos em placenta.

Além dos genes submetidos à ICX, foi importante a escolha de, ao menos, um gene que escapasse à ICX. Como descrito no item 3.5 da metodologia, o padrão esperado nos eletroferogramas de amostras com ICX aleatória deve ser equivalente àquele de um gene com expressão bialélica, e isso pôde ser verificado com o gene *ZFX*, que apresentou tal padrão de expressão em 10 dos 11 casos analisados.

4.2. ANÁLISE DO DNA GENÔMICO

Os 28 SNPs distribuídos nos 23 genes candidatos revelaram 222 casos de heterozigose - um valor que representa aproximadamente 36% de polimorfismos informativos, com uma média de 10 SNPs em heterozigose por amostra; ou ainda 7,9 amostras heterozigotas para um mesmo SNP (Tabela 3).

Tabela 3. Validade das amostras de placenta (linhas), quanto à presença de alelos heterozigotos em cada um dos genes (colunas) analisados. Em vermelho, casos de heterozigose; em branco, homozigose.

	TBL1X	PIGA	ZFX	TSPAN7	DYNLT3	MAOA	TIMP1	EBP	SUV39H1	OPHN1	XIST	ATRX	ATP7A	SH3BGRL	SYTL4	TCEAL4	IL13RA1	GPC4	ZNF75D	G6PD	MPP1	VBPI	CLIC2
pl. 01																							
pl. 02																							
pl. 03																							
pl. 05																							
pl. 06																							
pl. 07																							
pl. 08																							
pl. 10																							
pl. 11																							
pl. 17																							
pl. 18																							
pl. 19																							
pl. 21																							
pl. 22																							
pl. 24																							
pl. 25																							
pl. 27																							
pl. 28																							
pl. 30																							
pl. 31																							
pl. 32																							
pl. 33																							

4.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO ALELO-ESPECÍFICA

Durante o trabalho de doutorado da aluna Raquel Stabellini foi gerado um perfil de atividade gênica alelo-específica de 9 dos 23 genes escolhidos para o presente estudo (Stabellini, 2008). Na ocasião foi utilizada uma linhagem clonal derivada de fibroblastos humanos a partir da linhagem feminina GM135 (originalmente obtida do Coriell Institute for Medical Research - New Jersey, USA), denominada GM135-Tel G9. Essas células haviam sido previamente selecionadas de maneira que apresentassem desvio total de inativação, de forma que toda a população tivesse o mesmo Xi (Vasques, 2003). Nestas, foi possível detectar em genes do cromossomo X a expressão monoalélica de 8 genes, incluindo o *XIST*, e expressão bialélica de *ZFX*, que de fato escapa à ICX (Figura 8) (Carrel e Willard,

2005). Dada a relevância como modelo experimental, esses dados também foram incorporados no presente trabalho, sendo utilizados como controle (Tabela 4).

Figura 8. Eletroferogramas representativos de três dos nove genes analisados em linhagem de fibroblastos humanos com desvio total de inativação. O nome de cada gene e a identificação do SNP estão indicados na porção superior de cada quadro. A posição do polimorfismo está evidenciada em amarelo. GM135-Tel G9, linhagem de fibroblasto humano feminino com origem clonal que apresenta desvio total de ICX (Stabellini, 2008).

Em contraste aos resultados obtidos com fibroblastos GM135-Tel G9, a análise visual dos eletroferogramas compreendendo os *loci* informativos não foi capaz de determinar com precisão o padrão de ICX em todas as amostras de placenta. Ao longo das análises surgiram muitos casos nos quais, no seqüenciamento de cDNA surgia um padrão intermediário, onde os picos referentes ao polimorfismo tinham, nitidamente, tamanhos diferentes (Figura 12).

Para quantificar a expressão relativa entre os alelos, o que reflete a escolha do Xi, foi feita uma análise *in silico* utilizando o aplicativo *PeakPicker*. Tendo como

base a altura dos picos referentes ao seqüenciamento do polimorfismo, essa ferramenta de bioinformática é capaz de quantificar a proporção entre os alelos expressos. Para cada gene, o DNA de amostras heterozigotas e homozigotas foi utilizado para se estabelecer os níveis esperados de inativação preferencial e aleatória, respectivamente.

Com o propósito de se averiguar a precisão da metodologia *in silico*, foi construída uma escala com sete amostras artificiais compostas de misturas de diferentes frações de duas amostras homozigotas para os diferentes alelos do SNP rs1044828. A figura 9 mostra o sucesso do teste, nesta pode-se verificar que o programa classificou com precisão a proporção de 50% e de 100% de cada alelo. Apesar das diferenças encontradas nas proporções 80:20/20:80 e nas 60:40/40:60, essas amostras também foram corretamente posicionadas dentro dos intervalos correspondentes a desvio de inativação e inativação aleatória, respectivamente.

Figura 9. Gráfico obtido dos valores atribuídos pelo programa *PeakPicker* para simulação de diferentes padrões de expressão alelo-específico. Resultados obtidos através do seqüenciamento do polimorfismo rs1044828. No eixo Y à esquerda, estão os valores normalizados para a razão entre os alelos. A linha sólida inferior delimita os valores esperados para ICX completamente desviada (0:100); e a superior para a aleatória (50:50). A linha pontilhada (20:80) foi calculada para se determinar o limite entre padrão aleatório e desviado de ICX (de acordo com o sugerido por Amos-Landgraf *et al.*, 2006). No gráfico, a posição referente a cada simulação está representada com os valores de cada proporção. Círculos vazados representam os valores de DNA genômico com alelos em homozigose (abaixo de 0:100) e heterozigose (acima de 50:50).

Ao se avaliar o padrão de expressão do gene *ZFX*, essa análise posicionou com sucesso a maioria das amostras dentro ou próximo ao limite esperado de inativação aleatória (entre 20:80 e 50:50) (Figura 10). De fato esses resultados refletem o padrão de expressão de um gene que escapa da ICX, como observado pela doutora Raquel Stabellini (Figura 8 Tabela 4) (Stabellini, 2008), e constatado na publicação de Carrel e Willard (2005).

Figura 10. Quantificação de expressão alelo-específica pelo *PeakPicker* para o gene *ZFX*. Resultados obtidos através do seqüenciamento do polimorfismo rs5949242. No eixo Y à esquerda, estão os valores normalizados para a razão entre os alelos. A linha sólida inferior delimita os valores esperados para ICX completamente desviada (0:100); e a superior para a aleatória (50:50). A linha pontilhada (20:80) foi calculada para se determinar o limite entre padrão aleatório e desviado de ICX (de acordo com o sugerido por Amos-Landgraf *et al.*, 2006). Círculos vazados representam os valores de DNA genômico com alelos em homozigose (abaixo de 0:100) e heterozigose (acima de 50:50); e os símbolos cheios, de cDNA. Triângulos representam réplicas experimentais de uma mesma amostra. A posição do asterisco é referente ao resultado obtido para o seqüenciamento de cDNA de GM135-Tel G9.

Os resultados do *PeakPicker* foram obtidos daqueles eletroferogramas com índice *phred* maior do que 20 (17 SNPs em 16 genes). Para apresentar relevância estatística, apenas foram submetidos a essas análises *loci* polimórficos com no mínimo cinco amostras informativas. São eles: rs3087965 (*PIGA*); rs5949242 (*ZFX*); rs10333 (*TSPAN7*); rs12849 (*DYNLT3*); rs3027407 (*MAOA*); rs3048 (*EBP*); rs3373 (*SUV39H1*); rs492933 (*OPHN1*); rs1894271 e rs1794213 (*XIST*); rs2227291

(*ATP7A*); rs1044828 (*SH3BGRL*); rs8780 (*SYTL4*); rs11010 (*TCEAL4*); rs1048369 (*GPC4*); rs1126762 (*MPP1*) e rs11887 (*VBP1*). Os outros 11 SNPs foram classificados visualmente.

A tabela 4 sumariza todos os dados obtidos na análise das placentas pl.01 a pl.30. Nela estão contidos tanto aqueles resultados gerados pelas análises *in silico*, quanto os obtidos pela classificação visual. Em cada amostra, o padrão de expressão entre os alelos, obtido de cada *locus*, foi utilizado em conjunto na determinação do padrão de ICX em três categorias: completamente desviado (razões igual ou inferiores ao limite de 0:100), desviado (razões compreendidas entre os limites 0:100 e 20:80), e inativação aleatória (razões iguais ou superiores a 20:80).

Tabela 4. Sumário da expressão gênica alelo-específica em placenta humana

Gene	SNP [£]	Exp. no Xi [§]	GM135	pl.06	pl.08	pl.11	pl.19	pl.27	pl.30	pl.01	pl.02	pl.05	pl.07	pl.10	pl.21	pl.28	pl.17	pl.18	pl.22	pl.24	pl.25	pl.03
<i>TBL1X</i>	rs7256	0/5	*	-	-	-	-	-	P*	-	M*	-	-	M*	-	-	-	-	-	-	P*	-
<i>PIGA</i>	rs11448948	0/7	-	*	-	M*	-	M*	-	-	*	-	-	M*	-	-	-	*	-	-	-	-
<i>PIGA</i>	rs3087965	0/7	-	-	-	M	M	M	P	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-
<i>ZFX</i>	rs5949242	11/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>TSPAN7</i>	rs10333	0/13	-	M	*	*	-	-	-	M	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>DYNLT3</i>	rs12849	0/10	-	X	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	-	*	M
<i>MAOA</i>	rs3027407	3/7	-	-	-	-	M	M	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>TIMP1</i>	rs4898	0/10	-	-	-	M*	-	-	*	-	-	-	-	*	-	X	-	-	-	*	-	-
<i>EBP</i>	rs3048	0/11	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SUV39H1</i>	rs3373	0/9	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>OPHN1</i>	rs492933	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-
<i>XIST</i>	rs1894271	9/9 §	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-
<i>XIST</i>	rs16992443	9/9 §	*	-	-	-	-	X	X	-	-	*	-	-	M*	-	-	-	-	-	-	-
<i>XIST</i>	rs1794213	9/9 §	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-
<i>XIST</i>	rs1620574	9/9 §	-	-	-	P*	P*	-	-	-	*	-	-	-	X	M*	*	-	-	-	-	-
<i>XIST</i>	rs16992436	9/9 §	-	-	-	-	-	X	X	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ATRX</i>	rs3088074	0/14	-	-	-	-	-	X	-	*	-	-	*	X	P*	P*	*	-	-	-	-	-
<i>ATP7A</i>	rs2227291	0/11	-	-	-	-	-	X	P	-	-	X	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-
<i>SH3BGR1</i>	rs1044828	0/10	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>SYTL4</i>	rs8780	0/9	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>TCEAL4</i>	rs11010	0/12	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>IL13RA1</i>	rs2254672	0/9 §	-	-	-	-	-	-	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	*	*
<i>GPC4</i>	rs1048369	2/16	-	*	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ZNF75D</i>	rs1129093	0/12	-	-	-	M*	-	-	-	-	-	-	X	-	P*	X	X	-	-	-	*	-
<i>G6PD</i>	rs2230037	0/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>MPP1</i>	rs1126762	0/10	-	-	M	M	M	-	P	-	M	-	M*	-	-	-	-	P*	X	-	-	-
<i>VBPI</i>	rs11887	0/7	-	M	M	M	M*	X	P*	-	-	-	-	-	*	P	*	-	-	-	-	-
<i>CLIC2</i>	rs559165	1/11	-	-	M*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-
Classificação quanto ao padrão de ICX		Completamente desviado										Desviado										N.D.

(£) Variante de acordo com o banco de SNPs, dbSNP montagem 129, disponibilizado pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

(#) Expressão no Xi de acordo com Carrel e Willard (2005). Os resultados estão apresentados como o número de fibroblastos primários que expressavam o gene pelo número de fibroblastos observados.

(§) Resultados apresentados como o número de células híbridas camundongo/humano que expressavam o gene pelo número de híbridos observados.

(M) expressão do alelo materno; (P) expressão do alelo paterno.

(*) locus submetido às análises no PeakPicker.

(X) locus heterozigoto não analisado, (-) locus homozigoto.

Escala de cores:

Expressão monoalélica

Expressão com desvio

Expressão bialélica

Seis amostras foram classificadas como apresentando padrão de ICX completamente desviado (Tabela 4, casos pl.06, pl.08, pl.11, pl.19, pl.27 e pl.30). Em todas elas, a origem parental do alelo expresso pôde ser determinada, pois o DNA materno era homozigoto para pelo menos três SNPs informativos na placenta correspondente. É interessante destacar que em três das seis placentas com padrão de inativação completamente desviado (pl.08, pl.11 e pl.19) os genes eram expressos pelo alelo materno e, de maneira consistente, a expressão de *XIST* tinha origem exclusiva no alelo paterno, revelando inativação preferencial do pX, como mostram os eletroferogramas na figura 11.

Figura 11. Eletroferogramas representativos de três casos que revelam inativação completamente desviada e preferencial do cromossomo X paterno. O número de identificação de cada caso (compreendendo DNA e cDNA de placenta e DNA parental) é indicado na porção superior, o nome do gene e a identificação do SNP estão indicados abaixo de cada quadro. Os fragmentos dos eletroferogramas estão dispostos de cima para baixo como: DNA de placenta informativa; cDNA da respectiva amostra; DNA parental. A posição do polimorfismo está evidenciada em amarelo.

Outras doze amostras puderam ser classificadas como ICX aleatória (Tabela 4: pl.17, pl.18, pl.22, pl.24 e pl.25) ou com desvio de inativação (Tabela 4: pl.01, pl.02, pl.05, pl.07, pl.10, pl. 21 e pl.28). Apenas uma amostra não pôde ter o padrão determinado com tanta clareza: a pl.03 apresentou dois *loci* com expressão monoalélica, um levemente desviado, e outros dois com um claro padrão de expressão bialélica (Tabela 4). Na figura 12 estão dois exemplos relacionados aos casos listados acima, onde para o mesmo gene foi possível observar uma amostra com desvio e outra com expressão bialélica. No eletroferograma do cDNA do caso 01, referente à pl.01, é possível observar que o tamanho do pico relativo à timina na posição polimórfica é consideravelmente maior do que o da citosina; já no caso 17, referente à pl.17, os dois picos apresentam tamanhos muito próximos. A quantificação das diferenças entre a altura dos picos pelo programa *PeakPicker* classificou a expressão nesses dois *loci* como desviada e bialélica, respectivamente (Tabela 4).

Figura 12. Eletroferogramas representativos de um caso de inativação desviada e outro de aleatória do cromossomo X. O número de identificação de cada caso é indicado na porção superior: caso 01, exemplo de ICX desviada; caso 17, exemplo de ICX aleatória. O nome do gene e a identificação do SNP estão indicados abaixo. Os fragmentos dos eletroferogramas estão dispostos de cima para baixo como: DNA de placenta informativa; cDNA da respectiva amostra; DNA materno. A posição do polimorfismo está evidenciada em amarelo.

