



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA E FUNCIONAL DO TRANSCRITO  
ESPECÍFICO DO X INATIVO (XIST) DURANTE O DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO INICIAL *IN VITRO* EM BOVINOS**

**Aluno: Anelise dos Santos Mendonça**

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA E FUNCIONAL DO TRANSCRITO  
ESPECÍFICO DO X INATIVO (XIST) DURANTE O DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO INICIAL *IN VITRO* EM BOVINOS**

**Aluno: Anelise dos Santos Mendonça**

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Uberlândia como parte  
dos requisitos para obtenção do  
Título de Doutor em Genética e  
Bioquímica (Área Genética).**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M539c      Mendonça, Anelise dos Santos, 1987  
2017      Caracterização epigenética e funcional do Transcrito Específico do  
X Inativo (XIST) durante o desenvolvimento embrionário inicial in vitro  
em bovinos / Anelise dos Santos Mendonça. - 2017.  
159 p. : il.

Orientador: Maurício Machaim Franco.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.5>  
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Desoxirribonucleases - Teses. 3.  
Cromossomos - Teses. 4. Núcleo Celular - Teses. I. Franco, Maurício  
Machaim. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA E FUNCIONAL DO TRANSCRITO  
ESPECÍFICO DO X INATIVO (XIST) DURANTE O DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO INICIAL *IN VITRO* EM BOVINOS**

**ALUNO:** Anelise dos Santos Mendonça

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof. Dr. Maurício Machaim Franco (Orientador)

**Examinadores:** Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Bonetti (UFU)  
Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo (UFU)  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Margot Alves Nunes Dode (EMBRAPA)  
Prof. Dr. Ricardo Alamino Figueiredo (EMBRAPA)

**Data da Defesa:** 08 / 12 / 2017

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

---

Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

*“Dizem que a vida é para quem sabe viver, mas ninguém nasce pronto. A vida é para quem é corajoso o suficiente para se arriscar e humilde o bastante para aprender.”*

*— Clarice Lispector*

Os sonhos só podem ser realizados quando  
temos pessoas para sonhar conosco...  
As batalhas só podem ser vencidas quando  
temos pessoas para lutar conosco...  
O sucesso só pode ser alcançado quando  
temos pessoas para desfrutá-lo conosco...  
Às pessoas que estiveram comigo durante  
toda essa jornada, dividindo os mesmos  
sonhos, lutas e vitórias...  
Minha família: ANA ABADIA, OMILTON,  
JULIANA e EDUARDO, à vocês  
Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, à quem sempre orei pedindo proteção, inspiração e coragem e que me permitiu chegar até aqui.

Às pessoas que estiveram incondicionalmente ao meu lado, seja fisicamente ou nos pensamentos e orações dia após dia: minha família! Aos meus pais, Omilton e Ana Abadia, pelos exemplos, ensinamentos e amor incondicional. À minha irmã, Juliana, pelos incontáveis minutos de conversa e pela mais pura e sincera amizade. Ao Eduardo, pelo amor e companheirismo de todas as horas. Essa conquista é de vocês e para vocês!

Ao Dr. Maurício M. Franco, meu orientador e amigo durante toda essa jornada. Pela oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente, pelos seus ensinamentos, incentivos e por sua amizade. E por me contagiar com a paixão pelo ‘ensinar’ e o ‘aprender’.

À Dr<sup>a</sup>. Margot Dode, pela amizade e ensinamentos essenciais à condução deste trabalho.

Aos amigos incríveis que fazem (ou fizeram) parte do vitorioso time do Laboratório de Reprodução Animal (LRA). Pesquisadores, técnicos ou alunos, cada um de vocês teve um papel importante para a realização desse trabalho, seja na bancada do dia-a-dia ou numa conversa informal. Com vocês vivi momentos maravilhosos, de muito trabalho, mas também de risadas e descontração. Cada um tem um lugar reservado na minha memória e no meu coração.

Aos funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e do Campo Experimental Sucupira, trabalhando na limpeza, nos laboratórios, nos escritórios ou na linha de abate dos frigoríficos. Sem vocês a realização desse trabalho não seria possível.

Aos professores que disponibilizaram seu tempo e um pouco do seu conhecimento ao aceitaram colaborar com esse trabalho compondo a banca examinadora do mesmo.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por disponibilizar toda a estrutura e pelo apoio financeiro necessários à realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pelo curso oferecido. Em especial, à Janaina de Souza Mota, secretária do programa, que mesmo à distância sempre se prontificou à ajudar de forma muito eficiente.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo da inativação do cromossomo X (ICX) em embriões fêmeas de camundongos.....	18
<b>Figura 2:</b> Modelo simplificado da regulação da inativação do cromossomo X (ICX) na região do centro de inativação do X (XIC) em camundongos.....	27
<b>Figura 3:</b> Processo de iniciação da inativação do cromossomo X em células tronco embrionárias de camundongos.....	29
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da estrutura da porção 5' do <i>locus</i> XIST de bovinos.....	38
<b>Figura 5:</b> Esquema da técnica de <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (SS-RT-PCR) utilizada para prospecção de transcritos <i>sense</i> e <i>antisense</i> no <i>locus</i> XIST.....	54
<b>Figura 6:</b> Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando um <i>amplicon</i> específico para a região DMR do exon 1 do gene XIST de ovócitos MII de bovinos utilizando como molde DNA genômico tratado com bissulfito de sódio.....	56
<b>Figura 7:</b> Exemplo de alinhamento realizado no programa BiQ Analyzer entre a sequência referência (linha superior) e um produto de sequenciamento (linha inferior) para a DMR 1 do gene XIST, mostrando a posição dos 17 sítios CpGs analisados.....	57
<b>Figura 8:</b> Padrão de metilação para a DMR 1 do gene XIST em gametas, embriões e placenta bovinos ( <i>Bos taurus indicus</i> ).....	58
<b>Figura 9:</b> Taxa de metilação para a região da DMR 1 do gene XIST.....	59

<b>Figura 10:</b> Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando um <i>amplicon</i> específico para a região do <i>Rep A</i> do gene XIST de espermatozoides bovinos utilizando como molde DNA genômico tratado com bissulfito de sódio.....	62
<b>Figura 11:</b> Exemplo de alinhamento realizado no programa BiQ Analyzer entre a sequência referência (linha superior) e um produto de sequenciamento (linha inferior) para a região do <i>Rep A</i> do gene XIST, mostrando a posição dos 18 sítios CpGs analisados.....	63
<b>Figura 12:</b> Padrão de metilação para a região <i>Rep A</i> do gene XIST em gametas, embriões e placenta bovinos ( <i>Bos taurus indicus</i> ).....	64
<b>Figura 13:</b> Taxa de metilação para a região do <i>Rep A</i> do gene XIST.....	65
<b>Figura 14:</b> Reprogramação da metilação do DNA de duas regiões do gene XIST em bovinos durante o final da gametogênese, início do desenvolvimento embrionário e na placenta.....	68
<b>Figura 15:</b> Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando um <i>amplicon</i> específico para a região do promotor do gene XIST de ovócitos MII bovinos utilizando como molde DNA genômico tratado com bissulfito de sódio.....	69
<b>Figura 16:</b> Exemplo de alinhamento realizado no programa BiQ Analyzer entre a sequência referência (linha superior) e um produto de sequenciamento (linha inferior) para a região do promotor do gene XIST, mostrando a posição dos 6 sítios CpGs analisados.....	70
<b>Figura 17:</b> Padrão de metilação da região promotora do gene XIST em gametas bovinos ( <i>Bos taurus indicus</i> ).....	70
<b>Figura 18:</b> Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os produtos da amplificação para o <i>locus</i> XIST e para o GAPDH em células individuais de mórula.....	72

<b>Figura 19:</b> Média dos Ct ( <i>threshold cycle</i> ) para os genes XIST e GAPDH para cada estágio de desenvolvimento analisado (ovócitos MII, embriões de 2 células, 4 células, 8-16 células e mórulas).....	73
<b>Figura 20:</b> Representação da expressão de XIST e GAPDH em células individualizadas de embriões bovinos fêmeas em diferentes estágios de desenvolvimento.....	74
<b>Figura 21:</b> Resultados da PCR em tempo real para a presença de transcritos <i>sense</i> e <i>antisense</i> no primeiro éxon ( <i>primers</i> TSIXP) e último éxon ( <i>primers</i> TSIXU) do <i>locus</i> XIST através da metodologia de SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) em embriões bovinos.....	76
<b>Figura 22:</b> Alinhamento dos produtos amplificados por PCR a partir dos transcritos <i>sense</i> e <i>antisense</i> do <i>locus</i> XIST em embriões bovinos com as sequências depositadas no <i>GenBank</i> .....	77
<b>Figura 23:</b> Resultados da PCR em tempo real para a presença de transcritos <i>sense</i> e <i>antisense</i> no primeiro éxon ( <i>primers</i> TSIXP) e último éxon ( <i>primers</i> TSIXU) do <i>locus</i> XIST através da metodologia de SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) em tecido testicular bovino.....	78
<b>Figura 24:</b> Razão Ct <i>antisense</i> /Ct <i>sense</i> para o primeiro e último éxons do <i>locus</i> XIST para embriões e tecido testicular de bovinos.....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação da região genômica, sequências dos <i>primers</i> , localização dos <i>primers</i> e tamanho do fragmento amplificado.....	44
<b>Tabela 2.</b> Condições da <i>nested</i> PCR para a DMR 1 do gene XIST.....	45
<b>Tabela 3.</b> Condições da <i>hemi-Nested</i> PCR para a região <i>Rep A</i> do gene XIST.....	46
<b>Tabela 4.</b> Condições da <i>hemi-Nested</i> PCR para a região promotora do gene XIST.....	47
<b>Tabela 5.</b> Identificação do gene, sequências dos <i>primers</i> , concentração dos <i>primers</i> e tamanho do fragmento amplificado para avaliação de expressão gênica <i>sense</i> e <i>antisense</i> .....	52
<b>Tabela 6.</b> Taxa de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para cada grupo analisado para a região diferencialmente metilada 1 do gene XIST.....	60
<b>Tabela 7.</b> Taxa de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para cada grupo analisado para a região do <i>Rep A</i> do gene XIST.....	66
<b>Tabela 8.</b> Taxa de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para espermatozoides e ovócitos maturados para a região promotora do gene XIST.....	71
<b>Tabela 9.</b> Expressão de GAPDH e XIST em ovócitos e células individuais de embriões em diferentes estágios (2 células, 4 células, 8-16 células e mórulas): número de estruturas avaliadas (ovócitos e embriões), número de células analisadas, quantidade de células GAPDH <sup>+</sup> , quantidade de células XIST <sup>+</sup> , taxa de células XIST <sup>+</sup> (%) e proporção de estruturas XIST <sup>+</sup> (%).....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A – Adenina

Acetil Co-A – Acetilcoenzima A

ADP – Adenosina difosfato

AID – Citidina desaminase

APOBEC – Subunidades catalíticas da enzima de edição de mRNA da apolipoproteína B

ARTs – Técnicas de reprodução assistida

BER – Reparação por excisão de bases

Bx – Blastocisto expandido

C – Citosina

cAMP – Adenosina monofosfato cíclico

CBX – Homólogo a *chromobox*

CCOs – Complexos cumulus-ovócitos

cDNA – DNA complementar

CDX4 – Homeobox caudal tipo 4

CGP – Células germinativas primordiais

CH<sub>3</sub> – Metil

CHIC1 – Domínio hidrofóbico rico em cisteína tipo 1

CIV – Cultivo *in vitro*

cm<sup>2</sup> – Centímetro quadrado

CNBP2 – Proteína *zinc finger* CCHC tipo 13

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

CpA – Citosina-fosfato-Adenina

CpC – Citosina-fosfato-Citosina

CpG – Citosina-fosfato-Guanina

CpT – Citosina-fosfato-Timina

Ct – Ciclo *threshold*

CTCF – Fator ligante CCCTC

DEPC – Dietilpirocarbonato

DMR – Região diferencialmente metilada

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease  
 DNMT – DNA Nucleotídeo Metiltransferases  
 dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
 DPPA3 – Proteína Associada à Pluripotência de Desenvolvimento 3  
 DTT – Ditioneitol  
 EDTA – Ácido etilendiamino tetra-acético  
 ENOX/JPX – Vizinho expresso de XIST  
 eRNA – *enhancer* de RNA  
 EZH2 – Enhancer do Homólogo 2 de Zeste  
 FIV – Fecundação *in vitro*  
 FSH – Hormônio Folículo Estimulante  
 FTX – *Five prime* do XIST  
 G – *Gauge*  
 G – Guanina  
 g – gravidade  
 GAPDH – Gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase  
 gDMR – DMR de linhagem germinativa  
 GRB10 – Proteína ligada ao receptor do fator de crescimento tipo 10  
 GV – Vesícula germinativa (ovócitos)  
 H2Aub – Ubiquitinação da histona H2A  
 H3K27me3 – Trimetilação da lisina 27 da histona H3  
 HAT – Histona Acetiltransferases  
 HDAC – Histona Deacetilases  
 HDMT – Histona Desmetilase  
 HMT – Histona Metiltransferase  
 HNRNPU – Ribonucleoproteína heterogênea nuclear U  
 IC – Centro de *imprinting*  
 ICR – Região controladora de *imprinting*  
 ICSM – Inativação Cromossômica Sexual Meiótica  
 ICX – Inativação do cromossomo X  
 iDMR – DMR *imprinted*  
 IGF2 – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2  
 IGF2R – Receptor do Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2

IPTG – Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo  
JARID2 – Domínio de interação contendo *Jumonji* e *AT-Rich* tipo 2  
Kb – quilobase  
KLF4 – Fator semelhante a *Kruppel* tipo 4  
LB – Meio Luria-Bertani  
LINEs – Elementos longos interestreadados  
LINX – Grande transcrito interveniente no XIC  
lncRNA – RNA longo não-codante  
M – Molar  
mA – Milliampere  
MAOA – Monoamina oxidase tipo A  
MCI – Massa celular interna  
MEST – Transcrito específico da mesoderme  
mg – Miligrama  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
MII – Metáfase II (ovócitos)  
min. – Minutos  
miRNA – Micro RNA  
MIV – Maturação *in vitro*  
mL – Mililitro  
mm – Milímetro  
mM – Milimolar  
n – Número  
NaCl – Cloreto de sódio  
NANOG – *Nanog homeobox*  
NAP1L2 – Proteína de montagem de nucleossomos 1 semelhante a 2  
NNAT – Neuronatina  
OCT4 – Fator de transcrição ligante no octâmero 4  
OV – *Overnight*  
pb – Pares de base  
PBS – Solução salina em tampão fosfato  
PcG – Proteínas *Policomb*  
PCR – Reação em cadeia da polimerase

PEG – Gene expresso paternalmente 1  
 p.i. – Pós-inseminação  
 pH – Potencial hidrogeniônico  
 PIVE – Produção *in vitro* de embriões  
 pg – picograma  
 PRC1 – Complexo Repressivo *Policomb* tipo 1  
 PRC2 – Complexo Repressivo *Policomb* tipo 2  
 PTNase K – Proteinase K  
 q.s.p – Quantidade suficiente para  
*Rep A – Repeat A*  
 RLIM – Proteínas *ring finger*, interação com o domínio LIM  
 RNA – Ácido ribonucleico  
 RNAm – RNA mensageiro  
 ncRNA – RNA não-codante  
 RNase - Ribonuclease  
 RNF12 – Proteína *Ring Finger*  
 rpm – Rotação por minuto  
 RSX – RNA do X silenciado  
 RT – Transcrição reversa  
 s. – Segundo  
 SAM –S-adenosilmetionina  
 SDS – Dodecil sulfato de sódio  
 SFB – Soro fetal bovino  
 SHARP – Proteína repressora associada a SMRT/HDAC1  
 siRNA – Pequeno RNA de interferência  
 SLC16A2 – Família dos carreadores de solute tipo 16 membro 2  
 SN – Sobrenadante  
 SOFaaci – Fluido do oviduto sintético com aminoácidos, citrato de sódio e mio-  
 inositol  
 SOX2 – SRY (região determinante do sexo Y)-*box 2*  
 SPEN – Proteínas *Split End*  
 SS-RT-PCR – RT-PCR de fita simples  
 SUMO – Modificador semelhante a pequena ubiquitina



T – Timina  
 TALP – *Tyrode's albumin lactate pyruvate*  
 TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA  
 TCM-199 – Meio de Cultura de Tecidos-199  
 tDMR – DMR transiente  
 TE – Tampão Tris-EDTA  
 TE – Trofoectoderma  
 TET – Translocação Dez-Onze  
 TRIS – Tris (Hidroximetil) Aminometano  
 TSIX – XIST *antisense* RNA  
 TSX – *Testes-specific* ligado a X  
 UI – Unidades Internacionais  
 XACT – Transcrito específico do X ativo  
 X-GAL – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo  
 Xi – Cromossomo X inativo  
 XIC – Centro de inativação do cromossomo X  
 XIST – Transcrito específico de inativação do cromossomo X  
 XistAR – RNA ativador do XIST  
 XITE – Elementos Transcrpcionais Intergênicos de Inativação de X  
 Xm – Cromossomo X materno  
 Xp – Cromossomo X paterno  
 YY1 – Transcrito Ying Yang 1  
 °C – Graus Celsius  
 % – Porcentagem  
 $\beta$ -ME–  $\beta$ -Mercaptoetanol  
 $\mu$ g – Micrograma  
 $\mu$ L – Microlitro  
 $\mu$ m – Micrômetro  
 $\mu$ M – Micromolar  
 ng – Nanograma  
 5-caC – 5-carboxicitosina  
 5-fC – 5-formilcitosina  
 5hmC – 5-hidroximetilcitosina

5mC – 5-metilcitosina

# CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA E FUNCIONAL DO TRANSCRITO ESPECÍFICO DO X INATIVO (XIST) DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO INICIAL *IN VITRO* EM BOVINOS

## RESUMO

Durante o desenvolvimento inicial de mamíferos ocorre, nos embriões fêmeas, o evento da inativação do cromossomo X (ICX), o qual é regido predominantemente por fatores epigenéticos. Na espécie murina sabe-se que o RNA longo não-codante (lncRNA) Transcrito Específico do X Inativo (XIST), juntamente com um pequeno RNA denominado *Rep A*, são essenciais para a iniciação do processo de ICX, mas muito pouco ainda se sabe sobre esses eventos iniciais em espécies domésticas de interesse comercial. Este estudo teve como objetivo caracterizar o padrão de metilação de DNA e de expressão do lncRNA XIST durante o desenvolvimento inicial de bovinos. Foram avaliados os padrões de metilação do DNA em três regiões diferentes da porção 5' e primeiro éxon do XIST (denominadas aqui promotor, *Rep A* e DMR 1) em gametas, embriões e placenta. Com relação à caracterização da expressão de XIST, foi investigado o perfil de expressão em blastômeros individuais, além da expressão fita-específica (transcrição *sense* e *antisense*) ao longo do gene. Para as avaliações de metilação foi utilizada a técnica de amplificação de DNA tratado com bissulfito de sódio por PCR seguido de sequenciamento. Para a expressão gênica em células embrionárias individuais foi utilizado o kit Single Cell-to-CT (Ambion). Para a detecção de transcritos *sense* e *antisense* foram utilizados *primers* gene-específicos para a síntese do cDNA. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). Os padrões de metilação do DNA para a DMR 1 e *Rep A* foram calculados para espermatozoides ( $3,33\% \pm 1,05$  e  $10,36\% \pm 3,73$ , respectivamente), ovócitos imaturos ( $79,54\% \pm 6,56$  e  $12,29\% \pm 4,21$ , respectivamente) ovócitos maturados ( $89,59\% \pm 2,31$  e  $74,27\% \pm 8,77$ , respectivamente), embriões de 8-16 células ( $0,00\% \pm 0,00$  e  $92,18\% \pm 2,22$ , respectivamente), mórulas ( $0,84\% \pm 0,57$  e  $95,33\% \pm 0,51$ , respectivamente), massa celular interna de blastocistos ( $1,07\% \pm 0,72$  e  $1,97\% \pm 1,41$ , respectivamente), células do trofoectoderma de blastocistos ( $3,93\% \pm 1,24$  e  $0,00\%$

$\pm 0,00$ , respectivamente), placenta (alantocórion) de duas fêmeas [A ( $89,38\% \pm 2,70$  e  $26,92\% \pm 11,27$ , respectivamente) e B ( $70,92\% \pm 10,70$  e  $89,24\% \pm 2,50$ , respectivamente)] e placenta (alantocórion) de dois machos [A ( $94,67\% \pm 1,18$  e  $88,78\% \pm 5,40$ , respectivamente) e B ( $94,44\% \pm 1,58$  e  $92,22\% \pm 2,07$ , respectivamente)]. Os padrões de metilação para espermatozoides e ovócitos maturados para a região do promotor de XIST foram  $3,12\% \pm 1,68$  e  $46,67\% \pm 10,58$ , respectivamente. Os padrões de metilação encontrados sugerem que essas regiões são tDMRs, as quais se reprogramam em momentos diferentes entre si, porém, não são regiões que poderiam conferir um caráter *imprinted* ao XIST. Além disso, a região *Rep A* pode ser uma candidata a um marcador epigenético na PIVE devido à sua reprogramação durante a maturação ovocitária. O RNA XIST foi detectado em ovócitos MII e células individuais de embriões do estágio de 2-células até mórula, indicando a presença de transcritos tanto de origem materna quanto embrionária. Além disso, foram detectados transcritos *sense* e *antisense* no início e final do *locus* XIST em embriões e tecido testicular, podendo ser um ou mais transcritos diferentes. A caracterização molecular do gene XIST em bovinos é um passo inicial e importante para entender os eventos relacionados à ICX durante a embriogênese, de forma a aprimorar as ARTs.

**Palavras-chave:** *Bos taurus indicus*, Expressão gênica, *Imprinting* genômico, Inativação do cromossomo X, Metilação do DNA, XIST

# EPIGENETIC AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE X-INACTIVE SPECIFIC TRANSCRIPT (XIST) DURING THE *IN VITRO* EARLY EMBRYO DEVELOPMENT IN CATTLE

## ABSTRACT

During the initial development of mammals, an event of X chromosome inactivation (XCI) occurs in female embryos, which is predominantly coordinated by epigenetic factors. In mice, it is known that the long non-coding RNA (lncRNA) X-Inactive Specific Transcript (XIST), in association with a small RNA named *Rep A*, are essentials to the initiation of the XCI process. However, little is known about this mechanism in domestic animals. The aim of this study was to characterize the DNA methylation and gene expression patterns of the lncRNA XIST during the early development in cattle. Three different regions of 5' portion and first exon of XIST were evaluated for DNA methylation (named here as promoter, *Rep A* and DMR 1) in gametes, embryos and placenta. Regarding gene expression, it was investigated the expression pattern in individual blastomeres, as wells as strand-specific expression (*sense* and *antisense* transcription) along the gene. For DNA methylation, PCR of sodium bisulfite treated-DNA followed by DNA sequencing was used. Single cell-to-CT (Ambion) kit was used for gene expression of oocytes and individual embryonic cells. Regarding *sense* and *antisense* gene expression, gene-specific *primers* were used for cDNA synthesis. Real-time PCR was conducted using Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems). DNA methylation patterns for DMR 1 and *Rep A* were determined in spermatozoa ( $3.33\% \pm 1.05$  and  $10.36\% \pm 3.73$ , respectively), immature oocytes ( $79.54\% \pm 6.56$  and  $12.29\% \pm 4.21$ , respectively) matured oocytes ( $89.59\% \pm 2.31$  and  $74.27\% \pm 8.77$ , respectively), 8-16 cell embryos ( $0.0\% \pm 0.00$  and  $92.18\% \pm 2.22$ , respectively), morula ( $0.84\% \pm 0.57$  and  $95.33\% \pm 0.51$ , respectively), inner cell mass of blastocysts ( $1.07\% \pm 0.72$  and  $1.97\% \pm 1.41$ , respectively), trophoectoderm of blastocysts ( $3.93\% \pm 1.24$  and  $0.00\% \pm 0.00$ , respectively), placenta (allantochorion) of two females [A ( $89.38\% \pm 2.70$  and  $26.92\% \pm 11.27$ , respectively) and B ( $70.92\% \pm 10.70$  and  $89.24\% \pm 2.50$ , respectively)] and placenta (allantochorion) of two males [A ( $94.67\% \pm 1.18$  and

88.78%  $\pm$  5.40, respectively) and B (94.44%  $\pm$  1.58 and 92.22%  $\pm$  2.07, respectively)]. The methylation profile in spermatozoa and matured oocytes for XIST promoter region were 3.12%  $\pm$  1.68 e 46.67%  $\pm$  10.58, respectively. The methylation patterns found here suggest that these regions are transient differently methylated regions (tDMRs), which are reprogrammed in different time, and are not regions that could give an imprinted character to the XIST. Moreover, *Rep A* is a candidate for epigenetic marker in *in vitro* fertilization (IVF) due to it is reprogramming during oocyte maturation. XIST RNA was detected in matured oocytes and individual cells of embryos of 2-cell until morula stages, suggesting the presence of transcripts of both maternal and embryonic origins. Moreover, *sense* and *antisense* transcripts were detected at the first and last exons of the XIST *locus* in embryos and testicular tissue, which may be one or more different transcripts. The molecular characterization of XIST gene in cattle is an initial and important step to understand the events related to XCI during embryogenesis in order to improve the assisted reproductive techniques.

**Key-words:** *Bos taurus indicus*, DNA methylation, Gene expression, Genomic imprinting, X chromosome inactivation, XIST

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 EPIGENÉTICA .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Metilação do DNA .....	4
1.1.2 Reprogramação da metilação do DNA durante a gametogênese e embriogênese inicial em mamíferos .....	7
1.1.3 Modificações pós-traducionais de Histonas .....	9
1.1.4 <i>Imprinting</i> Genômico .....	11
1.1.5 RNAs não-codantes .....	13
<b>1.2 INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X .....</b>	<b>14</b>
1.2.1 O ciclo da inativação do cromossomo X no modelo camundongo .....	16
1.2.2 Fatores envolvidos na inativação do cromossomo X em camundongos .....	19
1.2.2.1 XIST .....	19
1.2.2.2 <i>Rep A</i> .....	22
1.2.2.3 TSIX .....	23
1.2.2.4 Outros fatores envolvidos na inativação do cromossomo X .....	24
1.2.3 A inativação do cromossomo X em outras espécies de mamíferos .....	29
1.2.4 A inativação do cromossomo X em bovinos .....	31
1.2.5 Genes que escapam à inativação do cromossomo X .....	34
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL RELACIONADO À METILAÇÃO DE DNA .....	37
3.1.2 Reagentes e produtos químicos .....	39

3.1.3 Recuperação de ovócitos e maturação <i>in vitro</i> .....	39
3.1.4 Produção <i>in vitro</i> de embriões .....	40
3.1.5 Extração do DNA genômico de espermatozoide para análise de metilação .....	42
3.1.6 Obtenção do DNA genômico de ovócitos e embriões para análise de metilação .....	42
3.1.7 Extração do DNA genômico de tecido placentário.....	43
3.1.8 Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio .....	43
3.1.9 Amplificação por PCR do DNA tratado com bissulfito de sódio .....	43
3.1.10 Clonagem dos <i>amplicons</i> e extração do DNA plasmidial.....	47
3.1.11 Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências .....	48
3.2 EXPERIMENTOS RELACIONADOS A EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS INDIVIDUAIS .....	49
3.2.1 Obtenção de ovócitos maturados e blastômeros individuais de embriões produzidos <i>in vitro</i> .....	49
3.2.2 PCR em Tempo Real (RT-qPCR) para detecção da expressão gênica em ovócitos e células individuais de embriões .....	49
3.3 EXPERIMENTOS RELACIONADOS À CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA <i>SENSE</i> E <i>ANTISENSE</i> ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) PARA O <i>LOCUS</i> XIST .....	51
3.3.1 Obtenção do material biológico .....	51
3.3.2 Extração de RNA total e transcrição reversa .....	51
3.3.3 PCR em tempo real fita-específica [ <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> (SS-RT-PCR)] .....	53
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA DMR 1, DA REGIÃO <i>REP A</i> E DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE XIST EM GAMETAS, EMBRIÕES E TECIDO PLACENTÁRIO BOVINOS.....	56



4.1.1 Metilação da DMR 1 do gene XIST em gametas, embriões e placenta bovinos .....	56
4.1.2 Metilação da região <i>Repeat A (Rep A)</i> do gene XIST em gametas, embriões e placenta bovinos .....	61
4.1.3 Metilação da região promotora do gene XIST em gametas bovinos ....	69
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA NO <i>LOCUS</i> XIST EM CÉLULAS INDIVIDUAIS DE EMBRIÕES BOVINOS.....	71
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA <i>SENSE</i> E <i>ANTISENSE</i> por SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) PARA O <i>LOCUS</i> XIST .....	75
5. DISCUSSÃO .....	80
6. CONCLUSÕES .....	92
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXOS .....	140

## 1. INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia da reprodução animal que inclui a maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) de embriões a partir de ovócitos imaturos (Barnes e First, 1991). É uma técnica que permitiu incrementar significativamente a multiplicação de animais geneticamente superiores. O Brasil ocupa uma posição de destaque em relação à PIVE, sendo o primeiro produtor mundial de embriões produzidos *in vitro*, responsável por mais de 350 000 embriões produzidos anualmente (Viana, Figueiredo *et al.*, 2017).

A evolução da PIVE em bovinos ao longo do tempo é notória, e se deve principalmente às pesquisas desenvolvidas na área nesses últimos anos (Viana, Siqueira *et al.*, 2012). Entretanto, se os números absolutos de embriões produzidos *in vitro* são bastante expressivos, não se pode dizer o mesmo das taxas de produção, já que dificilmente elas ultrapassam os 40% de embriões no estágio de blastocisto em relação à quantidade de ovócitos submetidos à MIV (Lonergan e Fair, 2008; Diogenes, Guimaraes *et al.*, 2017). Assim, blastocistos produzidos *in vitro* apresentam qualidade inferior quando comparados com aqueles produzidos *in vivo*, além de ocorrerem maiores perdas embrionárias nos primeiros 14 dias de gestação (Diskin, Murphy *et al.*, 2006; Hansen, Block *et al.*, 2010).

Embora na PIVE se busque “mimetizar” os aspectos fisiológicos da maturação ovocitária, fecundação e embriogênese inicial, é consenso na comunidade científica que o sistema *in vitro* prejudica essas importantes fases da reprodução de mamíferos. A retirada prematura do gameta feminino do ovário, mudanças de temperatura durante a manipulação, composição dos meios de cultivo, condições de incubação, entre outros aspectos da produção *in vitro*, são responsáveis por alterarem severamente as características fisiológicas, moleculares e epigenéticas dos gametas e dos possíveis embriões produzidos, o que deve contribuir para a menoreficiência da técnica.

Dentre as características susceptíveis ao processo da PIVE destacam-se as epigenéticas, as quais podem ser bastante sensíveis às alterações ambientais, principalmente durante a gametogênese e o desenvolvimento embrionário inicial, períodos estes nos quais reprogramações epigenéticas essenciais e eventos a elas

relacionadas acontecem e estão sendo conduzidos num sistema *in vitro*. Um desses eventos é a inativação do cromossomo X (ICX), que ocorre em todas as fêmeas de mamíferos durante a fase da embriogênese inicial e que é regida essencialmente por fatores epigenéticos. O estudo dos processos epigenéticos envolvidos nesse evento em gametas, embriões, fetos e tecidos somáticos, num contexto das técnicas de reprodução assistida (ARTs), pode dar informações importantes acerca da influência da PIVE sobre eles e subsidiar pesquisas futuras para a prospecção de marcadores moleculares epi (genéticos) para a qualidade de gametas e embriões.

## **1.1 EPIGENÉTICA**

O advento dos organismos multicelulares, com a complexidade e especificidade de tecidos, órgãos, sistemas e espécies trouxe a necessidade de uma complexa e coordenada regulação da expressão gênica de uma maneira célula ou tecido-específica. Visto que a base genética é única para todas as células de um indivíduo, o padrão da expressão gênica dentro de uma linhagem celular é responsável pela especificidade dos diferentes fenótipos – formas, cores, funções e reações – observadas nos diferentes tipos celulares, que são responsáveis pelas particularidades teciduais. Essa diversidade é controlada, predominante, por processos epigenéticos, que agem regulando a expressão gênica.

No sentido literal, a palavra epigenética, cunhada por Conrad Waddington em 1942, significa “acima da genética”, e se refere ao estudo de alterações estáveis e herdáveis no potencial de expressão de genes e fenótipo celular e que não estão relacionadas à sequência primária do DNA. Essas alterações surgem durante o desenvolvimento embrionário ou proliferação celular (Jaenisch e Bird, 2003), as quais são preservadas ou regeneradas durante a divisão celular (Laird, 2010; Margueron e Reinberg, 2010) não comprometendo a sequência de nucleotídeos do DNA (Singal e Ginder, 1999).

As alterações epigenéticas são reversíveis, por isso são susceptíveis a fatores ambientais, que podem contribuir para o desenvolvimento de características fenotípicas anormais. Como exemplo tem-se a hipermetilação de genes supressores de tumores como consequência da idade, nutrição (ingestão calórica,

níveis nutricionais e fitoquímicos), fatores físicos (comportamento, temperatura, densidade populacional, estresse), fatores químicos (toxinas e fármacos) ou efeitos estocásticos (Jaenisch e Bird, 2003; Faulk e Dolinoy, 2014). Dessa forma, a epigenética estabeleceu uma conexão entre os fatores ambientais e o genoma (Lyko e Maleszka, 2011; Faulk e Dolinoy, 2014).

Os estudos da herança das modificações fenotípicas provocadas pelo ambiente datam de mais de dois séculos atrás. Jean-Baptiste Lamarck (1744-1829) defendia que o uso excessivo de uma determinada parte do corpo levaria ao aumento do seu tamanho, e que esse fenótipo era herdado pelos descendentes desses progenitores que adquiriram esses traços através dos seus hábitos. Já o biólogo ucraniano Trofim Lysenko (1898-1976) acreditava que as plantações poderiam se adaptar a climas mais frios caso as sementes fossem expostas a temperaturas mais baixas. A teoria da evolução proposta por Charles Darwin (1809-1882) e outros estudos que se basearam em análises empíricas refutaram essas teorias durante alguns anos ao afirmarem que as células germinativas eram incapazes de herdar modificações fenotípicas adquiridas. Nos dias de hoje, entretanto, sabe-se que existe uma relação entre o ambiente no qual o indivíduo é exposto nos primórdios do seu desenvolvimento e a aquisição de características específicas na sua vida adulta e nos seus descendentes, mostrando que, pelos menos à princípio, as ideias de Lamarck não estavam tão equivocadas. Sabe-se, por exemplo, que mulheres submetidas a períodos longos de privação de alimentos durante o período de peri-concepção geram descendentes com predisposição a doenças cardiovasculares e esquizofrenia (Heijmans, Tobi *et al.*, 2008).

As modificações epigenéticas relacionam-se com a conformação da cromatina. Elas podem ocorrer tanto a nível de DNA quanto de histonas, permitindo ao DNA maior ou menor compactação, regulando assim a transcrição. Em se tratando de DNA, a mais conhecida é a metilação. Já com relação às histonas, que compõem os nucleossomos, têm-se várias alterações pós-traducionais, presença de variantes de histonas e remodelagem de outras proteínas associadas à cromatina (Strahl e Allis, 2000; Rideout, Eggan *et al.*, 2001; Li, 2002; Wijchers e Festenstein, 2011). Além disso, pequenos RNAs que atuam no genoma regulando a transcrição gênica também são considerados fatores epigenéticos, já que são capazes de serem criados, deletados, modificados ou replicados em resposta à

estímulos ambientais, regulando a expressão de genes (Anava, Posner *et al.*, 2014; Bohacek e Mansuy, 2015).

As modificações epigenéticas estão relacionadas com inúmeros eventos biológicos, tais como diferenciação celular, *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X, embriogênese, desenvolvimento de doenças, silenciamento de elementos transponíveis etc. Dessa forma, um estreito controle epigenético rege os eventos biológicos, os quais são imprescindíveis para a manutenção da vida das diferentes espécies.

### **1.1.1 Metilação do DNA**

Uma das mais estudadas e conhecidas modificações epigenéticas, controlando a expressão gênica nos mamíferos é a metilação do DNA. Ela se caracteriza pela adição covalente de um grupo metil (CH<sub>3</sub>) em uma base nitrogenada do DNA. Em mamíferos essa modificação ocorre preferencialmente no carbono 5 do anel da base citosina de um dinucleotídeo CpG (Citosina-fosfato-Guanina), formando um base denominada 5-metilcitosina (5-mC) (Zaidi, Young *et al.*, 2010; Eglen e Reisine, 2011; Lyko e Maleszka, 2011; Branco, Ficiz *et al.*, 2012). Quando esses dinucleotídeos são encontrados em grandes quantidades em uma região relativamente pequena do genoma, formam-se as ilhas CpG, que são regiões do genoma com mais de 500 pares de base (pb) e alta frequência de dinucleotídeos CG, sendo que em humanos 70% dos genes possuem ilhas CpG em seus promotores (Saxonov, Berg *et al.*, 2006; Manipalviratn, Decherney *et al.*, 2009). Embora a metilação do DNA ocorra em maior frequência em dinucleotídeos CpG, foi identificado que citosinas não precedidas de guanina (CpC, CpA e CpT) podem ser também suscetíveis a marcas de metilação, como em células-tronco embrionárias humanas, cérebro e ovócitos de camundongos (Lister, Pelizzola *et al.*, 2009; Shirane, Toh *et al.*, 2013).

A metilação do DNA ocorre com frequências distintas, dependendo da região do genoma a qual se instala. As ilhas CpG por exemplo, presentes principalmente nos promotores gênicos e em regiões intragênicas, e que possuem alto conteúdo C+G são normalmente desmetiladas. Por outro lado, a maior parte do genoma, que

contém uma baixa frequência de CpG, está geralmente metilada (Cooper e Krawczak, 1989).

A metilação do DNA é um dos processos epigenéticos mais estáveis, regulando importantes funções biológicas, como o *imprinting* genômico, silenciamento de *transposons* e estabilidade cromossomal (Gehring, Reik *et al.*, 2009; Zaidi, Young *et al.*, 2010; Guseva, Mondal *et al.*, 2012), sendo uma marca epigenética e atuando predominantemente como repressor gênico. A supressão da transcrição gênica é possível porque o grupo metil da 5-mC estende-se para dentro do sulco maior do DNA, interferindo na ligação dos fatores de transcrição (Faulk e Dolinoy, 2014). A compactação da cromatina é reforçada através da interação entre metilação do DNA e proteínas da cromatina, tais como *Polycomb group Proteins* (PcG) e *Enhancer of Zeste homolog 2* (EZH2) – que influenciam as modificações de histona (Faulk e Dolinoy, 2014).

O doador de grupos metil para o processo de metilação do DNA é o composto *S-Adenosylmethionine* (SAM). A transferência do grupo metil do SAM para uma citosina é catalisada por um grupo de enzimas denominadas DNA Metiltransferases (DNMTs), as quais parecem ser bastante conservadas na história evolutiva dos animais (Lyko e Maleszka, 2011). A enzima DNMT1 é responsável por manter o padrão de metilação em uma linhagem celular específica durante as divisões celulares ao inserir um grupo metil na fita recém-sintetizada, ao final da replicação semi-conservativa do DNA (Jurkowska, Jurkowski *et al.*, 2011). Este mecanismo é denominado metilação de manutenção. Usando a fita molde da replicação como referência do padrão de metilação, a DNMT1, que possui alta afinidade por DNA hemimetilado (Hsieh, 2000), tem o papel de conservar a “memória” epigenética dentro de uma linhagem celular, sendo a responsável por manter padrões importantes no DNA, como a manutenção dos padrões *imprinted* e da inativação do cromossomo X, essenciais na embriogênese inicial em mamíferos (Jurkowska, Jurkowski *et al.*, 2011). Além da metilação de manutenção, existe também a que acontece para estabelecer um novo padrão de metilação do DNA em uma linhagem celular, chamada de metilação *de novo*. Essa reação é catalisada pelas DNMT3A e DNMT3B, tendo um papel fundamental na embriogênese e gametogênese em mamíferos, além de serem possivelmente responsáveis por manter o padrão de metilação do DNA em cromossomo mitóticos e em regiões de

heterocromatina pericentroméricas (Jurkowska, Jurkowski *et al.*, 2011; Shirane, Toh *et al.*, 2013).

Outros membros da família das DNMTs são menos conhecidas, mas exercem papéis importantes no processo de metilação do DNA. A atividade catalítica da DNMT2 em metilar DNA é bastante discutível (Dong, Yoder *et al.*, 2001; Takayama, Dhahbi *et al.*, 2014), sendo esta enzima associada ao processo de metilação de RNA (Goll, Kirpekar *et al.*, 2006) enquanto a DNMT3L atua como um fator regulatório das DNMT3A e DNMT3B em células germinativas, sendo essencial para o estabelecimento do *imprinting* genômico em ovócitos e o silenciamento de sequências repetitivas dispersas em células germinativas masculinas (Schaefer, Ooi *et al.*, 2007; Shirane, Toh *et al.*, 2013). Já a DNMT1 apresenta algumas isoformas produzidas a partir de *splicing* alternativo, as quais têm funções célula-específicas. A DNMT1s apresenta-se em células somáticas, enquanto as DNMT1o e DNMT1p estão presentes em ovócito e espermatozoides, respectivamente (Mertineit, Yoder *et al.*, 1998; Song, Liu *et al.*, 2017).

Embora o processo de metilação do DNA seja relativamente bem conhecido, pouco se sabe sobre a desmetilação do DNA e as enzimas desmetilases. Sua importância na formação das células germinativas primordiais (CGP) e no início do desenvolvimento embrionário contradiz com os poucos estudos acerca desse processo, tornando-o ainda enigmático e controverso (Iqbal, Jin *et al.*, 2011).

A descoberta da 5-hidroximetilcitosina, produto da oxidação da 5-mC, tendo como produtos intermediários a 5-formilcitosina (5-fC) e a 5-carboxicitosina (5-caC) (Tahiliani, Koh *et al.*, 2009; Ito, Shen *et al.*, 2011), deixou um pouco menos obscuro o processo de desmetilação do DNA, o qual ocorre através da ação das enzimas *Ten Eleven Translocations* (TETs), por meio de processo oxidativo (Penn, Suwalski *et al.*, 1972; Globisch, Munzel *et al.*, 2010; Hashimoto, Liu *et al.*, 2012; Bogdanovic, Smits *et al.*, 2016). A 5-hmC está presente em uma gama de tecidos de camundongos e humanos, principalmente no sistema nervoso, mais precisamente nas células de Purkinje (Kriaucionis e Heintz, 2009; Globisch, Munzel *et al.*, 2010; Li e Liu, 2011). Embora a função da 5-hmC ainda não tenha sido totalmente elucidada, sabe-se que ela está relacionada com algumas patologias como doenças cardiovasculares e câncer (Orr, Haffner *et al.*, 2012) e na gametogênese e embriogênese (Iqbal, Jin *et al.*, 2011).

A ação das enzimas TET não é a única forma pela qual ocorre o processo de desmetilação do DNA. O sistema *activation-induced DNA-cytosine deaminase / Apolipoprotein BmRNA-editing catalytic polypeptides* (AID/APOBEC) retira um grupamento amino de uma 5-mC ou 5-hmC, induzindo à desmetilação (Liu e Schatz, 2009). Outro processo é através de glicosilases *Base Excision Repair* (BER), que desmetilam o DNA através de mecanismos de reparação do DNA (He, Li *et al.*, 2011). Assim, especula-se que múltiplas vias estão relacionadas à remoção da 5-mC do genoma, sendo que as enzimas TETs estão envolvidas em pelo menos algumas delas (Branco, Ficz *et al.*, 2012).

### **1.1.2 Reprogramação da metilação do DNA durante a gametogênese e embriogênese inicial em mamíferos**

O processo de reprogramação da metilação do DNA em mamíferos é bem conhecido. Nele, eventos de desmetilação e remetilação do DNA acontecem no genoma durante a gametogênese e o desenvolvimento embrionário inicial, e são essenciais para o estabelecimento dos corretos padrões epigenéticos célula ou tecido-específicos e para a manutenção da herança epigenética (Reik, Dean *et al.*, 2001). Para fins didáticos, divide-se a reprogramação epigenética em dois ciclos, que acontecem concomitantemente durante o desenvolvimento embrionário inicial.

O primeiro ciclo acontece nas CGP, para a formação dos gametas. Essas células são derivadas do epiblasto e durante sua migração e colonização da crista gonadal durante a embriogênese inicial vão perdendo seu padrão de metilação, assumindo um padrão bastante desmetilado, caracterizando um padrão unipotente (Molyneaux e Wylie, 2004). Em camundongos, nas células germinativas masculinas – proespermátogônias – a remetilação acontece ainda na fase fetal, sendo que ao nascimento o indivíduo possui, em todas as suas células germinativas, praticamente o padrão epigenético do gameta masculino (Bowles e Koopman, 2007; Macdonald e Mann, 2014). Já os ovócitos estacionados na prófase da meiose I apresentam níveis de metilação bastante basais, semelhantes aos das CGP, sendo que os gametas femininos somente começam a adquirir um padrão de metilação ovócito-específico a partir do recrutamento dos folículos primordiais para crescimento, sendo que ele se completa somente após a maturação do ovócito



(Fagundes, Michalczechen-Lacerda *et al.*, 2011; Mendonca Ados, Guimaraes *et al.*, 2015; Yu, Dong *et al.*, 2017). Embora o processo de reprogramação da metilação do DNA durante a gametogênese seja conservado entre os mamíferos, estudos mostram que diferenças espécie-específicas ocorrem (Park, Jeong *et al.*, 2007).

O segundo ciclo de reprogramação começa imediatamente após a fecundação, com a desmetilação de ambos os pró-núcleos, a fim de “apagar” a memória epigenética de gametas, sendo que no masculino essa desmetilação acontece de forma ativa – através das enzimas TETs que oxidam a 5-mC – e no feminino de forma passiva – através da remoção da DNMT1o do núcleo das células, perdendo sua capacidade de metilação de manutenção ao longo das divisões mitóticas (Dean, Santos *et al.*, 2001; Reik, Dean *et al.*, 2001; Macdonald e Mann, 2014). Na fase de embriogênese inicial os genomas paterno e materno começam a adquirir padrões específicos de metilação, processo conhecido como metilação *de novo*. O momento no qual essa remetilação do DNA ocorre varia conforme a espécie: em um período próximo à implantação do embrião murino (estágio de blastocisto) (Morgan, Santos *et al.*, 2005), no estágio de embrião de 8-16 células em bovinos (Maalouf, Alberio *et al.*, 2008), mórula em suínos (Park, Kim *et al.*, 2009) e 8 células em humanos (Guo, Zhu *et al.*, 2014) e macacos (Gao, Niu *et al.*, 2017). A partir desse momento ocorre o primeiro evento de diferenciação celular do embrião, na formação da massa celular interna (MCI), que originará as células do futuro feto, e do trofoectoderma (TE), que dará origem à placenta, sendo que este último adquire níveis mais baixos de metilação do que a MCI (Reik, Dean *et al.*, 2001; Morgan, Santos *et al.*, 2005).

O processo de remetilação do DNA é essencial para dar início ao processo de diferenciação celular e formação dos diferentes tecidos do organismo (Shemer, Walsh *et al.*, 1990; Del Arco e Izquierdo, 1993). Além disso, é justamente nessa fase do início da embriogênese, na qual ocorre alta síntese de DNA com o concomitante estabelecimento do padrão de metilação *de novo* do DNA, que o embrião é mais vulnerável aos fatores ambientais, sendo portanto susceptíveis aos efeitos das ARTs, como a PIVE. Fatores externos aos quais fêmeas gestantes são expostas podem desencadear alterações epigenéticas tanto na progênie diretamente (geração F1), afetando a reprogramação das células somáticas pluripotentes do embrião em formação, quanto na progênie da geração F1 (geração

F2), afetando a reprogramação das células germinativas primordiais em formação (Faulk e Dolinoy, 2014).

### **1.1.3 Modificações pós-traducionais de Histonas**

Dentre as mais importantes alterações epigenéticas destacam-se as modificações pós-traducionais das histonas. Estas são proteínas que se caracterizam por seu estado básico, tendo assim alta afinidade pelo caráter ácido da molécula de DNA. Juntos, DNA e histonas se estruturam em nucleossomos, formando o arcabouço da cromatina. A estrutura básica do nucleossomo é composta da molécula de DNA e um octâmero de histonas – duas histonas H2A, duas H2B, duas H3 e duas H4, as quais são conectadas por uma histona H1 (Li, Lu *et al.*, 2013).

Essas proteínas são susceptíveis a um vasto número de modificações pós-traducionais que ocorrem nas suas caudas amino terminais, as quais se projetam para fora da estrutura dos nucleossomos (Bannister e Kouzarides, 2011). Dependendo da modificação, quantidade de modificações, resíduo de aminoácido no qual a modificação ocorre e a histona que sofre a modificação, a expressão gênica pode ser inibida ou ativada, controlando finamente a maquinaria transcricional da célula (Strahl e Allis, 2000; Eglen e Reisine, 2011).

As principais modificações às quais as histonas estão sujeitas são a metilação de resíduos de arginina (R), metilação, acetilação, ubiquitinação, ADPRibosilação e SUMOilação de resíduos de lisina (K) e fosforilação de resíduos de serina (S) e treonina (T) (Smolle e Workman, 2013). Além dessas, outras modificações que podem ocorrer são glicosilação, deaminação, butirilação, biotinilação, N-formilação e isomerização de prolina (P) (Kouzarides, 2007). Essas modificações podem alterar os padrões de contato do DNA com o octâmero de histonas, influenciando diretamente a estrutura da cromatina (Smolle e Workman, 2013).

O processo de metilação de histonas ocorre com a adição de um grupo metil em resíduos de lisina ou arginina das histonas H3 e H4 (Xu e Andreassi, 2011). Resíduos de lisina, incluindo H3K4, H3K9, H3K27 e H3K36 podem ser mono, di ou trimetilados, sendo esse um processo reversível (Shi, Lan *et al.*, 2004). A metilação

e a desmetilação de histonas são processos catalisados por enzimas Histonas Metiltransferases (HMTs) e Histonas Desmetilases (HDMTs), respectivamente, sendo que sua expressão ocorre de uma maneira tecido-específica (Xu e Andreassi, 2011).

A acetilação é o processo epigenético mais estudado a nível de histonas, e é responsável por modificações mais bruscas no comportamento da cromatina do que a metilação, pois neutraliza a carga elétrica da histona, diminuindo a sua afinidade pelo DNA (Hasan e Hottiger, 2002). Os processos de acetilação e desacetilação de histonas são catalisados por grupos de enzimas Histona Acetiltransferases (HATs) e Histona Desacetilases (HDACs), respectivamente. As HATs transferem grupos acetil do composto acetil-CoA para grupos amino dos resíduos de lisinas das histonas (Eglen e Reisine, 2011; He, Han *et al.*, 2017), sendo um processo que normalmente induz à expressão gênica, já que as histonas acetiladas perdem o caráter básico e, conseqüentemente, diminuem sua afinidade pelo DNA, “afrouxando” a cromatina. Já as HDACs compreendem uma família de enzimas que removem os grupos acetil das histonas, tornando-as mais básicas e aumentando a interação com a molécula de DNA. Há quatro classes de HDACs que se diferenciam por sua sequência, estrutura e localização celular (De Ruijter, Van Gennip *et al.*, 2003; Eglen e Reisine, 2011).

O processo de fosforilação de histonas adiciona carga negativa à histona, diminuindo sua afinidade pelo DNA, estando assim relacionado com a ativação da transcrição, sendo importante nos processos de apoptose celular, mitose e meiose (Wang, Wu *et al.*, 2012). A SUMOilação de histonas possui função contrária, estando envolvida com o silenciamento da transcrição (Nathan, Sterner *et al.*, 2003). Já a ubiquitinação possui função de ativação ou repressão transcricional de acordo com o resíduo de lisina que recebe essa alteração (Wilkinson, 1987).

As alterações das histonas, especialmente acetilação e metilação, tem a função de modular a expressão gênica durante a gametogênese e embriogênese, participando, juntamente com a metilação do DNA, da reprogramação epigenética que acontece nessas fases de desenvolvimento. Assim, elas contribuem de maneira efetiva para o estabelecimento dos corretos padrões transcricionais durante o desenvolvimento embrionário (Chambers e Shaw, 1987; Kubicek, Schotta *et al.*, 2006).

#### 1.1.4 *Imprinting* Genômico

Experimentos de transferência pronuclear isoparental, realizados em camundongos no início da década de 1980, mostraram que as contribuições genéticas paternas e maternas não são equivalentes, estando sujeitas à regulação parental diferencial (Mcgrath e Solter, 1984), sendo essa diferença indispensável para o desenvolvimento embrionário normal. Uma considerável proporção de genes em mamíferos e fanerógamas está reprimida em apenas um cromossomo e sua transcrição ocorre de acordo com a sua origem parental (Wutz, Smrzka *et al.*, 1997; Reik e Dean, 2001; Manipalviratn, Decherney *et al.*, 2009). O que controla esse processo é, basicamente, a metilação do DNA diferencial entre os genomas paterno e materno. Esse processo é conhecido como *imprinting* genômico, e é estabelecido durante a gametogênese de acordo com o sexo do embrião. Durante a reprogramação epigenética os padrões de metilação dos genes *imprinted* das CGP são apagados, provavelmente próximo do dia 12 de desenvolvimento embrionário em camundongos, e depois reestabelecidos de acordo com o padrão do gameta masculino ou feminino (Reik e Walter, 2001; Manipalviratn, Decherney *et al.*, 2009). Durante a segunda “onda” de desmetilação do genoma, os genes *imprinted* são protegidos de sofrerem desmetilação após a fecundação, provavelmente devido à ação de produtos dos genes de pluripotência – como a *Developmental Pluripotency-Associated Protein 3* (DPPA3) – que os protegem da ação das enzimas TETs nessa fase de desenvolvimento, garantindo a transmissão à progênie dos padrões *imprinted* advindo dos gametas (Reik e Walter, 2001; Manipalviratn, Decherney *et al.*, 2009; Proudhon, Duffie *et al.*, 2012; Macdonald e Mann, 2014).

Em mamíferos os genes *imprinted* estão relacionados com a regulação do crescimento fetal, desenvolvimento pós-natal, comportamento e metabolismo (Hall, 1997; Reik e Walter, 2001; Daelemans, Ritchie *et al.*, 2010), o que levou à teoria do conflito genético, segundo a qual os genes paternalmente expressos tendem a aumentar o tamanho fetal a fim de extrair o máximo de nutrientes das fêmeas para que seus descendentes obtenham maior sucesso evolutivo. Em contrapartida, os genes de origem materna precisam ser mais conservativos para que o potencial materno não se esgote em uma única prole, o que justifica a tendência para que

genes maternalmente expressos suprimam o crescimento fetal (Moore e Haig, 1991). Distúrbios nesse “equilíbrio” da expressão gênica podem causar anomalias, como as Síndromes de *Prader Willi* e *Angelman* observadas em humanos (Frost e Moore, 2010).

A expressão dos genes *imprinted* é diferenciada dependendo se o cromossomo que os contém for de origem materna ou paterna (Feil, Walter *et al.*, 1994; Hall, 1997; Reik e Walter, 2001). Ou seja, nesses genes, apenas um alelo está ativo enquanto o outro está quase completamente silenciado (Daelemans, Ritchie *et al.*, 2010). Essas marcas sexo-específicas são proporcionadas principalmente por metilação do DNA em pequenas regiões desses genes ricas em CpGs, denominadas *germline Differentially Methylated Regions* (gDMRs) (Gebert, Wrenzycki *et al.*, 2009). As gDMRs podem ser classificadas em transientes (tDMRs) ou *imprinted* DMRs (iDMRs). As iDMRs não sofrem desmetilação após a fecundação (Proudhon, Duffie *et al.*, 2012; Macdonald e Mann, 2014), porém as tDMRs são maioria dentre as gDMRs, sofrendo reprogramação durante a embriogênese inicial (Smallwood, Tomizawa *et al.*, 2011; Macdonald e Mann, 2014). Dessa forma, somente a presença de uma gDMR não caracteriza um gene *imprinted* (Macdonald e Mann, 2014).

Genes *imprinted* raramente são encontrados isolados, sendo que cerca de 80% deles estão organizados em *clusters* juntamente com outros genes *imprinted* (Reik e Walter, 2001; Manipalviratn, Decherney *et al.*, 2009), o que permite sua regulação coordenada no domínio cromossomal. O controle da expressão de um *cluster* formado por mais de um gene *imprinted* no genoma de mamíferos é feito através de regiões específicas, denominadas *Imprinting Centers* (IC) ou *Imprinting Control Regions* (ICR) (Ohlsson, Paldi *et al.*, 2001; Reik e Walter, 2001; Verona, Mann *et al.*, 2003).

Um exemplo clássico de regulação *imprinted* é o modelo de regulação dos genes *Insulin-Like Growth Factor 2* (IGF2) e H19 (*H19 Imprinted maternally expressed transcript*) (Murrell, Heeson *et al.*, 2004). O gene IGF2 está envolvido em eventos primordiais na embriogênese, no crescimento fetal, diferenciação tecidual e desenvolvimento da placenta (Gebert, Wrenzycki *et al.*, 2006; Frost e Moore, 2010), sendo sua expressão de origem paterna e cujo controle é bastante complexo. A regulação da expressão do gene IGF2 em camundongos ocorre

através das DMR 0, DMR 1 e DMR 2. A DMR 0 está localizada no pseudo-éxon 1, sendo específica de placenta e maternalmente metilada (Moore, Constancia *et al.*, 1997). Já as DMR 1 e DMR 2 são paternalmente metiladas, estando a primeira localizada no promotor do gene IGF2 e segunda localizada dentro do último éxon desse gene (Feil, Walter *et al.*, 1994; Moore, Constancia *et al.*, 1997; Murrell, Heeson *et al.*, 2004; Gebert, Wrenzycki *et al.*, 2006; Ideraabdullah, Vigneau *et al.*, 2008; Paradowska, 2009; Franco, Prickett *et al.*, 2014). O gene IGF2 compartilha o mesmo *cluster* com o gene H19, cuja expressão é de origem materna. A presença de um *enhancer* que participa da expressão dos genes IGF2 e H19 permite um fino controle da expressão de ambos os genes, principalmente devido à presença de uma ICR localizada no gene H19.

No alelo materno a característica desmetilada da ICR possibilita a ligação do fator de repressão CTCF (Fator de Ligação CCCTC) e sua associação com a DMR 1 do IGF2. Isto possibilita uma configuração da cromatina para um estado de ativação do gene H19 pela presença do *enhancer* próximo ao promotor deste gene, e um domínio inativo do gene IGF2. Já no alelo paterno a ICR metilada associa-se com a DMR 2 do gene IGF2, também metilada, configurando um domínio de cromatina ativa para o gene IGF2 – pela proximidade do *enhancer* ao promotor do gene IGF2 – e um domínio inativo para o gene H19 (Murrell, Heeson *et al.*, 2004; Chao e D'amore, 2008; Ideraabdullah, Vigneau *et al.*, 2008; Paradowska, 2009).

Embora o *imprinting* genômico seja coordenado principalmente por metilação do DNA em regiões de iDMRs, outros fatores epigenéticos estão associados com a característica *imprinted*, tal como alterações de histonas. Um estudo recente confirmou que especificamente a trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3) é a marca *imprinted* do transcrito específico do X inativo (XIST) em ovócitos e embriões de camundongos, resultando no silenciamento materno de XIST nesta espécie (Inoue, Jiang *et al.*, 2017).

### 1.1.5 RNAs não-codantes

O dogma central da Biologia (DNA → RNA → Proteína) (Crick, 1958) cai por terra no anos 1970, com a descoberta de uma classe de RNAs mensageiros (RNAm) que não são traduzidos em proteínas (Adams e Cory, 1970). São os

chamados RNAs não-codantes (ncRNA). Estima-se que aproximadamente apenas 2% de todos os transcritos produzidos no genoma de eucariotos são traduzidos em proteínas (Di Mauro e Catalucci, 2017). Uma grande parte é composta por ncRNA, os quais são RNA funcionais, regulando a expressão gênica ao degradar RNAm ou participando de mecanismos pós-transcricionais, como o *splicing*. Fazem parte desse grupo de ncRNA os *transfer RNAs (tRNA)*, *ribosomal RNA (rRNA)*, *small interfering RNAs (siRNAs)*, *microRNAs (miRNAs)* and *long ncRNAs (lncRNAs)* (Kaikkonen, Lam *et al.*, 2011; Liu e Lu, 2012; Gomes, Nolasco *et al.*, 2013).

Os lncRNAs possuem funções regulatórias importantes, já que atuam na coordenação da transcrição gênica (como moduladores epigenéticos), compartimentalização nuclear e regulação gênica pós-transcricional (Lee, 2012; Greco, Gorospe *et al.*, 2015). Essa família de RNAs também possui função essencial no desenvolvimento embrionário, regulando a expressão de fatores de pluripotência, assim como no padrão de expressão gênica tecido-específico (Sheik Mohamed, Gaughwin *et al.*, 2010). Além disso, os lncRNAs desempenham funções cruciais no controle da inativação do cromossomo X durante a embriogênese inicial (Ponting, Oliver *et al.*, 2009; Inbar-Feigenberg, Choufani *et al.*, 2013).

## 1.2 INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Milhares de anos atrás os cromossomos sexuais começaram a se diferenciar dos cromossomos autossômicos, possivelmente com o advento da reprodução sexuada, uma importante estratégia de adaptação evolutiva, imprescindível para a diversidade genética observada nos dias de hoje. Nesse momento, possivelmente a maioria dos genes estavam presentes tanto no cromossomo X quanto no cromossomo Y (Pessia, Makino *et al.*, 2012), não existindo, portanto, nenhuma diferença entre os produtos de expressão dos dois cromossomos (Gribnau e Grootegeod, 2012). Como consequência do fato do cromossomo Y nunca sofrer recombinação, ele acabou sofrendo uma “degradação” gradual (Charlesworth e Charlesworth, 2000). Isso possibilitou o aumento das diferenças relacionadas aos produtos gênicos entre fêmeas e machos (Gribnau e Grootegeod, 2012; Pessia, Makino *et al.*, 2012). Assim, mecanismos de compensação de dose evoluíram com o intuito de diminuir ou extinguir o excesso de expressão de X em relação ao Y.

Como um exemplo tem-se a espécie *Tribolium castaneum* (besouro castanho) e outros insetos, nos quais o cromossomo X do macho expressa em dobro seus genes, quando comparados com os cromossomos X das fêmeas (Meller e Kuroda, 2002; Prince, Kirkland *et al.*, 2010). Já os vermes hermafroditas conservam ambos os cromossomos X ativos, mas reduzem pela metade a expressão de cada um deles (Meyer e Casson, 1986).

Em mamíferos, a inativação de um cromossomo X (ICX), que ocorre durante o desenvolvimento embrionário inicial, foi a estratégia evolutiva escolhida para compensar o desbalanço da produção gênica entre os sexos homo (fêmea) e heterogamético (macho). Nesse processo, um dos cromossomos X é silenciado (Lyon, 1961; Augui, Nora *et al.*, 2011; Teklenburg, Weimar *et al.*, 2012). Quando um cromossomo X é aleatoriamente inativado em uma determinada célula (X paterno – Xp ou materno – Xm), toda a sua descendência mantém o mesmo cromossomo X originalmente escolhido para ser inativado, gerando um “mosaicismo” nos tecidos femininos (Nesbit, 1971).

Embora seja um evento que acontece com as fêmeas de todos os representantes da classe dos mamíferos durante a fase embrionária inicial, existem diferenças importantes entre as espécies. Nos mamíferos metatérios, a ICX é *imprinted*, sendo que o cromossomo X a ser inativado é exclusivamente o de origem paterna (Sharman, 1971; Furlan e Rougeulle, 2016). Nesses indivíduos, a ICX é “orquestrada” por um lncRNA chamado *RNA on the silent X* (RSX), o qual parece ter surgido evolutivamente há aproximadamente 100 milhões de anos (Grant, Mahadevaiah *et al.*, 2012; Furlan e Rougeulle, 2016). Algumas espécies de eutérios (placentários), como roedores e bovinos, conservaram a característica *imprinted* da ICX, porém apenas na embriogênese inicial, antes da implantação, e nos anexos extraembrionários (Furlan e Rougeulle, 2016). Nas células que originarão os tecidos do futuro organismo, após a fase embrionária, a ICX é do tipo randômica com inativação aleatória do Xp ou Xm (Monk e Harper, 1979; Mak, Nesterova *et al.*, 2004; Okamoto, Otte *et al.*, 2004; Dupont e Gribnau, 2013). Em outras espécies, tais como humanos e coelhos, a ICX é exclusivamente randômica (Okamoto, Patrat *et al.*, 2011). A característica randômica da ICX resulta em mosaicismos, o qual é importante para a diversidade fisiológica e, em alguns casos, sobrevivência das fêmeas (Yue, Charles Richard *et al.*, 2016). A inativação *imprinted* é bastante



instável e depende de uma expressão contínua do *X-Inactive Specific Transcript* (XIST), enquanto a inativação randômica é mais estável, mesmo na ausência de transcrição de XIST (Dupont, Maduro *et al.*, 2016).