Na figura 13 estão dois exemplos do comportamento de amostras informativas para os genes *GPC4* e *TCEAL4*, submetidos à ICX (Carrel e Willard, 2005; Stabellini, 2008). A quantificação gerada pelo *PeakPicker* mostra que cada caso se comporta de maneira distinta quanto ao padrão de ICX, revelando uma gama de padrões de inativação que varia de completamente desviado a aleatório (ver anexo 2 para o conjunto completo de dados).

Figura 13. Quantificação da atividade gênica alelo-específica utilizando-se o programa *PeakPicker* para os genes *TCEAL4* e *GPC4*. No eixo Y à esquerda, estão os valores obtidos pela razão entre as alturas dos picos no alelo polimórfico. Em cada quadro a linha sólida inferior delimita os valores esperados para ICX completamente desviada (0:100). Acima da linha tracejada (20:80) estão amostras com ICX aleatória. As posições dos círculos vazados representam os valores de DNA genômico homozigoto (abaixo de 0:100) e heterozigoto (acima de 50:50); as dos símbolos cheios representam os de cDNA. Os triângulos indicam réplicas experimentais de uma mesma amostra. A posição do asterisco é referente ao resultado obtido para o seqüenciamento de cDNA de GM135-Tel G9.

Em todas as amostras houve coerência em relação à origem parental do alelo expresso, o que permitiu identificar nove casos de inativação preferencial do X paterno (Tabela 4: pl.01, pl.02, pl.06, pl.07, pl.08, pl.10, pl.11, pl.19, e pl.27), e três de ICX preferencial do materno (Tabela 4: pl.21, pl.28, e pl.30). Nesses dois grupos, em cinco das 12 amostras foi possível demonstrar consistência entre a origem parental do alelo expresso de *XIST* quando comparada à origem parental dos outros genes (Figura 11 e tabela 4: pl.08, pl.11, pl.19, pl.21 e pl.28).

Devido ao padrão variável encontrado entre as amostras representadas na tabela 4, foi levantada a seguinte hipótese: se de fato a ICX é aleatória em placenta,

é possível que esse órgão esteja organizado como um mosaico de duas diferentes populações celulares. Dessa forma, a placenta apresentaria regiões com células onde o pX teria sido inativado, e outras com o mX inativo. Para se verificar essa hipótese, foi elaborado um projeto em conjunto com a então aluna de Iniciação Científica Érica Araújo, para o qual foram coletados três fragmentos não adjacentes (A, B e C) de três placentas adicionais (pl.31, pl.32 e pl.33). O mesmo tipo de análise da expressão alelo-específica foi realizado para cada um dos fragmentos individualmente.

O fragmento A da pl.31 apresentou padrão consistente com ICX aleatória em genes como *XIST* e *OPHN1*, enquanto que os fragmentos B e C da mesma placenta indicavam ICX desviada e completamente desviada, respectivamente (Tabela 5 e figura 14: pl.31). Resultados similares foram observados pela expressão de *XIST* e *PIGA* na placenta 32, e *TSPAN7* e *VBP1* na placenta 33 (Tabela 5 e figura 14: pl.32 e pl.33).

Figura 14. Mosaicismo na placenta humana a termo em relação à escolha do X inativo. Trechos de eletroferogramas de DNA e cDNA dos três fragmentos (A, B e C) de cada placenta, selecionados de *loci* informativos. A identificação da amostra é indicada na porção superior, o nome do gene e a identidade do SNP estão indicados abaixo de cada quadro. A posição do polimorfismo está evidenciada em amarelo.

A tabela 5 foi formulada de maneira semelhante à organização dos dados na tabela 4. Nela, os dados das amostras pl.31, pl.32 e pl.33 estão dispostos de acordo com a expressão alelo-específica observada em cada fragmento não adjacente (A, B e C). À exceção dos *loci* que apresentaram expressão a partir de ambos os alelos, a origem do alelo expresso está indicada pelo símbolo do nucleotídeo na posição polimórfica. Assim, letras em fonte maiúscula representam o alelo predominantemente expresso, com pico mais alto; e as minúsculas, do mais baixo observados nos eletroferogramas. Tal notação facilita a visualização da expressão

diferencial entre os fragmentos, e evidencia o padrão de mosaicismo encontrado na placenta a termo.

Tabela 5. Caracterização do mosaicismo em placenta humana a termo.											
Gene	SNP [£]	Exp. no Xi [#]	pl. 31			pl. 32			pl. 33		
			A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>PIGA</i>	rs11448948	0 / 7	-	-	-	DEL/in*	*		-	-	-
<i>PIGA</i>	rs3087965	0 / 7		x	x	A/t			-	-	-
<i>ZFX</i>	rs5949242	11 / 11	-	-	-	-	-	-			
<i>TSPAN7</i>	rs10333	0 / 13	-	-	-		A		A	G*	*
<i>DYNLT3</i>	rs12849	0 / 10	-	-	-	A/t	A		T/a	T/a	A/t
<i>MAOA</i>	rs3027407	3 / 7	-	-	-	A	A*	A*	-	-	-
<i>TIMP1</i>	rs4898	0 / 10	-	-	-	-	-	-	C/t*	*	*
<i>EBP</i>	rs3048	0 / 11		A/c	C	-	-	-	x	x	x
<i>SUV39H1</i>	rs3373	0 / 9	G/a	A	G*	-	-	-	-	-	-
<i>OPHN1</i>	rs492933	1 / 12		C/t	T*	-	-	-	-	-	-
<i>XIST</i>	rs1894271	9 / 9 [§]		A/g	G				-	-	-
<i>XIST</i>	rs1620574	9 / 9 [§]	-	-	-	*	*	*	-	-	-
<i>ATP7A</i>	rs2227291	0 / 11	G/c	C/g*	G/c	-	-	-	-	-	-
<i>SYTL4</i>	rs8780	0 / 9	C/g	C/g*	C/g*	*	*		-	-	-
<i>TCEAL4</i>	rs11010	0 / 12		T/c	C/t*	-	-	-	-	-	-
<i>MPP1</i>	rs1126762	0 / 10	T/g	T		*			T	T	
<i>VBP1</i>	rs11887	0 / 7	*	C/t	*		*	*	T/c		
<i>CLIC2</i>	rs559165	1 / 11			G/t				-	-	-

(£) Variante de acordo com o banco de SNPs, dbSNP montagem 129, disponibilizado pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

(#) Expressão no Xi de acordo com Carrel e Willard (2005). Os resultados estão apresentados como o número de fibroblastos primários que expressavam o gene pelo número de fibroblastos observados.

(§) Resultados apresentados como o número de células híbridas camundongo/humano que expressavam o gene pelo número de híbridos observados.

(*) *locus* submetido às análises no *PeakPicker*.

(X) *locus* heterozigoto não analisado, (-) *locus* homozigoto.

Nas células coloridas, a letra em fonte maiúscula representa o alelo predominantemente expresso, de acordo com o nucleotídeo presente na posição polimórfica.

Escala de cores:

Expressão monoalélica

Expressão com desvio

Expressão bialélica

Os resultados obtidos com os diferentes fragmentos da placenta pl.31 deixam claro que cada um deles apresenta um padrão de ICX independente. Com este espécime foi possível observar padrões de expressão variando de mono a bialélico, incluindo inversões entre o alelo predominantemente expresso de um mesmo gene dependendo do fragmento analisado (Tabela 5: pl.31; fragmentos A, B e C; genes *EBP*, *SUV39H1*, *OPHN1*, *XIST*, *TCEAL4* e *MPP1*).

Todos os fragmentos da amostra pl.32 apresentaram principalmente expressão originária de ambos os alelos, indicando um resultado clássico do esperado para ICX aleatória. Entretanto, a expressão do gene *DYNLT3* varia entre A, B e C (desviado, completamente desviado e aleatório, respectivamente; Tabela

5), esses resultados são somente condizentes com o modelo de inativação em mosaico, logo cada fragmento apresenta um padrão independente de ICX.

Apesar de menos evidente, uma análise mais atenta dos resultados obtidos com a placenta pl.33 também corrobora o modelo de mosaicismo, tendo em vista que os fragmentos A e C apresentaram inversão entre os alelos preferencialmente expressos no gene *DYNLT3* (Tabela 5). Outra evidência vem com a análise do gene *TSPAN7*: no fragmento A há desvio total de ICX em favor do alelo que contém a adenina; no fragmento B, desvio total em favor do alelo que contém a guanina; e em C, foi detectada expressão a partir de ambos os alelos (Tabela 5 e figura 14: pl.33).

Em conjunto, a análise dos três diferentes fragmentos desses espécimes corrobora a hipótese de mosaicismo na placenta a termo.

4.4. RÉPLICAS EXPERIMENTAIS

A validade dos resultados foi testada em diferentes amostras através de réplicas experimentais. Um exemplo pode ser visto na figura 15, que mostra o sucesso em se reproduzir experimentalmente os resultados obtidos. Cada ponto no gráfico é resultado da avaliação dos eletroferogramas gerados a partir de cDNAs da mesma amostra, sintetizados independentemente. Ainda que os pontos não se sobreponham com perfeição, as diferenças são metodologicamente insignificantes e resultam de variação experimental. As figuras 10 e 13 também apresentam exemplos de réplicas experimentais referentes às amostras pl.21, pl.18 e pl.05, respectivamente (ver anexo 2 para mais exemplos).

Figura 15. Consistência obtida através de réplica experimental. No eixo Y estão os valores obtidos pela a razão entre as alturas dos picos no alelo polimórfico. O nome de cada gene e a identidade do SNP estão situados abaixo de cada conjunto de resultados. Para cada gene as linhas sólidas inferiores delimitam os valores esperados para ICX completamente desviada (0:100) e as superiores ICX aleatória (50:50); as linhas pontilhadas (20:80) foram calculadas para se determinar o limite entre padrão aleatório e desviado de ICX (de acordo com o sugerido por Amos-Landgraf *et al.*, 2006). Experimentos realizados com cDNA produzidos de maneira independente e obtidos da amostra pl.05.

5.1. IMPORTÂNCIA DA ANÁLISE GLOBAL DA ATIVIDADE GÊNICA ALELO-ESPECÍFICA

Ainda que nos últimos 30 anos, o padrão de ICX em tecidos extra-embrionários de humanos tenha sido alvo de diversos estudos, uma análise cuidadosa dos resultados publicados e principalmente de suas conclusões revela que este assunto continua controverso (Tabela 1). Em contraste ao que foi feito nos estudos anteriores, aqui foi utilizada uma metodologia que envolveu a análise de expressão gênica alelo-específica de diversos genes ao longo do cromossomo X. Assim, o presente trabalho buscou, de maneira inédita no que diz respeito a estudos que procuram definir o padrão de ICX em placenta humana, representar todas as diferentes porções do cromossomo X fora da região pseudo-autossômica.

A análise de múltiplos *loci* ligados ao X foi fundamental para identificar que o padrão de expressão do cromossomo como um todo pode ser heterogêneo. Por exemplo, se o presente estudo tivesse se baseado apenas nos padrões obtidos com os genes *TBL1X* e/ou *PIGA*, poder-se-ia ter chegado à conclusão de que a ICX ocorre de maneira preferencial em placenta humana. É importante perceber que, pela análise restrita da expressão alelo-específica desses dois genes, seriam gerados resultados muito similares ao observado nos trabalhos publicados por Harrison e Warburton (1986), Harrison (1989) e Uehara e colaboradores (2000) (Tabelas 1 e 4). Em contraste, avaliando-se apenas o padrão de expressão de *TIMP1* e/ou *TCEAL4* concluir-se-ia ICX aleatória, com o conjunto de amostras

informativas apresentando resultados semelhantes aos encontrados em Migeon e Do (1978, 1979) e Looijenga e colaboradores (1999) (Tabelas 1 e 4). A metodologia aqui aplicada demonstra de forma clara e robusta que pode haver imprecisão ao se inferir o estado transcricional do cromossomo X como um todo a partir de um único ou mesmo poucos *loci*.

Ainda que a origem parental do alelo expresso seja consistente em cada amostra, a maioria das amostras apresentou genes com padrões de expressão variáveis (Tabelas 4 e 5). Esse dado pode indicar um possível relaxamento, ainda que heterogêneo, do estado epigenético do cromossomo Xi na placenta a termo. De fato, já foi demonstrado *in vitro* que o cromossomo inativo de trofoblastos parece ser mais suscetível à reativação de seus genes quando inseridos em sistemas de células híbridas camundongo/humano do que aqueles originados de outros tecidos somáticos (Migeon *et al.*, 1986; Migeon *et al.*, 2005). Além disso, um estudo recente verificou o estado transcricional de nove genes autossômicos que sofrem *imprinting* genômico na placenta, ou seja possuem expressão dependente da origem parental (Lambertini *et al.*, 2008). Os autores reportam que esses genes podem apresentar graus variáveis de perda de *imprinting* na placenta a termo. Assim, o padrão variável da atividade gênica entre os *loci* de uma mesma amostra observado aqui (Tabelas 4 e 5), pode ser tanto um reflexo da instabilidade na manutenção do Xi de trofoblastos, quanto resultado dos mesmos processos epigenéticos envolvidos na perda de *imprinting* dos autossomos. É interessante ressaltar que essa extensiva variação de expressão não foi observada na linhagem GM135-Tel G9 (Stabellini, 2008), nem no painel da atividade do Xi em linhagens primárias de fibroblastos humanos (Carrel e Willard, 2005).

5.2. INATIVAÇÃO ALEATÓRIA EM PLACENTA HUMANA

A tabela 4 evidencia que cada amostra de placenta apresenta um comportamento próprio em relação à escolha e ao padrão de ICX; em cada uma delas foi possível identificar casos de inativação aleatória, inativação desviada, e ainda de desvio total de ICX. Dentre os casos que se enquadram nestas duas últimas categorias, são observadas ocorrências de inativação preferencial tanto do X paterno quanto do materno. Esses resultados indicam não apenas que a origem parental do Xi em placenta humana a termo é aleatória como também sugerem que o órgão esteja arranjado como um mosaico em relação à escolha do Xi.

A hipótese de mosaicismo foi confirmada em três placentas adicionais, nas quais foi possível demonstrar que o padrão de inativação difere entre três fragmentos não adjacentes coletados de uma mesma amostra (Tabela 5 e figura 14). A verificação da extensão do mosaicismo pôde ser inferida pela maneira como foram obtidas as amostras de RNA (sub-item 3.2.2.2): pode-se presumir que as populações de células com o mesmo Xi estejam arranjadas em manchas de pelo menos 8 mm³, uma vez que este era o tamanho médio da amostra utilizada na extração de RNA. Adicionando-se à essa inferência o fato que em apenas duas amostras foram detectados padrões bialélicos de expressão em todos os *loci*, tornam-se fortes os indicativos de que as manchas que compõem o mosaico são razoavelmente grandes. Se as regiões com ICX preferencial fossem muito pequenas, o esperado seria um número maior de amostras que indicassem, por si só, inativação aleatória.