### 1.2.1 O ciclo da inativação do cromossomo X no modelo camundongo

Dentre os mamíferos, a ICX é mais bem conhecida na espécie murina (Payer, Lee *et al.*, 2011; Oikawa, Inoue *et al.*, 2014). A inativação *imprinted* do X ocorre primeiramente nos estágios iniciais do desenvolvimento. Em camundongos, no estágio embrionário de 2-células o Xp é preferencialmente inativado (Huynh e Lee, 2003; Okamoto, Otte *et al.*, 2004). Isso acontece possivelmente devido ao processo de inativação dos cromossomos sexuais meióticos (ICSM) (Turner, Mahadevaiah *et al.*, 2005), que acontece durante a espermatogênese (Huynh e Lee, 2003). Durante a fase de paquíteno da prófase da meiose I da gametogênese masculina as regiões não-homólogas dos cromossomos X e Y sofrem o processo da ICSM, um fenômeno que se acredita suprimir a recombinação entre as cromatinas não-homólogas dos cromossomos sexuais. Como resultado, tem-se que 85% da "cromatina sexual pós-meiótica" permanece reprimida transcricionalmente durante a espermiogênese. Isso confere ao Xp um estado de "pré-inativação" após a fecundação do ovócito pelo espermatozoide (Namekawa, Park *et al.*, 2006; Turner, Mahadevaiah *et al.*, 2006), sendo que todas as células embrionárias têm o seu Xp silenciado até o estágio de mórula. Após a primeira diferenciação celular e durante o estágio de peri-implantação, a inativação *imprinted* do Xp é mantida apenas nas células do trofoectoderma (TE), que originarão os tecidos extraembrionários (Takagi e Sasaki, 1975; Okamoto, Otte *et al.*, 2004). Por outro lado, nas células da massa celular interna (MCI), o Xp é reativado e um dos cromossomos X é aleatoriamente inativado (Mak, Nesterova *et al.*, 2004; Okamoto, Otte *et al.*, 2004), sendo que ambos os cromossomos X têm a mesma chance de serem inativados (Lyon, 1961).

A característica *imprinted* da ICX durante a embriogênese inicial de camundongos e nas células do trofoectoderma ocorre sob o controle dos genes XIST, cuja transcrição é controlada pela marca H3K27me3 (Inoue, Jiang *et al.*, 2017), e do seu transcrito *antisense* TSIX, sendo ambos produzidos no

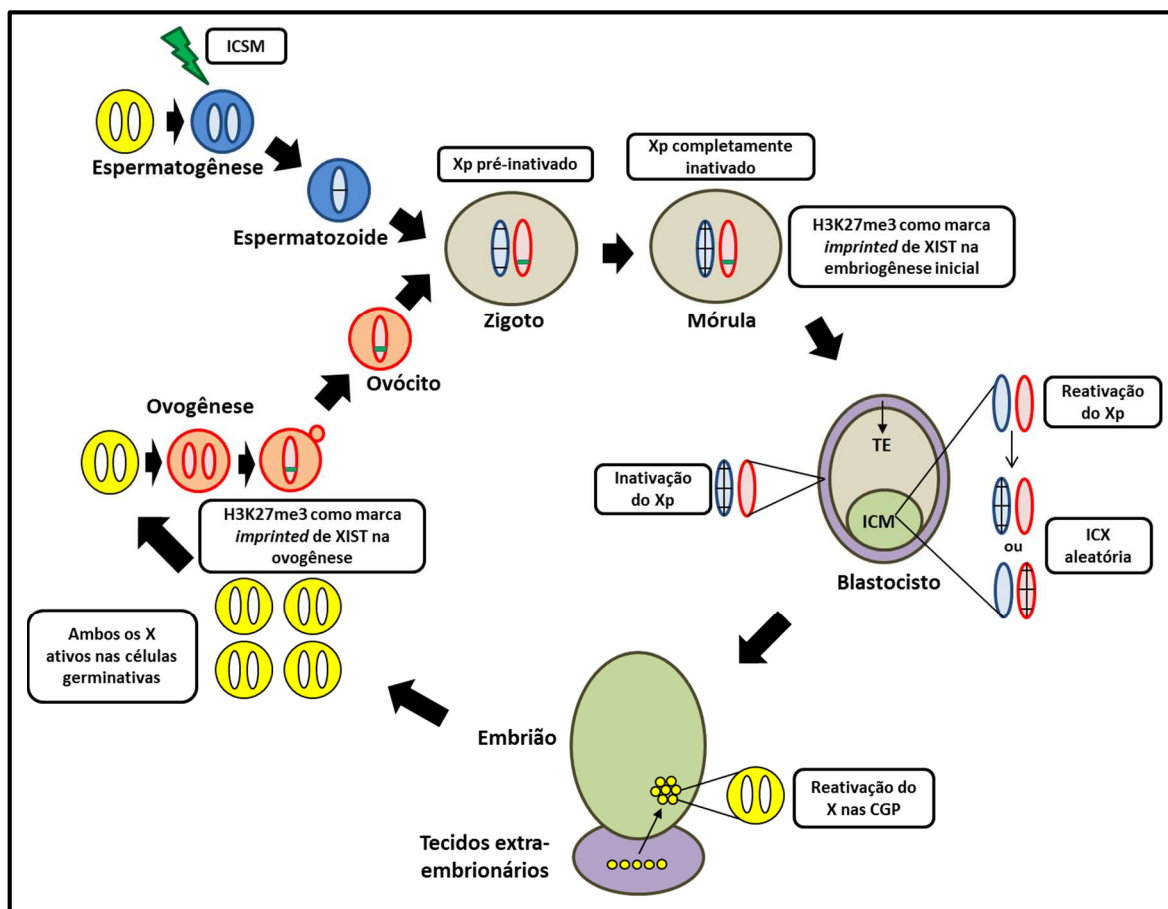
cromossomo X inativo e ativo, respectivamente (Lee, Davidow *et al.*, 1999; Lee e Lu, 1999; Payer, Lee *et al.*, 2011). A transcrição *imprinted* de XIST no cromossomo X paterno e o seu acúmulo em *cis* no cromossomo, recruta uma série de fatores de silenciamento transcricional, os quais auxiliam na compactação da cromatina e no silenciamento do cromossomo X paterno (Okamoto e Heard, 2009). O cromossomo de origem materna, por outro lado, adquire marcas durante a ovogênese que o mantém “resistente” à transcrição do XIST e, consequentemente, à inativação (Tada, Obata *et al.*, 2000).

A reativação do X paterno nas células da mórula que originarão a MCI ocorre concomitantemente à expressão de alguns genes de pluripotência nessas células, como *POU class 5 homeobox 1* (POU5F1 ou OCT4), *Nanog homeobox* (NANOG), *SRY (sex determining region Y)-box 2* (SOX2) e REX1, os quais modulam XIST negativamente e estimulam a expressão de TSIX (Navarro, Chambers *et al.*, 2008; Navarro, Oldfield *et al.*, 2010; Gontan, Achame *et al.*, 2012). Próximo à implantação, ambos os cromossomo X das células da MCI de blastocistos murinos ficam em contato físico, evento que se denomina “pareamento dos cromossomos X” (Bacher, Guggiari *et al.*, 2006; Xu, Tsai *et al.*, 2006). Esse contato permite a expressão aleatória de XIST em um dos cromossomos X, impedindo a sua expressão no cromossomo que deverá permanecer inativo (Monkhorst, Jonkers *et al.*, 2008; Barakat, Jonkers *et al.*, 2010; Dupont e Gribnau, 2013). O cromossomo X, após ser inativado, localiza-se preferencialmente no espaço perinucleolar durante a fase S do ciclo celular, a fim de manter o seu estado inativo (Zhang, Huynh *et al.*, 2007) ou localiza-se na periferia nuclear (Ohno, Kaplan *et al.*, 1958).

As células da MCI originam as CGP. Durante a migração e a colonização das gônadas em formação pelas CGP, um ciclo de reprogramação epigenética ocorre, na qual estas células perdem todo o padrão de metilação, incluindo as marcas *imprinted* (Shovlin, Durcova-Hills *et al.*, 2008). Após a colonização, essas células começam a se diferenciar em células precursoras dos gametas (ovogônias ou proespermátogônias dependendo do sexo do indivíduo), adquirindo um padrão específico de metilação sexo-dependente (Bowles e Koopman, 2007; Kobayashi, Sakurai *et al.*, 2012; Shirane, Toh *et al.*, 2013). Nas fêmeas, durante essa fase pré-natal da gametogênese, um segundo ciclo de reativação do cromossomo X acontece, na qual o cromossomo X inativo (independente da sua origem parental)

perde os fatores de silenciamento e é reativado (De Napoles, Nesterova *et al.*, 2007; Sugimoto e Abe, 2007). Assim, ambos os cromossomos X, materno e paterno, permanecem em um estado ativo nas células precursoras dos gametas e adquirem uma marca *imprinted*, a qual protege esse cromossomo (futuro Xm) de ser inativado após a fecundação (De Napoles, Nesterova *et al.*, 2007).

Um esquema do ciclo de ICX em embriões fêmeas de camundongos está mostrado na Figura 1.



**Figura 1: Ciclo da inativação do cromossomo X (ICX) em embriões fêmeas de camundongos.** Assim que ocorre a fecundação inicia-se um gradual processo de inativação do cromossomo X paterno (Xp) (possivelmente em consequência ao processo de inativação dos cromossomos sexuais meióticos - ICSM) até o estágio de mórula, no qual o Xp está completamente inativado. Já o cromossomo X materno (Xm) permanece ativo no final da ovogênese e em embriões pré-implantação, devido à marca *imprinted* de XIST H3K27me3 (pequeno retângulo verde no Xm; parte superior da figura). Nos embriões em estágio de blastocisto (à direita na figura) e próximo à implantação, as células do trofoectodermia (TE) mantêm o Xp inativo. Já as células da massa celular interna (ICM) reativam seu Xp e sofrem uma ICX aleatória, inativando ou o Xp ou o Xm. Durante o desenvolvimento embrionário algumas das células da ICM originam as células germinativas primordiais (CGP) (parte inferior da figura), as quais se reprogramam epigeneticamente, reativando o seu X inativo. Como resultado, ambos os cromossomos X das CGP permanecem ativos quando elas migram e colonizam a crista gonadal. Essas células, precursoras dos ovócitos, recebem uma marca (H3K27me3) que possibilita o futuro Xm do ovócito a resistir à ICX após a fecundação pelo espermatozoide.

### 1.2.2 Fatores envolvidos na inativação do cromossomo X em camundongos

Uma gama de ncRNA, complexos proteicos e genes de pluripotência está envolvida na ICX, pelo menos em camundongos. Associados a outros ou atuando isoladamente, esses fatores possibilitam o estabelecimento de eventos epigenéticos e, conseqüentemente, o remodelamento da cromatina. Dentre os eventos epigenéticos que coordenam o processo da ICX destacam-se a metilação do DNA e alterações de histonas (Chang, Tucker *et al.*, 2006).

#### 1.2.2.1 XIST

Na região do XIC (*X Inactivation Centre*) é produzido o XIST, o qual é um transcrito não-codante de 17 kb em camundongos (após o processamento) (Brown, Hendrich *et al.*, 1992; Hong, Ontiveros *et al.*, 1999) e sujeito a *splicing* alternativo e poliadenilação (Hong, Ontiveros *et al.*, 1999; Memili, Hong *et al.*, 2001). Como é sujeito a *splicing* alternativo, é possível a geração de várias isoformas de RNA XIST, as quais podem ser produzidas de uma forma tecido ou sexo-dependente (Brown, Hendrich *et al.*, 1992; Hong, Ontiveros *et al.*, 1999; Memili, Hong *et al.*, 2001; Ma e Strauss, 2005; Kim, Choi *et al.*, 2015). A sua estrutura molecular, em termos de número de éxons e quantidade de sequências repetitivas é relativamente conservada entre as espécies de mamíferos eutérios, mas a sequência de nucleotídeos pode variar de forma espécie-específica (Nesterova, Slobodyanyuk *et al.*, 2001; Chureau, Prissette *et al.*, 2002; Hoki, Kimura *et al.*, 2009).

Esse transcrito é um dos mais importantes fatores para a iniciação da ICX, atuando em *cis* ao longo do cromossomo em que é transcrito para realizar o silenciamento cromossomal (Mohandas, Sparkes *et al.*, 1981; Hall, 1991; John e Surani, 1996; Duthie, Nesterova *et al.*, 1999; Simon, Tenzen *et al.*, 1999; Augui, Nora *et al.*, 2011; Wijchers e Festenstein, 2011). Ele é responsável por recrutar complexos enzimáticos catalisadores de adição de fatores epigenéticos de silenciamento durante a embriogênese, tais como o *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2), que catalisa a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) e o *Polycomb Repressive Complex 1* (PRC1), responsável pela ubiquitinação da

histona H2A (H2Aub) (Fang, Chen *et al.*, 2004; Chaumeil, Le Baccon *et al.*, 2006; Cerase, Pintacuda *et al.*, 2015). Além disso, foi observada a perda de marcas de histonas relacionadas com um estado de eucromatina, como metilação da lisina 4 da histona 3 (H3K4me) e acetilação da histona H3 (H3ac) logo após a expressão do RNA XIST (Chaumeil, Le Baccon *et al.*, 2006). Outras marcas epigenéticas repressivas, como a presença da histona macroH2A e a metilação do DNA são incorporadas no Xi de forma XIST-dependente a fim de estabilizar o cromossomo inativo (Wutz, 2011).

A estrutura genômica XIST é complexa. Aproximadamente seis grupos de regiões repetitivas (*repeats*) em *tandem* se posicionam dentro do XIST, e parecem ser bastante conservadas no genoma das espécies de mamíferos (Gendrel e Heard, 2014). Em camundongos, foram identificadas as seis regiões repetitivas, denominadas de A a F (*Repeats A-F*) (Brown, Hendrich *et al.*, 1992; Nesterova, Slobodyanyuk *et al.*, 2001). A origem evolutiva dessas regiões é variável. Os *Repeats A*, *C* e *D* tem, como provável origem, retrovírus endógenos (Wutz, Rasmussen *et al.*, 2002; Elisaphenko, Kolesnikov *et al.*, 2008). O *Repeat F* foi, provavelmente, originado de *transposons* de DNA, o *Repeat B* é uma região de microsatélites, enquanto o *Repeat E* consiste em uma região IAP (*intracisternal A particle*) (Nesterova, Slobodyanyuk *et al.*, 2001; Elisaphenko, Kolesnikov *et al.*, 2008).

As funções dessas regiões repetitivas ainda não foram totalmente elucidadas, mas estudos mostram que sua conformação espacial e estrutura molecular no RNA XIST parecem favorecer a ligação ou recrutamento de fatores importantes para a ICX (Lu, Carter *et al.*, 2017). O RNA XIST parece interagir com o fator de transcrição *Ying Yang 1* (YY1) através do *Repeat C*, por exemplo, prendendo o RNA XIST ao centro de nucleação do Xi em *cis* (Jeon e Lee, 2011). O *Repeat E*, que é o único fora do éxon 1 em camundongos, também tem um papel importante na localização do RNA XIST na cromatina ao se complexar com a proteína de associação à matriz nuclear *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U* (HNRNPU), além de estar relacionado com a expressão de genes do cromossomo X que escapam à inativação (Yue, Ogawa *et al.*, 2017). Já os *Repeats B* e *F* parecem ser responsáveis pelo recrutamento da *Jumonji and AT-Rich Interaction Domain containing 2* (JARID2), um cofator do PRC2, para o Xi (Da

Rocha, Boeva *et al.*, 2014). Por outro lado, as regiões *Repeats A* e *D* agem diretamente no processo de ICX. A importância do *Repeat D* foi recentemente estudada. Sabe-se que ele regula XIST positivamente, controlando o processo de ICX, embora não se saiba o mecanismo exato pelo qual isso ocorre (Lv, Yuan *et al.*, 2016). Dentre todas, a região *Repeat A* parece ser a mais importante para o processo de iniciação e manutenção do cromossomo X inativo (Wutz, Rasmussen *et al.*, 2002; Zhao, Sun *et al.*, 2008).

Há mais de três décadas a metilação do DNA tem sido proposta como sendo uma das principais responsáveis pelo “gatilho” da inativação do cromossomo X em embriões femininos (Monk, Boubelik *et al.*, 1987). O gene XIST em camundongos apresenta dinucleotídeos CpG na sua porção inicial (incluindo a região promotora) com algumas características de ilha CpG, porém, não é muito rico nesses dinucleotídeos (Norris, Patel *et al.*, 1994). Estudos mostraram que a metilação nesses CpGs da região promotora está relacionada com a repressão da transcrição desse gene (Hendrich, Brown *et al.*, 1993), além de ser responsável por estabelecer os padrões *imprinted* observados na embriogênese inicial de camundongos, com a inativação do Xp (Ariel, Robinson *et al.*, 1995). No entanto, a presença de dinucleotídeos CpG na região promotora de XIST não é bem conservada entre as espécies de mamíferos, sendo que outras regiões ricas em CpG regulam a expressão desse gene, como no éxon 1 para bovinos, a qual se caracteriza por ser uma DMR relacionada com a coordenação da expressão de XIST (Penny, Kay *et al.*, 1996; Marahrens, Panning *et al.*, 1997; Dindot, Kent *et al.*, 2004; Borensztein, Syx *et al.*, 2017).

Em camundongos, sugere-se que a regulação da transcrição do gene XIST é dependente de fatores de pluripotência, como OCT4 e SOX2, que atuam de forma a reprimir a expressão de XIST de uma maneira alelo específica durante as fases iniciais de desenvolvimento embrionário (Navarro e Avner, 2009). Além disso, o fator *Ring Finger Protein 12* (RNF12) é altamente expresso durante as clivagens iniciais do embrião murino, o que parece estar relacionado com a ativação de XIST no Xp ou a degradação de REX1, repressor de XIST, nesse mesmo cromossomo (Shin, Bossenz *et al.*, 2010; Dupont e Gribnau, 2013). Assim, em camundongos, a inativação do cromossomo X *imprinted* parece ser resultado de um elaborado

controle entre fatores que estimulam a expressão de XIST no Xp e impedem sua expressão no Xm.

#### **1.2.2.2 Rep A**

A região repetitiva *A* (*Rep A*) localiza-se no início do éxon 1, na posição +310...737 em camundongos (GenBank M97167.1) (Brockdorff, Ashworth *et al.*, 1992) e +3480...770 em humanos (GenBank M97168.1) (Brown, Hendrich *et al.*, 1992). Das regiões repetitivas do XIST é a mais conservada entre os mamíferos (Maenner, Blaud *et al.*, 2010).

A região do *Rep A* é capaz de transcrever um ncRNA funcional em camundongos, o qual tem um papel crucial na função do silenciamento do X (Wutz, Rasmussen *et al.*, 2002; Zhao, Sun *et al.*, 2008; Hoki, Kimura *et al.*, 2009). Embora esteja presente em células de ambos os sexos antes da ICX em camundongos, sua expressão é exclusivamente em células de fêmeas após o processo de ICX (Zhao, Sun *et al.*, 2008). Sua estrutura é bastante conservada entre as espécies de mamíferos placentários, formando uma estável estrutura *tetraloop* em “grampo” (Duszczuk, Wutz *et al.*, 2011).

O transcrito *Rep A* é responsável por espalhar, em *cis*, o transcrito de XIST ao longo do cromossomo X que será inativado (Engreitz, Pandya-Jones *et al.*, 2013). Isso provavelmente é possível pelo fato de se ligar diretamente nos componentes do PRC2, especialmente EZH2 e SUZ12, recrutando o complexo proteico para o Xi via RNA XIST (Zhao, Sun *et al.*, 2008; Maenner, Blaud *et al.*, 2010), mantendo assim o padrão de X inativo (Furlan e Rougeulle, 2016). Outros estudos, entretanto, mostram que PRC2 pode ser recrutado para XIST na ausência de *Rep A* (Plath, Fang *et al.*, 2003; Kohlmaier, Savarese *et al.*, 2004), evidenciando que outras regiões dentro do RNA XIST recrutam PRC2 com ou independentemente do *Rep A* (Maclary, Hinten *et al.*, 2013). De toda forma, *Rep A* auxilia na estabilização da interação PRC2 / XIST (Da Rocha, Boeva *et al.*, 2014).

### 1.2.2.3 TSIX

A região do XIC contém também o TSIX, um ncRNA *antisense* do XIST que exibe um padrão de expressão antagônico a XIST (Lee e Lu, 1999). Antes da ICX TSIX é expresso em ambos os cromossomos X. Após o início do processo de inativação, a expressão de TSIX permanece apenas no X que permanecerá ativo (Lee, Davidow *et al.*, 1999) e sua regulação é coordenada por uma região localizada entre 20 e 32 kb *downstream* a XIST conhecida por *X-inactivation intergenic transcription elements* (XITE) (Ogawa e Lee, 2003).

A expressão de TSIX é importante para a definição de qual cromossomo X ficará ativo. Esse gene parece ser muito importante para estabelecer o padrão de heterocromatina do promotor de XIST no futuro X ativo ao enriquecer a região promotora deste último com fatores de cromatina repressiva, como H3K9me e metilação de dinucleotídeos CpG (Navarro, Page *et al.*, 2006). Por outro lado, TSIX favorece o aumento de fatores relacionados à eucromatina ao longo de XIST, como ativação da H3K4me2 e repressão de H3K27me3 (Sun, Deaton *et al.*, 2006; Navarro, Chantalat *et al.*, 2009). Dessa forma, TSIX tem um papel essencial na transição do promotor de XIST de um estado de eucromatina para heterocromatina (Ohhata, Hoki *et al.*, 2008). Finalmente, TSIX recruta para o promotor de XIST a DNMT3A, a qual metila o promotor de XIST no futuro X ativo (Sado, Hoki *et al.*, 2005; Sun, Deaton *et al.*, 2006).

Assim, o controle preciso da expressão de XIST e TSIX regula o processo de ICX (Navarro e Avner, 2010). Neste sentido, foi mostrado que uma fita dupla de RNA formada pelos transcritos de XIST e TSIX pode estar envolvida na ICX, funcionando como um mecanismo de RNA de interferência ao ser clivada pela enzima *Dicer* (Ogawa, Sun *et al.*, 2008). Finalmente, TSIX parece estar envolvido com a transição da ICX de *imprinted* para randômica ao longo da evolução, já que a expressão bialélica de TSIX nos estágios pré-implantacionais de camundongos “apagam” as marcas epigenéticas relacionadas a ICX *imprinting*, tornando ambos os loci XIST (paterno e materno) epigeneticamente indistinguíveis e susceptíveis à inativação X aleatória (Navarro, Pichard *et al.*, 2005).



#### 1.2.2.4 Outros fatores envolvidos na inativação do cromossomo X

Sabe-se que XIST é muito pouco expresso em células-tronco (Penny, Kay *et al.*, 1996; Okamoto, Otte *et al.*, 2004). Isso pode ter relação com a alta expressão de fatores de pluripotência presentes nessas células, ou seja, em células no estágio de pré-ICX a expressão de XIST parecer ser reprimida diretamente por fatores de pluripotência, tais como OCT4, NANOG e SOX2, os quais se ligam na região do éxon 1 de XIST (Navarro, Chambers *et al.*, 2008; Donohoe, Silva *et al.*, 2009). Além disso, a expressão de XIST é inibida indiretamente pela regulação positiva de TSIX por fatores de pluripotência, como OCT4, REX1, c-MYC e *Kruppel like factor 4* (KLF4), os quais se ligam ao promotor de TSIX (Navarro e Avner, 2010) ou ao XITE, *enhancer* de TSIX (Donohoe, Silva *et al.*, 2009). Assim os fatores de pluripotência, juntamente com a expressão de TSIX, são importantes para manter XIST inativo em estágio de indiferenciação celular (Jeon, Sarma *et al.*, 2012).

A ICX é um processo que acontece como resultado de um delicado controle de expressão de XIST, realizado por um balanço entre repressores e ativadores da sua expressão (Tian, Sun *et al.*, 2010; Sun, Del Rosario *et al.*, 2013). Um ncRNA responsável por esse balanço é o *Expressed neighbour of Xist* (ENOX/JPX), o qual atua como um ativador de XIST e cuja presença é necessária para a contínua expressão de XIST no Xi, ou seja, na manutenção da ICX (Tian, Sun *et al.*, 2010). Outro importante ativador de XIST é o RNF12, um gene que codifica uma E3 ubiquitina ligase (RLIM) (Jonkers, Barakat *et al.*, 2009). É um potente ativador de XIST, atuando em *trans* (Jonkers, Barakat *et al.*, 2009; Navarro e Avner, 2010), especialmente no desenvolvimento embrionário (Barakat, Jonkers *et al.*, 2010). RLIM, produto da expressão de RNF12, está envolvido com a degradação de REX1 (Gontan, Achame *et al.*, 2012), sendo que a expressão de duas cópias ativas de RNF12 é essencial para a correta ICX (Barakat, Loos *et al.*, 2014).

O RNA XIST é responsável por recrutar o PRC2, o qual é fundamental para a formação da estrutura de heterocromatina do Xi (Maclary, Buttigieg *et al.*, 2014), pois catalisam alterações de histonas com características repressivas, como a ubiquitinação da lisina 119 da histona H2A (H2AK119ub) e especialmente a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) (Gieni e Hendzel, 2009; Sauvageau e Sauvageau, 2010; Surface, Thornton *et al.*, 2010; Margueron e

Reinberg, 2011). H3K27me3 é um marcador de silenciamento epigenético que é comumente utilizado para identificar o Xi em células somáticas de fêmeas (Teklenburg, Weimar *et al.*, 2012). O recrutamento de PRC2 ocorre, possivelmente, pela ação do RNA *Rep A*, que se liga às subunidades EZH2 e SUZ12 de PRC2 antes da ligação com o próprio RNA XIST, para que as marcas repressivas de histonas possam ser colocadas no Xi, o que aumenta ainda mais a expressão de XIST, propiciando o espalhamento do processo de inativação ao longo de todo o cromossomo (Zhao, Sun *et al.*, 2008; Maclary, Hinten *et al.*, 2013). Recentemente um estudo mostrou que um cofator do PRC2, JARID2, faz a mediação entre PRC2 e XIST através dos *repeats B e F* deste último (Da Rocha, Boeva *et al.*, 2014). Além de PRC2, o complexo PRC1 também parece ser recrutado para o Xi, o qual catalisa a H2AK119u, uma marca de histona repressiva que é essencial para recrutar PRC2 para o X inativo por meio de sua subunidade *Chromobox Homolog* (CBX) de PRC1 (Almeida, Pintacuda *et al.*, 2017).

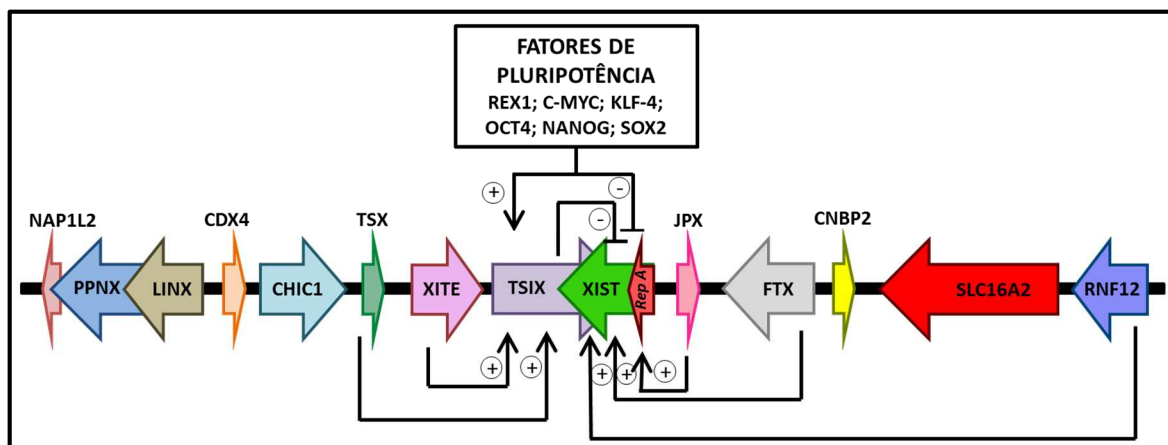
O processo de inativação do cromossomo X é complexo. Participam dele não só moléculas de RNA não-codantes e proteínas que são produzidas a partir de genes presentes no cromossomo X, mas também outros fatores que, além de outras funções distintas no genoma, também têm papel crucial na ICX. Um desses fatores é o *11-Zinc Finger Protein CTCF (CCCTC binding factor)*, ou simplesmente CTCF. No processo de ICX, ele tem um papel crucial no posicionamento do Xi no espaço perinucleolar durante a fase S da intérfase (Yang, Deng *et al.*, 2015). Essa localização é importante provavelmente para a manutenção e replicação da heterocromatina (Zhang, Huynh *et al.*, 2007), mantendo assim suas características epigenéticas (Yang, Deng *et al.*, 2015). Além disso, CTCF parece ter a função de mediar o pareamento dos dois cromossomos X no início da diferenciação celular – “gatilho” para a cascata de eventos moleculares que culminam com inativação de um dos cromossomos X (Xu, Donohoe *et al.*, 2007). Contudo, um estudo mais recente mostra que o pareamento dos cromossomos X não é fundamental para a ICX, sendo uma consequência desse processo (Barakat, Loos *et al.*, 2014). De toda forma, a interação de CTCF com OCT4, que ocorre com o pareamento dos cromossomos, permite uma distribuição assimétrica dos fatores de pluripotência entre os dois cromossomos, permitindo a ativação de XIST e a repressão de TSIX no futuro Xi (Donohoe, Silva *et al.*, 2009).

Vários outros fatores, oriundos ou não do cromossomo X, estão envolvidos principalmente na regulação de XIST. Um desses fatores, importantes para o início e manutenção da ICX, é o fator de transcrição *Ying Yang 1* (YY1), o qual é uma proteína *zinc finger* multifuncional e que pode se associar tanto ao promotor do XIST quanto do TSIX em camundongos (Makhlouf, Ouimette *et al.*, 2014). No processo de ICX, YY1 liga-se diretamente ao gene XIST através do *Repeat F* (Jeon e Lee, 2011), ativando o promotor de XIST nos mamíferos eutérios e permitindo sua expressão no Xi (Makhlouf, Ouimette *et al.*, 2014). *Five prime to XIST* (FTX) é outro fator presente no XIC que parece ter uma alta correlação com a ICX em muitas espécies de animais placentários. É formado por vários miRNAs, produz um transcrito não-codante que permanece no núcleo e controla positivamente a expressão de XIST em *cis* em células tronco embrionárias, evitando a metilação do promotor de XIST (Chureau, Chantalat *et al.*, 2011).

Outro ncRNA atuante no processo de ICX é o *Testes-specific X-linked* (TSX), também presente no XIC. Ao longo da evolução, parece ter surgido na transição da ICX *imprinted* para randômica (Anguera, Ma *et al.*, 2011), porém não é muito conservado entre as diferentes espécies de mamíferos, sendo considerado um pseudogene em humanos, bovinos e canídeos (Chureau, Prissette *et al.*, 2002). Alguns estudos sugerem que TSX tem um papel importante na repressão da expressão de XIST ao mesmo tempo em que regula positivamente a expressão de TSIX (Anguera, Ma *et al.*, 2011; Maclary, Hinten *et al.*, 2013).

Mais recentemente, outro ncRNA *antisense*, transcrito a partir do éxon 1 do XIST em camundongos, e denominado *Xist Activating RNA* (XistAR), foi descoberto (Sarkar, Gayen *et al.*, 2015). Diferentemente do TSIX, este RNA é transcrito no cromossomo X inativo e tem a função de dirigir a expressão de XIST, funcionando como um *enhancer* de RNA (eRNA) para XIST (Sarkar, Gayen *et al.*, 2015), sendo que eRNA são RNAs transcritos a partir de *enhancers* os quais coordenam a função de um gene (Lam, Li *et al.*, 2014), neste caso o XIST.

A Figura 2 esquematiza os principais fatores diretamente envolvidos na ICX em camundongos e que estão presentes na região do Centro de Inativação do X (*X Inactivation Centre* – XIC), na qual o processo de ICX se inicia (Augui, Nora *et al.*, 2011).