Os dados expostos neste trabalho concordam com os resultados previamente publicados sobre o padrão de expressão dos genes *AR* e *FMR1* em placenta a

termo e vilosidades coriônicas, respectivamente (Looijenga *et al.*, 1999; Willemsen *et al.*, 2002). Considerando-se a extensão do mosaicismo aqui sugerido, é possível reavaliar os dados da literatura e verificar que eles se encaixam nesse modelo, estando de fato em acordo com o padrão de ICX aleatório (Tabela 1). Os únicos dois estudos que identificaram ICX exclusivamente preferencial apresentam importantes limitações: o primeiro se baseou em dados de apenas duas amostras (Goto *et al.*, 1997); enquanto que o segundo obteve seus resultados de trofoblastos diferenciados a partir da linhagem de células-tronco embrionárias humanas H9 (Dhara e Benvenisty, 2004). Entretanto, já foi demonstrada a instabilidade epigenética do cromossomo X nessas células (Shen *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008), o que indica que talvez não sirvam como um modelo adequado nos estudos de ICX humana *in vitro*.

Outro dado importante para a comprovação de ICX aleatória em placenta e de seu comportamento como mosaico vem das amostras informativas para o gene *XIST*. Uma vez que esse gene é exclusivamente expresso a partir do X inativo (Brown *et al.*, 1991), seu padrão de expressão bialélico reflete, no contexto da nossa metodologia, uma origem multiclonal de alguns fragmentos e, logo, padrão de inativação aleatório (Tabela 4). Adicionalmente, a origem parental do alelo expresso de *XIST* nos diferentes fragmentos da amostra pl.31, também revela a existência de regiões de inativação preferencial do homólogo materno ou paterno (Tabela 5 e figura 14).

Ainda que o gene *XIST* tenha sido primeiramente identificado em humanos (Brown *et al.*, 1991; Brown *et al.*, 1992), os mecanismos moleculares de compensação de dose tem sido amplamente estudados em camundongos (revisto

em Payer e Lee, 2008). Entretanto, é importante ressaltar que existem diferenças fundamentais no que se refere aos processos de ICX entre essas duas espécies, visto que já está muito bem caracterizada a diferença estrutural entre os genes *TSIX/Tsix* (revisto em Vasques *et al.*, 2002; Payer e Lee, 2008). A extensiva caracterização da presença de ICX aleatória neste trabalho contribui com mais uma evidência dessa diferença ao demonstrar que o mX também é passível de sofrer inativação em tecidos extra-embrionários humanos.

5.3. PROCESSOS EVOLUTIVOS DA ICX EM MAMÍFEROS

Em marsupiais, a inativação exclusiva do cromossomo X paterno foi demonstrada em todos os tecidos e em diversos dos representantes atuais desse grupo (Cooper *et al.*, 1971; Sharman, 1971; Johnston e Robinson, 1987; VandeBerg *et al.*, 1979). Durante os 147 milhões de anos que separam evolutivamente os metatérios dos eutérios (Bininda-Emonds *et al.*, 2007), o processo de ICX passou a apresentar em eutérios uma via adicional, exclusiva das células da massa celular interna, que resulta no processo aleatório de escolha do X inativo, como observado em camundongos (revisto em Pereira e Stabellini, 2005). Entretanto o mecanismo de ICX preferencial do cromossomo de origem paterna se manteve nos tecidos extra-embrionários de camundongos, ratos, e ainda que menos extensivamente caracterizado, em bovinos (Takagi e Sasaki, 1975; Wake *et al.*, 1976; West *et al.*, 1977; Xue *et al.*, 2002).

O *imprinting* genômico é um fenômeno epigenético que resulta na expressão monoalélica de certos genes de maneira dependente da origem parental, e até o momento não há evidências de que este mecanismo esteja presente em outros

vertebrados. Visto que a ICX também é encontrada apenas nos mamíferos placentários, alguns trabalhos sugerem que ambos os processos tenham evoluído em concomitância aos processos evolutivos que deram origem à placenta (Reik e Lewis, 2005; Monk *et al.*, 2006; Moore *et al.*, 1995). Ainda que transiente, a placenta é um órgão essencial no desenvolvimento embrionário. Durante a gestação, é o primeiro órgão a se formar, sendo responsável pelo estabelecimento das conexões vasculares com a mãe, permitindo as trocas gasosas e de nutrientes. Este órgão produz ainda os hormônios responsáveis pela manutenção da gestação e do desenvolvimento embrionário, estando envolvido na proteção imune do feto (Schneider, 1991).

Em camundongos, todos os genes autossômicos submetidos ao *imprinting* genômico exclusivamente na placenta são expressos a partir do alelo de origem materna. A estes genes são atribuídas principalmente funções relacionadas à proliferação, diferenciação celular, migração e capacidade de invasão no endométrio (revisto em Wagschal e Feil, 2006). Um estudo muito interessante demonstrou que a maioria dos ortólogos desses genes murinos parece ter perdido em humanos a característica de *imprinting* exclusiva do órgão (Monk *et al.*, 2006). Uma vez que as marcas epigenéticas do *imprinting* em autossomos e do cromossomo Xi são semelhantes na placenta de camundongo (revisto em Reik e Lewis, 2005; Wagschal e Feil, 2006), poder-se-ia cogitar que tanto o *imprinting* do cromossomo X quanto dos autossomos teria se perdido em humanos. Não obstante, é notável a preponderância de amostras de placenta com expressão preferencial do alelo materno. Portanto, ainda que a ICX exclusiva do pX tenha se perdido durante a

evolução em humanos, ainda pode existir uma vantagem proliferativa naquelas células que inativam o pX no início do desenvolvimento da placenta.

Ao longo deste trabalho esclareceu-se o padrão de ICX em placenta humana a termo, verificando-se que ela ocorre de maneira distinta àquela observada em camundongos. Tendo em vista as diferenças em relação aos processo de ICX entre essas duas espécies, expostas ao longo dessa dissertação, seria de grande relevância estudar os padrões de ICX em tecidos extra-embrionários de outros eutérios, com o intuito de compreender melhor a evolução da compensação de dose nos mamíferos placentários.

6. CONCLUSÃO

Desde as primeiras observações de que em fêmeas de mamíferos eutérios existe um cromossomo X que se comporta de maneira distinta dos outros cromossomos, já foram publicados inúmeros trabalhos visando a esclarecer os padrões e mecanismos envolvidos em todos os estágios do processo de inativação daquele cromossomo. Apesar dos esforços nos últimos 30 anos em se elucidar o padrão de ICX em tecidos extra-embrionários humanos, as incongruências entre as publicações ainda não permitem determinar o padrão nesses tecidos (Tabela 1).

Neste trabalho foram empregadas análises de expressão de genes ao longo do cromossomo X, o que tornou possível determinar que o padrão de ICX em placenta humana a termo é independente da origem parental. Essa conclusão não teria sido alcançada não fosse o significativo número de amostras aliado à análise de um número representativo de *loci* que cobrem diversas regiões do cromossomo (Tabela 4). De grande importância também foi a avaliação de diferentes fragmentos de um mesmo espécime, fundamental na consolidação da hipótese da placenta humana a termo se apresentar como um mosaico de áreas distintas com populações celulares clonais que inativam o mesmo cromossomo X.

Devido às inconsistências na literatura referente ao padrão de ICX em tecidos extra-embrionários humanos, foi feita uma intensa re-avaliação dos resultados previamente publicados. De forma surpreendente, a análise desse complexo conjunto de resultados (Tabela 1) está de acordo com a hipótese comprovada experimentalmente nesta dissertação: que a placenta se apresenta como um mosaico em relação à ICX (Tabelas 4 e 5).

Além do esclarecimento sobre o padrão de ICX em placenta humana, os resultados aqui apresentados revelam que o padrão de expressão no cromossomo Xi é heterogêneo, se não nos tecidos embrionários, ao menos na placenta a termo, concordando com os achados de Migeon e colaboradores (1986 e 2005) e Lambertini e colaboradores (2008). Essa observação indica um possível relaxamento na manutenção da inativação do X no órgão. Para se demonstrar se essa é uma característica específica da manutenção de ICX nesta fase de desenvolvimento, seria importante realizar análises similares às descritas aqui em tecidos extra-embrionários humanos mais precoces.

Sabe-se hoje que a inativação preferencial do cromossomo X paterno acontece em marsupiais, tendo sido descrita também apenas em tecidos extra-embrionários de murinos e bovinos. Em humanos, a ICX se dá de maneira aleatória tanto no embrião quanto na placenta, como extensivamente caracterizado no presente estudo. Para auxiliar na busca por respostas relativas aos processos evolutivos envolvidos na aquisição e perda da inativação exclusiva do X de origem paterna, seria de grande relevância que fossem realizados estudos semelhantes ao deste trabalho em outros representantes da infraclasse Eutéria.

Em mamíferos a inativação do cromossomo X (ICX) consiste no silenciamento gênico de um dos dois X presentes nas células somáticas normais das fêmeas, garantindo a compensação de dose transcricional em relação aos machos. Existem duas formas de ICX: aleatória, na qual a escolha do cromossomo X inativado se dá ao acaso (X paterno ou materno); e de maneira completamente desviada, na qual a atividade do cromossomo X dependerá de sua origem parental. Nas fêmeas marsupiais a inativação ocorre de forma completamente desviada, sendo o X paterno preferencialmente inativado em todas as células, já nas células embrionárias de eutérios, o que se observa é a ICX aleatória. Entretanto, naquelas células que darão origem aos tecidos extra-embrionários, de camundongos e bovinos, a ICX se dá de forma equivalente à dos marsupiais, ou seja, o X paterno é preferencialmente inativado. Há mais de 30 anos o padrão de ICX em tecidos extra-embrionários humanos tem sido alvo de intenso debate. A crítica que se faz aqui é que tais estudos foram realizados com base na expressão de apenas um ou dois genes ligados ao X com amostras de tecidos extra-embrionários em diferentes idades gestacionais e, por vezes, em poucas amostras, o que deve ter levado às contradições entre as conclusões. O diferencial deste trabalho foi a utilização de técnicas de genotipagem de SNPs presentes em regiões codificadoras, para analisar o padrão de atividade alelo-específica de um grande número de genes presentes ao longo de todo o cromossomo X, gerando um panorama mais representativo da ICX em placenta humana. Neste estudo é comprovado o padrão aleatório de ICX em placenta humana a termo e demonstrado que este órgão se apresenta como um

mosaico em relação à escolha do X inativo. A análise global da atividade gênica no cromossomo X indicou ainda que a manutenção do estado epigenético do X inativo parece ser heterogêneo. Em conjunto, os dados gerados são capazes de explicar as incongruências entre as conclusões previamente publicadas. Este trabalho também ilustra as diferenças nos mecanismos de ICX entre humanos e camundongos e reforça a importância de se avaliar esse tema em outras espécies de mamíferos eutérios na tentativa de se elucidar os processos evolutivos envolvidos na compensação de dose em mamíferos.

Imprinted inactivation of the paternal X chromosome in marsupials is the primordial mechanism of dosage compensation for X-linked genes between females and males in Therians. In Eutherian mammals, X chromosome inactivation (XCI) evolved into a random process in cells from the embryo proper, where either the maternal or paternal X can be inactivated. However, species like mouse and bovine maintained imprinted XCI exclusively in extraembryonic tissues. The existence of imprinted XCI in humans remains controversial, with studies based on the analyses of only one or two X-linked genes in different extraembryonic tissues. Here we readdress this issue in human term placenta by performing a robust analysis of allele-specific expression of 23 X-linked genes, including XIST, using 28 SNPs in transcribed regions. We show that XCI is random in human placenta, and that this organ is arranged in relatively large patches of cells with either maternal or paternal inactive X. In addition, this chromosome-wide analysis indicated heterogeneous maintenance of the epigenetic state along the inactive X, which combined with the extensive mosaicism found in placenta, can explain the lack of agreement among previous studies. Our results illustrate the differences of XCI mechanism between humans and mice, and highlight the importance of addressing the issue of imprinted XCI in other species in order to understand the evolution of dosage compensation in placental mammals.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amos-Landgraf, JM, Cottle, A, Plenge, RM, Friez, M, Schwartz, CE *et al* X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am.J.Hum.Genet.*, 2006. 79:493-499.
- Anderson, CL e Brown, CJ Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. *Am.J.Hum.Genet.*, 1999. 65:699-708.
- Bacher, CP, Guggiari, M, Brors, B, Augui, S, Clerc, P *et al* Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nat.Cell Biol.*, 2006. 8:293-299.
- Barr, ML e Bertram, EG A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, 1949. 163:676
- Beutler, E, YEH, M, e FAIRBANKS, VF The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: studies using the gene for C-6-PD-deficiency as a marker. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1962. 48:9-16.
- Bininda-Emonds, OR, Cardillo, M, Jones, KE, MacPhee, RD, Beck, RM *et al* The delayed rise of present-day mammals. *Nature*, 2007. 446:507-512.
- Boumil, RM e Lee, JT Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. *Hum.Mol.Genet.*, 2001. 10:2225-2232.
- Brockdorff, N, Ashworth, A, Kay, GF, McCabe, VM, Norris, DP *et al* The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell*, 1992. 71:515-526.
- Brown, CJ, Ballabio, A, Rupert, JL, Lafreniere, RG, Grompe, M *et al* A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, 1991. 349:38-44.
- Brown, CJ, Carrel, L, e Willard, HF Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *Am.J.Hum.Genet.*, 1997. 60:1333-1343.
- Brown, CJ, Hendrich, BD, Rupert, JL, Lafreniere, RG, Xing, Y *et al* The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*, 1992. 71:527-542.
- Carrel, L e Willard, HF X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*, 2005. 434:400-404.
- Charlesworth, B The evolution of sex chromosomes. *Science*, 1991. 251:1030-1033.
- Cheng, MK e Disteche, CM A balancing act between the X chromosome and the autosomes. *J.Biol.*, 2006. 5:2-
- Clemson, CM, McNeil, JA, Willard, HF, e Lawrence, JB XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J.Cell Biol.*, 1996. 132:259-275.

- Cooper,DW, VandeBerg,JL, Sharman,GB, e Poole,WE Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. *Nat.New Biol.*, 1971. 230:155-157.
- Crews,D Sex determination: where enviroment and genetics meet. *Evol.Dev.*, 2003. 5:50-55.
- Csankovszki,G, Nagy,A, e Jaenisch,R Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J.Cell Biol.*, 2001. 153:773-784.
- Deakin,JE, Chaumeil,J, Hore,TA, e Marshall Graves,JA Unravelling the evolutionary origins of X chromosome inactivation in mammals: insights from marsupials and monotremes. *Chromosome.Res.*, 2009. 17:671-685.
- Dhara,SK e Benvenisty,N Gene trap as a tool for genome annotation and analysis of X chromosome inactivation in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.*, 2004. 32:3995-4002.
- Disteche,CM Escapees on the X chromosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 1999. 96:14180-14182.
- Engelstadter,J Constraints on the evolution of asexual reproduction. *Bioessays*, 2008. 30:1138-1150.
- Ewing,B e Green,P Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.*, 1998. 8:186-194.
- Ewing,B, Hillier,L, Wendl,MC, e Green,P Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, 1998. 8:175-185.
- Fox,H Aging of the placenta. *Archives of Disease in Childhood*, 1997. 77:F171-F175.
- Ge,B, Gurd,S, Gaudin,T, Dore,C, e et al. Survey of allelic expression using EST mining. *Genome Res.*, 2005. 15:1584-1591.
- Goto,T, Wright,E, e Monk,M Paternal X-chromosome inactivation in human trophoblastic cells. *Mol.Hum.Reprod.*, 1997. 3:77-80.
- Graves,JA Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell*, 2006. 124:901-914.
- Graves,JA Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annu.Rev.Genet.*, 2008. 42:565-586.
- Gupta,V, Parisi,M, Sturgill,D, Nuttall,R, Doctolero,M *et al* Global analysis of X-chromosome dosage compensation. *J.Biol.*, 2006. 5:3-
- Harrison,KB X-chromosome inactivation in the human cytotrophoblast. *Cytogenet.Cell Genet.*, 1989. 52:37-41.
- Harrison,KB e Warburton,D Preferential X-chromosome activity in human female placental tissues. *Cytogenet.Cell Genet.*, 1986. 41:163-168.

- Huynh,KD e Lee,JT Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature*, 2003. 426:857-862.
- Johnston,PG e Robinson,ES X chromosome inactivation in female embryos of a marsupial mouse (*Antechinus stuartii*). *Chromosoma*, 1987. 95:419-423.
- Lakhotia,SC e Mukherjee,AS Chromosomal basis of dosage compensation in *Drosophila*. 3. Early completion of replication by the polytene X-chromosome in male: further evidence and its implications. *J.Cell Biol.*, 1970. 47:18-33.
- Lambertini,L, Diplas,AI, Lee,MJ, Sperling,R, Chen,J *et al* A sensitive functional assay reveals frequent loss of genomic imprinting in human placenta. *Cancer Biol.Ther.*, 2008. 3:
- Lee,JT Reply to "Is Tsix repression of Xist specific to mouse?". *Nat.Genet.*, 2003. 33:337-338.
- Lee,JT, Davidow,LS, e Warshawsky,D Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat.Genet.*, 1999. 21:400-404.
- Lee,JT e Lu,N Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell*, 1999. 99:47-57.
- Looijenga,LH, Gillis,AJ, Verkerk,AJ, van Putten,WL, e Oosterhuis,JW Heterogeneous X inactivation in trophoblastic cells of human full-term female placentas. *Am.J.Hum.Genet.*, 1999. 64:1445-1452.
- Lyon,MF Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 1961. 190:372-373.
- Lyon,MF Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am.J.Hum.Genet.*, 1962. 14:135-148.
- Mak,W, Nesterova,TB, de,NM, Appanah,R, Yamanaka,S *et al* Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*, 2004. 303:666-669.
- Mietton,F, Sengupta,AK, Molla,A, Picchi,G, Barral,S *et al* Weak but uniform enrichment of the histone variant macroH2A1 along the inactive X chromosome. *Mol.Cell Biol.*, 2009. 29:150-156.
- Migeon,BR Is Tsix repression of Xist specific to mouse? *Nat.Genet.*, 2003. 33:337-338.
- Migeon,BR, Axelman,J, e Jeppesen,P Differential X reactivation in human placental cells: implications for reversal of X inactivation. *Am.J.Hum.Genet.*, 2005. 77:355-364.
- Migeon,BR, Chowdhury,AK, Dunston,JA, e McIntosh,I Identification of TSIX, encoding an RNA antisense to human XIST, reveals differences from its murine counterpart: implications for X inactivation. *Am.J.Hum.Genet.*, 2001. 69:951-960.
- Migeon,BR e Do,TT In search of nonrandom X inactivation: studies of the placenta from newborns heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Basic Life Sci.*, 1978. 12:379-391.

- Migeon, BR e Do, TT In search of non-random X inactivation: studies of fetal membranes heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am.J.Hum.Genet.*, 1979. 31:581-585.
- Migeon, BR, Lee, CH, Chowdhury, AK, e Carpenter, H Species differences in TSIX/Tsix reveal the roles of these genes in X-chromosome inactivation. *Am.J.Hum.Genet.*, 2002. 71:286-293.
- Migeon, BR, Schmidt, M, Axelman, J, e Cullen, CR Complete reactivation of X chromosomes from human chorionic villi with a switch to early DNA replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 1986. 83:2182-2186.
- Mohandas, TK, Passage, MB, Williams, JW3, Sparkes, RS, Yen, PH *et al* X-chromosome inactivation in cultured cells from human chorionic villi. *Somat.Cell Mol.Genet.*, 1989. 15:131-136.
- Monk, D, Arnaud, P, Apostolidou, S, Hills, FA, Kelsey, G *et al* Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2006. 103:6623-6628.
- Moore, T, Hurst, LD, e Reik, W Genetic conflict and evolution of mammalian X-chromosome inactivation. *Dev.Genet.*, 1995. 17:206-211.
- Nakamura, M Sex determination in amphibians. *Semin.Cell Dev.Biol.*, 2008.
- Nguyen, DK e Disteche, CM Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. *Nat.Genet.*, 2006. 38:47-53.
- Ohno, S e Hauschka, TS Allocycly of the X-chromosome in tumors and normal tissues. *Cancer Res.*, 1960. 20:541-545.
- Ohno, S, Kaplan, WD, e Kinosita, R Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp.Cell Res.*, 1959. 18:415-418.
- Okamoto, I, Otte, AP, Allis, CD, Reinberg, D, e Heard, E Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, 2004. 303:644-649.
- Patrat, C, Okamoto, I, Diabangouaya, P, Vialon, V, Le, BP *et al* Dynamic changes in paternal X-chromosome activity during imprinted X-chromosome inactivation in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 2009. 106:5198-5203.
- Payer, B e Lee, JT X Chromosome Dosage Compensation: How Mammals Keep the Balance. *Annu.Rev.Genet.*, 2008.
- Pereira, LV e Stabellini, R. Initiation of X-chromosome inactivation. In: Jorde, LB, Little, P. F. R, e Subramaniam, S. (editors). *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, John Wiley & Sons, 2005.
- Rastan, S e Cattanach, BM Interaction between the Xce locus and imprinting of the paternal X chromosome in mouse yolk-sac endoderm. *Nature*, 1983. 303:635-637.
- Reik, W e Lewis, A Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat.Rev.Genet.*, 2005. 6:403-410.

- Rice,WR Evolution of the Y sex chromosome in animals. *Bioscience*, 1996. 46:331-343.
- Richards,B, Skoletsky,J, Shuber,AP, Balfour,R, Stern,RC *et al* Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum.Mol.Genet.*, 1993. 2:159-163.
- Ropers,HH, Wolff,G, e Hitzeroth,HW Preferential X inactivation in human placenta membranes: is the paternal X inactive in early embryonic development of female mammals? *Hum.Genet.*, 1978. 43:265-273.
- Ross,MT, Grafham,DV, Coffey,AJ, Scherer,S, McLay,K *et al* The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature*, 2005. 434:325-337.
- Santos,FR, Pena,SD, e Epplen,JT Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum.Genet.*, 1993. 90:655-656.
- Schneider,H Placental transport function. *Reprod.Fertil.Dev.*, 1991. 3:345-353.
- Sharman,GB Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature*, 1971. 230:231-232.
- Shen,Y, Matsuno,Y, Fouse,SD, Rao,N, Root,S *et al* X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2008. 105:4709-4714.
- Silva,SS, Rowntree,RK, Mekhoubad,S, e Lee,JT X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 2008. 105:4820-4825.
- Skaletsky,H, Kuroda-Kawaguchi,T, Minx,PJ, Cordum,HS, Hillier,L *et al* The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 2003. 423:825-837.
- Smith,CA, Roeszler,KN, Hudson,QJ, e Sinclair,AH Avian sex determination: what, when and where? *Cytogenet.Genome Res.*, 2007. 117:165-173.
- Souza, J. E. S. Identificação in-silico de genes humanos submetidos à expressão alélica diferencial. São PAulo: Universidade de São Paulo. Doutorado. 2008.
- Stabellini, R. Análise funcional do genes XIST e DNMT1 na manutenção do processo de inativação do cromossomo X humano através do silenciamento gênico por RNAi. São Paulo: Universidade de São Paulo. Doutorado. 2008.
- Straub,T e Becker,PB Dosage compensation: the beginning and end of generalization. *Nat.Rev.Genet.*, 2007. 8:47-57.
- Takagi,N e Sasaki,M Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, 1975. 256:640-642.
- Tsuchiya,KD e Willard,HF Chromosomal domains and escape from X inactivation: comparative X inactivation analysis in mouse and human. *Mamm.Genome*, 2000. 11:849-854.

- Uehara,S, Tamura,M, Nata,M, Ji,G, Yaegashi,N *et al* X-chromosome inactivation in the human trophoblast of early pregnancy. *J.Hum.Genet.*, 2000. 45:119-126.
- VandeBerg,JL, Thiel,JE, Hope,RM, e Cooper,DW Expression of PGK-A in the Australian brush-tailed possum, *Trichosurus vulpecula* (Kerr), consistent with paternal X inactivation. *Biochem.Genet.*, 1979. 17:325-332.
- Vasques, L. R. Análise funcional do gene DNMT1 no controle da expressão do gene XIST e na manutenção do estado inativo do cromossomo X-inativo (Xi). São Paulo: Universidade de São Paulo. Doutorado. 2003.
- Vasques,LR, Klockner,MN, e Pereira,LV X chromosome inactivation: how human are mice? *Cytogenet.Genome Res.*, 2002. 99:30-35.
- Wagschal,A e Feil,R Genomic imprinting in the placenta. *Cytogenet.Genome Res.*, 2006. 113:90-98.
- Wake,N, Takagi,N, e Sasaki,M Non-random inactivation of X chromosome in the rat yolk sac. *Nature*, 1976. 262:580-581.
- West,JD, Frels,WI, Chapman,VM, e Papaioannou,VE Preferential expression of the maternally derived X chromosome in the mouse yolk sac. *Cell*, 1977. 12:873-882.
- Willemsen,R, Bontekoe,CJ, Severijnen,LA, e Oostra,BA Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. *Hum.Genet.*, 2002. 110:601-605.
- Xu,N, Tsai,CL, e Lee,JT Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science*, 2006. 311:1149-1152.
- Xue,F, Tian,XC, Du,F, Kubota,C, Taneja,M *et al* Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat.Genet.*, 2002. 31:216-220.
- Zeng,SM e Yankowitz,J X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta*, 2003. 24:270-275.

Anexo 1 - Lista de primers para amplificação de genes ligados ao cromossomo X utilizados nesse trabalho. *descritos em Carrel e Willard (2005); ** descrito em Brown et al. (1997); *** desenhados por nossa equipe						
Gene	SNP	Polimorfismo	Primer F	Primer R	Amplicon DNA	Amplicon cDNA
<i>ATP7A</i> *	rs2227291	C/G	CAGTTTTTCGGAGGCTGGTA	AGCATAGGGGGTGTGTCAA	188 pb	188 pb
<i>ATRX</i> *	rs3088074	C/G	TGGTTTTGAGATGCTTGCTC	CAGCAGAAAGGCACAGTTGAT	186 pb	186 pb
<i>CLIC2</i> *	rs559165	T/G	CAGTGGACAGATTATTTATGGC	GCTAAACAGAAAGAGTTAGGAGAGC	183 pb	183 pb
<i>DYNLT3</i> *	rs12849	T/A	GCCAAAAACAAGATCACTGC	GAGAGCGGAACCATAACTCA	200 pb	200 pb
<i>EBP</i> *	rs3048	G/T	CCATCAGCCCCACAAAAGACAT	AGCCATGTGGTCACGACTAA	161 pb	161 pb
<i>G6PD</i> **	rs2230037	C/T	GATGATGACCAAGAAGCCGG	TTCTCCAGCTCAATCTGTGTG	428 pb	219 pb
<i>GPC4</i> *	rs1048369	C/A	CACGTCGTTCCCATTTGTATG	ACCTGTTTTGCAGTGACAGGA	158 pb	158 pb
<i>IL13RA1</i> ***	rs2254672	T/G	TGATGACAACTACAGAAAAACC	AGACTGTAAACCCCTGGAAG	236 pb	236 pb
<i>MAOA</i> ***	rs3027407	A/G	GTAACATTCTATTTCAACTTCAG	GGGAAAAACAAGAGGTGGG	362 pb	362 pb
<i>MPP1</i> *	rs1126762	G/T	CGCCTTTATTTTCAGGGAATGAC	AAGTCTCTTTGGCACACTCACAA	222 pb	220 pb
<i>OPHN1</i> *	rs492933	C/T	GGATGTCAACCAGTCTCTTAG	GCAAACTGGGCTGGAAGATA	251 pb	251 pb
<i>PIGA</i> *	rs11448948; rs3087965	-A ; T/A	CGACCAGTGCAAACTGACAG	AGGTTTTAGAGGCATGCCAC	255 pb	255 pb
<i>SH3BGRL</i> *	rs1044828	C/T	CTCTCATTCCTAAGTTGCCTCA	GAAGCTCAGAAAAATCTGTGG	199 pb	199 pb
<i>SUV39H1</i> *	rs3373	G/A	TTGTGCTCACCCCTGGTTC	GCATAGGGTTGAGGGGTGTA	292 pb	292 pb
<i>SYTL4</i> *	rs8780	G/C	ATTAAAGCACACATACATGTCAG	ATGAACCGAATGAGGAATG	136 pb	136 pb
<i>TBL1X</i> ***	rs7256	G/A	TGCTTGCGACACATCCCA	GACACCATCTCTACCCAC	147 pb	147 pb
<i>TCEAL4</i> *	rs11010	C/T	TGGCTCATTACCTCAAGGAG	CTTGACCTCTAGGGTAGAA	186 pb	186 pb
<i>TIMP1</i> *	rs4898	C/T	GCACATCACTACCTGCAGATT	AGCCACGATTTAGGGAATG	169 pb	169 pb

Gene	SNP	Polimorfismo	Primer F	Primer R	Amplicon DNA	Amplicon cDNA
TSPAN7*	rs10333	A/G	CATTTGGTTTGATTTTCCCTC	ACAATAGCAATTAAATTGGGGA	292 pb	292 pb
VBPI*	rs11887	C/T	AGTTTACTTTTTTCCCTTTCCAAT	GTAGTTAGTTATTTCGTTAAGC	201 pb	201 pb
XIST*	rs1620574	T/C	TCATTCCCTATCTGTATAGAACTGTAGGATT	AGCTATATCTGCTGAATGATCATTGATTA	139 pb	139 pb
XIST***	rs1894271	A/G	CAGCATGGTTGGTGACACCTAAG	TGGAATGAGCAGTGTGCGAT	241 pb	241 pb
XIST***	rs16992436	A/G	GGCATTATTTCTGACTTGGAGATG	CCTGCTTATCGTAGTGGCCAG	431 pb	431 pb
XIST***	rs1794213	T/G	GATGGTTATGGAAAGGGTGACTG	CAAATGTTAACTGCATGATTGCC	311 pb	311 pb
XIST***	rs16992443	C/A	GTGACACACAAGGCCAACGACC	GAATCAGGCTTAAAGATAAACACAGGAG	369 pb	369 pb
ZFX*	rs5949242	T/C	TGGCAAACCTCTGAAAGTGCT	ACATTATGGGGGCCCAAGAAAG	158 pb	158 pb
ZNF75D*	rs1129093	T/C	GGAGACACTAGACATGCTTC	CACACAGGAGAGAAGCCCTT	200 pb	200 pb

Anexo 2 – Quantificação de expressão alelo-específica pelo *PeakPicker*. Os gráficos estão dispostos em ordem alfabética de acordo com o nome de cada gene.