**Figura 2: Modelo simplificado da regulação da inativação do cromossomo X (ICX) na região do centro de inativação do X (XIC) em camundongos.** A figura mostra a localização e o sentido de transcrição de cada um dos fatores presentes no XIC e que coordenam os eventos da ICX. A transcrição dos genes que ativam a expressão de XIST ou TSIX está marcada com “+” enquanto a transcrição dos genes que reprimem a expressão de XIST ou TSIX está marcada com “-”. Além dos RNAs não-codantes e proteínas já descritos ao longo do trabalho (TSX, XITE, TSIX, XIST, JPX, FTX e RNF12), outros genes presentes no XIC participam da ICX, como *Nucleosome Assembly Protein 1 Like 2* (NAP1L2), PPNX, *Large Intervening Transcript in the Xic* (LINX), *Caudal Type Homeobox 4* (CDX4), *Cysteine Rich Hydrophobic Domain 1* (CHIC1), *Zinc Finger CCHC-type Containing 13* (CNBP2) e *Solute Carrier Family 16 Member 2* (SLC16A2) (Chureau, Prissette *et al.*, 2002).

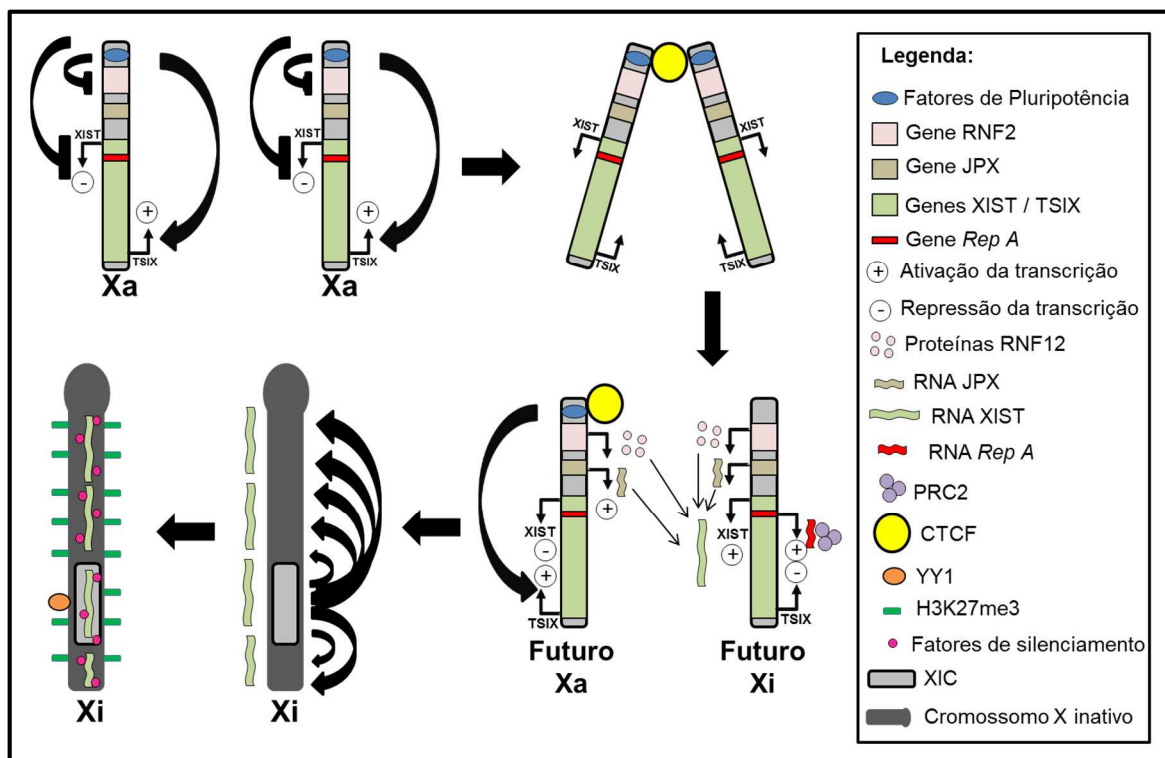
A literatura mostra que podem existir até 200 proteínas associadas ao XIST, as quais modulam sua expressão e são responsáveis pela estrutura da heterocromatina do Xi (Lu, Carter *et al.*, 2017). Um exemplo é a HNRNPU. Essa proteína é um componente da matriz nuclear e no processo de ICX faz uma “ponte” entre o RNA XIST e a cromatina ao se ligar no *Repeat C* do XIST (Hasegawa, Brockdorff *et al.*, 2010; Jeon, Sarma *et al.*, 2012). Dessa forma, HNRNPU mantém estável a localização do RNA XIST no Xi. Atuando também na estabilidade do Xi tem-se a Macro H2A (Pasque, Gillich *et al.*, 2011), uma variante de histona associada à repressão da transcrição, e os *Like Long Interspersed Nuclear Elements* (LINEs), sendo que estes últimos também estão relacionados ao silenciamento de genes presentes em regiões passíveis de escaparem da ICX (Chow, Ciaudo *et al.*, 2010).

Outro complexo proteico também envolvido na característica de cromatina inativa em camundongos é a *SMRT/HDAC1-associated repressor protein* (SHARP), que faz parte da família *Split End* (SPEN) de repressores transcricionais, associando-se e ativando a Histona Desacetilase 3 (HDAC3) (Ariyoshi e Schwabe, 2003; You, Lim *et al.*, 2013). A partir de sua transcrição, XIST associa-se com o complexo SHARP, recrutando a HDAC3 para o cromossomo X a ser inativado ou

induzindo a atividade desta, o que leva à remoção das marcas de acetilação de histonas, compactando a cromatina e promovendo o silenciamento transcricional (Kuo e Allis, 1998; Mchugh, Chen *et al.*, 2015). Além disso, o recrutamento de PRC2 pelo XIST acontece de uma maneira HDAC3-dependente, através da interação direta PRC2/HDAC3 ou por meio do silenciamento transcricional induzido por HDAC3 (Mchugh, Chen *et al.*, 2015). Isso sugere que a interação entre XIST e os complexos proteicos são essenciais, tanto no início do processo de ICX com o recrutamento de fatores de silenciamento (HDAC3), quanto na manutenção do estado inativo do cromossomo com o recrutamento de fatores epigenéticos repressivos estáveis (PRC2) (Riising, Comet *et al.*, 2014; Mchugh, Chen *et al.*, 2015).

De uma maneira geral, o “espalhamento” do RNA XIST ao longo de todo o cromossomo X a ser inativado induz à redução da atividade da RNA Polimerase II e das marcas de cromatina ativa, como acetilação de histonas e a H3K4me2, ao mesmo tempo em que a cromatina é enriquecida com marcas repressivas, tais como H3K27me3 (Plath, Fang *et al.*, 2003) e H2AK119u (Almeida, Pintacuda *et al.*, 2017). Essas alterações são seguidas pela incorporação da histona macro H2A, metilação do DNA em genes ligados ao X e incorporação de H3K9me e H4K20me3, as quais também contribuem para a característica de heterocromatina (Costanzi e Pehrson, 1998; Chadwick e Willard, 2004; Rougeulle, Chaumeil *et al.*, 2004; Heard e Disteche, 2006)

Os principais eventos que estão relacionados ao processo de iniciação da inativação do cromossomo X em camundongos estão esquematizados na Figura 3.



**Figura 3: Processo de iniciação da inativação do cromossomo X em células tronco embrionárias de camundongos.** Em células tronco de camundongos existem fatores de pluripotência que inibem a expressão de RNF12, ao mesmo tempo em que a expressão TSIX é estimulada. Esses eventos acontecem em ambos os cromossomos X, caracterizando o estado ativo desses cromossomos (parte superior da figura, à esquerda). Após o “gatilho” para a diferenciação celular, ambos os cromossomos X pareiam-se por meio da interação com CTCF (parte superior da figura, à direita). Quando se separam, há uma distribuição assimétrica dos fatores de pluripotência, sendo que o futuro X ativo (Xa) permanece com maior quantidade de fatores do que o futuro X inativo (Xi) (parte inferior da figura, à direita). O futuro Xi, com escassos fatores de pluripotência, tem a expressão de XIST ativada, ao mesmo tempo em que a expressão de TSIX é negativamente regulada. O RNA *Rep A* é então expresso, recrutando PRC2. A expressão de JPX e RNF12 é estimulada em ambos os cromossomos (parte inferior da figura, à direita). Esses eventos regulam XIST positivamente (parte inferior da figura, à esquerda). YY1 é recrutado para o Xi e o RNA XIST se “espalha” em *cis* ao longo do X a ser inativado, cobrindo todo o cromossomo (parte inferior da figura, à esquerda). Finalmente, outros fatores de silenciamento são recrutados para manter o estado inativo do cromossomo X.

### 1.2.3 A inativação do cromossomo X em outras espécies de mamíferos

Mesmo após mais de cinco décadas desde as primeiras evidências da ICX (Lyon, 1961), ainda existem muitas dúvidas sobre os mecanismos que controlam esse processo e o momento no qual ele ocorre, principalmente em outras espécies que não a murina. Existem diferenças significativas entre as espécies estudadas, fazendo-se necessário caracterizar a ICX em outras espécies, especialmente nas domésticas. A maioria dos trabalhos que vêm sendo publicados sobre a ICX têm os seguintes objetivos: 1) identificar os mecanismos epigenéticos que explicariam

o fato de um cromossomo X ser inativado e outro não, mesmo ambos tendo a mesma sequência de DNA; 2) determinar o momento que a ICX ocorre durante a embriogênese; 3) estabelecer a ICX como um marcador celular de pluripotência e 4) estudar a ICX em mamíferos em um contexto evolutivo (Basu e Zhang, 2011).

A ICX não ocorre no mesmo momento e lançando mão dos mesmos fatores moleculares em todas as espécies de mamíferos estudadas. Sabe-se que a duração da embriogênese inicial das diferentes espécies é distinta, e os eventos embrionários também acontecem em momentos diferentes. Um exemplo é a ativação do genoma embrionário, que ocorre no estágio de 2-células em camundongos (Aoki, Worrad *et al.*, 1997), 4-8 células em humanos (Niakan e Eggan, 2013) e por volta do estágio de 8 células em bovinos (Datta, Rajput *et al.*, 2015). Pela diversidade dos aspectos fisiológicos encontrados na embriogênese de mamíferos as diferenças observadas na ICX entre as diferentes espécies eram esperadas.

Em marsupiais, mamíferos metatérios, a presença de XIST não foi detectada. Contudo, o gene RSX parece possuir propriedades semelhantes ao XIST na ICX (Grant, Mahadevaiah *et al.*, 2012).

O RNA XIST, no entanto, parece ser essencial no processo de ICX em mamíferos eutérios (Penny, Kay *et al.*, 1996). Sabe-se que a expressão de XIST não é *imprinted* em humanos como é em camundongos, sendo expresso em ambos os cromossomos X a partir do estágio de 4-8 células (Okamoto, Patrat *et al.*, 2011). Essa característica não é exclusividade dos humanos, sendo que a perda da característica *imprinted* foi também encontrado em coelhos e cavalos (Escamilla-Del-Arenal, Da Rocha *et al.*, 2011; Deng, Berletch *et al.*, 2014). Além disso, ambos os cromossomos X estão ativos, tanto nas células do trofoectoderma quanto nas da MCI em humanos, até mesmo na presença do RNA XIST, indicando que a ICX nessa espécie ocorre possivelmente em estágios de desenvolvimento mais tardios quando comparados com a espécie murina (Okamoto, Patrat *et al.*, 2011).

Em suínos, a ICX parece também ocorrer mais tardiamente do que camundongos. Em um estudo recente, foi observado um padrão desmetilados de XIST e o acúmulo do seu RNA em blastocistos partenogênicos (Hwang, Oh *et al.*, 2015). Por outro lado, nesse mesmo estágio embrionário, foram observadas diferenças entre o padrão de expressão de genes ligados ao X em embriões fêmeas

e machos produzidos *in vitro* (Hwang, Oh *et al.*, 2015). Além disso, a H3K27me3 foi detectada pela primeira vez em embriões alongados (10 dias após a fecundação) (Gao, Hyttel *et al.*, 2011). Todos esses resultados em conjunto, sugerem que a ICX em suínos não se completa no estágio de blastocisto esférico.

Muito pouco se sabe sobre a ICX em humanos quando comparados com camundongos (Briggs, Dominguez *et al.*, 2015). Sabe-se, por exemplo, que existem fatores relacionados à ICX presentes em humanos que não foram detectados em camundongos. Um exemplo é o transcrito *X Active Specific Transcript* (XACT), que cobre o cromossomo X ativo em células humanas pluripotentes, não sendo detectado na espécie murina (Vallot, Huret *et al.*, 2013). Os resultados sugerem que XACT pode ser um importante regulador da ICX na embriogênese inicial humana, evitando a inativação do Xa durante a ICX, controlando assim a atividade do cromossomo X (Vallot e Rougeulle, 2013).

Sabe-se que a ICX é predominantemente randômica em mulheres, o que permite o balanço das expressões de Xm e Xp nas populações celulares (Cotton, Price *et al.*, 2015). Entretanto, foi diagnosticado que algumas mulheres perderam o padrão aleatório de ICX, sendo então mais susceptíveis a doenças recessivas ligadas ao X (Chen, Wu *et al.*, 2014) e a alguns tipos de câncer, como de ovário, mama, pulmão, esôfago e do sistema nervoso conforme recente revisão (Li, Zhang *et al.*, 2013). Estudos epigenômicos são frequentemente utilizados para identificar doenças associadas com alterações de expressão de genes ligados ao X, a fim de prospectar marcadores para doenças ou regiões regulatórias susceptíveis a doenças (Cotton, Price *et al.*, 2015). Outros estudos mostraram que é importante elucidar o *status* de ICX em células tronco embrionárias humanas na medicina regenerativa, como uma possível forma de avaliar a qualidade celular (Tukiainen, Pirinen *et al.*, 2014; Qi, Ding *et al.*, 2015).

#### **1.2.4 A inativação do cromossomo X em bovinos**

O conhecimento sobre a ICX em camundongos é relativamente avançado quando comparado com outras espécies de mamíferos. Os estudos concentram-se principalmente na identificação e determinação de funções dos fatores envolvidos na regulação do processo, assim como no momento em que a inativação do X



acontece na embriogênese inicial. O conhecimento produzido utilizando a espécie murina é importante como modelo de estudo para entender o processo em humanos e detectar, por exemplo, predisposição a doenças.

Embora o camundongo continue a ser o principal modelo de estudo, pela facilidade de obtenção, manutenção e manipulação, ciclo de vida curto e semelhanças fisiológicas com a espécie humana, sabe-se que o processo de ICX possui diferenças importantes entre as espécies (Escamilla-Del-Arenal, Da Rocha *et al.*, 2011). Dessa forma, é necessário o investimento em estudos que tenham como objetivo a elucidação dos mecanismos de ICX em outras espécies, como nas domésticas, sobre as quais ainda pouco se sabe sobre esse processo. Dentre essas espécies, destaca-se a espécie bovina, pelo seu valor comercial. Além disso, é uma das espécies de eleição para o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias de reprodução animal, sendo que a ICX pode ser utilizada com um marcador de qualidade, subsidiando assim, o incremento das biotecnologias relacionadas à reprodução de bovinos. Neste sentido, a avaliação de eventos moleculares relacionados à ICX no genoma presente no corpúsculo polar, por exemplo, seria um método não invasivo a ser utilizado para acessar marcadores moleculares relacionados à qualidade de ovócitos.

A estrutura do gene XIST na espécie bovina assemelha-se ao da espécie murina, embora diferenças importantes tenham sido observadas (Elisaphenko, Kolesnikov *et al.*, 2008). Estudos de bioinformática indicam que o tamanho gênico é de cerca de 35 kb, sendo formado por sete éxons e dois pseudo-éxons e apresentando também cinco sequências repetitivas em *tandem* no éxon 1 (*Repeats A, B, C, D e F*) e uma no éxon 6 (*Repeat E*) (Elisaphenko, Kolesnikov *et al.*, 2008). Como é susceptível ao *splicing* alternativo, sua transcrição pode gerar três isoformas (X1, X2 e X3; Gene ID: 338325).

A expressão de XIST é um dos eventos mais importantes no processo de iniciação da ICX, sendo sua expressão *imprinted* em fibroblastos bovinos (D'Cruz, Wilson *et al.*, 2008). Seu transcrito foi detectado em embriões bovinos a partir do estágio de 2-células (De La Fuente, Hahnel *et al.*, 1999; Peippo, Farazmand *et al.*, 2002; Oliveira, Saraiva *et al.*, 2013), sugerindo que também nessa espécie XIST possa ser um fator importante a partir deste momento da embriogênese inicial ou mesmo que não tenha nenhuma função neste momento, considerando que muito

provavelmente não é oriundo de transcrição do genoma embrionário e sim uma herança materna.

A ICX em camundongos tem característica *imprinted* na fase pré-implantacional dos embriões, a qual é herdada pelos tecidos extraembrionários, e randômica nos tecidos que formarão o embrião, estendendo-se por toda a vida do indivíduo (Lyon, 1961; Huynh e Lee, 2003; 2004). Apesar do escasso conhecimento em bovinos, há evidências de que a ICX na placenta possui também um caráter de *imprinted* paterno (Xue, Tian *et al.*, 2002). Outro estudo mostrou expressão paterna do XIST no córion, enquanto expressão bialélica foi observada no alantoide, fígado, pulmão e cérebro em fetos de 72 dias de vida, sugerindo um padrão *imprinted* tecido-específico e expressão monoalélica randômica de XIST nos tecidos somáticos dos bovinos (Dindot, Kent *et al.*, 2004), de uma maneira semelhante a camundongos, mas diferente de humanos.

Diferente de camundongos, em que a implantação ocorre precocemente (Kirchhof, Carnwath *et al.*, 2000) e a ICX é detectada no dia 3,5 pós-fecundação no estágio de peri-implantação (Lee, 2011), a ICX completa em bovinos foi detectada somente em alguns embriões no dia 8 pós-fecundação (em estágio de blastocisto), tanto em condições *in vivo* quanto *in vitro*, e em todos os embriões fêmeas apenas entre os dias 14 e 15 de desenvolvimento, no estágio de blastocisto alongado (De La Fuente, Hahnel *et al.*, 1999; Bermejo-Alvarez, Rizos *et al.*, 2010). Uma significativa parte do processo de ICX ocorre após a eclosão do embrião, e antes do seu reconhecimento materno, aproximadamente no dia 16 pós-fecundação em bovinos, acontecendo mais tardiamente quando comparado com camundongos (Bermejo-Alvarez, Rizos *et al.*, 2011). Numa visão epigenética, blastocistos de camundongos são mais avançados do que os embriões de ungulados, sendo que esses últimos não estão “preparados” para a implantação (Bermejo-Alvarez, Rizos *et al.*, 2011). Outro estudo mostrou que o processo de ICX não ocorre até o estágio de 8-16 células em condições *in vitro*, pela detecção bialélica do gene *Monoamine Oxidase A* (MAOA). No entanto, no estágio de mórula, o cromossomo X paterno não expressa MAOA, com posterior transcrição do Xp no estágio de blastocisto, sugerindo que em mórula o Xp está inativo e, no estágio seguinte ocorre a reativação desse mesmo cromossomo X (Ferreira, Machado *et al.*, 2010). Observada a diversidade de resultados encontrados na literatura para o momento

em que a ICX em bovinos, é imprescindível que esse processo seja melhor explorado nessa espécie.

Embora a expressão de TSIX na ICX seja importante em camundongos, sua presença e seu papel na inativação do X em bovinos ainda não foram bem evidenciados. Em várias espécies, inclusive a bovina, TSIX é considerado um “pseudogene”, o que significa que sua estrutura original foi perdida ao longo da evolução, já que a porção 3' do gene não é conservada entre as espécies de mamíferos (Chureau, Prissette *et al.*, 2002; Dindot, Kent *et al.*, 2004). Por outro lado, a expressão do gene FTX em células tronco embrionárias bovinas é o primeiro fator do XIC a influenciar XIST positivamente, independente da inativação do X (Chureau, Chantalat *et al.*, 2011).

#### **1.2.5 Genes que escapam à inativação do cromossomo X**

Embora o processo de ICX seja bastante abrangente, alguns genes escapam dele e não são silenciados. Em humanos, aproximadamente 75% dos genes ligados ao X são susceptíveis a serem inativados em todas as fêmeas, 15% dos genes escapam à ICX em todas as mulheres e 10% escapam à ICX em algumas mulheres (Carrel e Willard, 2005). Em camundongos, apenas 3% dos genes ligados ao X escapam à ICX (Berletch, Yang *et al.*, 2010). Além da diferença entre as espécies de mamíferos, existem diferenças significativas entre os tecidos de um mesmo indivíduo, o que pode influenciar a predisposição a doenças (Deng, Berletch *et al.*, 2014; Peeters, Cotton *et al.*, 2014). Os genes que mais escapam à ICX em humanos estão localizados no braço curto proximal do cromossomo (Al Nadaf, Deakin *et al.*, 2012), mas em camundongo esses genes estão espalhados ao longo do cromossomo (Yang, Babak *et al.*, 2010). Muitos dos genes ligados ao X que possuem um homólogo no cromossomo Y escapam à inativação a fim de manter a compensação de dose entre fêmeas e machos (Ross, Grafham *et al.*, 2005).

A expressão bialélica dos genes que escapam à ICX parece ser importante em humanos, já que um completo silenciamento do cromossomo X resulta na Síndrome de *Turner*, cujas mulheres portadoras apresentam um útero infantil, infertilidade e baixa estatura, entre outras anormalidades (Bondy, 2007). Genes que

escapam à ICX normalmente não são recobertos pelo RNA XIST e não possuem marcas repressivas de histonas, tendo também um padrão específico de metilação do DNA (Berletch, Ma *et al.*, 2015).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização molecular do gene XIST durante o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* em bovinos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os padrões de metilação do DNA em três regiões possivelmente envolvidas no controle da expressão de XIST em gametas e embriões bovinos produzidos *in vitro*;
- Caracterizar o perfil da expressão gênica em células individuais na região do *locus* XIST nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*;
- Caracterizar o perfil da expressão gênica *sense* e *antisense* na região do *locus* XIST em embriões bovinos *produzidos in vitro*.

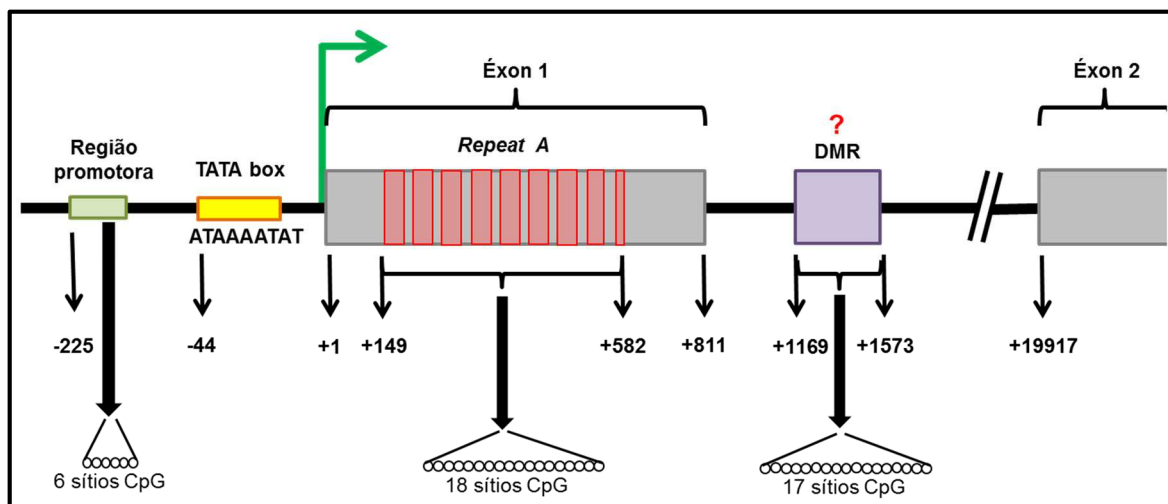
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL RELACIONADO À METILAÇÃO DE DNA

Uma análise mais detalhada da porção inicial (5') do gene XIST foi previamente realizada a fim de localizar as regiões a serem estudadas neste trabalho. Para isso, foram utilizadas informações depositadas no *GenBank* e dados da literatura.

A única isoforma de XIST de *Bos taurus* depositada no *GenBank* que contém o éxon 1 é a variante X2 (XR\_001500119.1). Interessantemente, de acordo com a estrutura dessa isoforma, a DMR conhecida como pertencente ao éxon 1 (Liu, Yin *et al.*, 2008; Shen, Lin *et al.*, 2013) situa-se, na verdade no íntron 1. Além disso, o *primer forward* que foi desenhado para este estudo e utilizado no experimento de detecção de transcritos *sense* e *antisense* do *locus* XIST utilizando a técnica de *SS-RT-PCR* encontra-se no éxon 1, enquanto o *primer reverse* está localizado no éxon 2. Entretanto, para fins didáticos deste trabalho e para seguir a denominação da literatura científica, optou-se por continuar referindo-se a essa região como DMR 1.

A Figura 4 e o **Anexo 1** detalham a estrutura de uma porção da região 5' do *locus* XIST de bovinos, a qual foi utilizada para a caracterização epigenética e funcional neste estudo.



**Figura 4: Representação esquemática da estrutura da porção 5' do locus XIST de bovinos.** A linha larga preta, na horizontal, indica a sequência genômica, enquanto os retângulos maiores em cinza representam os éxons 1 e 2. As duas linhas inclinadas antes do éxon 2 indicam que a extensão do primeiro íntron não está totalmente esquematizada na figura aqui. Os retângulos verde e amarelo representam a região promotora e um possível TATA box, respectivamente. Os retângulos estreitos vermelhos na vertical e dentro do éxon 1, indicam as 8,5 sequências repetitivas que constituem a região do *Repeat A*, enquanto o retângulo roxo no primeiro íntron indica a DMR 1, a qual foi analisada neste trabalho, sendo que a marcação “?” indica a dúvida sobre a localização exata dessa região (no éxon 1 ou íntron 1), de acordo com a sequência do *GenBank*. A seta larga verde indica o local de início da transcrição do XIST. Já as setas finas pretas indicam a localização e posição das principais regiões analisadas neste trabalho. As setas largas pretas indicam as três regiões escolhidas para as análises da metilação do DNA, sendo os círculos brancos os dinucleotídeos CpGs avaliados.

A DMR 1 do gene XIST foi escolhida para este estudo por ser uma região rica em sítios CpG e já ter sido alvo de estudos anteriores em bovinos, os quais discutem o seu possível envolvimento no controle da expressão de XIST (Liu, Yin *et al.*, 2008; Shen, Lin *et al.*, 2013; Kaneda, Watanabe *et al.*, 2017), e no seu possível envolvimento na característica *imprinted* da inativação do cromossomo X em camundongos (McDonald, Paterson *et al.*, 1998; Dindot, Kent *et al.*, 2004; Do, Han *et al.*, 2008). Uma das linhas de pesquisa do laboratório de reprodução animal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia é caracterizar os eventos moleculares envolvidos na iniciação do processo de inativação do cromossomo X em bovinos, buscando marcadores moleculares relacionados à qualidade de gametas e embriões. Neste sentido, é nosso interesse procurar por regiões do DNA que apresentam marcas que possam sugerir um caráter *imprinted* também em bovinos. Isso justifica o interesse em prospectar essas marcas em gametas, embriões e placenta, visto que há evidências na literatura apontando para *imprinting* genômico nesta última. Assim, grande parte do éxon 1 do gene XIST foi

estudado, dividindo-o em duas regiões a serem avaliadas: a região *Rep A* e a DMR 1, além da região promotora desse gene.

Todo os experimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília, Distrito Federal.

### **3.1.2 Reagentes e produtos químicos**

A menos que especificado, todos os reagentes e produtos químicos utilizados neste trabalho foram adquiridos da Sigma (Sto. Louis, MO, USA).

### **3.1.3 Recuperação de ovócitos e maturação *in vitro***

Complexos cumulus-ovócitos (CCOs) de vacas mestiças (*Bos taurus indicus* X *Bos taurus taurus*) foram obtidos a partir de ovários provenientes de abatedouros da região de Luziânia, Goiás. Os ovários foram coletados imediatamente após o abate dos animais e transportados ao Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em frascos contendo solução salina (NaCl 0,9%) acrescida de 100 UI/mL de penicilina G e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma, Sto Louis MO, USA) a uma temperatura entre 34 e 36°C. O tempo de transporte dos ovários do abatedouro até o laboratório não excedeu a 4 horas.

No laboratório, os folículos de 3-8 mm de diâmetro foram puncionados utilizando agulhas de calibre 18 G e seringas de 10 mL. O material aspirado foi depositado em tubos cônicos de plástico de 15 mL, os quais permaneceram em banho-maria (35°C) por no mínimo 5 min. para a sedimentação do material aspirado. Posteriormente o material foi transferido para placas de petri 100 x 20 mm contendo líquido folicular centrifugado (700 g por 5 min. a 37°C). Os CCOs foram rastreados e selecionados com o auxílio de estereomicroscópio (Stemi SV6, Zeiss®, Göttingen, Alemanha). Apenas CCOs contendo pelo menos quatro camadas compactas de células do cumulus e ovócitos com citoplasma homogêneo foram selecionados para o experimento.

Parte dos CCOs foram desnudados por sucessivas pipetagens em PBS com 10% de soro fetal bovino (SFB). Em seguida os ovócitos desnudos foram lavados



sucessivamente em PBS sem cálcio e magnésio para remover as células do cumulus e armazenados a -80 °C para posterior análise de metilação do DNA.

CCOs destinados à maturação *in vitro* (MIV) foram lavados e transferidos em grupos de 25-30 para gotas de 150 µL de meio de maturação [TCM-199 com sais de Earl's (Invitrogen®)] suplementado com 10% de soro fetal bovino SFB (Invitrogen®), 10 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH), 1 µg/mL de L-glutamina, 0,1 mM de cisteamina, 0,2 mM de piruvato de sódio e 250 mg/mL de sulfato de amicacina. As gotas foram cobertas com óleo de silicone e as estruturas foram submetidas à MIV por 24 horas a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Após a maturação, as estruturas foram incubadas em 0,2% de hialuronidase por 10 min. e em seguida desnudadas por sucessivas pipetagens. Apenas foram considerados maturados os ovócitos nos quais pode ser observada a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Os ovócitos maturados e livres de células do cumulus foram lavados sucessivamente em PBS sem cálcio e magnésio e em seguida armazenados a -80 °C para posterior análise de metilação de DNA.

### **3.1.4 Produção *in vitro* de embriões**

A obtenção dos ovários, recuperação dos ovócitos e maturação *in vitro* dos mesmos para a produção *in vitro* de embriões foram realizadas exatamente conforme descrito anteriormente. CCOs submetidos à MIV por 24 horas foram transferidos para gotas de 50 µL de meio de fecundação *Tyrode's albumin lactate pyruvate* [TALP (Parrish, Krogenaes *et al.*, 1995)] suplementado com 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina, cobertas com óleo de silicone. Para a fecundação *in vitro* (FIV), foi utilizado sêmen sexado para fêmea de um touro da raça Gir Leiteiro (ABS Pecplan) de fertilidade *in vitro* comprovada. As palhetas de sêmen foram descongeladas a 37 °C por 30 seg. e somente foram utilizadas para a fecundação *in vitro* as amostras de sêmen que apresentaram no mínimo 30% de motilidade e grau 2 de vigor. As células espermáticas foram selecionadas utilizando o método de gradiente de *Percoll* (GE® Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 45:90% (400 µL de cada em microtubo de 1,5 mL), centrifugando a 9000 g por 5 min. O *pellet* resultante da centrifugação foi homogeneizado em 1 mL de meio *Sperm-TALP* e submetido a nova centrifugação

por 9000 g por 5 min. O *pellet* resultante desta última centrifugação foi ressuspendido em aproximadamente 60 µL de meio *Sperm-TALP*, sendo utilizados 10 µL dessa ressuspensão para a inseminação dos ovócitos em cada gota. CCOs e espermatozoides foram co-incubados por 18 horas a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram cuidadosamente pipetados para a remoção do excesso de células do cumulus, lavados e transferidos para gotas de 150 µL de meio fluido do oviduto sintético (SOFaaci) (Holm, Shukri *et al.*, 1998) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de citrato trissódico, 2,77 mM de mio-inositol e 5% SFB (Invitrogen®) cobertas com óleo de silicone. Os embriões foram cultivados a 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

Os embriões produzidos para este estudo foram coletados em diferentes fases do desenvolvimento: 2 células [32 horas pós inseminação (p.i.)], 4 células (48 horas p.i.), 8-16 células (72 horas p.i.), mórula (144 horas p.i.) e blastocistos expandidos (168 horas p.i.). Para a coleta de todos os estágios embrionários foram utilizados horários determinados de acordo com estudos anteriores (Ferreira, Machado *et al.*, 2010). Os embriões foram retirados da gota de cultivo e lavados 3 vezes em PBS sem cálcio e magnésio. Em seguida foram armazenados em *pools* em PBS a -80°C para análise de metilação do DNA ou em RNA *later* (Ambion, Austin, TX, USA) a -80°C para análise de expressão gênica.