Gráficos da quantificação de expressão alelo-específica pelo *PeakPicker*. Em cada gráfico: no canto superior, nome do gene e identidade do SNP; no eixo Y à esquerda, estão os valores normalizados para a razão entre os alelos; a linha sólida inferior delimita os valores esperados para ICX completamente desviada (0:100), e a superior, para a aleatória (50:50); a linha pontilhada (20:80) foi calculada para se determinar o limite entre padrão aleatório e desviado de ICX (de acordo com o sugerido por Amos-Landgraf *et al.*, 2006). As posições dos círculos vazados representam os valores de DNA genômico homozigoto (menores ou iguais a 0:100) e heterozigoto (maiores ou iguais a 50:50); as dos símbolos cheios, representam os de cDNA. Os triângulos de mesma direção indicam réplicas experimentais de uma mesma amostra. A posição do asterisco é referente ao resultado obtido para o seqüenciamento de cDNA de GM135-Tel G9.

Anexo 3 – Artigo submetido na revista *PLoS Genetics*

Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome.

Running head: X Chromosome Inactivation in Human Placenta.

Joana Carvalho Moreira de Mello¹, Érica Sara Souza de Araújo¹, Raquel Stabellini¹, Ana Maria Fraga¹, Jorge Estefano Santana de Souza², Anamaria A. Camargo², Lygia V. Pereira^{1*}.

¹Laboratório de Genética Molecular, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 05508-090, Brazil; ²São Paulo Branch, Ludwig Institute for Cancer Research, 01323-903 São Paulo, Brazil.

* corresponding author's email: lpereira@usp.br.

ABSTRACT

Imprinted inactivation of the paternal X chromosome in marsupials is the primordial mechanism of dosage compensation for X-linked genes between females and males in Therians. In Eutherian mammals, X chromosome inactivation (XCI) evolved into a random process in cells from the embryo proper, where either the maternal or paternal X can be inactivated. However, species like mouse and bovine maintained imprinted XCI exclusively in extraembryonic tissues. The existence of imprinted XCI in humans remains controversial, with studies based on the analyses of only one or two X-linked genes in different extraembryonic tissues. Here we readdress this issue in human term placenta by performing a robust analysis of allele-specific expression of 22 X-linked genes, including *XIST*, using 27 SNPs in transcribed regions. We show that XCI is random in human placenta, and that this organ is arranged in relatively large patches of cells with either maternal or paternal inactive X. In addition, this chromosome-wide analysis indicated heterogeneous maintenance of the epigenetic state along the inactive X, which combined with the extensive mosaicism found in placenta, can explain the lack of agreement among previous studies. Our results illustrate the differences of XCI mechanism between humans and mice, and highlight the importance of addressing the issue of imprinted XCI in other species in order to understand the evolution of dosage compensation in placental mammals.

AUTHOR SUMMARY

How similar are humans to mice? Here we show that in what regards the X chromosome, we are indeed different. In mammals, dosage compensation of gene products from the single X in male and the two X in females is achieved by silencing of one X in female cells, a process called X chromosome inactivation (XCI). This process is best studied in mice, where it has been shown to occur in two different ways during embryogenesis: cells of the extraembryonic tissues inactivate the paternal X (imprinted XCI), whereas those that will give rise to tissues of the adult randomly inactivate either the maternal or the paternal X. In humans, random XCI in the embryo is well characterized. In contrast, imprinted XCI in human extraembryonic tissues is still controversial. We readdressed this issue using a robust methodology to study the activity of the X chromosome as a whole in human placenta. We show that, different from the mouse, XCI is random in this organ. Our results indicate that dosage compensation has evolved in a different way at least in humans, and that, although the mouse is a powerful experimental model, we need to reexamine the mechanisms of XCI in the human system.

Introduction

In mammals, dosage compensation of X-linked gene products between XX females and XY males is achieved by the transcriptional inactivation of the extranumerary X in females early in embryogenesis. In marsupials, X chromosome inactivation (XCI) is imprinted, and the paternal X is inactivated in the embryo [1,2]. Imprinted XCI is also found in Eutherians like murines [3–5] and bovines [6], however exclusively in extraembryonic tissues. In cells of the embryo proper, either the paternal or the maternal X chromosome is inactivated in a random fashion.

Traditionally, the process of XCI has been best studied in the mouse, where it has been shown to be triggered by expression in *cis* of the noncoding *Xist* gene exclusively from the future inactive X (Xi), and to occur in two waves in the female pre-implantation embryo (reviewed in [7]). Imprinted XCI becomes evident as early as in the 4-cell stage [8–10], where expression of *Xist* exclusively from the paternal X (Xp) results in its inactivation. At the blastocyst stage, cells from the inner cell mass reactivate the inactive Xp, and then go through a second round of XCI, this time randomly choosing the paternal or the maternal X as the inactive one [9,11].

Studies of XCI in human extraembryonic tissues date back to late 1970's, when the most common X-linked marker used was glucose-6-phosphate dehydrogenase (*G6PD*) with its electrophoretic variant isoforms (Table 1). The analysis of G6PD in samples from term placentas provided conflicting results regarding the pattern of XCI in those tissues, where both random [12] and imprinted inactivation [13–15] were reported. Similar contradicting conclusions were obtained in studies analyzing other polymorphic X-linked loci in chorionic villi at different gestational ages (Table 1) [16–20].

Some factors may account for these controversies, including analysis of different tissues, small sample size and possible contamination with maternal DNA. Additionally, it is important to note that all those reports have relied on the analysis of only one or two X-linked loci in order to infer the activity of the entire chromosome (Table 1). However, some data indicate a possible variability in the expression status of some genes from the Xi among females [21,22], and therefore, the analysis of a single locus may not be adequate to represent the expression activity of the whole X chromosome.

Here we take advantage of the vast number of SNPs described along the human X [22,23] to perform for the first time a chromosome-wide analysis of allele-specific gene expression in full-term placenta. Our data show that this extraembryonic tissue is composed of relatively large clonal populations with either the paternal or the maternal Xi, which could be interpreted as skewed XCI, and may explain the contradictory nature of the previous reports. As a consequence, we conclude that XCI is random in human placenta.

Results

Samples were collected from the fetal portion of 22 full-term human placentas, and from the respective maternal oral mucosa cells. Each placenta sample was tested for maternal DNA contamination and to confirm maternal identity by PCR amplification of 17 microsatellites in different autosomes and the amelogenin locus (data not shown). In only one case (pl.05) the maternal DNA sample did not match with the placental specimen (data not shown), and therefore that maternal DNA was removed from the analysis.

We selected 27 SNPs in exons of 22 X-linked genes expressed in placenta whose transcriptional activity from the Xi had been previously analyzed in non-randomly inactivated primary human fibroblasts [22] (Figure 1, Table S1). Placental samples were genotyped for these X-linked SNPs, resulting in at least 5 informative SNPs per sample (average of 9 informative SNPs/sample). In addition, each SNP was informative in at least 4 samples (average of 10 informative samples/SNP) (Figure 1).

To evaluate allele-specific gene expression, cDNA of RNAs from informative samples were genotyped by direct sequencing of the respective RT-PCR products. As a control we used a cell line of human fibroblasts with completely skewed XCI [24,25], in which we were able to show monoallelic expression of 8 informative genes, including *XIST*, and biallelic expression of the escapee gene *ZFX* in accordance with the expression profile of the Xi [22] (Figure 2A).

We applied this analysis to the collection of placental specimens, determining the origin of the expressed allele for each informative gene (Figure 1, Figure 2B-D). In contrast with results from the fibroblast cell line, where a clear mono or biallelic expression pattern was observed for each gene analyzed, many placental samples showed intermediate allelic ratios (Figure 2D) that were quantified with the PeakPicker software [26]. For each gene, DNA from heterozygous and homozygous samples were used to set up the threshold values of expected allelic ratios corresponding to random (50:50) and completely skewed XCI (0:100), respectively. Figure 3 shows representative examples of the PeakPicker analysis per gene and per sample. For the escapee gene *ZFX*, this analysis placed most samples in or close to the 50:50 ratio of expressed alleles, reflecting its biallelic expression pattern (Figure

3A). In contrast, *GPC4*, a gene subjected to XCI, displayed a wider variability of allelic ratios among different samples, ranging from 0:100 to 50:50 (Figure 3B). PeakPicker results were obtained for those electropherograms with phred scores greater than 20 (16 SNPs in 15 genes). The remaining 11 SNPs were classified by visual analysis of the electropherograms (Figure 1).

Figure 1 summarizes our data after quantification. The ratios of expressed alleles observed in each locus were used to classify samples in three categories regarding the XCI pattern: completely skewed (allelic ratios at or below the 0:100 threshold), skewed (allelic ratios between 0:100 and 20:80), and random (allelic ratios at or above 20:80). We found consistency regarding the parental origin of the highest expressed allele within all samples classified as skewed or completely skewed, allowing us to score 9 samples as presenting preferential paternal XCI (pl.01, pl.02, pl.06, pl.07, pl.08, pl.10, pl.11, pl.19, and pl.27), and 3 with preferential inactivation of the maternal X (pl.21, pl.28, and pl.30). In addition, 5 of these 12 samples showed consistent opposite parental origin of the expressed *XIST* allele when compared to the other X-linked genes (Figure 1: pl.08, pl.11, pl.19, pl.21 and pl.28; Figure 2B, 2C). Five additional placental samples (Figure 1: pl.17, pl.18, pl.22, pl.24 and pl.25) presented patterns consistent with random XCI. A puzzling pattern was observed in pl.03, where two loci showed completely skewed pattern of inactivation, while two other loci presented random inactivation (Figure 1).

To reconcile the variable patterns observed, we proposed that XCI is in fact random in placenta, which is organized in patches of cells with either the maternal or the paternal inactive X. To test this hypothesis, we collected 3 additional placentas and analyzed allele-specific gene expression in three different non-adjacent

fragments of each (Figure 4). While allele-specific gene expression analysis of *XIST* and *OPHN1* in fragment *a* from placenta 31 indicated random XCI pattern, fragments *b* and *c* from the same placenta showed skewed and completely skewed XCI, respectively (Figure 4A). Similar results were observed for *XIST* and *PIGA* genes in placenta 32, and *TSPAN7* and *VBP1* in placenta 33 (Figure 4B, 4C). Together, these data corroborate our hypothesis and demonstrate that each isolated fragment from a single placenta may yield different results regarding patterns of XCI.

Discussion

Imprinted inactivation of the paternal X chromosome occurs in marsupials as the ancestral mechanism of dosage compensation between the genders in Therians. During the 147 million years that separate Metatheria from Eutheria [27], this process acquired an additional pathway exclusively in the epiblast cells, consisting of reactivation of the Xi and a second round of XCI, this time random, as observed in mice (reviewed in [28]). The question remains: how much more has XCI evolved from that mammal to humans?

Recently, XCI in human embryos has been shown to be present as early as at the 8-cell stage, indicating that pre-implantation XCI has been evolutionary conserved between humans and mice [29]. However, it has not been determined whether at that stage inactivation was imprinted or random. Although imprinted XCI in humans has been the subject of several studies for the last 30 years, a careful analysis of published results and their conclusions reveals that this issue is still controversial. Even the two most recent articles on this subject have reported random and non-random inactivation in different extraembryonic tissues [20,30]. Since all

those studies relied on data from only one or two X-linked loci (Table 1), we set forth to readdress this issue in human term placenta, performing a more robust analysis of allele-specific gene expression along the X chromosome. This allowed us to conclude that XCI is random in that organ.

The analysis of multiple X-linked loci was fundamental to understand that the expression behavior of the chromosome as a whole can be heterogeneous. For instance, if we had looked at only *TBL1X* and/or *PIGA*, we would conclude that XCI is imprinted in human placenta (Figure 1). In contrast, analysis of *TIMP1* and/or *TCEAL4* alone would indicate random XCI. Therefore, the activity of the whole X chromosome should not be inferred from that of a single locus. In fact, although the data was consistent within each sample in terms of parental origin of the highest expressed allele, in most of them the ratios varied among different loci (Figure 1), suggesting a heterogeneous relaxation of the epigenetic state along the Xi in this organ. Indeed, Xi chromosomes from term placenta are more amenable to reactivation in human/rodent somatic cell hybrids than those from other somatic tissues [31]. Our data in the *in vivo* system is compatible with the reactivation of some genes on the Xi, and thus corroborate those observations *in vitro*. It is interesting to notice that such extensive variation was not observed in the GM135 cell line, nor in a panel of 30 primary human fibroblasts [22], which indicates that maintenance of XCI may indeed be less stringent in placenta. A similar analysis in different human tissues will be important to show whether the relaxation of XCI is restricted to extraembryonic tissues, or it is a more general feature of this epigenetic control.

Equally important was to analyze a considerable number of samples, which allowed us to identify diverse patterns of XCI only consistent with random inactivation

in the placenta, and the arrangement of this organ in patches of cells as large as 8 mm³ (see Materials and Methods) with the same Xi. The analysis of different non-adjacent fragments of the same specimen confirmed this mosaicism, and is in accordance with results obtained independently for the *AR* and the *FMR1* genes in term placenta and chorionic villi, respectively [32,33]. Actually, if one considers the extensive mosaicism of those tissues, most of the data in the literature is in agreement with random XCI in the human extraembryonic lineage (Table 1). The only two studies that identified exclusively non-random XCI had important limitations: the first one relied on data from only two samples [18]; while the second was performed in trophoblast cells derived from the H9 line of human embryonic stem cells [30], which has recently been shown to present instability of the epigenetic state of the X chromosome [34,35], not modeling human XCI adequately *in vitro*.

Finally, in contrast to other studies [18,19], the placental samples used in the present work were not dissected, and thus included extraembryonic mesoderm, a tissue of different embryonic origin than trophectoderm and possibly with random XCI [4]. However, it is important to notice that if our samples were composed of a mixture of tissues with random and imprinted XCI, we would not expect the identification of a large proportion of samples/loci with completely skewed XCI, as found here (Figure 1). In fact, the data of Goto et al. [18], based on two samples, do not show conclusively the existence of two cell lineages with different patterns of XCI in the human placenta, while Uehara et al. [19] observed random XCI in isolated trophoblasts more frequently than in whole villi. Therefore, the existence of two independent patterns of XCI in human extraembryonic tissues has not been demonstrated, and our data argues against it.