Os embriões em estágio de blastocisto expandido destinados às análises de metilação do DNA foram micromanipulados para a separação das células da massa celular interna (MCI) das células do trofoectoderma (TE), já que neste estágio é possível uma clara distinção entre os dois tipos celulares. Para isso, utilizou-se um protocolo previamente desenvolvido no laboratório (Ferreira, Aguiar Filho *et al.*, 2015). A micromanipulação para a separação das células do TE foi realizada manualmente utilizando um micromanipulador M&M - The Micromanipulator Microscope Company, Escondido, CA, USA e lâminas de aço inoxidável (Bio-Cut®-Blades Feather, Feather Safety Razor Co, Chome Kita-Ku, Osaka, Japan) em um ângulo de 15 graus. Os embriões foram micromanipulados em placas de Petri em gotas de 150 µL de PBS suplementado com 2% de SFB, sob estereomicroscópio (Stemi SV6, Zeiss®, Göttingen, Alemanha). O material, de diferentes embriões, foi agrupado de acordo com a sua origem (MCI ou TE) e armazenado a -80°C.

As imagens de todos os embriões foram obtidas utilizando a câmera DS-Ri1 acoplada ao monitor DS-L3 (Nikon, Tokyo, Japan) acoplado ao microscópio invertido (Axiovert 135 M, Zeiss, Germany) ou ao estereomicroscópio (Stemi SV6, Zeiss®, Göttingen, Alemanha).

### **3.1.5 Extração do DNA genômico de espermatozoide para análise de metilação**

Foi utilizado sêmen de um touro sexualmente maduro da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), de fertilidade comprovada e usado rotineiramente na produção *in vitro* de embriões no laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia. Foram usadas, no total, três palhetas de sêmen, de três partidas diferentes. O processamento das células espermáticas e a extração do DNA genômico se deram conforme descrito por Carvalho e colaboradores (Carvalho, Michalczechen-Lacerda *et al.*, 2012) (**Anexo 2**).

### **3.1.6 Obtenção do DNA genômico de ovócitos e embriões para análise de metilação**

Para a determinação do padrão de metilação do DNA foram utilizados 120 ovócitos para cada grau de desenvolvimento [ovócitos imaturos (GV) e ovócitos maturados (em metáfase II; MII)], divididos em duas réplicas (dois *pools* de 60 ovócitos cada), para cada região do DNA analisada (DMR 1, *Rep A* e promotor). Já para embriões foram utilizados 1 *pool* de embriões no estágio de 8-16 células contendo 17 estruturas; 2 *pools* de mórulas, com 5 estruturas em cada *pool*, 1 *pool* contendo 10 biópsias de MCI e 1 *pool* contendo 10 biópsias de TE. Para cada *pool* de ovócitos, embriões, TE e MCI foi adicionada pronase E na concentração final de 10 mg/mL para promover a digestão da zona pelúcida. Em seguida cada *pool* de ovócitos ou embriões foi submetido a uma incubação a 37°C por 30 min. (para degradação da zona pelúcida), seguida de outra incubação a 85°C por 15 min. (para inativação da enzima pronase) em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany). A lise celular ocorreu após choque térmico, em que os ovócitos e embriões foram congelados em nitrogênio líquido e

imediatamente aquecidos em termociclador a 95 °C por 1 min. Esse processo foi repetido por 5 vezes. O protocolo detalhado está descrito no **Anexo 3**.

### **3.1.7 Extração do DNA genômico de tecido placentário**

Foram coletadas amostras de tecido placentário – alantocóron – de 4 partos de animais da raça Nelore (2 fêmeas e 2 machos) imediatamente após a expulsão da placenta, sendo que as gestações foram produzidas a partir de inseminação artificial utilizando sêmen convencional (não sexado). Foram utilizadas pinça e tesoura estéreis para a obtenção de fragmentos da placenta de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, os quais foram depositados em um microtubo de 1,5 mL. Os microtubos com os fragmentos de placenta foram armazenados a -80 °C para posterior extração do DNA genômico, a qual foi realizada utilizando o kit QIAmp DNA Mini and Blood Mini (Qiagen) (**Anexo 4**). O DNA extraído foi quantificado e armazenado a -20 °C.

### **3.1.8 Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio**

O DNA genômico de espermatozoides, ovócitos GV e MII, embriões e tecido placentário foi tratado com bissulfito de sódio utilizando o kit EZ DNA Methylation-Lightning® (Zymo Research, Irvine, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante (**Anexo 5**). Resumidamente, a técnica consiste na desnaturação do DNA a partir de hidróxido de sódio e tratamento com bissulfito de sódio, o qual possibilita a conversão de citosinas não metiladas em uracilas. O DNA tratado foi armazenado a -80 °C para posterior amplificação.

### **3.1.9 Amplificação por PCR do DNA tratado com bissulfito de sódio**

As amostras de DNA genômico tratadas com bissulfito de sódio foram submetidas à amplificação por PCR para três diferentes regiões genômicas do gene XIST: uma ilha CpG classicamente conhecida (Liu, Yin *et al.*, 2008; Shen, Lin *et al.*, 2013; Kaneda, Watanabe *et al.*, 2017) dentro éxon 1 do transcrito XIST (DMR 1), a região *Repeat A* (Rep A), também no éxon 1 de XIST e a região promotora de XIST (Promotor). A referência de acesso ao *GenBank* para todas as regiões é

AJ421481.1. Foi realizada *nested* PCR (para a DMR 1) ou *hemi-nested* PCR (para as regiões de *Rep A* e promotor) utilizando o termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany). As sequências dos *primers* utilizados nas reações, localização dos mesmos na sequência do gene e o tamanho dos fragmentos amplificados estão mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Identificação da região genômica, sequências dos *primers*, localização dos *primers* e tamanho do fragmento amplificado.

Região genômica	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Localização dos <i>primers</i>	Tamanho do amplicon
DMR 1 externo	F: GGGTGT TTTTGT TTTAGTGTGTAGTA R: CTTTAATACCACTAAATAATAC	+1127 a +1252 +1581 a +1608	482 pb
DMR 1 interno	F: TTGTTATATAGTAAAGATGGT R: ACCAATCCTAACTAAATA	+1169 a +1190 +1552 a +1573	405 pb
<i>Rep A</i> externo	F: TTTGGTTGTTTTTTGGGTTTTTTGTGG R: ACCTAACTACAAAATCATCTCCCAA	+84 a +112 +693 a +717	634 pb
<i>Rep A</i> interno	R: TAAATCCACTCACACAACACAAAC	+660 a +683	600 pb
Promotor externo	F: TTT GAA GTT ATG GTT TTT GGA TTA GAA ATG R: TAAAATCTAAAAAATATTCCAAAAAAACCACAC	-411 a -382 -125 a -92	320 pb
Promotor interno	F: TTGTTATTTTTTTGAATTTTTTTTTTTTGTATTGGG	-346 a -309	255 pb

F – *forward*; R – *reverse*; pb – pares de base

Os *primers* utilizados para amplificação da DMR 1 foram obtidos a partir de trabalho previamente publicado (Liu, Yin *et al.*, 2008). Já os *primers* para a amplificação da região *Rep A* e promotor foram desenhados para esse estudo, baseando-se na descrição da região *Repeat A* de XIST (Duszczuk, Wutz *et al.*, 2011) e na predição da região promotora de XIST para bovinos (Dindot, Kent *et al.*, 2004), respectivamente. Os *primers* para as regiões *Rep A* e promotora foram desenhados utilizando a ferramenta *Bisulfite Primer Seeker* (<http://www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker>).

Ambas as reações para a DMR 1 foram realizadas utilizando tampão da Taq 1 X; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTP 0,4 mM; 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum®

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1  $\mu$ M de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), sendo o volume de cada reação ajustado para 20  $\mu$ L com água ultrapura. As condições de amplificação para todas as amostras estudadas (espermatozoides, ovócitos, embriões e placenta), tanto para reação de PCR *out* (1ª reação) quanto *inner* (2ª reação), estão especificadas na Tabela 2. A extensão final para as duas reações foi conduzida por 72 °C por 15 min.

**Tabela 2.** Condições da *nested* PCR para a DMR 1 do gene XIST.

Reação	Volume de DNA ( $\mu$ L)	Desnaturação Inicial	40 Ciclos		
			Desnaturação	Anelamento	Extensão
1ª reação	3,0	94 °C 7 min.	94 °C 45 s.	47 °C 1min. e 30 s.	72 °C 1 min.
2ª reação	0,5*	94 °C 4 min.	94 °C 40 s.	42 °C 45 s.	72 °C 45 s.

\* Este volume de DNA é oriundo da 1ª reação de PCR

As reações de amplificação para a região *Rep A* foram realizadas utilizando tampão da Taq 1 X; dNTP 0,4 mM; 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1  $\mu$ M de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), sendo o volume de cada reação ajustado para 20  $\mu$ L com água ultrapura. Todas as reações de amplificação para essa região foram conduzidas com um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 4 minutos e extensão final de 72 °C por 15 minutos. A quantidade MgCl<sub>2</sub> e as condições de amplificação para todas as amostras estudadas (espermatozoides, ovócitos, embriões e placenta), tanto para reação de PCR *out* (1ª reação) quanto *inner* (2ª reação), estão especificadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Condições da hemi-Nested PCR para a região *Rep A* do gene XIST.

Material biológico	Reação	MgCl <sub>2</sub> (mM)	DNA (μL)	45 Ciclos		
				Desnaturação	Anelamento	Extensão
Espermatozoide	1 <sup>a</sup>	1,0	3,0	94 °C	55 °C	72 °C
				40 s.	1min.	1 min.
	2 <sup>a</sup>	1,0	0,25*	94 °C	55 °C	72 °C
				40 s.	1min.	1 min.
Placenta	1 <sup>a</sup>	1,0	3,0	94 °C	55 °C	72 °C
				40 s.	1min.	1 min.
	2 <sup>a</sup>	1,0	0,25*	94 °C	64,5 °C	72 °C
				40 s.	1min.	1 min.
Ovócitos e embriões	1 <sup>a</sup>	1,0	3,0	94 °C	54 °C	72 °C
				40 s.	1min.	1 min.
	2 <sup>a</sup>	1,5	0,5*	94 °C	65 °C	72 °C
				40 s.	1min.	1 min.

\* Este volume de DNA é oriundo da 1<sup>a</sup> reação de PCR

Já as reações de amplificação para a região promotora do gene XIST foram realizadas utilizando tampão da Taq 1 X; dNTP 0,4 mM; 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 1 μM de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), sendo o volume de cada reação ajustado para 20 μL com água ultrapura. Todas as reações de amplificação para essa região foram conduzidas com um passo de desnaturação inicial de 94 °C por 4 minutos e extensão final de 72 °C por 15 minutos. A quantidade MgCl<sub>2</sub> e as condições de amplificação para todas as amostras estudadas (espermatozoides e ovócitos), tanto para reação de PCR *out* (1<sup>a</sup> reação) quanto *inner* (2<sup>a</sup> reação), estão especificadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Condições da hemi-*Nested* PCR para a região promotora do gene XIST.

Reação	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Volume de DNA (μL)	40 ciclos na 1ª reação e 45 na 2ª reação		
			Desnaturação	Anelamento	Extensão
1ª	2,0	3,0	94 °C	53,5 °C	72 °C
			40 s.	1 min.	1 min.
2ª	1,5	0,5*	94 °C	59 °C	72 °C
			40 s.	1 min.	1 min.

\* Este volume de DNA é oriundo da 1ª reação de PCR

Todo o volume das PCR foi submetido à eletroforese a uma corrente elétrica constante de 50 mA em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL) em meio Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 X. Utilizou-se o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O gel foi fotodocumentado em um equipamento Gel-doc 1000 Bio Rad (Bio-Rad Laboratories SA, EUA). Os *amplicons* foram recortados do gel e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante (**Anexo 6**). Em seguida as amostras purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® (ND- 1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

### 3.1.10 Clonagem dos *amplicons* e extração do DNA plasmidial

Após a purificação e quantificação em espectrofotômetro, os *amplicons* de cada grupo (espermatozoide, ovócitos GV e MII, embriões dos diferentes estágios de desenvolvimento e placenta) foram inseridos no vetor TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A transformação foi realizada em células DH5α por choque térmico e o produto foi espalhado em placas de petri 90 x 15 mm contendo meio Luria- Bertani (LB) ágar com ampicilina 100 μg/mL, 20 μL de X-Gal a 40 mg/mL e 4 μL de IPTG 0,1 M, seguida por inversão das placas e incubação em estufa a 37 °C por 14 horas e a 4 °C por no mínimo duas horas.

Foi utilizado um palito de madeira estéril para a retirada das colônias brancas da placa de cultivo e sua deposição em tubo cônico de 15 mL contendo 3 mL de



meio LB acrescido de ampicilina 100 µg/mL. Os tubos permaneceram sob agitação de 250 rpm a 37 °C por 16 horas em agitador (New Brunswick Scientific Co, NJ, USA). O protocolo da clonagem dos *amplicons* está descrito detalhadamente no **Anexo 7**.

Aproximadamente metade do conteúdo dos tubos foi utilizada para a extração do DNA plasmidial. Para isso foi utilizado o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as normas do fabricante (**Anexo 8**). O DNA plasmidial purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

A confirmação da presença do inserto (*amplicon*) no vetor foi também verificada através da digestão enzimática utilizando a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Foram utilizadas 5 U de enzima e 2 µL de DNA plasmidial purificados. A reação ocorreu a 37 °C *overnight*.

### 3.1.11 Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências

As amostras de plasmídeos contendo o inserto (200 ng) foram sequenciadas utilizando a metodologia de dideoxi com o *primer* universal M13 *Reverse* (0,25 µM). A qualidade dos cromatogramas foi analisada utilizando o *software* CHROMAS® 2.4.4 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Para a quantificação do padrão de metilação das CpG da DMR 1 (17 CpG), *Rep A* (18 CpG) e região promotora do gene XIST (6 CpG) utilizou-se o *software* BiQ Analyser® (Bock, Reither *et al.*, 2005) (Max-Planck Society, München, Germany, <http://biq-analyzer.bioinf.mpi-sb.mpg.de/>), comparando as sequências obtidas com a depositada no *GenBank* (AJ421481.1).

Foram consideradas para o estudo apenas sequências que apresentaram no mínimo 95% de conversão pelo bissulfito de sódio (taxa de conversão das citosinas não seguidas de guanina) e sequências com o mínimo de 95% de identidade (comparadas com a sequência referência utilizada). Foram consideradas sequências hipermetiladas aquelas que apresentaram ≥50% de sítios CpGs metilados (Imamura, Kerjean *et al.*, 2005) e o número mínimo de alelos foi determinado a partir do número de alelos diferentes encontrados em cada amostra analisada.

## **3.2 EXPERIMENTOS RELACIONADOS A EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS INDIVIDUAIS**

### **3.2.1 Obtenção de ovócitos maturados e blastômeros individuais de embriões produzidos *in vitro***

Para este experimento foram utilizados ovócitos maturados e embriões produzidos *in vitro* conforme protocolo descrito anteriormente. Ovócitos MII (n=5) e embriões em diferentes estágios de desenvolvimento – 2-células (n=5), 4-células (n=5), 8-16 células (n=3) e mórulas (n=2) – foram produzidos para a caracterização do perfil da expressão gênica na região do *locus* XIST em blastômeros individuais. Os ovócitos e embriões foram lavados primeiramente em PBS com 20% de SFB, seguido por um segundo banho em PBS na ausência de SFB. Em seguida foram submetidos à digestão da zona pelúcida em um banho com pronase E (10 mg/mL) por cerca de 5 min., monitorando em estereomicroscópio (Stemi SV6, Zeiss®, Göttingen, Alemanha) a degradação da mesma. As estruturas foram então submetidas a 2 banhos em PBS com 2% de SFB. Os ovócitos foram depositados individualmente em microtubo de 0,2 mL contendo 10 µL de solução de lise celular e DNase, conforme protocolo do kit Single Cell-to-CT™ (Ambion, Austin, TX, USA). Para a separação dos blastômeros foi feita a dissociação mecânica das células utilizando pipetas de vidro com abertura de diâmetros variados (10, 5 e 3 µm de diâmetro) de acordo com o tamanho das células embrionárias. Foram feitas pipetagens sucessivas até a separação completa das células. Cada blastômero foi depositado individualmente em microtubos de 0,2 mL contendo 10 µL de solução de lise celular e DNase, conforme protocolo do kit Single Cell-to-CT™ (Ambion, Austin, TX, USA).

### **3.2.2 PCR em Tempo Real (RT-qPCR) para detecção da expressão gênica em ovócitos e células individuais de embriões**

A caracterização do padrão de expressão gênica em ovócitos e blastômeros individuais dos embriões foi realizada utilizando o kit Single Cell-to-CT™ (Ambion, Austin, TX, USA), conforme recomendações do fabricante (**Anexo 9**). Em suma, as

células individualizadas foram submetidas a uma reação de lise celular por 5 min. em tampão de lise e DNase, sendo a reação interrompida por uma solução de parada da reação. Em seguida o lisado foi submetido ao protocolo de transcrição reversa nas seguintes condições: 25 °C por 10 min., 42 °C por 60 min. e 85 °C por 5 min. O cDNA resultante foi pré-amplificado em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) utilizando um *pool* de TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) para os genes XIST (119 pb) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; 118 pb). As condições da pré-amplificação foram: 95 °C por 10 min.; 14 ciclos de 95 °C por 15 seg. e 60 °C por 4 min. e 99 °C por 10 min. O cDNA pré-amplificado foi diluído em uma concentração de 1:10 com água *nuclease free* e então submetido à amplificação por PCR em tempo real para o gene de interesse – XIST –, utilizando o GAPDH como controle endógeno. A região escolhida para se analisar a expressão de XIST foi o último éxon do gene, visto que é uma região comum às três isoformas do gene. Foram utilizados 1 X do TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 X do TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA), 10 µL do cDNA pré-amplificado e volume final de 25 µL completado com água *nuclease free*. A reação de amplificação foi conduzida no termociclador ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sob as seguintes condições: 50 °C por 2 min.; 95 °C por 10 min. e 45 ciclos de 95 °C por 5 seg. e 60 °C por 1 min. A análise dos resultados foi realizada utilizando o *baseline* automático e *threshold* de 0,2. Os volumes totais de algumas PCR foram colocados em gel de agarose 2% para a confirmação do tamanho esperado dos *amplicons*. Foi feita uma análise e interpretação qualitativa dos dados (presença ou ausência de expressão), utilizando os Ct (*threshold cycle*), os *amplicons* no gel e o resultado do sequenciamento para cada célula individual, embrião e estágio embrionário analisado.

### 3.3 EXPERIMENTOS RELACIONADOS À CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA *SENSE* E *ANTISENSE* (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) PARA O LOCUS XIST

#### 3.3.1 Obtenção do material biológico

Os embriões utilizados foram produzidos tal como descrito anteriormente. Utilizou-se 1 *pool* de 40 embriões no estágio Bx (168 p.i.), produzidos a partir de sêmen sexado para fêmea, que foram armazenados em RNA*later* (Ambion, Austin, TX, USA) a -80 °C.

Para a obtenção do tecido testicular foi realizado um procedimento de orquiectomia em um animal púbere mestiço (Nelore x Curraleiro pé-duro) de cerca de 2 anos de idade. Logo após a remoção cirúrgica o testículo foi higienizado e cortado com o auxílio de um bisturi para a exposição do parênquima testicular. Em seguida, foram retirados vários fragmentos com o auxílio de uma lâmina de bisturi, os quais foram depositados em microtubos de 1,5 mL estéreis. Adicionou-se, então, RNA*later* (Ambion, Austin, TX, USA), em um volume necessário para cobrir todo o tecido testicular e em seguida foram acondicionados em gelo até o transporte para o laboratório, sendo em seguida armazenados a -80 °C para posterior extração do RNA.

#### 3.3.2 Extração de RNA total e transcrição reversa

O RNA total dos embriões (1 *pool*) foi isolado utilizando o kit RNeasy Plus Micro (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com instruções do fabricante (com pequenas modificações, conforme **Anexo 10**). Já a extração do RNA total do tecido testicular (1 amostra) foi conduzida utilizando o TRIzol™ Plus RNA Purification, seguido por purificação utilizando o kit PureLink™ RNA Mini (Ambion, Austin, TX, USA) (**Anexo 11**). O RNA total purificado foi tratado com *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega, Madison, WI, USA), utilizando 5 U da enzima para as amostras de RNA de tecido testicular ou 0,5 U para as amostras de RNA dos embriões.

Realizou-se a síntese de cDNA utilizando o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as

recomendações do fabricante. Foram utilizados *primers* gene-específicos (*forward* ou *reverse*) nas concentrações finais de 0,1 µM, tanto para o primeiro quanto para o último éxons do gene XIST. Essa é a metodologia de eleição pelo fato dos transcritos *sense* e *antisense* compartilharem a mesma região do genoma, sendo transcritos em sentidos opostos. Como cada uma das fitas da dupla hélice do DNA da região analisada pode ser responsável pela transcrição de um RNAm diferente, é necessário que o estudo dessa região seja feito a nível “fita-específico”. Os *primers* gene-específicos foram desenhados para este estudo com base na sequência reversa complementar do RNA XIST de bovinos (*GenBank* XR\_001500119.1), usando a ferramenta IDT Primer Quest software (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>). As sequências dos *primers* gene-específicos estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Identificação do gene, sequências dos *primers*, concentração dos *primers* e tamanho do fragmento amplificado para avaliação de expressão gênica *sense* e *antisense*.

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Concentração dos <i>primers</i>	Tamanho do <i>amplicon</i>
XIST éxon 1	F: CAGGCTTCACTCCACCTAAA	100 nM	175 pb
	R: GTTAGGCTAGAGGGTTGGTTAG		
XIST último éxon	F: GGACCAGACTTCACCAAGAAA	200 nM	159 pb
	R: GAAATGGGCCTAGTCTAAAGGG		

Foi usado *primer* oligo(dT) na concentração final de 2,5 µM como um controle positivo da reação. Outra reação de síntese de cDNA, na ausência de transcriptase reversa (*RT*-), também foi realizada, servindo como um controle negativo para atestar a ausência de contaminação por DNA genômico na reação de PCR. As amostras de cDNA utilizando oligo(dT) e *RT*- foram usadas na reação de PCR em tempo real tanto para amplificações do primeiro quanto do último éxon. A síntese de cDNA para esse experimento foi conduzida conforme descrito no **Anexo 12**.

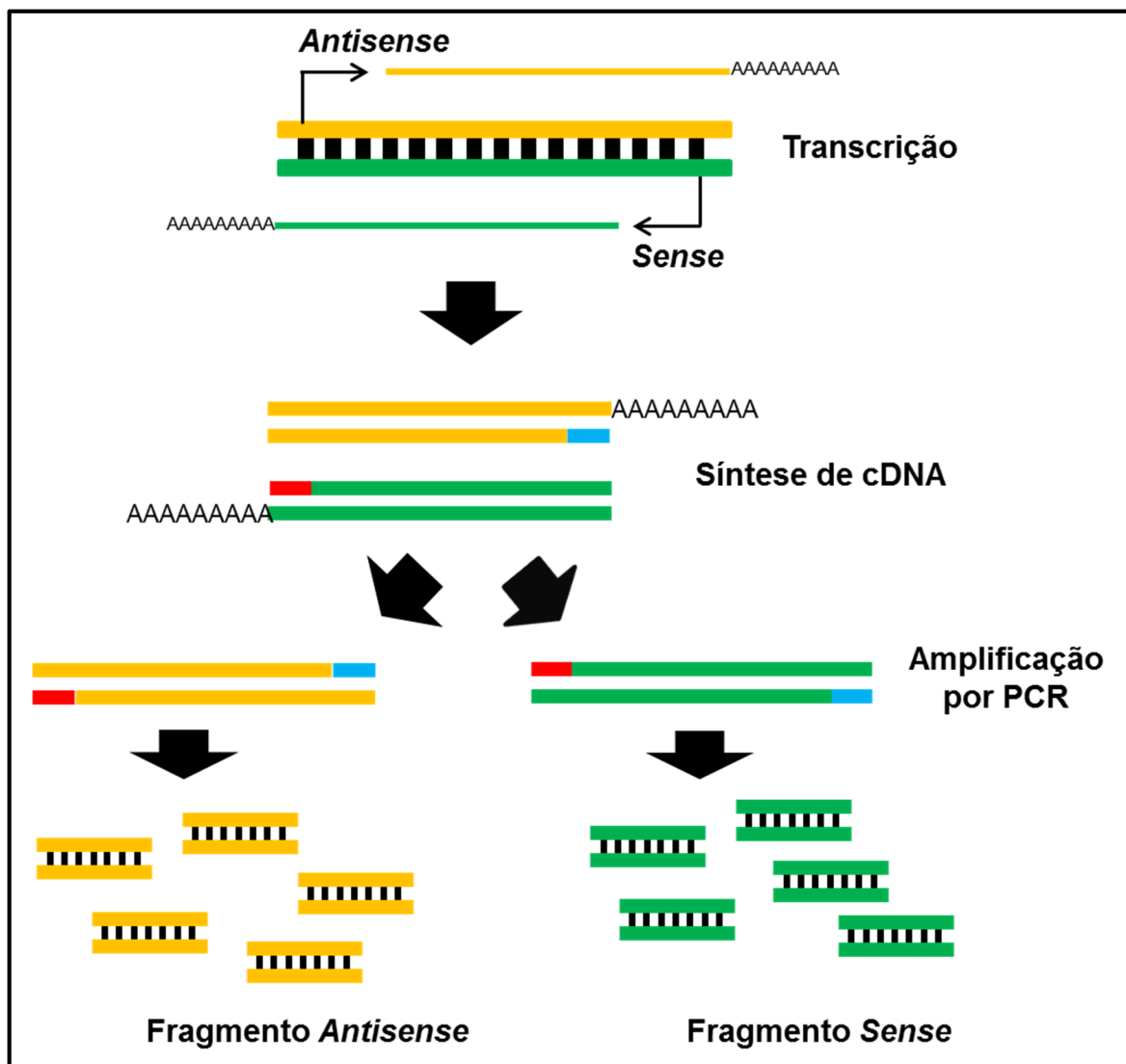
A partir de cada amostra de RNA total foram sintetizadas 6 amostras distintas de cDNA: uma amostra de cDNA a partir do *primer* TSIXP *forward* (TSIXP F), uma a partir do *primer* TSIXP *reverse* (TSIXP R), uma a partir do *primer* TSIXU *forward* (TSIXU F), uma a partir do *primer* TSIXU *reverse* (TSIXU R), uma a partir de *primers*

oligo(dT) e uma outra também utilizando *primers* oligo(dT), mas na ausência da enzima transcriptase reversa (*RT*-). Como os *primers* específicos foram desenhados a partir da sequência reversa e complementar de XIST, as amplificações correspondentes aos cDNAs sintetizados a partir dos *primers forward* referem-se ao transcrito *sense* (XIST), enquanto aquelas correspondentes aos cDNAs sintetizados a partir dos *primers reverse* referem-se ao transcrito *antisense* (não caracterizado em bovinos).

### **3.3.3 PCR em tempo real fita-específica [Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (SS-RT-PCR)]**

Os cDNA sintetizados com os *primers* fita-específicos e seus controles foram utilizados como molde para amplificação por PCR tempo real. Para cada reação foi utilizado cDNA equivalente a dois embriões e ~ 50 ng de RNA proveniente de tecido testicular. As PCR foram conduzidas utilizando Fast Sybr Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), em um termociclador ABI 7500 Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA). O volume final da reação foi de 25 µL e as condições de amplificações foram as seguintes: 95°C por 10 min., seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s. e anelamento e extensão a 60°C por 1 min., seguidas de uma curva de dissociação (95°C por 15 s., 65°C por 1 min., 95°C por 30 s. e 60°C por 15 s.). Os dados de fluorescência foram coletados após cada ciclo de extensão.

Foram analisadas a expressão *sense* e *antisense* para as regiões do primeiro e último éxons do gene XIST (TSIXP e TSIXU, respectivamente). As sequências e concentrações dos *primers* utilizadas nas reações de PCR, e tamanho dos *amplicons*, para cada região estudada, estão mostrados na Tabela 5. A técnica de *SS-RT-PCR* utilizada nesse trabalho está esquematizada na Figura 5.



**Figura 5:** Esquema da técnica de *Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (SS-RT-PCR) utilizada para prospecção de transcritos *sense* e *antisense* no *locus XIST*. As linhas amarela e verde com cauda PoliA no final 3' representam transcritos antisense e sense para um mesmo *locus* (fita dupla de DNA), respectivamente. Os transcritos são submetidos à transcrição reversa utilizando primers específicos para as fitas *sense* e *antisense* (barras pequenas azul e vermelha). Após a síntese do DNA complementar (cDNA), as amostras são submetidas à amplificação por PCR em tempo real utilizando o mesmo par de primers utilizados para a síntese do cDNA.

Foi feita uma única reação de PCR para cada amostra. Os *amplicons* foram submetidos à eletroforese a corrente elétrica constante de 50 mA em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL) em meio TBE 0,5 X. Utilizou-se o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O gel foi fotodocumentado em um equipamento Gel-doc 1000 Bio Rad (Bio-Rad Laboratories SA, EUA). Os produtos da PCR foram recortados do gel e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante. Em

seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

Os *amplicons* foram finalmente sequenciados utilizando 40 ng de DNA purificado e 0,25 µM dos *primers* específicos. Para o sequenciamento, foi utilizada a metodologia de dideoxi. A qualidade dos cromatogramas foi analisada utilizando o *software* CHROMAS® 2.4.4. As sequências obtidas foram comparadas com as sequências correspondentes depositadas no *GenBank* utilizando a ferramenta BLASTN

([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

### 3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de quantificação do padrão de metilação foram comparados entre os tratamentos experimentais utilizando-se Análise de Variância e o teste *t* de Student ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney se os dados apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Para os dados de expressão gênica foi feita análise descritiva dos dados, identificando se havia ou não a presença dos transcritos de interesse. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Systat, versão 10.2 (2002, Inc., Richmond, CA, USA).

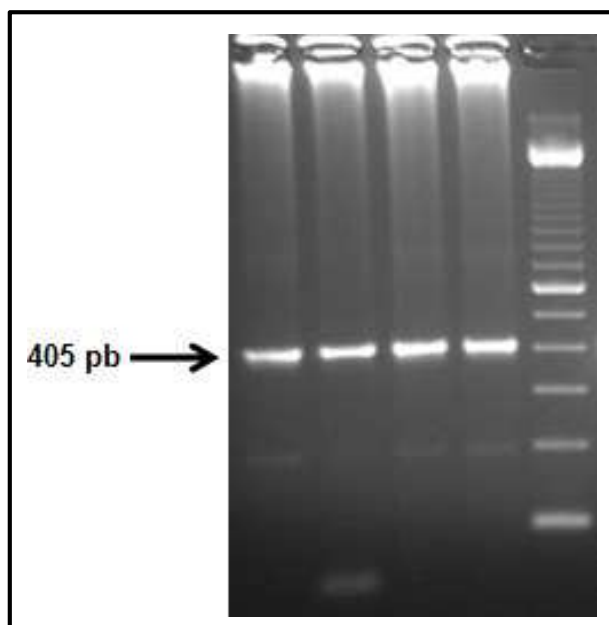


## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DA DMR 1, DA REGIÃO *REP A* E DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE XIST EM GAMETAS, EMBRIÕES E TECIDO PLACENTÁRIO BOVINOS

#### 4.1.1 Metilação da DMR 1 do gene XIST em gametas, embriões e placenta bovinos

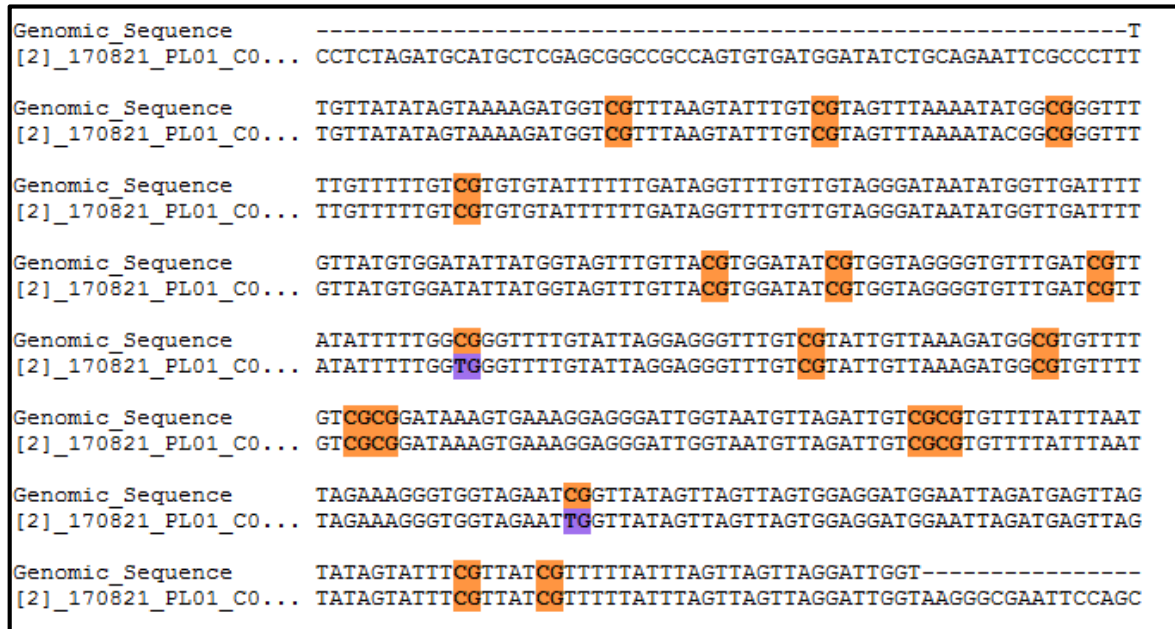
Os produtos da amplificação do DNA genômico tratado com bissulfito de sódio para a DMR 1 do gene XIST foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corados com brometo de etídeo, conforme Figura 6.



**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando um *amplicon* específico para a região DMR do exon 1 do gene XIST de ovócitos MII de bovinos utilizando como molde DNA genômico tratado com bissulfito de sódio. As quatro primeiras linhas são repetições da mesma PCR. A região amplificada referente ao XIST possui 405 pares de base (pb). A linha 5 à direita mostra o padrão de bandas do marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

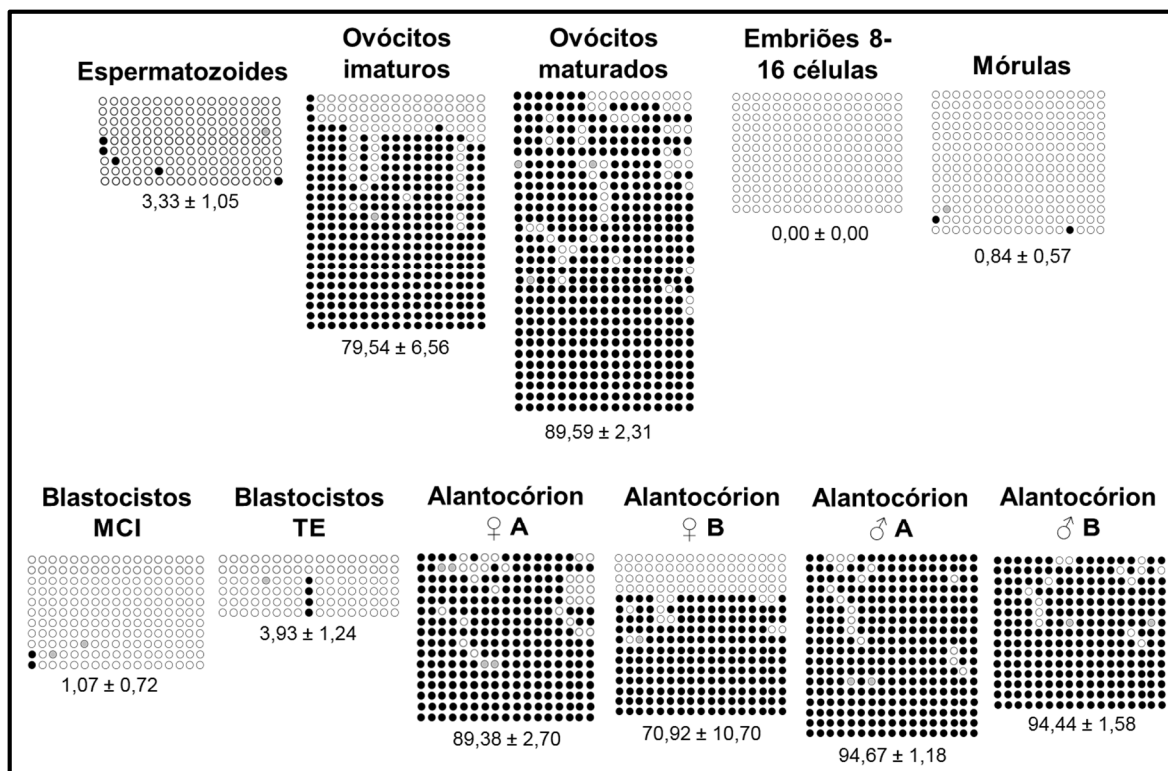
Os *amplicons* foram purificados do gel de agarose, e posteriormente clonados em células de DH5 $\alpha$ , tendo os plasmídeos purificados e sequenciados. As sequências foram analisadas no programa BiQ Analyser e somente foram consideradas para as análises as que tiveram o mínimo de 95% de identidade e

95% de conversão por bissulfito de sódio. A Figura 7 representa um exemplo de alinhamento para a análise do padrão de metilação para essa região específica.



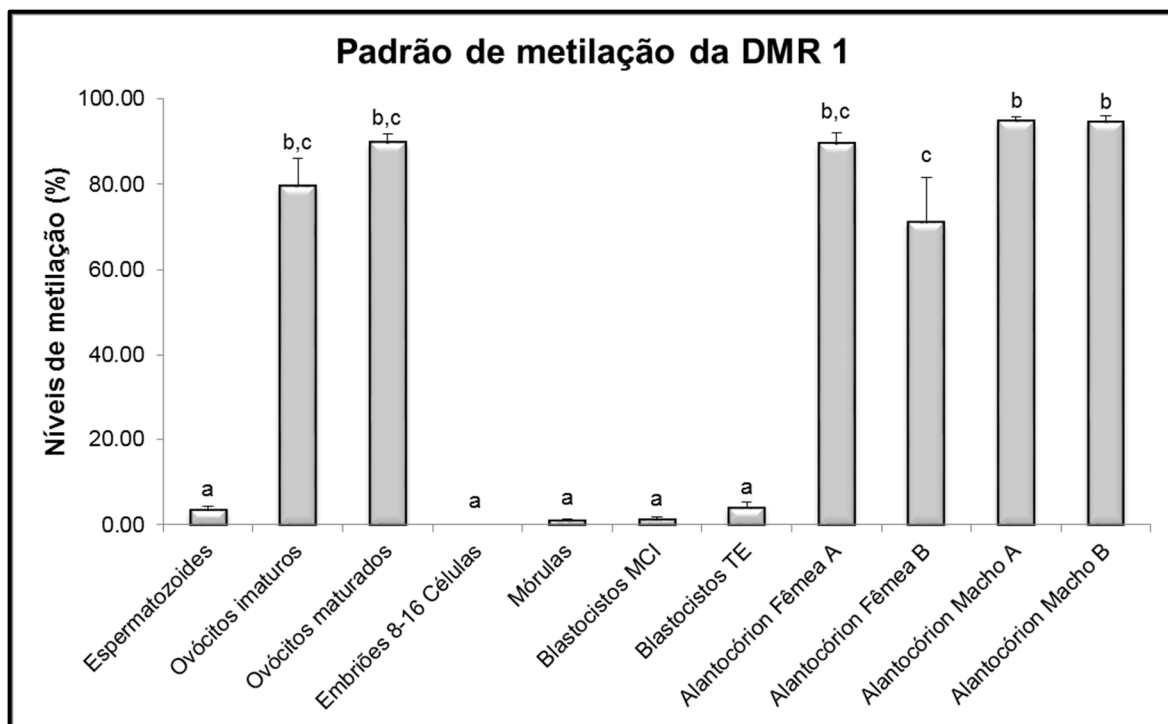
**Figura 7: Exemplo de alinhamento realizado no programa BiQ Analyzer entre a sequência referência (linha superior) e um produto de sequenciamento (linha inferior) para a DMR 1 do gene XIST, mostrando a posição dos 17 sítios CpGs analisados.** Marcações nas cores laranja e roxa indicam citosinas não metiladas, enquanto as marcações somente na cor laranja indicam citosinas metiladas.

Foram analisados 17 sítios CpG para a DMR 1 do gene XIST. Os padrões de metilação dessa região para espermatozoides, ovócitos, embriões e tecido placentário (alantocórion) estão representados na Figura 8.



**Figura 8: Padrão de metilação para a DMR 1 do gene XIST em gametas, embriões e placenta bovinos (*Bos taurus indicus*).** Padrões de metilação para a DMR 1 em espermatozoides, ovócitos imaturos, ovócitos maturados, embriões de 8-16 células, mórulas, massa celular interna de blastocistos expandidos, trofoectoderma de blastocistos expandidos, alantocórion fêmea A, alantocórion fêmea B, alantocórion macho A e alantocórion macho B. Os números abaixo de cada grupo indicam a média do padrão de metilação em percentagem  $\pm$  erro padrão da média. Cada linha representa um clone; cada círculo representa uma citosina num contexto de dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica citosina metilada, enquanto círculo branco indica citosina não metilada. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento.

Os níveis de metilação de cada grupo estudado também estão representados na Figura 9 e os valores de  $p$  para todas as análises estatísticas realizadas para a DMR 1 do gene XIST encontram-se no **Anexo 13**.



**Figura 9: Taxa de metilação para a região da DMR 1 do gene XIST.** Cada barra representa um grupo analisado (espermatozoides, ovócitos imaturos, ovócitos maturados, embriões de 8-16 células, mórulas, massa celular de blastocistos expandidos, trofoectoderma de blastocistos expandidos, alantocórion fêmea A, alantocórion fêmea B, alantocórion macho A e alantocórion macho B). Os resultados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam níveis diferentes de metilação ( $p < 0,05$ ).

A taxa de metilação, número de sequências analisadas, o número mínimo de alelos encontrados e o número de sequências hipermetiladas [ $\geq 50\%$  de sítios CpGs metilados (Imamura, Kerjean *et al.*, 2005)] para cada material biológico estudado estão representados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Taxa de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para cada grupo analisado para a região diferencialmente metilada 1 do gene XIST.

Grupos estudados	Taxa de metilação (%) $\pm$ erro padrão da média	Número de clones analisados	Número mínimo de alelos analisados	Número de sequências hipermetiladas
Espermatozoide	3,33 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	9	5	0 (0,0%)
Ovócitos imaturos (GV)	79,54 $\pm$ 6,56 <sup>b,c</sup>	24	9	20 (83,3%)
Ovócitos maturados (MII)	89,59 $\pm$ 2,31 <sup>b,c</sup>	30	19	29 (96,7%)
Embriões 8-16 células	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	12	1	0 (0,0%)
Mórulas	0,84 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	14	3	0 (0,0%)
MCI de blastocistos Bx	1,07 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>	11	3	0 (0,0%)
TE de blastocistos Bx	3,93 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup>	6	2	0 (0,0%)
Alantocórion fêmea A	89,38 $\pm$ 2,70 <sup>b,c</sup>	16	11	16 (100,0%)
Alantocórion fêmea B	70,92 $\pm$ 10,70 <sup>c</sup>	16	7	12 (75,0)
Alantocórion macho A	94,67 $\pm$ 1,18 <sup>b</sup>	18	10	18 (100,0%)
Alantocórion macho B	94,44 $\pm$ 1,58 <sup>b</sup>	15	8	15 (100,0%)

a, b, c Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados, considerando-se  $p < 0,05$ . GV – vesícula germinativa; MII – meiose II; MCI – massa celular interna; TE – trofoectoderma; Bx – blastocisto expandido

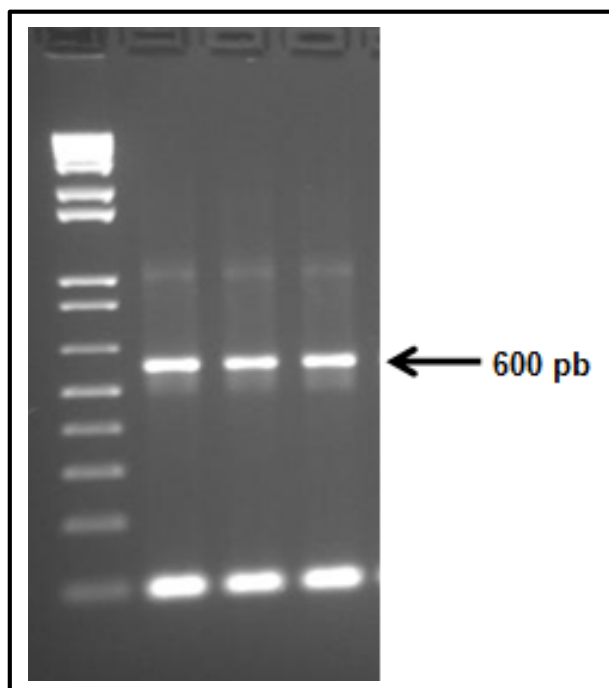
Padrões de metilação contrastantes foram encontrados para os gametas masculino e feminino para a DMR 1 do gene XIST em bovinos, sendo que espermatozoides apresentaram um padrão hipometilado ( $3,33 \pm 1,05\%$ ) quando comparado com ovócitos maturados ( $89,59 \pm 2,31\%$ ;  $p < 0,001$ ). Tem-se ainda diferença quando se compara a distribuição de alelos hipo ou hipermetilados, na qual espermatozoides apresentaram somente alelos hipometilados, enquanto ovócitos maturados apresentaram 96,7% dos seus alelos hipermetilados. Observa-se ainda que os ovócitos não sofrem mais mudanças no padrão de metilação para essa região específica durante a maturação nuclear, já que os níveis de metilação encontrados para o gameta imaturo e maturado são estatisticamente semelhantes, ( $79,54 \pm 6,56$  e  $89,59 \pm 2,31$ , respectivamente,  $p = 0,339$ ).

Essa região encontra-se completamente desprogramada na embriogênese inicial, baseando-se no padrão hipometilado observado já a partir do estágio de 8-16 células ( $0,00 \pm 0,00$ ), passando por mórula ( $0,84 \pm 0,57$ ) e mantendo-se até o estágio de blastocisto ( $1,07 \pm 0,72$  e  $3,93 \pm 1,24$ ). No entanto, o padrão hipometilado observado nas células do trofoectoderma de blastocistos não se mantém nas células do alantocóron originário tanto de gestações de bezerros fêmeas quanto de machos, nas quais houve um ganho significativo de metilação do DNA para essa região ao longo do desenvolvimento.

#### **4.1.2 Metilação da região *Repeat A (Rep A)* do gene *XIST* em gametas, embriões e placenta bovinos**

A região *Repeat A (Rep A)* está presente no éxon 1 do gene *XIST*, *usptream* à DMR 1 (Figura 4) e também foi analisada quanto ao padrão de metilação do DNA. A região é bastante conservada entre diferentes espécies de mamíferos, e baseando-se em informações de camundongos, pode também estar envolvida na regulação da expressão de *XIST* e/ou *Rep A* em bovinos e, conseqüentemente, na inativação do cromossomo X.

O DNA tratado com bissulfito de sódio foi amplificado por PCR e os produtos foram submetidos à eletroforese de gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, conforme Figura 10.



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando um *amplicon* específico para a região do *Rep A* do gene *XIST* de espermatozoides bovinos utilizando como molde DNA genômico tratado com bissulfito de sódio. A linha 1 à esquerda mostra o padrão de bandas do marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As três linhas seguintes são repetições da mesma PCR. A região amplificada possui 600 pares de base (pb).

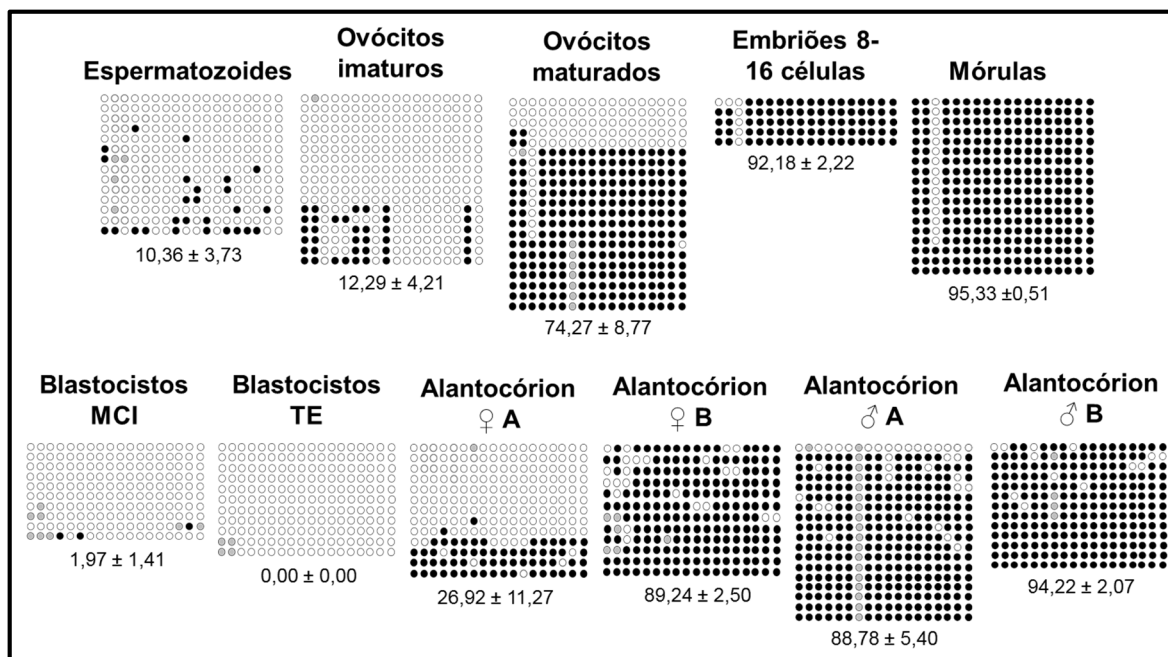
Os *amplicons* foram purificados do gel e clonados em células DH5 $\alpha$ , tendo os plasmídeos purificados e sequenciados. As sequências foram analisadas no programa BiQ Analyser e somente as que tiveram taxas de identidade e conversão por bissulfito de sódio > 95% foram consideradas para as análises. A Figura 11 representa um exemplo de alinhamento para a análise do padrão de metilação para essa região específica.

Genomic_Sequence	TTATTGTTTATCGCGGTTGTGGATATTGGTTTTAGTGTGTATATAGATAGGTAGATAG
[2]_170821_PL02_GO...	TTATTGTTTATCGCGGTTGTGGATATTGGTTTTAGTGTGTATATAGATAGGTAGATAG
Genomic_Sequence	ATATATTATTATTGTTATTATTTTTATTTAAACGGGGTTATGGATATTGTTTTTTATTT
[2]_170821_PL02_GO...	ATATATTATTATTGTTATTATTTTTATTTAAACGGGGTTATGGATATTGTTTTTTATTT
Genomic_Sequence	TATTTTTTTTTAAATTTGTTTATCGGGGTTACGGATATTGTTTTTAATTTTTTTTTTTT
[2]_170821_PL02_GO...	TATTTTTTTTTAAATTTGTTTATCGGGGTTACGGATATTGTTTTT-A--GTTTTTTTTT
Genomic_Sequence	TTTTAGTTTATCGGGGTTTCGGATATTGTTGTGTATTTTTTTTTTTTTTAATTTGGTTT
[2]_170821_PL02_GO...	TTTTAGTTTATCGGGGTTTCGGATATTGTTGTGTGTA-TTTTTTTTTTTTTAATTTGGTTT
Genomic_Sequence	ATCGGGGTAATGGATATTGTTTTTTTTTTAAATGTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTTGT
[2]_170821_PL02_GO...	ATTGGGGTAATGGATATTGTTTTTTTTTTAAATGTGTG---TTTTTTTTTTTTTGT
Genomic_Sequence	TATCGGGGTTTCGGATATTGTTTAAATTTTTTTTTTTGTTTATCGGGGTTTCGGATA
[2]_170821_PL02_GO...	TATCGGGGTTTCGGATATTGTTTAA--TTTTTTTTTTGTTTATCGGGGTTTCGGATA
Genomic_Sequence	TTTGTTTTAATTTTTTTTTTTGTTTATCGGGGTTCGCGGATATTGTTTAGATTTTTGT
[2]_170821_PL02_GO...	TTTGTTTTAA--TTTTTTTTTTGTTTATCGGGGTTCGCGGATATTGTTTAGATTATTGT
Genomic_Sequence	TTATATTATTTATCGGGGTTTATATGTTGGAAAAGTGTGGGTTTTGTGGTTTCGTTGT
[2]_170821_PL02_GO...	TTATATTATTTATCGGGGTTTATATGTTGGAAAAGTGTGGGTTTTGTGGTTTCGTTGT
Genomic_Sequence	ATTATTTGGAATGTTTATAAAATTTTGTGTTAATCGTTTGTGTGTGTGAGTGGATTTA
[2]_170821_PL02_GO...	ATTATTTGGAATGTTTATAAAATTTTGTGTTAATCGTTTGTGTGTGTGAGTGGATTTA

**Figura 11: Exemplo de alinhamento realizado no programa BiQ Analyzer entre a sequência referência (linha superior) e um produto de sequenciamento (linha inferior) para a região do *Rep A* do gene XIST, mostrando a posição dos 18 sítios CpGs analisados.** Marcações nas cores laranja e roxa indicam citosinas não metiladas, enquanto as marcações somente na cor laranja indicam citosinas metiladas.

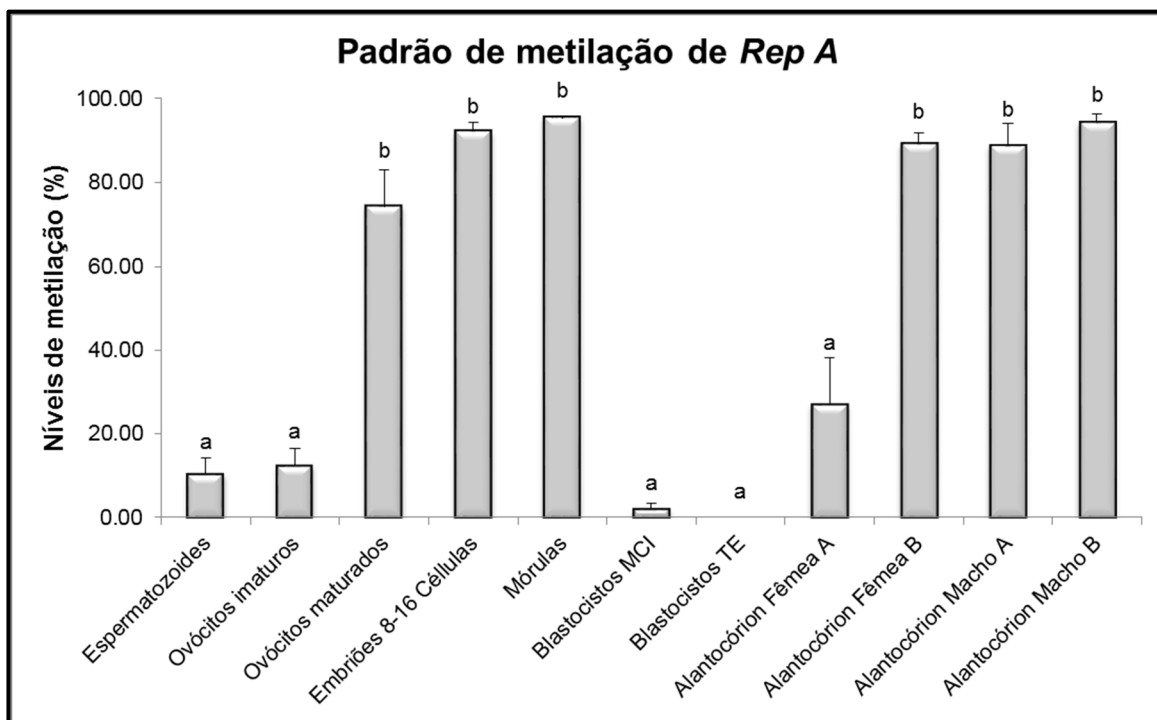
Foram analisados 18 sítios CpG para a região *Rep A*. Os padrões de metilação da região em espermatozoides, ovócitos, embriões e tecido placentário (alantocórion) bovinos estão representados na Figura 12.





**Figura 12: Padrão de metilação para a região *Rep A* do gene *XIST* em gametas, embriões e placenta bovinos (*Bos taurus indicus*).** Padrões de metilação para *Rep A* em espermatozoides, ovócitos imaturos, ovócitos maturados, embriões de 8-16 células, mórulas, massa celular interna de blastocistos expandidos, trofoectoderma de blastocistos expandidos, alantocórion fêmea A, alantocórion fêmea B, alantocórion macho A e alantocórion macho B. Os números abaixo de cada grupo indicam a média do padrão de metilação em percentagem  $\pm$  erro padrão da média. Cada linha representa um clone; cada círculo representa uma citosina num contexto de dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica citosina metilada, enquanto círculo branco indica citosina não metilada. Círculo cinza indica não detecção do sítio CpG no sequenciamento.

Os níveis de metilação de cada grupo estudado também estão representados na Figura 13 e os valores de  $p$  para todas as análises estatísticas realizadas para a região de *Rep A* do gene *XIST* encontram-se no **Anexo 14**.



**Figura 13: Taxa de metilação para a região do Rep A do gene XIST.** Cada barra representa um grupo analisado (espermatozoides, ovócitos imaturos, ovócitos maturados, embriões de 8-16 células, mórulas, massa celular de blastocistos expandidos, trofoectoderma de blastocistos expandidos, alantocórion fêmea A, alantocórion fêmea B, alantocórion macho A e alantocórion macho B). Os resultados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam níveis diferentes de metilação ( $p < 0,05$ ).

A taxa de metilação, número de sequências analisadas, o número mínimo de alelos encontrados e o número de sequências hipermetiladas [ $\geq 50\%$  de sítios CpGs metilados (Imamura, Kerjean *et al.*, 2005)] para cada material biológico estudado estão representados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Taxa de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para cada grupo analisado para a região do *Rep A* do gene XIST.

Grupos estudados	Taxa de metilação (%) $\pm$ erro padrão da média	Número de clones analisados	Número mínimo de alelos analisados	Número de sequências hipermetiladas
Espermatozoide	10,36 $\pm$ 3,73 <sup>a</sup>	14	11	1 (7,1%)
Ovócitos imaturos (GV)	12,29 $\pm$ 4,21 <sup>a</sup>	17	5	0 (0,0%)
Ovócitos maturados (MII)	74,27 $\pm$ 8,77 <sup>b</sup>	21	6	16 (76,2%)
Embriões 8-16 células	92,18 $\pm$ 2,22 <sup>b</sup>	5	2	5 (100,0%)
Mórulas	95,33 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup>	18	2	18 (100,0%)
MCI de blastocistos Bx	1,97 $\pm$ 1,41 <sup>a</sup>	10	3	0 0 (0,0%)
TE de blastocistos Bx	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	11	1	0 0 (0,0%)
Alantocórion fêmea A	26,92 $\pm$ 11,27 <sup>a</sup>	13	7	4 (30,8%)
Alantocórion fêmea B	89,24 $\pm$ 2,50 <sup>b</sup>	12	8	12 (100,0%)
Alantocórion macho A	88,78 $\pm$ 5,40 <sup>b</sup>	18	12	17 (94,4%)
Alantocórion macho B	94,22 $\pm$ 2,07 <sup>b</sup>	13	8	13 (100,0%)

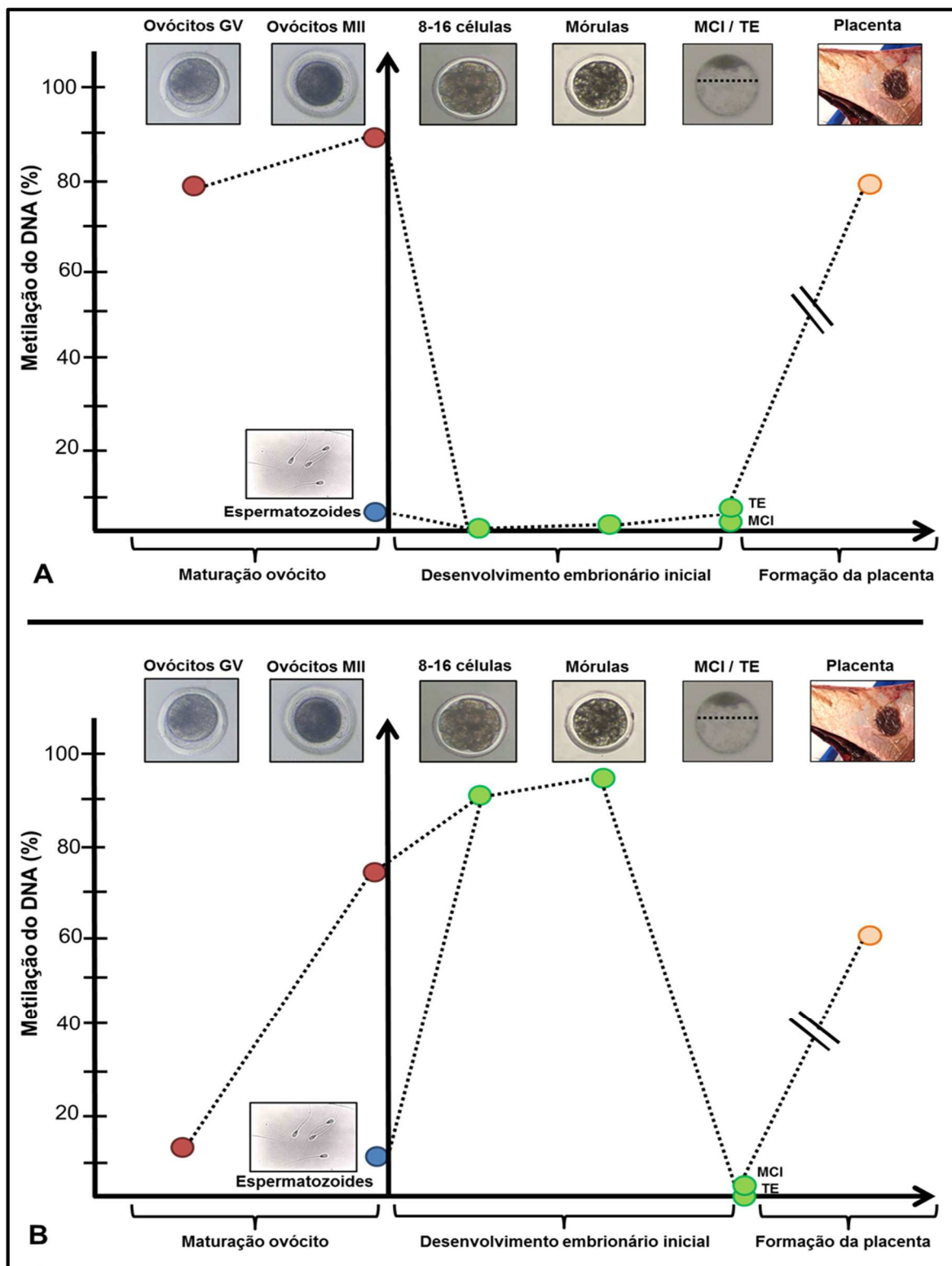
a, b Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados, considerando-se  $p < 0,05$ . GV – vesícula germinativa; MII – meiose II; MCI – massa celular interna; TE – trofoectoderma; Bx – blastocisto expandido

Tal como observado para a DMR 1, a região do *Repeat A* também apresentou padrões de metilação contrastantes para os gametas masculino e feminino maturados (10,26  $\pm$  3,73% e 74,27  $\pm$  8,77%, respectivamente;  $p < 0,001$ ), assim como na distribuição de alelos hipermetilados (7,1% e 76,2%, respectivamente). Além disso, observa-se que ainda está ocorrendo mudanças no padrão de metilação do DNA do ovócito para essa região específica durante a maturação nuclear, na qual a região *Rep A* apresentou um aumento expressivo dos níveis de metilação quando se compara ovócitos imaturos daqueles maturados (12,29  $\pm$  4,21% e 74,27  $\pm$  8,77%, respectivamente;  $p < 0,001$ ).