Although the *XIST* gene was first identified in humans [36], until now the molecular mechanisms of dosage compensation have been best studied in the mouse (reviewed in [7]). However, there are fundamental differences in that process between the two species, including the structure of the *TSIX/Tsix* gene (reviewed in [37]), and lack of imprinted XCI in extraembryonic tissues as thoroughly characterized here. It is interesting to notice that several autosomal genes imprinted exclusively in placenta in mice are not under this epigenetic control in humans [38]. Since the epigenetic marks of imprinted autosomes and of the imprinted Xi are similar in mouse placenta (reviewed in [39,40]), one may envision that imprinted XCI in human extraembryonic tissues was lost during evolution in conjunction with autosomal imprinting. Nevertheless, it is noteworthy the preponderance of placental samples with preferential expression of maternal alleles. Therefore, although imprinted XCI was lost during evolution, a proliferative advantage may remain for cells that inactivate the Xp in human placenta. In light of our data, it will be important to address the issue of imprinted XCI in other Eutherians in order to understand the evolution of dosage compensation in placental mammals.

Materials and Methods

Samples

Twenty two human full-term placentas with corresponding maternal oral mucosa samples were collected at Amparo Maternal Obstetric Clinic (São Paulo, Brazil), with parental fully informed consent and approval by the local Institutional Ethics Committee. Only placentas resulting from normal pregnancies and delivery of a healthy female child were included in this study. Placental fragments were collected

from the fetal portion near the umbilical cord insertion, washed several times in PBS to remove traces of maternal blood, and rapidly submerged in RNA stabilizing solution (RNA/ater™ QIAGEN) (samples 1-30). For placentas numbered 31, 32 and 33, three fragments were obtained from distinct nonadjacent regions of the same placenta and individually processed in a similar way. Maternal oral mucosa samples were stabilized in 50 mM NaOH.

Nucleic acid extraction

Maternal genomic DNA was extracted as described [41]. Placental genomic DNA was extracted from 25 mg fragments, previously digested with 360 µL of lysis buffer (Amersham Biosciences, GE) and 40 µL of proteinase K (20 mg/mL) at 55 °C over night, using GFX™ Genomic Blood DNA Purification Kit according to manufacturer's protocol (Amersham Biosciences, GE).

Total RNA was prepared from up to 100 mg (4-8 mm³ fragments) of placental tissue using Trizol® Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's protocol, previous digested with 20 mg/ml proteinase K for 30 minutes at 55 °C. To avoid DNA contamination, rigorous DNase treatment with Turbo DNA-Free (Ambion) was performed, following manufacturer's instructions. One to 2 µg of total DNase-treated RNA were reverse transcribed using M-MLV (Invitrogen) according to manufacturer's protocol. To test for DNA contamination, cDNA synthesis was also performed in the absence of reverse transcriptase (RT-).

SNP selection and primers design

Based on the human X chromosome sequence [23], NCBI dbSNP BUILD 129 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>), and the expression profile on the Xi in a panel of 30 human primary fibroblasts [22], we selected 27 SNPs located in coding regions of 22 X-linked genes expressed in placenta. All primers were designed avoiding annealing in known SNPs regions. The list of SNPs and primers is presented in Table S1.

Genotyping and analysis of allele-specific expression:

Fifty to 100 ng of DNA or cDNA were used as templates for PCR amplification of the region surrounding each SNP with the primers listed in Table S1. PCR conditions are available on request. Before sequencing, PCR products were separated in 6% polyacrilamde gel electrophoresis, and visualized by silver staining to exclude assays showing any amplification from the RT- reaction and from the negative no-template control. Sequencing was carried out using those same primers and the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Sequencing products were separated on an ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyzer, following manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Most samples were analyzed at least twice for each SNP, including distinct cDNA synthesis, RT-PCRs and sequencing assays.

Quantification of allele-specific gene expression

Allelic expression levels were determined using the PeakPicker software specifically developed for relative quantification of peaks in sequencing

electropherograms [26]. Because peak heights vary depending on sample, base type and their position within the sequence, the PeakPicker software carries out a normalization step in which the SNP allele height is compared to the height of reference peaks in flanking sequence. Default normalization settings were applied to quantify the relative amount of the two alleles measured from the electropherogram based on peak intensity of the two polymorphic bases. Subsets of informative heterozygotes, at least five for each SNP, were identified and their cDNA was amplified in identical conditions to verify the peak height ratio between bases corresponding to the SNP. We limited our PeakPicker analysis to sequence traces in which 70% of the bases within a 21 base window flanking the SNP presented phred quality score >20 [42,43]. Ratio values above 1 were transformed to $1/(\text{ratio})$ to set all of them in a 0-1 scale and then adjusted to the mean of the peak intensity ratios from DNA samples. Genomic DNA from heterozygous and homozygous samples were used to set up a threshold for allelic ratios of 50:50 and 0:100, respectively, for each gene. The normalized heterozygote and homozygote ratios of genomic DNA samples were then used to estimate the methodological variability and establish a 99% confidence interval (CI) for 50:50 and 0:100 ratios of expressed alleles, respectively. The 99% CI was calculated assuming that normalized peak height ratios of DNA samples are normally distributed according to the Anderson-Darling test. In addition, a theoretical threshold of 20:80 ratio was calculated for each gene by dividing the respective interval between 50:50 and 0:100. The pattern of XCI for each sample was based on the analysis of allelic ratios of all informative loci. Allelic ratios above 20:80 were indicative of random XCI [44]; between 20:80 and 0:100 were considered as

skewed XCI; and only those ratios at or below 0:100 were classified as completely skewed XCI.

Acknowledgments

We wish to thank Dr Daniel O. Vidal, for his significant help on the analysis of differential allele-expression; Dr Denilce R. Sumita, for the microsatellite experiments and analysis; and Professor Estela Bevilacqua for insights on the physiology and morphology of the human placenta.

References

1. Sharman GB (1971) Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature* 230: 231-232.
2. Cooper DW, VandeBerg JL, Sharman GB, Poole WE (1971) Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. *Nat New Biol* 230: 155-157.
3. Takagi N, Sasaki M (1975) Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature* 256: 640-642.
4. West JD, Frels WI, Chapman VM, Papaioannou VE (1977) Preferential expression of the maternally derived X chromosome in the mouse yolk sac. *Cell* 12: 873-882.
5. Wake N, Takagi N, Sasaki M (1976) Non-random inactivation of X chromosome in the rat yolk sac. *Nature* 262: 580-581.
6. Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, et al. (2002) Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genet* 31: 216-220.
7. Payer B, Lee JT (2008) X Chromosome Dosage Compensation: How Mammals Keep the Balance. *Annu Rev Genet*
8. Huynh KD, Lee JT (2003) Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* 426: 857-862.
9. Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E (2004) Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* 303: 644-649.

10. Patrat C, Okamoto I, Diabangouaya P, Vialon V, Le BP, et al. (2009) Dynamic changes in paternal X-chromosome activity during imprinted X-chromosome inactivation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 5198-5203.
11. Mak W, Nesterova TB, de NM, Appanah R, Yamanaka S, et al. (2004) Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* 303: 666-669.
12. Migeon BR, Do TT (1978) In search of nonrandom X inactivation: studies of the placenta from newborns heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Basic Life Sci* 12: 379-391.
13. Ropers HH, Wolff G, Hitzeroth HW (1978) Preferential X inactivation in human placenta membranes: is the paternal X inactive in early embryonic development of female mammals? *Hum Genet* 43: 265-273.
14. Harrison KB, Warburton D (1986) Preferential X-chromosome activity in human female placental tissues. *Cytogenet Cell Genet* 41: 163-168.
15. Harrison KB (1989) X-chromosome inactivation in the human cytotrophoblast. *Cytogenet Cell Genet* 52: 37-41.
16. Migeon BR, Do TT (1979) In search of non-random X inactivation: studies of fetal membranes heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Hum Genet* 31: 581-585.
17. Mohandas TK, Passage MB, Williams JW3, Sparkes RS, Yen PH, et al. (1989) X-chromosome inactivation in cultured cells from human chorionic villi. *Somat Cell Mol Genet* 15: 131-136.
18. Goto T, Wright E, Monk M (1997) Paternal X-chromosome inactivation in human trophoblastic cells. *Mol Hum Reprod* 3: 77-80.
19. Uehara S, Tamura M, Nata M, Ji G, Yaegashi N, et al. (2000) X-chromosome inactivation in the human trophoblast of early pregnancy. *J Hum Genet* 45: 119-126.
20. Zeng SM, Yankowitz J (2003) X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta* 24: 270-275.
21. Anderson CL, Brown CJ (1999) Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMP1 gene. *Am J Hum Genet* 65: 699-708.
22. Carrel L, Willard HF (2005) X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434: 400-404.
23. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, et al. (2005) The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 434: 325-337.
24. Vasques LR, Pereira LV (2001) Allele-specific X-linked gene activity in normal human cells assayed by expressed single nucleotide polymorphisms (cSNPs). *DNA Res* 8: 173-177.

25. Stabellini R, de Mello JC, Hernandez LM, Pereira LV (2009) MAOA and GYG2 are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts. *Epigenetics* 4: 388-393.
26. Ge B, Gurd S, Gaudin T, Dore C, et al. (2005) Survey of allelic expression using EST mining. *Genome Res* 15: 1584-1591.
27. Bininda-Emonds OR, Cardillo M, Jones KE, MacPhee RD, Beck RM, et al. (2007) The delayed rise of present-day mammals. *Nature* 446: 507-512.
28. Pereira LV, Stabellini R (2005) Initiation of X-chromosome inactivation. In: Jorde LB, Little PFR, Subramaniam S, editors. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. John Wiley & Sons. pp. 144-148.
29. van den Berg IM, Laven JS, Stevens M, Jonkers I, Galjaard RJ, Gribnau J, van Doorninck JH (2009) X chromosome inactivation is initiated in human preimplantation embryos. *Am J Hum Genet* 84: 771-779.
30. Dhara SK, Benvenisty N (2004) Gene trap as a tool for genome annotation and analysis of X chromosome inactivation in human embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 32: 3995-4002.
31. Migeon BR, Schmidt M, Axelman J, Cullen CR (1986) Complete reactivation of X chromosomes from human chorionic villi with a switch to early DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 2182-2186.
32. Looijenga LH, Gillis AJ, Verkerk AJ, van Putten WL, Oosterhuis JW (1999) Heterogeneous X inactivation in trophoblastic cells of human full-term female placentas. *Am J Hum Genet* 64: 1445-1452.
33. Willemsen R, Bontekoe CJ, Severijnen LA, Oostra BA (2002) Timing of the absence of FMR1 expression in full mutation chorionic villi. *Hum Genet* 110: 601-605.
34. Shen Y, Matsuno Y, Fouse SD, Rao N, Root S, et al. (2008) X-inactivation in female human embryonic stem cells is in a nonrandom pattern and prone to epigenetic alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4709-4714.
35. Silva SS, Rowntree RK, Mekhoubad S, Lee JT (2008) X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 4820-4825.
36. Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafreniere RG, Xing Y, et al. (1992) 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: 527-542.
37. Vasques LR, Klockner MN, Pereira LV (2002) X chromosome inactivation: how human are mice? *Cytogenet Genome Res* 99: 30-35.
38. Monk D, Arnaud P, Apostolidou S, Hills FA, Kelsey G, et al. (2006) Limited evolutionary conservation of imprinting in the human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 6623-6628.

39. Reik W, Lewis A (2005) Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet* 6: 403-410.
40. Wagschal A, Feil R (2006) Genomic imprinting in the placenta. *Cytogenet Genome Res* 113: 90-98.
41. Richards B, Skoletsky J, Shuber AP, Balfour R, Stern RC, et al. (1993) Multiplex PCR amplification from the CFTR gene using DNA prepared from buccal brushes/swabs. *Hum Mol Genet* 2: 159-163.
42. Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res* 8: 175-185.
43. Ewing B, Green P (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res* 8: 186-194.
44. Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, et al. (2006) X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet* 79: 493-499.
45. Brown CJ, Carrel L, Willard HF. (1997) Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *Am J Hum Genet* 60: 1333-1343.

FIGURES AND TABLES:

Gene	Position [¥]	SNP [£]	Xi exp. [#]	GM135	pl.06	pl.08	pl.11	pl.19	pl.27	pl.30	pl.01	pl.02	pl.05	pl.07	pl.10	pl.21	pl.28	pl.17	pl.18	pl.24	pl.25	pl.22	pl.03				
<i>TBL1X</i>	Xp22.31-22.2	rs7256	0/5	*	-	-	-	-	-	P*	-	M*	-	-	M*	-	-	-	-	-	P*	-	-				
<i>PIGA</i>	Xp22.2	rs11448948	0/7	-	*	-	M*	-	M*	-	-	*	-	-	M*	-	-	-	*	*	-	-	-				
<i>PIGA</i>	Xp22.2	rs3087965	0/7	-	-	-	M	M	M	P	-	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-	-				
<i>ZFX</i>	Xp22.11	rs5949242	11/11	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>TSPAN7</i>	Xp21.1	rs10333	0/13	-	M	*	-	*	-	-	M	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>DYNLT3</i>	Xp11.4	rs12849	0/10	-	X	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	-	*	-	M				
<i>TIMP1</i>	Xp11.23	rs4898	0/10	-	-	*	M*	-	-	*	-	-	-	-	*	-	X	-	-	*	-	-	-				
<i>EBP</i>	Xp11.23	rs3048	0/11	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>SUV39H1</i>	Xp11.23	rs3373	0/9	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>OPHN1</i>	Xq12	rs492933	1/12	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	P	-	-	-	-	-	-				
<i>XIST</i>	Xq13.2	rs1894271	9/9 §	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-				
<i>XIST</i>	Xq13.2	rs16992443	9/9 §	*	-	-	-	-	X	X	-	-	*	-	-	M*	-	-	-	-	-	-	-				
<i>XIST</i>	Xq13.2	rs1794213	9/9 §	-	-	P	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-				
<i>XIST</i>	Xq13.2	rs1620574	9/9 §	-	-	-	P*	P*	-	-	-	*	-	-	-	X	M*	*	-	-	-	-	-				
<i>XIST</i>	Xq13.2	rs16992436	9/9 §	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>ATRX</i>	Xq21.1	rs3088074	0/14	-	-	-	-	-	X	-	*	-	-	*	X	P*	P*	-	-	-	-	-	-				
<i>ATP7A</i>	Xq21.1	rs2227291	0/11	-	-	-	-	-	X	P	-	-	-	X	-	-	-	P	-	-	-	*	-				
<i>SH3BGR1</i>	Xq21.1	rs1044828	0/10	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>SYTL4</i>	Xq22.1	rs8780	0/9	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>TCEAL4</i>	Xq22.2	rs11010	0/12	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	*	-				
<i>IL13RA1</i>	Xq24	rs2254672	0/9 §	-	-	-	-	X	-	*	*	-	-	-	-	P*	-	-	-	X	*	-	*				
<i>GPC4</i>	Xq26.2	rs1048369	2/16	-	*	M	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>ZNF75D</i>	Xq26.3	rs1129093	0/12	-	-	-	M*	-	-	-	-	-	-	X	-	P*	X	X	-	-	*	-	-				
<i>G6PD</i>	Xq28	rs2230037	0/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	M*	-	-	-	P*	-	-	X	-				
<i>MPP1</i>	Xq28	rs1126762	0/10	-	-	M	M	M	-	P	-	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
<i>VBPI</i>	Xq28	rs11887	0/7	-	M	M	M	M*	X	P*	-	-	-	-	-	*	P	*	-	-	-	-	-				
<i>CLIC2</i>	Xq28	rs559165	1/11	-	-	M*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-				
XCI pattern					Skewed																	Highly skewed			Biallelic		N.D.