Outra diferença observada bastante interessante é quando se compara o padrão de metilação do DNA para as regiões da DMR 1 e para a *Rep A* após a

fecundação. Enquanto a DMR 1 encontra-se desmetilada já no estágio de 8-16 células, para a *Rep A* a desmetilação acontece apenas a partir do estágio de blastocisto, sendo que embriões em estágios mais precoces de desenvolvimento (estágio de 8-16 células e mórula) apresentam um alto padrão de metilação ( $92,18 \pm 2,22\%$  e  $95,33 \pm 0,51$ , respectivamente), quando comparados com as células da massa celular interna e do trofoectoderma ( $1,97 \pm 1,41\%$  e  $0,00 \pm 0,00\%$ , respectivamente). Altos padrões de metilação são novamente reestabelecidos nas células do alantocórion, como os provenientes da gestação de uma das fêmeas analisadas ( $89,24 \pm 2,50\%$ ), sendo que na outra o padrão de metilação manteve-se mais baixo ( $26,92 \pm 11,27\%$ ;  $p < 0,001$ ). No tecido placentário dos machos, foram encontrados apenas altos padrões de metilação.

A reprogramação da metilação do DNA que ocorre nas regiões da DMR 1 e do *Rep A* no final da gametogênese, no desenvolvimento embrionário inicial e na placenta em bovinos está representada na Figura 14.

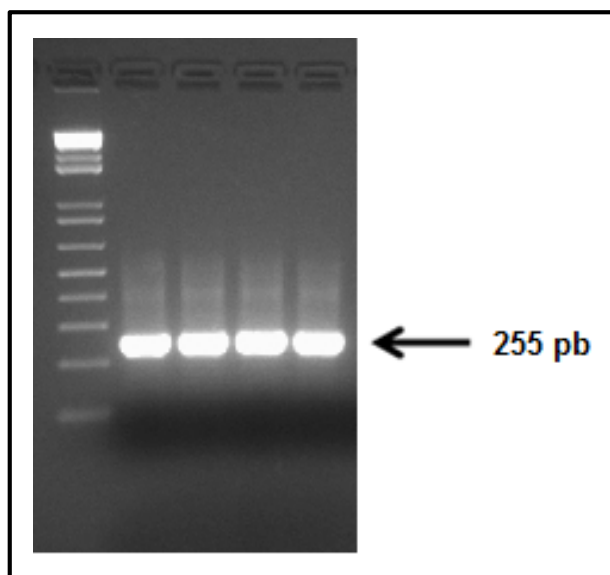


**Figura 14: Reprogramação da metilação do DNA de duas regiões do gene XIST em bovinos durante o final da gametogênese, início do desenvolvimento embrionário e na placenta.** O eixo Y indica a porcentagem de metilação, enquanto o eixo X representa as diferentes fases do desenvolvimento estudadas [GV- vesícula germinativa (ovócitos imaturos), MII – meiose II (ovócitos maturados), espermatozoides, embriões de 8-16 células, mórulas, MCI – massa celular interna e TE – trofoectoderma de blastocistos expandidos e placenta], tanto para a DMR 1 (A) quanto para a região do Rep A (B). As diferentes amostras biológicas estão representadas por círculos de diferentes cores, sendo vermelha para ovócitos, azul para espermatozoide, verde para embriões e laranja para placenta (alantocórion).

#### 4.1.3 Metilação da região promotora do gene XIST em gametas bovinos

Embora não esteja descrito na literatura o envolvimento da metilação do DNA dessa região com o controle da expressão de XIST em bovinos, essa região do promotor apresenta alguns dinucleotídeos CpG em sua sequência, sendo, portanto, passíveis de sofrerem metilação. Dessa forma, analisou-se também o padrão de metilação do DNA dessa região.

O DNA genômico de espermatozoides e ovócitos tratado com bissulfito de sódio foi amplificado por PCR e os *amplicons* submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, conforme Figura 15.



**Figura 15:** Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando um *amplicon* específico para a região do promotor do gene XIST de ovócitos MII bovinos utilizando como molde DNA genômico tratado com bissulfito de sódio. A linha 1 à esquerda mostra o padrão de bandas do marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As quatro linhas seguintes são repetições da mesma PCR. A região amplificada possui 255 pares de base (pb).

Os *amplicons* foram purificados do gel e clonados em células DH5 $\alpha$ , tendo os plasmídeos purificados e sequenciados. As sequências foram analisadas no programa BiQ Analyser e somente as que tiveram taxas de identidade e conversão por bissulfito de sódio > 95% foram consideradas para as análises. A Figura 16 representa um exemplo de alinhamento de sequências de DNA para a quantificação dos níveis de metilação para essa região específica.

```

Genomic_Sequence      ----TTGTTATTTTTTTGAATTTTTTTTTTTTGTATTGGGTAAATTTTGAATCGGTT
[2]_20171010_PL_01... CCTTTTGTATTTTTTTGAA-TTTTTTTTTTTGTATTGGGTAAATTTTGAATCGGTT

Genomic_Sequence      AAATTATAAATATGTTTGGTTTTTAATTTTTTAGGTTATTTTTTTTTTATTTTTTTCGTT
[2]_20171010_PL_01... AAATTATAAATATGTTTGGTTTTTAATTTTTTAGGTTA-TTTTTTTTTTATTTTTTGTGTT

Genomic_Sequence      TTTAGTTTTTTTTTTTTTATTTTTTAAAGCGTTGTATTTTGTTCGATCGTTATATTTT
[2]_20171010_PL_01... TTTAGTTTTTTTTTTTTTATTTTTTAAAGCGTTGTATTTTGTTCGATCGTTATATTTT

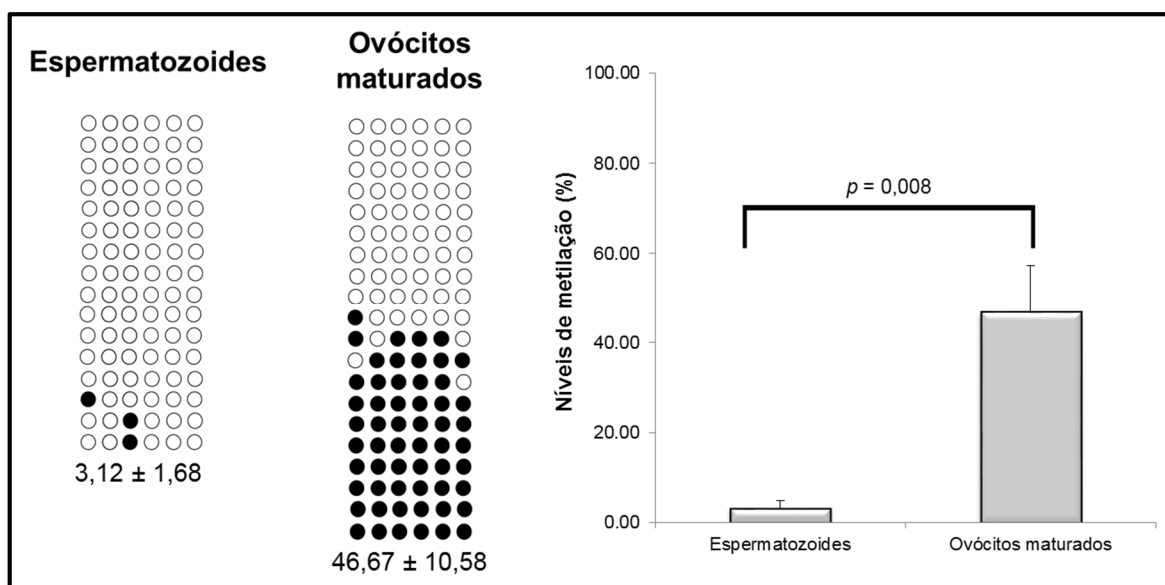
Genomic_Sequence      TTTTTTTTCGAGATGGAAGTTTATTAATATTGGATTTTTTGTGTTGTGGTTTTTTTTTG
[2]_20171010_PL_01... TTTTTTTTCGAGATGGAAGTTTATTAATATTGGATTTTTTGTGTTGTGGTTTTTTTTTG

Genomic_Sequence      GAATATTTTTTAGATTTTA-----
[2]_20171010_PL_01... GAATATTTTTTAGATTTTAAAGGGCGAATTCACGACACTGGCGCCGTTACTAGTGGAT

```

**Figura 16:** Exemplo de alinhamento realizado no programa BiQ Analyzer entre a sequência referência (linha superior) e um produto de sequenciamento (linha inferior) para a região do promotor do gene XIST, mostrando a posição dos 6 sítios CpGs analisados. Marcações nas cores laranja e roxa indicam citosinas não metiladas, enquanto as marcações somente na cor laranja indicam citosinas metiladas.

Foram analisados 6 sítios CpG para a região promotora do XIST. O padrão de metilação para essa região, em espermatozoides e ovócitos MII (maturados), está representado na Figura 17.



**Figura 17:** Padrão de metilação da região promotora do gene XIST em gametas bovinos (*Bos taurus indicus*). Representação dos padrões de metilação para região promotora em espermatozoides e ovócitos maturados. Cada linha representa um clone; cada círculo representa uma citosina num contexto de dinucleotídeo CpG. Círculo preto indica citosina metilada, enquanto círculo branco indica citosina não metilada. Os resultados dos níveis de metilação estão também representados na forma de gráfico, como média  $\pm$  erro padrão da média, em que cada barra representa um grupo analisado (espermatozoides e ovócitos maturados). Os resultados estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média. O valor de  $p$  indica níveis diferentes de metilação entre os dois grupos analisados, de acordo com o teste de Mann-Whitney ( $p = 0,008$ ).

A taxa de metilação, número de sequências analisadas, o número mínimo de alelos encontrados e o número de sequências hipermetiladas [ $\geq 50\%$  de sítios CpGs metilados (Imamura, Kerjean *et al.*, 2005) para cada amostra estudada, estão representados na Tabela 8 abaixo.

**Tabela 8.** Taxa de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para espermatozoides e ovócitos maturados para a região promotora do gene XIST.

Grupos estudados	Taxa de metilação $\pm$ erro padrão da média	Número de clones analisados	Número mínimo de alelos analisados	Número de sequências hipermetiladas
Espermatozoides	3,12 $\pm$ 1,68 <sup>a</sup>	16	3	0 (0,%)
Ovócitos maturados (MII)	46,67 $\pm$ 10,58 <sup>b</sup>	20	6	10 (50,0%)

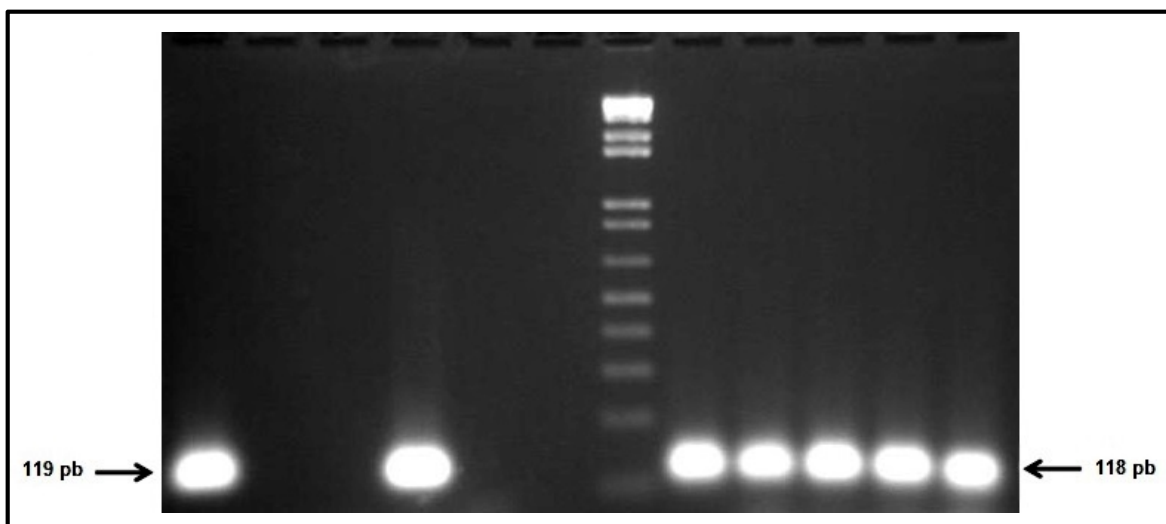
<sup>a, b</sup> Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados, considerando-se  $p < 0,05$ .

Assim como para as outras duas regiões analisadas (DMR 1 e *Rep A*), a região promotora, embora apresentando poucos dinucleotídeos CpG, possui diferentes padrões de metilação quando se compara os gametas masculino e feminino ( $p = 0,008$ ). Espermatozoides apresentaram-se hipometilados para essa região (3,12  $\pm$  1,68), assim como ocorreu para a DMR 1 e para a região *Rep A*, enquanto ovócitos apresentaram níveis de metilação próximos dos 50%.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA NO *LOCUS* XIST EM CÉLULAS INDIVIDUAIS DE EMBRIÕES BOVINOS

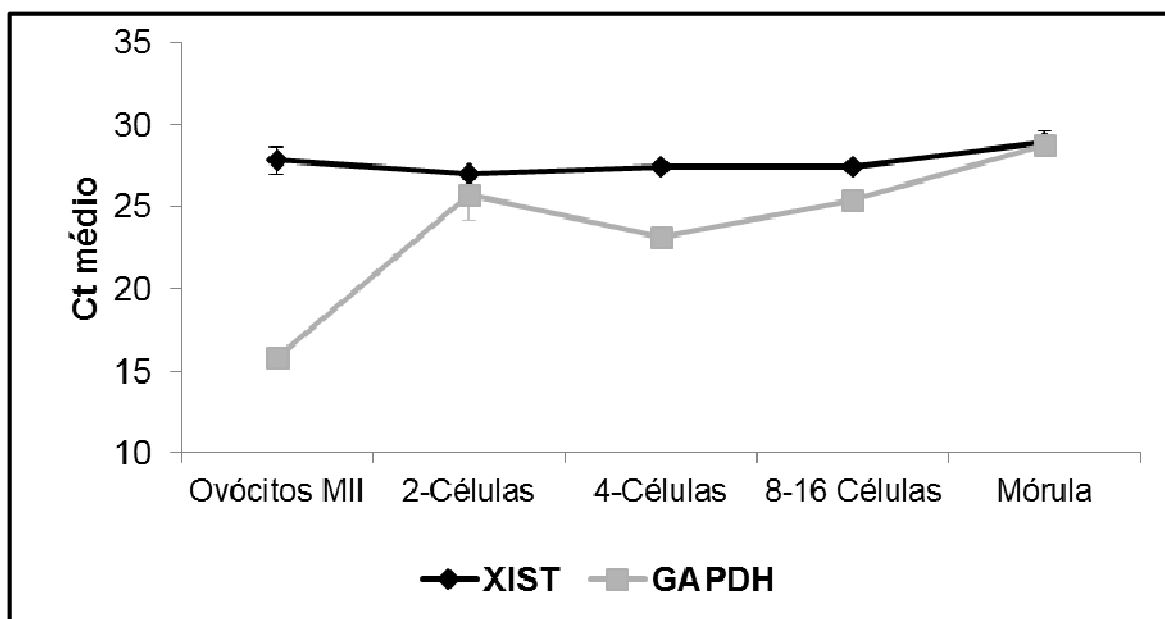
Blastômeros individuais de embriões produzidos a partir de sêmen sexado para fêmea foram submetidos à análise de expressão gênica para o *locus* XIST. Após a PCR em tempo real, os *amplicons* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo para confirmação do tamanho esperado dos *amplicons* para o transcrito alvo e para o gene GAPDH, conforme mostrado na Figura 18.





**Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os produtos da amplificação para o locus XIST e para o GAPDH em células individuais de mórula.** Os amplicons referentes ao XIST possuem 119 pares de base (pb) (lado esquerdo do marcador), enquanto os amplicons referentes ao GAPDH possuem 118 pb (lado direito do marcador). Ao centro, marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Foram detectados transcritos para o *locus* XIST em ovócitos MII individuais e blastômeros individuais, de embriões bovinos fêmeas nos estágios de 2 células até mórula, através de PCR em tempo real. O gene GAPDH foi escolhido como controle endógeno (controle positivo) e somente as células nas quais foram detectadas expressão de GAPDH (GAPDH<sup>+</sup>) foram consideradas viáveis e contabilizadas nas análises. Foram analisados 5 ovócitos individualmente, células individuais de 5 embriões de 2 células, de 5 embriões de 4 células, de 3 embriões de 8-16 células e de 2 mórulas. O resultado da detecção da expressão gênica nos diferentes blastômeros analisados, assim como os valores de Ct (*threshold cycle*) para cada embrião e estágio de desenvolvimento estão representados no **Anexo 15** e as médias de Ct para ovócitos e embriões em cada estágio de desenvolvimento estão também representados na Figura 19.



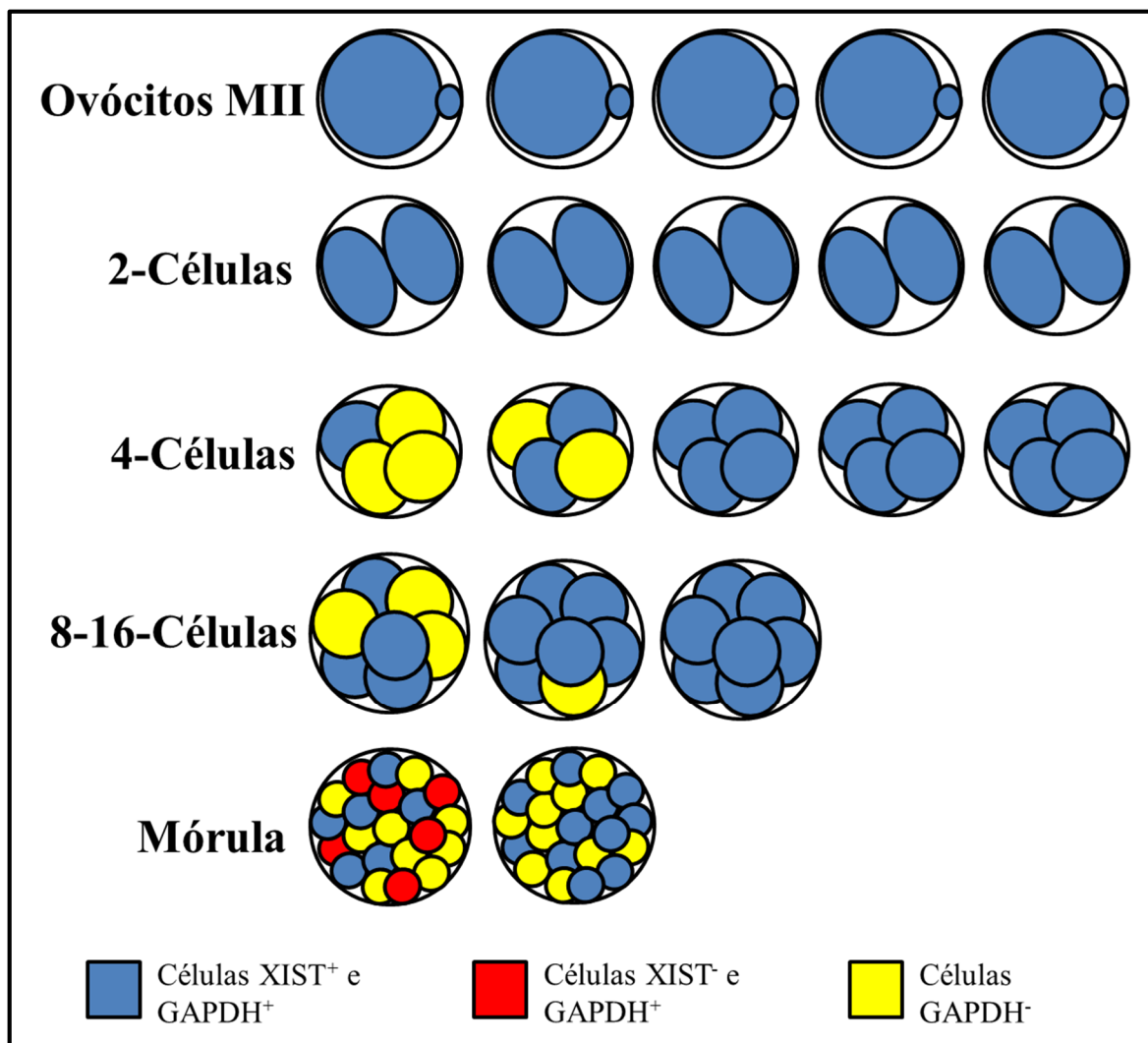
**Figura 19:** Média dos Ct (*threshold cycle*) para os genes XIST e GAPDH para cada estágio de desenvolvimento analisado (ovócitos MII, embriões de 2 células, 4 células, 8-16 células e mórulas). Os valores estão representados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Os resultados qualitativos, detecção ou não de transcritos, para XIST e GAPDH nos ovócitos e células embrionárias individuais estão também representados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Expressão de GAPDH e XIST em ovócitos e células individuais de embriões em diferentes estágios (2 células, 4 células, 8-16 células e mórulas): número de estruturas avaliadas (ovócitos e embriões), número de células analisadas, quantidade de células GAPDH<sup>+</sup>, quantidade de células XIST<sup>+</sup>, taxa de células XIST<sup>+</sup> (%) e proporção de estruturas XIST<sup>+</sup> (%).

Estágio Embrionário	Número de estruturas analisadas	Número de células analisadas	Células GAPDH <sup>+</sup>	Células XIST <sup>+</sup>	Células XIST <sup>+</sup> (%)	Estruturas XIST <sup>+</sup>
Ovócitos MII	5	5	5	5	100%	5/5
2-Células	5	10	10	10	100%	5/5
4-Células	5	15	15	15	100%	5/5
8-16 Células	3	24	24	24	100%	3/3
Mórula	2	17	17	14	82,3%	2/2

As informações contidas na Tabela 9 estão representadas de forma esquemática na Figura 20.



**Figura 20: Representação da expressão de XIST e GAPDH em células individualizadas de embriões bovinos fêmeas em diferentes estágios de desenvolvimento.** Foram analisados blastômeros de embriões em diferentes estágios embrionários (2-Células, 4-Células, 8-16 Células e Mórula), além de ovócitos maturados (MII). A detecção de XIST e/ou GAPDH está esquematizado por cores, conforme legenda na parte inferior da figura. Os círculos correspondentes às células de embriões de 8-16 células e mórula não representam o número real de blastômeros analisados, sendo que o padrão das cores no desenho é proporcional aos números reais.

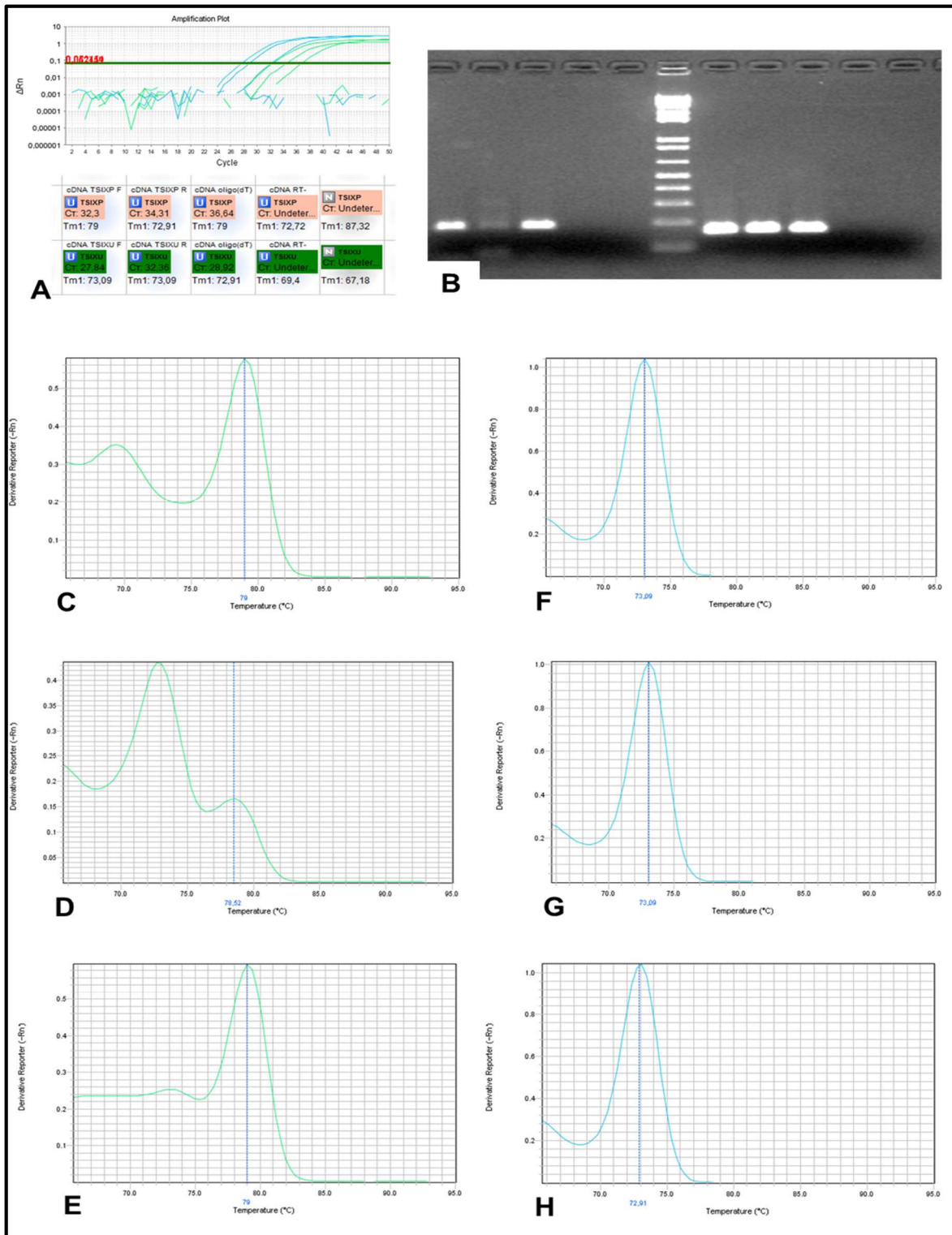
Foi observado que todos os ovócitos e os embriões de 2 células apresentaram, tanto expressão de XIST quanto de GAPDH. Já no estágio de 4 células, 3 dos 5 embriões analisados apresentaram expressão de XIST e GAPDH em todas as células, enquanto que em 2 embriões foram detectados blastômeros GAPDH<sup>-</sup>. Dois embriões de 8-16 células também apresentaram blastômeros GAPDH<sup>-</sup>. Finalmente, entre as células consideradas viáveis (GAPDH<sup>+</sup>), os embriões em estágio de mórula apresentaram 82,3% de blastômeros positivos para o gene XIST, diferentemente dos outros estágios embrionários e ovócitos, nos

quais todas as células consideradas viáveis apresentaram expressão de transcrito no *locus* XIST.

#### **4.3 CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA *SENSE* E *ANTISENSE* por SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) PARA O LOCUS XIST**

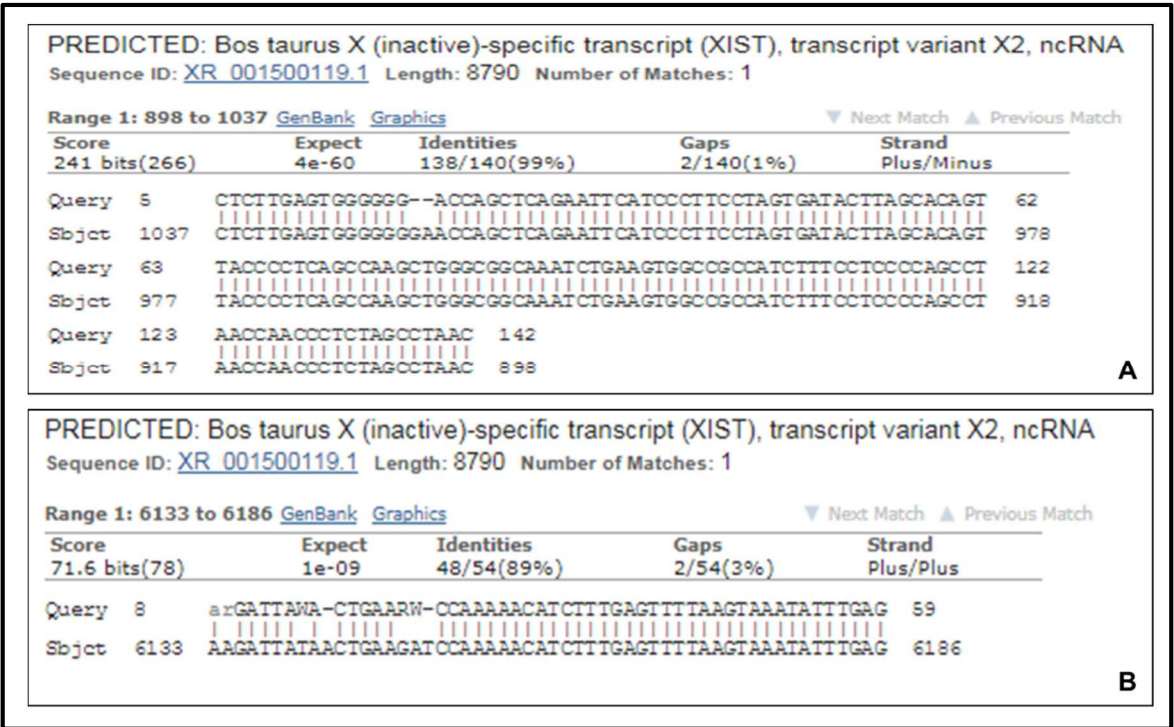
Para este experimento foram produzidos embriões em estágio de blastocisto expandido e foram utilizadas também amostras de parênquima testicular como controle. Após a extração do RNA, o cDNA foi sintetizado e submetido à PCR em tempo real. Os fragmentos amplificados pela PCR em tempo real foram submetidos à eletroforese em gel e após a confirmação do tamanho esperado dos *amplicons*, eles foram purificados e sequenciados. Portanto, a identidade dos produtos foi confirmada através do tamanho dos amplicons (175 pb para o primeiro éxon e 159 pb para o último éxon), da temperatura de *melting* ( $T_m$ ) (~ 79°C para o primeiro éxon e ~ 73°C para o último éxon) e pelo sequenciamento.

Os resultados da amplificação dos transcritos *sense* e *antisense* em blastocistos expandidos estão apresentados na Figura 21.



**Figura 21: Resultados da PCR em tempo real para a presença de transcritos *sense* e *antisense* no primeiro éxon (*primers* TSIXP) e último éxon (*primers* TSIXU) do locus XIST através da metodologia de SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) em embriões bovinos.** Curvas de amplificação (parte superior da figura) e valores de Ct (*threshold cycle*) para as amplificações a partir de cDNA sintetizado com *primers* gene-específicos *forward* (TSIXP F e TSIXU F) e *reverse* (TSIXP R e TSIXU R), além de cDNA sintetizado usando *primers* oligo(dT) e um cDNA na ausência de transcriptase reversa (RT-) (A). Eletroforese em gel de agarose 2%, mostrando as amplificações para TSIX F, R, oligo (dT) e RT- e o negativo (branco) da PCR para o primeiro éxon (175 pares de base; lado esquerdo do gel) e para o último éxon (159 pares de base; lado direito do gel). Ao centro, marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) (B). Curvas de *melting* para os *amplicons* obtidos a partir de cDNA sintetizado com os *primers* TSIXP *forward* (C), TSIXP *reverse* (D), oligo(dT) (E), TSIXU *forward* (F), TSIXU *reverse* (G) e oligo(dT) (H).

Os resultados do sequenciamento dos *amplicons* foram comparados com as sequências depositadas no *GenBank* utilizando a ferramenta BLASTN. Os resultados do alinhamento para o primeiro éxon (TSIXP) e último éxon (TSIXU) estão representados na Figura 22.