Figure 1: Summary of allele-specific X-linked gene expression in human placenta. Ratios of expressed alleles for each locus are shown: red (0:100); pink (between 0:100 and 20:80); green (above 20:80). Ratios of expressed alleles were scored by PeakPicker or visual analysis (*) of electropherograms. GM135, completed skewed XCI human fibroblast cell line. Placental samples (pl.) are grouped as showing predominantly completely skewed, skewed, or random inactivation. (ND) not determined. (-) non-informative locus; (X) informative locus; (M) expression from maternal allele; (P) expression from paternal allele. (¥) Chromosomal position as in Vega Human View, v35 - Mar 2009 (http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/index.html). (£) SNP variant according to NCBI dbSNP BUILD129 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). (#) Gene expression on the Xi [22], where expression results are indicated as the number of primary human fibroblasts expressing each gene from the Xi per number fibroblasts tested. (§) number of rodent/human somatic cell hybrids with the Xi that expressed the gene per number of hybrids tested.

Figure 2: Analyses of expressed alleles in human term placenta. Examples of electropherograms of DNA and cDNA sequences of X-linked SNPs in (A) completely skewed fibroblast GM135; (B) pl.19; (C) pl.28; and (D) pl.17. Genes symbols and corresponding SNP ID are indicated above. Sequences from DNA and cDNA from cell line/placental samples, and corresponding maternal (mat.) DNA are shown. SNP position is highlighted in yellow. In (A) *ZFX* is shown as an example of a gene that escapes XCI.

Figure 3: Quantification of ratio of expressed alleles using PeakPicker software. Solid lines indicate theoretical threshold levels for 0:100 (lower) and 50:50 (upper) ratios of expressed alleles. Dotted line indicates theoretical ratio of 20:80. Open circles represent data from genomic DNA, filled circles from cDNA, and asterisks from cDNA of completely skewed fibroblast GM135. Gene symbols and corresponding SNP ID are indicated. Analysis of (A) ZFX (escapes XCI), and (B) GPC4 (subjected to XCI) genes in different placentas; (C) Ratios of expressed alleles in pl.05: circles represent different replicates for each SNP assayed.

Figure 4: Mosaicism of the human full-term placenta regarding XCI. Electropherograms of DNA and cDNA sequences of X-linked SNPs in three different fragments of placentas (A) 31, (B) 32 and (C) 33. Gene symbols and corresponding SNP ID are indicated. SNPs are highlighted in yellow.

Table 1: Review of the literature regarding XCI pattern in human extraembryonic tissue

Material (origin)	Extraembryonic cell lineage	Locus	Results (*)	Authors' conclusion	Ref.
Placenta (full-term)	Placental membranes homogenate	<i>G6PD</i>	13 skew ed (Xp inactive); 9 random	Preferential paternal inactivation	[13]
Placenta (full-term)	Chorionic villi	<i>G6PD</i>	9 random; 3 skew ed (Xp inactive)	Random inactivation	[12]
Chorionic villi# (suction abortion)		<i>G6PD</i>	8 skew ed in some degree (6 Xp inactive and 2 Xm inactive); 1 random	Random inactivation	[16]
Placenta (full-term)	Fresh amnion	<i>G6PD</i>	8 skew ed (7 Xp inactive and 1 Xm inactive); 3 random	Preferential paternal inactivation	[14]
	Cultured amnion		22 skew ed (16 Xp inactive and 6 Xm inactive); 10 random		
	Fresh chorion		11 random; 9 skew ed (8 Xp inactive and 1 Xm inactive)		
	Cultured chorion		21 skew ed (16 Xp inactive and 5 Xm inactive); 11 random		
	Cultured villi		16 skew ed (15 Xp inactive and 1 Xm inactive); 10 random		
Placenta (full-term)	Cultured cytotrophoblasts isolated from several cotyledons	<i>G6PD</i>	7 skew ed in some degree (5 Xp inactive and 2 Xm inactive); 5 completely skew ed (Xp inactive)	Preferential paternal inactivation	[15]
Chorionic villi (elective abortion)	Fresh and cultured villi	<i>G6PD</i> and <i>HPRT</i>	4 random	Random inactivation	[17]
Chorionic villi# (diagnostic exam)	Fresh trophoblastic cells	<i>AR</i>	2 skew ed (Xp inactive)	Preferential paternal inactivation	[18]
Placenta (full term)	2 adjacent fragments isolated from the same cotyledon	<i>AR</i>	5 skew ed in some degree (2 Xp inactive; 2 Xm inactive; 1 either Xp or Xm); 2 completely skew ed (1 Xp inactive and 1 either Xp or Xm); 1 random	Random inactivation	[32]
	9 non-adjacent fragments isolated from the same placenta		Heterogeneous pattern depending on the cotyledon		
Chorionic villi# (elective abortion)	Whole (fresh) branch villi	<i>PGK1</i>	5 skew ed in some degree (alw ays more Xp inactive); 1 random	Non-random inactivation	[19]
	Trophoblasts isolated from anchoring villi		19 skew ed (13 Xp inactive and 6 Xm inactive); 11 random		
	Trophoblasts isolated from branch villi		17 skew ed (14 Xp inactive and 3 Xm inactive); 21 random		
Chorionic villi# (diagnostic exam)		<i>FMR1</i>	2 random	Random inactivation	[33]
Chorionic villi#,* (elective abortion)	Cytotrophoblasts	<i>AR</i>	37 random; 17 skew ed in some degree; 1 completely skew ed	Both random and skew ed inactivation	[20]
Human embryonic stem cells (H9 line)	Human ES cells at passages 45-48 differentiated in trophoblasts	<i>FMR1</i>	Non-random	Non-random inactivation	[30]
(#) villi from first trimester (¥) villi from second trimester (*) Xp, paternal X; Xm, maternal X.					

Anexo 4 – Artigo publicado no periódico *Epigenetics* em agosto de 2009.

MAOA and *GYG2* are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts

Raquel Stabellini, Joana Carvalho Moreira de Mello, Lys Molina Hernandes and Lygia V. Pereira*

Departamento de Genética e Biologia Evolutiva; Instituto de Biociências; Universidade de São Paulo; São Paulo, Brazil

X chromosome inactivation (XCI) is a comprehensively studied phenomenon that helped to highlight the heritable nature of epigenetic modifications. Although it consists of the transcriptional inactivation of a whole X chromosome in females, some genes escape this process and present bi-allelic expression. Using human fibroblasts with skewed inactivation, we determined allele-specific expression of two X-linked genes previously described to escape XCI in rodent/human somatic cell hybrids, *MAOA* and *GYG2*, and the pattern of DNA methylation of their 5' end. Results from these complementary methodologies let us to conclude that both genes are subjected to X inactivation in normal human fibroblasts, indicating that hybrid cells are not an adequate system for studying epigenotypes. We emphasize the need of an analysis of XCI in normal human cell lines, helping us to determine more precisely which X-linked genes contribute to differences among genders and to the phenotypes associated with sex chromosomes aneuploidies.

Introduction

X chromosome inactivation occurs early in female mammalian development to achieve X-linked dosage compensation between the sexes.¹ The process is initiated by transcription and cis-localization of the non-coding XIST RNA, which then recruits many of the epigenetic features generally associated with heterochromatin, including histone modifications, histone variants and DNA methylation, rendering this chromosome transcriptionally

inactive (reviewed in ref. 2). The silenced state of the inactive X (Xi) is maintained consistently during mitosis, so that all cells in a clonal population have the same Xi. The long-term and highly stable silencing responsible for clonality is mediated by the synergism of multiple epigenetic modifications that characterize the Xi.

XCI is an impressive example of epigenetic gene regulation, whereby the majority of genes on the approximately 160 Mb X chromosome is silenced in a strictly cis-limited fashion. However, it is now known that at least 15% of the genes on the human X chromosome always escape inactivation to some degree by unknown mechanisms, and another 10% show variable patterns of inactivation, which are likely to have medical relevance.³ These genes, including many without functional equivalents on the Y chromosome, are probably related to the differences between genders, and to the clinical abnormalities in patients with aneuploidies of the X chromosomes. At least some of the epigenetic marks that are characteristic to the Xi are missing in the genes escaping inactivation⁴ what ascertains the importance of the analysis of these genes for the understanding of the mechanics of XCI itself.

Different methodologies have been employed to study escape from XCI, from the early reports analyzing an X-linked erythrocyte surface antigen⁵ or measuring enzymatic activities,⁶ to some important studies describing the use of somatic cell-hybrid systems.^{7,8} Alternatively, different groups analyzed X-linked polymorphisms in female cell lines with complete skewed X inactivation in order to determine the inactivation status of different

Key words: *MAOA*, *GYG2*,

X chromosome inactivation, epigenetics, human fibroblasts, somatic cell hybrids, allele specific expression

Abbreviations: *GYG2*, glycogenin-2 gene; *MAOA*, monoamine oxidase A gene; *MAOB*, monoamine oxidase B gene; SNP, single nucleotide polymorphism; XCI, X chromosome inactivation

Submitted: 06/02/09

Accepted: 07/13/09

Previously published online:
www.landesbioscience.com/journals/epigenetics/article/9492

*Correspondence to:
Lygia V. Pereira; Email: lpereira@usp.br

Figure 1. Examples of monoallelic expression of *MAOA* and *GYG2* genes. (A) RT-PCR products containing the SNPs rs1137070 in *MAOA* and rs211659 in *GYG2*, showing integrity of the cDNA and lack of contamination with genomic DNA. (+) RT added, (-) RT omitted. (B) and (C), sequences of informative SNPs for *MAOA* and *GYG2*, respectively. Upper: genomic DNA, Lower: cDNA. Arrows indicate position of the polymorphisms.

genes.⁹⁻¹² More recently, the sequencing of the human X chromosome¹³ has taken the study of escapees from XCI, mostly based on somatic cell hybrids, to a much more complete, wide-range level.³

In this study, we have addressed the issue of adequacy of the somatic cell hybrid system for the analysis of XCI by analyzing the pattern of expression of two X-linked genes previously described to escape inactivation, *MAOA* and *GYG2*, in normal human cells. In order to determine the X inactivation status of these genes, the allelic expression of different SNPs was analyzed on four human fibroblasts cell lines with completely skewed XCI. Bisulfite sequencing of the CpG islands from the genes distinguished two patterns of methylation, confirming distinct activities of the alleles.

Results and Discussion

In order to examine gene activity on the Xi, we used an in vitro system to monitor allele-specific X-linked gene expression that more accurately mimics this process in vivo.¹² Completely skewed populations of cells were generated by selection of untransformed human fibroblast cell lines heterozygous for mutations in the *HPRT* gene in media containing 8-aza or HAT. Death of all cells by counterselection with the opposite drug confirmed the nonrandom XCI in the populations.

Cell lines were genotyped for four different SNPs in expressed regions of the *MAOA* gene (rs3027407, rs11544798, rs1137070 and rs1800466), and three in *GYG2* (rs211659, rs2306734 and rs2306735) (Table 1). Two cell lines were informative for the SNPs on *MAOA*, whereas three were informative for SNPs

on *GYG2* (Table 1). Allele-specific gene expression was assayed by sequencing of RT-PCR products from RNA from each cell line (Fig. 1). Both *MAOA* and *GYG2* display monoallelic expression in all cell lines analyzed (Fig. 1B and C, Table 1).

The state of chromatin activity and DNA methylation patterns are closely correlated, where open active regions of chromatin are associated with hypomethylated DNA, and close inactive regions are associated with hypermethylated DNA.¹⁶ Additionally, due to the XCI, active and inactive X alleles are differentially methylated.¹⁷ However, chromatin of genes that escape the silencing process fail to present the methylated structure characteristic to the Xi.¹⁸⁻²¹

In order to complement our findings from the analysis of allele-specific expression, sodium bisulfite modification followed by sequencing of PCR products was

Figure 2. Bisulfite sequencing analysis of 5' end of *MAOA* (A) and *GYG2* gene (B). Each line represents a single DNA template molecule and each circle represents a CpG dinucleotide. Black and open circles represent methylated and unmethylated CpGs, respectively. The methylation status of the missing circles was not determined due to sequencing failure. Over each diagram, a schematic map of the region analyzed, where thick black bar denotes CpG island and small red bars correspond to PCR primers positions. Brackets on the left indicate two differentially methylated groups of molecules for each gene. Regions with opposed CpG methylation are highlighted in red rectangles.

used to determine the CpG methylation pattern of the 5' end of both *MAOA* and *GYG2* genes. Figure 2 illustrates representative results from methylation analysis

of the cell line GM00135. In both cases, two patterns of methylation can be identified. On *MAOA*, a highly methylated allele is opposed to a less methylated one

(15.64% versus 49.57% of total CpGs). In fact, some specific CpGs dinucleotides in the fragment analyzed have opposed patterns, namely CpGs 6, 9 to 11, 20, 23 and

Table 1. Genotype and allele-specific expression of SNPs in human fibroblasts cell lines

Gene	Variant ^a	GM135	GM1661	GM13	GM2226
MAOA	rs3027407	A/G (A)	A	G	A/G (G)
	rs11544798	G	G	G	G
	rs1137070	T/C (T)	T	C	T/C (C)
	rs1800466	A	A	A	A
GYG2	rs211659	A/T (T)	A	A	A
	rs2306734	C	T	C/T (C)	C/T (C)
	rs2306735	A	G	A/G (A)	A/G (A)

Letters in brackets indicate the expressed allele. ^aVariant as identified in NCBI SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

25 (Fig. 2A). On *GYG2*, CpG dinucleotides 11 and 12, 26 and 27, 36, 42 and 43 displayed completely opposed patterns of methylation, corroborating the presence of two epigenetically distinct alleles (Fig. 2B).

Differently from results obtained in rodent/human somatic cell hybrids,³ taken together our analysis of allele-specific expression and pattern of methylation show that *GYG2* and *MAOA* are subjected to XCI in normal human fibroblasts.

Monoamine oxidase A (*MAOA*) is a major enzyme in the regulation of serotonin level, implicated in multiple psychiatric disorders and behavioral traits (reviewed in ref. 22). *MAOA* is located on Xp11.3, adjacent to *MAOB* gene. Monoallelic expression of *MAOA* had been reported in bovine,²³ as well as in human cells.^{10,24} However according to Carrel and Willard,³ every rodent/human somatic cell hybrid analyzed (nine out of nine) displayed biallelic expression of this gene.

The human glycogenin-2 (*GYG2*) was identified due to a significant similarity to, although being distinct from, the muscle glycogenin-1, and is present preferentially in liver, heart, and, to a lesser extent, pancreas.²⁵ *GYG2* self-glucosylates to form an oligosaccharide primer required for the initiation step of glycogen biosynthesis, serving as a substrate for glycogen synthase. Similar to *MAOA* gene, *GYG2* has been described to escape XCI in rodent/human somatic cell hybrids.³

GYG2 maps to Xp22.3, in a region close to, but outside of, pseudoautosomal region 1 (PAR1).²⁶ This region contains several X-Y shared genes or genes that have closely related pseudogenes on the Y chromosome. Although one sequence from the Y

chromosome (AC002992) includes regions that are over 90% identical to exons one to three of *GYG2*,²⁶ this Y pseudogene neither contains the sequences that encode glycosyl transferase domain, nor the conserved region close to the COOH terminus of glycogenin proteins that is important for interaction with glycogen synthase. *GYG2*, then, does not share a similarity with other PAR1 genes, whose expression is similar in males and females due to their escape from XCI and expression in Xi in addition to the presence of functional Y similar genes. More alike the rest of X linked genes, dosage compensation of *GYG2* between the sexes is achieved through the process of XCI.

Somatic cell hybridization is an extremely important method developed for assigning human genes, sequence-tagged sites or biochemical markers to individual chromosomes or sub-chromosomal regions. Hybrid cells can also be a source of DNA for preparing chromosome-specific DNA libraries.

However, for some studies like those of patterns of expression and epigenetic characteristics of cells, this may be far from the ideal system. It has been well established that cell fusion is capable of inducing global alterations that can culminate in a remarkable change in the epigenotype of the somatic nucleus. A dramatic demonstration of the capability of these modifications induced by cell fusion is the reprogramming of adult cells when fused to embryonic stem cells.²⁷ Modifications in DNA methylation and gene expression have been reported in somatic cells hybrids, with re-activation of previously silent genes,²⁸⁻³⁰ including genes on the human Xi.³¹⁻³⁴ Nevertheless, somatic cell hybrids have been extensively used for

the study of different aspects of XCI in humans, including the identification of escapees on the Xi^{3,7,8} and the function of *XIST* gene in maintenance of the inactive state.³⁵

Differences in anatomy, physiology, cognition, behavior and disease susceptibility between males and females continue to represent a monumental challenge to different areas of research.³⁶ Recently, Johnston et al.³⁷ demonstrated that the overall X-linked gene expression is only slightly higher in females compared to males, and this difference can largely be accounted for by elevated expression in female of just approximately five percent of X-linked genes. It will be important, then, to determine more accurately which genes contribute in fact to X-linked expression differences among genders, calling attention to the need of an extensive analysis of XCI in normal human cells. Here we showed two examples of genes that were once described to escape from XCI in somatic-cell hybrids, but in fact do not in normal human fibroblasts. Our results emphasize the need for the development of more adequate experimental systems in which to study human XCI.

Materials and Methods

Cell lines. Four untransformed fibroblast cell lines (GM02226, GM00013, GM00135 and GM01661) derived from female carriers of Lesch-Nyhan Syndrome (MIM #300322) from the NIGMS Human Genetic Cell Repository were grown under the recommended conditions. Every cell line is heterozygous for a mutation in the *HPRT* gene, and subpopulations of cells with completely skewed XCI were obtained by selection in media containing 8-azaguanine (8-aza) or HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine), as described elsewhere.¹⁴

Genotyping and analysis of allele-specific expression. Genomic DNA was extracted using standard phenol protocol.¹⁵ Total RNA was prepared using Trizol (Invitrogen), according to manufacturer's protocol; after a rigorous DNase treatment with Turbo DNA-Free (Ambion), two micrograms were reverse transcribed using SuperScript III (Invitrogen). As a control for DNA contamination of the samples,

cDNA synthesis was also performed in the absence of reverse transcriptase. Fifty to 100 ng of DNA or cDNA were used as templates for PCR amplification of the region surrounding each SNP, using primers listed in Table 2. The PCR conditions are available on request. PCR products were sequenced using those same primers and the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit with ABI3100 Prism Genetic Analyzer, following manufacturer's instructions (Applied Biosystems). For each informative SNP, at least two independent cDNA preparations were analyzed by RT-PCR and sequencing. Sequencing of SNPs rs3027407, rs211659, rs2306734 and rs2306735 were confirmed on forward and reverse strands.

Methylation analysis. Genomic DNA from GM00135 cell line was treated with sodium bisulfite using EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions. CpG islands were determined according to the UCSC Genome Bioinformatics web site (<http://genome.ucsc.edu/>). DNA fragments were amplified by nested PCRs designed to analyze CpG islands within a 417 bp fragment at the 5' end of *MAOA* gene, and a 443 pb sequence at the 5' end and the first exon of *GYG2* gene. PCR was performed using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and PCR products were cloned into a pGEM T Easy Vector (Promega). At least 30 random clones were PCR amplified using M13 standard primers and were analyzed by automatic sequencing using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit with ABI3100 Prism Genetic Analyzer, following manufacturer's instructions (Applied Biosystems). The primer sequences for external (Ext) and internal (Int) PCRs are: *MAOA_Ext_F*—5'-Ttt TGt Att tAG TAA Ttt TTT ttA G-3'; *MAOA_Ext_R*—5'-aCC AAa CCA Taa CTA CAC TAC AC-3'; *MAOA_Int_F*—5'-AtA tAA GGA tAT TtT AAA ttT AAT AA-3'; *MAOA_Int_R*—5'-ACC CCT CAC Taa CCA aaa TC-3'; *GYG2_Ext_F*—5'-TGt AtT tAT TtA TTT ATT tAG TTT ATG-3'; *GYG2_Ext_R*—5'-Aaa CCT CCT CCA CTa CCC A-3'; *GYG2_Int_F*—5'-TAA Gtt tTG tTt TtT ttt TtT GG-3'; *GYG2_Int_R*—5'-TCC CCT aCA aCC CCC TAC-3'.

Table 2. Primer sequences for amplification of regions including SNPs analyzed in this study

Gene	SNPs	Primers
MAOA	rs3027407 and rs11544798	F—5' GTAACATTCTATTTCAACTTCAG 3'
		F cDNA—5' CCAGTGCATTATGAAGAGAAG 3' ^a
MAOA	rs1137070 and rs1800466	R—5' GGGGAAAACAAGAGGTGGG 3'
		F—5' AAATGGTCTCGGGAAGGTGA 3' ^b
GYG2	rs211659	R—5' ACCGTGGCAGGAGCTTGAT 3' ^b
		F—5' CGCTGTTGAACCTTGTGCCT 3' ^b
GYG2	rs2306734 and rs2306735	F cDNA—5' TTCACCACTGGGTCTAAC 3' ^a
		R—5' ACCACCATCGAGAGTCTACT 3' ^b
GYG2	rs2306734 and rs2306735	F—5' GTTCCAGTGCAAAGGTCGTC 3'
		R—5' ATCTTCTGAACGGCGTCTCT 3'

^aPrimers specific for cDNA amplification are named accordingly. ^bPrimers previously described.³

Acknowledgements

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

References

1. Lyon M. Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 1961; 190:372-3.
2. Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16:247-55.
3. Carrel L, Willard HF. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 2005; 434:400-4.
4. Brown CJ, Greally JM. A stain upon the silence: genes escaping X inactivation. *Trends Genet* 2003; 19:432-8.
5. Fialkow PJ. X-chromosome inactivation and the Xg locus. *Am J Hum Genet* 1970; 22:460-3.
6. Shapiro LJ, Mohandas T, Weiss R. Non-inactivation of an X-chromosome locus in man. *Science* 1979; 204:1224-6.
7. Mohandas T, Sparkes RS, Hellkuhl B, Grzeschik KH, Shapiro LJ. Expression of an X-linked gene from an inactive human X chromosome in mouse-human hybrid cells: further evidence for the noninactivation of the steroid sulfatase locus in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77:6759-63.
8. Brown CJ, Carrel L, Willard HF. Expression of genes from the human active and inactive X chromosomes. *Am J Hum Genet* 1997; 60:1333-43.
9. Carrel L, Willard HF. Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:7364-9.
10. Benjamin D, Van Bakel I, Craig IW. A novel expression based approach for assessing the inactivation status of human X-linked genes. *Eur J Hum Genet* 2000; 8:103-8.
11. Kutsche R, Brown CJ. Determination of X-chromosome inactivation status using X-linked expressed polymorphisms identified by database searching. *Genomics* 2000; 65:9-15.
12. Vasques LR, Pereira LV. Allele-specific X-linked gene activity in normal human cells assayed by expressed single nucleotide polymorphisms (cSNPs). *DNA Res* 2001; 8:173-7.
13. Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, et al. The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* 2005; 434:325-37.
14. Migeon BR. X-linked hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase deficiency: detection of heterozygotes by selective medium. *Biochem Genet* 1970; 4:377-83.
15. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Third edition, Cold Spring Harbor Laboratory 2001.
16. Razin A, Cedar H. Distribution of 5-methylcytosine in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:2725-8.
17. Wolf SF, Jolly DJ, Lunnen KD, Friedmann T, Migeon BR. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyl transferase locus on the human X chromosome: implication for X chromosome inactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:2806-10.
18. Goodfellow PJ, Mondello C, Darling SM, Pym B, Little P, Goodfellow PN. Absence of methylation of a CpG-rich region at the 5' end of the MIC2 gene on the active X, the inactive X, and the Y chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:5605-9.
19. Gilbert SL, Sharp PA. Promoter-specific hypocacetylation of X-inactivated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:13825-30.
20. Boggs BA, Cheung P, Heard E, Spector DL, Chinault AC, Allis CD. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. *Nat Genet* 2002; 30:73-6.
21. Filippova GN, Cheng MK, Moore JM, Truong JP, Hu YJ, Nguyen DK, et al. Boundaries between chromosomal domains of X inactivation and escape bind CTCF and lack CpG methylation during early development. *Dev Cell* 2005; 8:31-42.
22. Shih JC, Thompson RF. Monoamine oxidase in neuropsychiatry and behavior. *Am J Hum Genet* 1999; 65:593-8.
23. Xue F, Tian XC, Du F, Kubota C, Taneja M, Dinnyes A, et al. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nat Genetics* 2002; 31:216-20.
24. Nordquist N, Orelund L. Monoallelic expression of MAOA in skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348:763-7.
25. Mu J, Skurat AV, Roach PJ. Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *J Biol Chem* 1997; 272:27589-97.
26. Zhai L, Mu J, Zong H, DePaoli-Roach AA, Roach PJ. Structure and chromosomal localization of the human glycogenin-2 gene GYG2. *Gene* 2000; 242:229-35.

27. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 2005; 309:1369-73.
28. Tada M, Tada T, Lefebvre L, Barton SC, Surani MA. Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J* 1997; 16:6510-20.
29. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 2001; 11:1553-8.
30. Blau HM, Blakely BT. Plasticity of cell fate: insights from heterokaryons. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10:267-72.
31. Ellis N, Keitges E, Gartler SM, Rocchi M. High-frequency reactivation of X-linked genes in chinese hamster X human hybrid cells. *Somat Cell Mol Genet* 1987; 13:191-204.
32. Gartler SM, Goldman MA. Reactivation of inactive X-linked genes. *Dev Genet* 1994; 15:504-14.
33. Yoshida I, Nishita Y, Mohandas TK, Takagi N. Reactivation of an inactive human X chromosome introduced into mouse embryonal carcinoma cells by microcell fusion with persistent expression of XIST. *Exp Cell Res* 1997; 230:208-19.
34. Takagi N. Variable X chromosome inactivation patterns in near-tetraploid murine EC x somatic cell hybrid cells differentiated in vitro. *Genetica* 1993; 88:107-17.
35. Brown CJ, Willard HF. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature* 1994; 368:154-6.
36. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 2003; 423:825-37.
37. Johnston CM, Lovell FL, Leongamornlert DA, Stranger BE, Dermitzakis ET, Ross MT. Large-scale population study of human cell lines indicates that dosage compensation is virtually complete. *PLoS Genet* 2008; 4:9.

Joana Carvalho Moreira de Mello obteve o título de Bacharel em Ciências Biológicas em 2006 e de Licenciatura em 2007 pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Começou sua pesquisa em Inativação do Cromossomo X sob a orientação da Profa. Dra. Lygia da Veiga Pereira em 2005 como trabalho de Iniciação Científica, que se estendeu para Mestrado a partir de 2007.

Ao longo deste período foram publicados dois artigos em reconhecidos periódicos internacionais.

O primeiro foi resultado de pesquisas realizadas com as colegas de laboratório Raquel Stabellini e Lys Molina Hernandez e com sua orientadora Dra. Lygia da Veiga Pereira: **MAOA and GYG2 are submitted to X chromosome inactivation in human fibroblasts**. Raquel Stabellini, Joana Carvalho Moreira de Mello, Lys Molina Hernandez e Lygia da Veiga Pereira. Artigo publicado no periódico editado pela Landes Bioscience, *Epigenetics* (4:6, 388-393) em agosto de 2009.

O segundo trabalho foi desenvolvido ao longo do curso de pós-graduação ministrado pela Profa. Dra. Sabine Eggers, 'Variabilidade Biológica no *Homo sapiens*: Fatores Genéticos e Ambientais', durante o segundo semestre de 2007: **Syphilis at the Crossroad of Phylogenetics and Paleopathology**. Fernando Lucas de Melo, Joana Carvalho Moreira de Mello, Ana Maria Fraga, Kelly Nunes, Sabine Eggers. Artigo publicado no periódico *online* PLoS Neglected Tropical Diseases [4(1):e575] em Janeiro de 2010 (<http://www.plosntds.org>).

Em abril de 2009 participou do MC-GARD - Higher order of genome architecture em Edimburgo (Escócia), o que gerou mais duas publicações nos anais do encontro:

X Chromosome Inactivation Patterns in Human Placenta. Joana Carvalho Moreira de Mello, Raquel Stabellini, Érica Araújo, Lys Molina Hernandez, Daniel Onofre Vidal, Jorge Souza, Anamaria Camargo e Lygia da Veiga Pereira. *In: Meeting of MC-GARD.eu - Higher order of genome architecture, 2009, Edinburgh. Cellular Oncology. Amsterdam : IOS, 2009. v. 31. p. 135.*

X-Linked Genes Behave Differently In Normal Human Cells And Rodent/Human Somatic Cell Hybrids Regarding XCI. Raquel Stabellini, Joana Carvalho Moreira de Mello, Lys Molina Hernandez e Lygia da Veiga Pereira. *In: Meeting of MC-GARD.eu - Higher order of genome architecture, 2009, Edinburgh. Cellular Oncology. Amsterdam : IOS, 2009. v. 31. p. 132.*