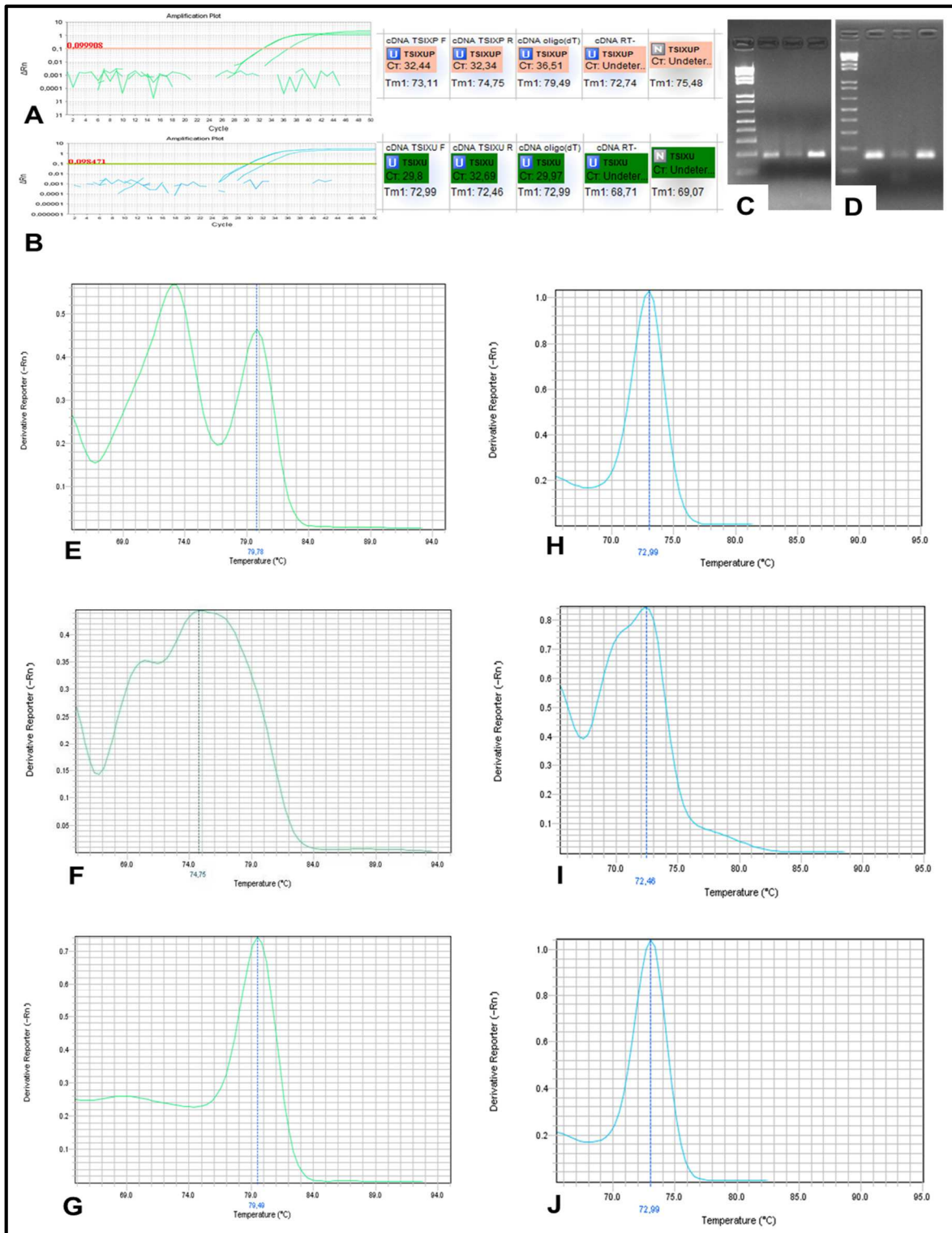


**Figura 22:** Alinhamento dos produtos amplificados por PCR a partir dos transcritos *sense* e *antisense* do locus XIST em embriões bovinos com as sequências depositadas no *GenBank*. Os *amplicons* tiveram suas sequências alinhadas usando a ferramenta BLASTN, tanto para a região do primeiro éxon (TSIXP) (A) quanto para a região do último éxon TSIXU (B).

Os *amplicons* sequenciados obtiveram uma boa taxa de identidade para a sequência do transcrito XIST bovino depositada no *GenBank*, tanto para o primeiro éxon (99%) quanto para o último éxon (89%). Em conjunto, os resultados sugerem que houve expressão *sense* (XIST; a partir do cDNA sintetizado com os primers *forward*) e *antisense* (a partir do cDNA sintetizado com os primers *reverse*) tanto no primeiro quanto no último éxon do gene XIST em embriões bovinos. O controle oligo(dT) comprovou as amplificações *primers*-específicas, e a ausência de amplificação dos controles *negativos* atesta a ausência de contaminação por DNA genômico.

Os resultados da amplificação dos transcritos *sense* e *antisense* do locus XIST para tecido testicular estão apresentados na Figura 23.

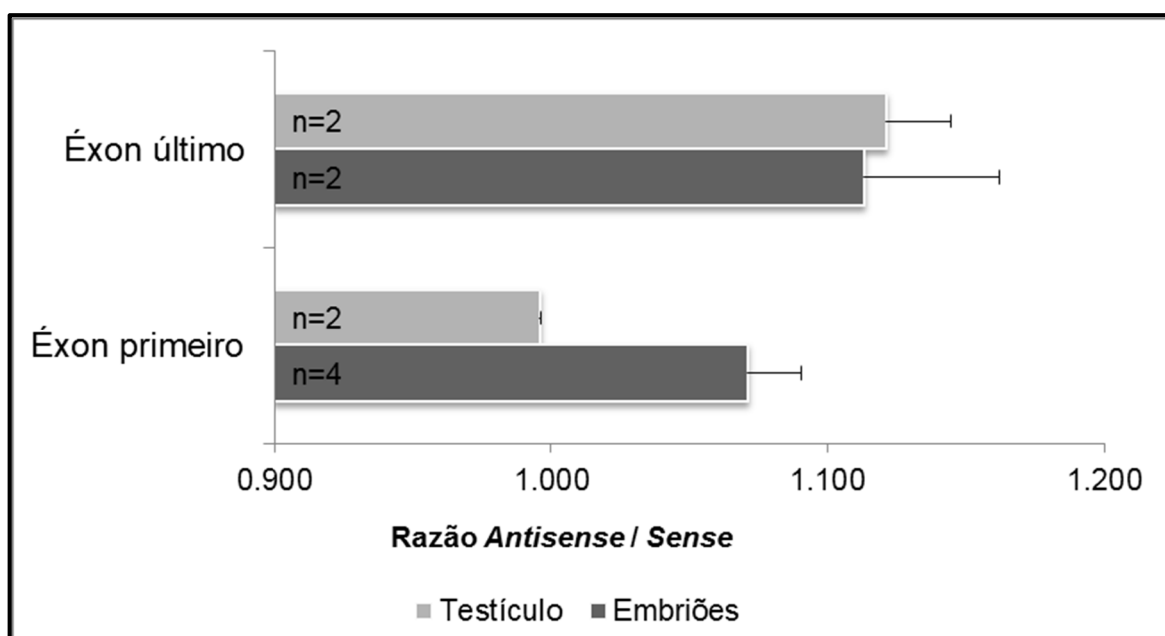




**Figura 23: Resultados da PCR em tempo real para a presença de transcritos *sense* e *antisense* no primeiro éxon (*primers* TSIXP) e último éxon (*primers* TSIXU) do locus XIST através da metodologia de SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) em tecido testicular bovino.** Curvas de amplificação e valores de Ct (*threshold cycle*) para as amplificações a partir de cDNA sintetizado com *primers* gene-específicos *forward* e *reverse*, além de cDNA sintetizado usando *primers* oligo(dT) e um cDNA na ausência de transcriptase reversa (RT-) para os *primers* TSIXP (A) e TSIXU (B). Eletroforese em gel de agarose 2%, mostrando à esquerda o marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) e em seguida as amplificações para TSIX F, R e oligo(dT) para o primeiro éxon (175 pares de base; C) e para o último éxon (159 pares de base; D). Curvas de *melting* para os *amplicons* obtidos a partir de cDNA sintetizado com os *primers* TSIXP *forward* (E), TSIXP *reverse* (F), oligo(dT) (G), TSIXU *forward* (H), TSIXU *reverse* (I) e oligo(dT) (J).

Os resultados referentes às amplificações dos transcritos *sense* e *antisense* para parênquima testicular são semelhantes àqueles encontrados para embriões, pois foi detectada transcrição *sense* e *antisense* no primeiro e último éxons de XIST (início e final do gene). Tal como nos resultados para embriões, o controle oligo(dT) comprovou as amplificações *primers*-específicas, e a ausência de amplificação dos controles *negativos* atesta a ausência de contaminação por DNA genômico.

As médias das razões Ct *antisense*/Ct *sense* para o primeiro e o último éxons para todas as PCRs realizadas para embriões e tecido testicular em que foram observadas amplificação do cDNA oligo(dT) e ausência de amplificação em *RT*-estão apresentados na Figura 24.



**Figura 24: Razão Ct *antisense*/Ct *sense* para o primeiro e último éxons do locus XIST para embriões e tecido testicular de bovinos.** Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. As barras indicam a razão dos valores de Ct para os transcritos *sense* e *antisense*.



## 5. DISCUSSÃO

O processo da ICX caracteriza-se pelo fato de que fêmeas de qualquer espécie de mamífero devem inativar um dos seus cromossomos X como um mecanismo de compensação de dose, já que os machos possuem apenas um cromossomo X (Lyon, 1961). Esse evento é bastante conhecido em camundongos e humanos, porém, suas características em outras espécies, especialmente entre os animais de produção, ainda são bastante desconhecidas. Embora pareça ser um evento relativamente bem conservado entre os mamíferos eutérios (Escamilla-Del-Arenal, Da Rocha *et al.*, 2011), diferenças importantes já foram relatadas entre as espécies, sugerindo que esse processo pode não ser tão bem conservado ao longo da evolução biológica quanto se acreditava.

A transcrição do lncRNA XIST é fundamental para o início do processo de inativação do cromossomo X e a manutenção do seu estado inativo (Nesterova, Mermoud *et al.*, 2002; Gribnau e Grootegoed, 2012). Uma DMR dentro do éxon 1 (DMR 1) do gene XIST de bovinos foi escolhida para ser analisada neste estudo. Há pelo menos duas décadas sabe-se que o padrão de metilação de uma região equivalente a essa em camundongos controla a expressão de XIST e, conseqüentemente, o estado ativo ou inativo do cromossomo X (Heard, Clerc *et al.*, 1997; Goto e Monk, 1998). Assim, na espécie murina um padrão desmetilado na região promotora e dentro do éxon 1 de XIST está relacionado com o X inativo, enquanto as mesmas regiões hipermetiladas estão associadas à cópia ativa desse cromossomo (Norris, Patel *et al.*, 1994). Os resultados de metilação encontrados para espermatozoides e ovócitos para a DMR 1 foram opostos. Além disso, não foram encontrados alelos hipermetilados em espermatozoides, enquanto que em ovócitos MII 96,7% dos alelos estavam hipermetilados. Os padrões hipometilado e hipermetilado encontrados para espermatozoides e ovócito MII respectivamente, já foram também documentados em outros trabalhos com bovinos (Liu, Yin *et al.*, 2008; Su, Yang *et al.*, 2011; Kaneda, Watanabe *et al.*, 2017) e em regiões equivalentes em camundongos (Ariel, Robinson *et al.*, 1995) e ovinos (Zhao, Zhao *et al.*, 2011). Esses resultados sugerem que o padrão de metilação para essa região do XIST é uma característica relativamente conservada entre os mamíferos eutérios e que pode estar envolvida numa organização diferencial do padrão de

cromatina entre os dois gametas no momento da fecundação, tal como ocorre em camundongos, espécie cuja ICX é paternalmente *imprinted* no início da embriogênese (Huynh e Lee, 2003; Okamoto, Otte *et al.*, 2004).

Um padrão semelhante foi encontrado para espermatozoides para as regiões *Rep A* e promotora, as quais se mostraram hipometiladas. Já ovócitos MII apresentaram um padrão hipermetilado para a região *Rep A* e um padrão de metilação intermediário para a região promotora. Sabe-se que em camundongos a região do *Rep A* transcreve um lncRNA independente da transcrição do RNA XIST, sendo aquele imprescindível para os eventos iniciais da ICX (Zhao, Sun *et al.*, 2008). Como na espécie murina ocorre a presença de pelo menos dois RNAs *sense* sendo transcritos ao longo dessa região, XIST e *Rep A*, a expressão de ambos pode estar sendo controlada por diferentes regiões dentro do *locus* XIST e/ou mecanismos epigenéticos, sendo a metilação do DNA um desses mecanismos. Em bovinos, a região *Rep A* apresenta um número considerável de dinucleotídeos CpG, assim como a região promotora do XIST. Esse estudo caracterizou pela primeira vez os padrões de metilação do DNA na região promotora do XIST e na sua região do *Repeat A* em gametas bovinos. Especificamente em relação à região *Rep A* não há nenhuma informação na literatura sobre padrões de metilação para essa região, nem mesmo em camundongos. Embora não tenha sido avaliada a associação entre esses padrões de metilação para essas diferentes regiões de XIST com sua expressão, os resultados aqui apresentados trazem evidências de que os padrões de metilação dessas regiões, isoladas ou em associação, podem participar do controle da expressão de XIST e ou mesmo de outros lncRNAs, como o *Rep A*, como acontece para camundongos (Zhao, Sun *et al.*, 2008).

Os padrões de metilação encontrados para a região promotora de XIST (Figura 17 e Tabela 8) estão de acordo com os resultados da literatura para camundongos [hipermetilado em ovócitos e desmetilado em espermatozoides (Zuccotti e Monk, 1995)], embora tenha sido encontrado um padrão menos metilado para ovócitos que o encontrado para camundongos. Na espécie murina a expressão de XIST tem um controle *imprinted*, sendo regulada por uma DMR localizada na região promotora e na porção 5' do éxon 1 do XIST (Dindot, Kent *et al.*, 2004), o que sugere que o padrão de metilação para essa região possa estar envolvido na expressão de XIST também em bovinos.

Quando se considera os conhecimentos gerados neste estudo no contexto da produção *in vitro* de embriões, um resultado relevante observado aqui é que enquanto a DMR 1 apresenta níveis de metilação semelhantes para ovócitos GV e MII (Figuras 8 e 9; Tabela 6), a região *Rep A* apresenta padrões de metilação bastante diferentes entre estes ovócitos (Figuras 12 e 13; Tabela 7). Isto significa que está havendo ainda, durante a maturação *in vitro*, a reprogramação do padrão de metilação do DNA, com o ovócito MII adquirindo um padrão hipermetilado durante essa etapa final da ovogênese. Assim, este resultado coloca a região *Rep A* como uma região candidata a marcador molecular epigenético para qualidade de ovócitos oriundos de folículos de 3 a 8 mm, pois se está havendo ainda reprogramação, essa região pode ser mais sensível aos efeitos ambientais, inclusive do sistema *in vitro*. Outros trabalhos já mostraram que ovócitos terminam de adquirir seu padrão específico de metilação de DNA somente ao final maturação nuclear, tanto para bovinos (Fagundes, Michalczechen-Lacerda *et al.*, 2011; Mendonça Ados, Guimaraes *et al.*, 2015) quanto para suínos (Marinho, Rissi *et al.*, 2017) e camundongos (Xu, Chen *et al.*, 2017), mostrando a importância de um bom sistema de maturação *in vitro* para que o ovócito adquira seu perfil epigenético correto e, conseqüentemente, competência, podendo então ser fecundado e levar uma gestação a termo.

Neste estudo foi observado que espermatozoides apresentaram padrões bem homogêneos de metilação para todas as regiões analisadas. Isso já foi constatado também na literatura para a espécie bovina, tanto para o gene XIST (Kaneda, Watanabe *et al.*, 2017) quanto para os genes IGF2 e IGF2R (Carvalho, Michalczechen-Lacerda *et al.*, 2012). No entanto, os ovócitos maturados *in vitro* apresentaram um padrão de metilação bastante heterogêneo para as três regiões analisadas, com alelos hipometilados e hipermetilados (Figuras 8, 12 e 17; Tabelas 6, 7 e 8). Estes resultados estão de acordo com dados anteriores deste mesmo laboratório, nos quais foi avaliado o padrão de metilação para o gene IGF2 (Fagundes, Michalczechen-Lacerda *et al.*, 2011). Essa variação observada nos padrões de metilação de ovócitos MII pode ser consequência do efeito adverso do sistema de maturação *in vitro* sobre a reprogramação epigenética, ser devido a uma heterogeneidade do *pool* de ovócitos avaliados, os quais são oriundos de folículos de diferentes tamanhos, ou mesmo da interação desses dois fatores.

Além do fato de ser um processo não natural, que pode influenciar os padrões epigenéticos, a rotina da PIVE recomenda o uso de ovócitos provenientes de folículos de 3 a 8 mm de diâmetro, o que significa uma população de ovócitos heterogênea e em diferentes estágios de desenvolvimento. Estudos anteriores deste mesmo laboratório mostraram que ovócitos bovinos oriundos de folículos antrais de diferentes tamanhos apresentam diferenças importantes no perfil de expressão de genes relacionados a fatores de crescimento, metilação do DNA e alterações de histonas (Caixeta, Ripamonte *et al.*, 2009; Bessa, Nishimura *et al.*, 2013), além de padrões de metilação também distintos (Fagundes, Michalczechen-Lacerda *et al.*, 2011; Mendonça Ados, Guimaraes *et al.*, 2015). Dessa forma, embora tenha sido avaliada apenas a maturação nuclear, com o segundo corpúsculo polar extruso, os processos de maturação citoplasmática e reprogramação epigenética podem não estar sendo finalizados corretamente, levando à produção de gametas de qualidade variada, refletindo diretamente na qualidade do ovócito submetido à fecundação *in vitro*. Assim, é importante que as mesmas avaliações de metilação do DNA feitas neste estudo para ovócitos maturados *in vitro* sejam também realizadas em ovócitos maturados *in vivo*, a fim de comprovar se o processo *in vitro* interfere no processo final da reprogramação da metilação do DNA.

O padrão hipermetilado encontrado em ovócitos MII para as diferentes regiões estudadas de XIST sugere um estado de cromatina repressiva para essas regiões, assim, uma condição de cromatina não apta à transcrição de XIST, sugerindo um estado ativo do cromossomo X, como já foi descrito em camundongos (Okamoto, Otte *et al.*, 2004). Ao contrário, o padrão hipometilado encontrado para espermatozoide pode remeter à uma cromatina apta a transcrever XIST. No entanto, deve-se levar em consideração que a cromatina espermática está extremamente compactada pela presença de protaminas (Oliva, Bazett-Jones *et al.*, 1987). Esse “empacotamento” mediado pelas protaminas, com consequente repressão da atividade transcricional, têm sido considerada uma forma de regulação epigenética exclusiva de espermatozoides (Hammoud, Purwar *et al.*, 2010; Carrell, 2012). A ausência de marcas de metilação nas regiões controladoras de XIST e/ ou *Rep A*, que possibilitariam um estado inativo do X, são insuficientes

para permitir a transcrição pelo alto grau de compactação da cromatina em espermatozoides, o que torna essas células não aptas à transcrição.

Logo após a fecundação inicia-se uma segunda onda de reprogramação epigenética nos pró-núcleos masculino e feminino (Reik, Dean *et al.*, 2001), sendo que embriões em estágios iniciais de desenvolvimento [estágio de blastocisto em camundongos (Santos, Hendrich *et al.*, 2002) e 8-16 células em bovinos (Maalouf, Alberio *et al.*, 2008)] apresentam níveis basais de metilação. Essa reprogramação acontece de maneira global no genoma, porém o momento exato no qual isso ocorre pode variar entre os genes (Morgan, Santos *et al.*, 2005). Para a DMR 1, os resultados apresentados neste estudo mostraram que já existe um padrão desmetilado em embriões no estágio de 8-16 células, o qual persiste pelo menos até blastocisto expandido, tanto nas células da massa celular interna quanto do trofoectoderma (Figuras 8, 9 e 14; Tabela 6). Esse resultado está parcialmente de acordo com a literatura que descreve um processo de desmetilação global do genoma nos dois pró-núcleos iniciando-se logo após a fecundação em mamíferos (Dean, Santos *et al.*, 2001; Reik, Dean *et al.*, 2001; Zhang, Chen *et al.*, 2016). No estágio de 8-células, os embriões caracterizam-se por um padrão global bastante desmetilados em bovinos, sendo que logo em seguida, no estágio de 16 células, os embriões já começam a remetilação global do genoma (Maalouf, Alberio *et al.*, 2008). Os resultados apresentados neste estudo mostraram, entretanto, que ambos os genomas materno e paterno apresentam-se desmetilados para a região DMR 1, tanto em embriões de 8-16 células quanto nos estágios de mórula e blastocisto expandido. Como não foi avaliado o padrão de metilação de embriões em estágios mais avançados que blastocisto expandido, não se pode afirmar se e quando começa a ocorrer o processo de metilação *de novo* para essa região.

Se o perfil de metilação da DMR 1 ter alguma associação com a transcrição do XIST, o que não foi testado nesse estudo, a simples mudança do padrão de metilação de ovócito MII para embriões a partir do estágio de 8-16 células (Figuras 8 e 9) pode sugerir que, em algum nível, pelo menos algum evento relacionado à ICX já está ocorrendo a partir do estágio embrionário de 8-16 células em bovinos. Estudos anteriores mostraram que a expressão de XIST antecede o início da inativação do cromossomo X em camundongos (Brown e Willard, 1994; Penny, Kay *et al.*, 1996), sendo que em bovinos a ICX é concluída em blastocistos iniciais em

alguns embriões e no estágio de blastocisto alongado (dias 14 e 15 de desenvolvimento) em todos os embriões fêmeas (De La Fuente, Hahnel *et al.*, 1999). Assim, um padrão desmetilado dessa região nos estágios embrionários mais precoces de desenvolvimento, como encontrado neste estudo, pode estar relacionado ao início da expressão de XIST já em blastocistos. Isto está de acordo com dados anteriores deste mesmo laboratório para expressão gênica, onde foi detectada a presença de transcritos sense no *locus* XIST (Figura 21), muito provavelmente RNA XIST, em blastocistos.

O padrão de metilação para *Rep A* em embriões diverge em alguns aspectos daqueles encontrados para a DMR 1. Essa região permanece hipermetilada até o estágio de mórula, diferentemente da DMR 1 que já no estágio de 8-16 células se encontra desmetilada (Figura 14). Além disso, um aspecto que chama atenção, pois difere do que está relativamente consolidado na literatura que mostra uma onda de desmetilação global e ativa do pró-núcleo masculino (Macdonald e Mann, 2014), é que essa região *Rep A* ganhou metilação no pró-núcleo masculino na embriogênese inicial (Figura 14). Em seguida, um processo de desmetilação ocorre até o estágio de blastocisto, tanto nas células da massa celular interna quanto no trofoectoderma. Portanto, pelo que é de conhecimento geral, essa dinâmica diferente da reprogramação da metilação para essa região específica mostrada aqui, é um resultado inédito para embriões bovinos produzidos *in vitro*. Tomando-se os resultados dos padrões de metilação para a DMR 1 e para *Rep A* como um todo e observando as diferenças consideráveis nesses padrões, especialmente durante a maturação *in vitro* e a dinâmica de desmetilação pós-fecundação (Figura 14), sugerimos que estas duas regiões possam estar controlando diferentes transcritos, assim como ocorre para camundongos (Zhao, Sun *et al.*, 2008).

Considerando que as duas regiões para as quais avaliamos o padrão de metilação do DNA, DMR 1 e *Rep A*, se apresentaram totalmente desmetiladas nas células do trofoectoderma (Figura 14), sugere-se que estas regiões não são responsáveis pela marca *imprinted* para o XIST na placenta, pois se sim, um padrão próximo de 50% de metilação seria esperado. Uma gDMR controlando a característica *imprinted* do gene XIST já foi observada em gametas (Zuccotti e Monk, 1995), embriões em estágios pré-implantacionais (Huynh e Lee, 2003; Okamoto, Otte *et al.*, 2004) e nas células do trofoectoderma de camundongos

(Takagi e Sasaki, 1975; Heard e Disteche, 2006). Porém, em humanos e coelhos, foi observado um caráter não *imprinted* desse gene (Okamoto, Patrat *et al.*, 2011). Em bovinos, um controle *imprinted* para o XIST ainda é bastante discutível. Trabalhos recentes discordam do caráter *imprinted* de XIST, sendo um relatando que seu controle é não *imprinted*, sem, contudo, elucidar a origem dessa informação (Kaneda, Watanabe *et al.*, 2017), enquanto outros trabalhos caracterizaram o gene XIST como “supostamente *imprinted*” (Driver, Huang *et al.*, 2013; Chen, Zhang *et al.*, 2016), paternalmente *imprinted* (Ruddock, Wilson *et al.*, 2004) ou maternalmente *imprinted* (Dindot, Kent *et al.*, 2004). Esses resultados sugerem que talvez o padrão *imprinted* nos tecidos extraembrionários observado em camundongos (Takagi e Sasaki, 1975) esteja sim preservado em bovinos, como sugere (Dindot, Kent *et al.*, 2004), mas que a iDMR responsável por esse controle *imprinted* do XIST em bovinos esteja em outra região do *locus* XIST que não as avaliadas aqui neste estudo ou mesmo fora dele ou ainda que a marca *imprinted* de XIST em bovinos esteja nas histonas, tal como ocorre em camundongos (Inoue, Jiang *et al.*, 2017).

Já para os padrões de metilação para o alantocórion de fêmeas, a DMR 1 mostrou-se bastante metilada para os dois animais. Considerando-se o caráter *imprinted* da ICX em placentas bovinas observado em trabalhos anteriores (Xue, Tian *et al.*, 2002; Dindot, Kent *et al.*, 2004), e supondo que essa região analisada aqui faça parte do controle da expressão de XIST, esperava-se um padrão de metilação nessa região próximo de 50% (Reik e Walter, 2001; Kim, Bretz *et al.*, 2015), como foi demonstrado para o padrão de metilação dessa DMR em fibroblastos bovinos (Liu, Yin *et al.*, 2008). No entanto, alguns tecidos somáticos podem perder o controle *imprinted* para alguns genes, como já foi demonstrado em células do cumulus bovinas para o gene IGF2 (Franco, Fagundes *et al.*, 2014), em tecidos somáticos que não o sistema nervoso central em humanos para o gene *Growth Factor Receptor-Bound Protein 10* (GRB10) (Blagitko, Mergenthaler *et al.*, 2000) e em células embrionárias humanas para os genes IGF2, PEG1/MEST (*Paternally Expressed Gene 1/Mesoderm-Specific Transcript*), H19 e NNAT (*Neuronatin*) (Nye, Hoyo *et al.*, 2015), sugerindo que o padrão *imprinted* é estabelecido de uma maneira tecido/célula-específico (Imamura, Kerjean *et al.*, 2005; Prickett e Oakey, 2012). A literatura corrobora os resultados aqui

apresentados ao não mostrar evidências de um controle *imprinted* em bovinos por parte dessa DMR 1 nas células do trofoectoderma, as quais são precursoras de tecidos placentários (Min, Park *et al.*, 2017). Além disso, foi mostrado que diferentes tecidos somáticos possuem diferentes padrões de metilação para a DMR correspondente em ovinos, variando entre tecidos hipermetilados (pulmão e rim) e hipometilado (coração) (Zhao, Zhao *et al.*, 2011). Em bovinos, foram encontrados padrões hipermetilados para essa DMR em leucócitos sanguíneos periféricos (Kaneda, Watanabe *et al.*, 2017) e em fibroblastos de pele (Azevedo, 2012). Placentas suínas apresentaram um padrão hemimetilado (30%) para uma DMR do gene XIST (Wang, Chen *et al.*, 2014), enquanto as placentas bovinas apresentaram padrões de metilação variáveis para essa região para a subespécie *Bos taurus taurus* (35,71% a 72,73%) (Su, Yang *et al.*, 2011), sendo que esses últimos dados corroboram com os resultados apresentados no presente estudo (70,92% a 89,38%). Tomados em conjunto, o padrão de metilação para essa região é mais uma evidência de que a DMR 1 não é a responsável pela característica *imprinted* de XIST nos tecidos extraembrionários de bovinos, sendo o seu padrão de metilação estabelecido de uma maneira tecido ou espécie-específico.

Para a região *Rep A*, os padrões de metilação encontrados em alantocórion de fêmeas foram ainda mais variáveis dos que os encontrados para a DMR 1 ( $26,92\% \pm 11,27$  e  $89,24\% \pm 2,50$ ) (Figuras 12 e 13; Tabela 7). Como os resultados também não ficaram próximos dos 50% esperados para uma região controladora de *imprinting* (Reik e Walter, 2001), sugere-se que também essa região não esteja envolvida em um possível controle *imprinted* de XIST em tecidos extraembrionários bovino. Já em relação às placentas de machos, tanto a região da DMR 1 quanto o *Rep A*, apresentaram-se bastante hipermetiladas (Figuras 8, 9, 12 e 13 e Tabelas 6 e 7), sendo que esses resultados corroboram com os dados encontrados em suínos (Wang, Chen *et al.*, 2014), indicando que, por se tratar de células de macho, há a presença de apenas um cromossomo X, e assim espera-se um padrão bastante hipermetilado, característico da não expressão de XIST.

Os padrões contrastantes de metilação do DNA encontrados para espermatozoides e ovócitos MII para as três regiões avaliadas apresentam padrões de gDMR. No entanto, quando se observa os padrões de metilação para a DMR 1 e *Rep A* em embriões, nota-se que estas sofreram um processo de desmetilação



para ambos os genomas, masculino e feminino, perdendo, portanto, a característica de uma DMR (Figura 14). Algumas gDMRs são resistentes ao processo de desmetilação global que ocorre no genoma embrionário logo após a fecundação (Proudhon, Duffie *et al.*, 2012; Macdonald e Mann, 2014). Contudo, a maior parte das gDMRs são reprogramadas na embriogênese inicial, perdendo seu padrão de metilação diferencial até o estágio de blastocisto, sendo estas denominadas DMRs transientes (tDMRs) (Smallwood, Tomizawa *et al.*, 2011; Proudhon, Duffie *et al.*, 2012; Macdonald e Mann, 2014). Portanto, as regiões estudadas aqui (DMR 1 e Rep A), seguiram esse padrão de tDMR.

Assim como os padrões de metilação, a caracterização do perfil de expressão gênica do *locus* XIST nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário é importante para entender a dinâmica de expressão *sense* e *antisense* dessa região, a qual é essencial para a fina regulação da ICX em mamíferos. A literatura é bastante controversa sobre a expressão de XIST em ovócitos e embriões em estágios bem precoces de desenvolvimento em mamíferos. Foi mostrado, por exemplo, que não há expressão de XIST durante a ovogênese em camundongos (Mccarrey e Dilworth, 1992). Em humanos existem ainda mais divergências nos resultados. Enquanto um trabalho descreveu a expressão de XIST em embriões a partir do estágio de zigoto (Daniels, Zuccotti *et al.*, 1997), um estudo mais recente, trabalhando com expressão gênica em células individuais de embriões, detectou XIST apenas a partir do estágio de quatro células (Briggs, Dominguez *et al.*, 2015). Com relação a bovinos, embora um trabalho não tenha detectado expressão de XIST em ovócitos maturados *in vitro* (Nino-Soto, Basrur *et al.*, 2007), outros trabalhos detectaram a expressão de XIST em embriões produzidos *in vitro* a partir do estágio de 1-célula (De La Fuente, Hahnel *et al.*, 1999; Peippo, Farazmand *et al.*, 2002; Wrenzycki, Lucas-Hahn *et al.*, 2002), sendo essa expressão mantida nos estágios de mórula e blastocisto (Nino-Soto, Basrur *et al.*, 2007; Oliveira, Saraiva *et al.*, 2013; Chen, Zhang *et al.*, 2016). Estes resultados são bastante controversos, pois a detecção de RNA XIST em embriões bovinos no estágio de 1-célula diz respeito à herança materna (Datta, Rajput *et al.*, 2015). Portanto, esse RNA deveria ser detectado em ovócitos maturados, a não ser que a maturação *in vitro* tenha afetado o perfil de expressão de XIST. Nossos resultados de expressão de XIST em embriões corroboram os dados da literatura, já que foi

detectada a expressão de XIST em todos os estágios embrionários estudados (Figura 20). No entanto, os resultados para ovócitos MII são discrepantes, já que também foi detectada a expressão de XIST em todos os ovócitos analisados (Figura 20), discordando dos dados da literatura os quais não detectaram expressão de XIST (Nino-Soto, Basrur *et al.*, 2007). Como já foi discutido anteriormente, essas diferenças podem ser devidas a diferenças nos protocolos de maturação *in vitro* ou uma influência do próprio sistema *in vitro* de maturação. Assim, é importante que seja avaliada também a expressão de XIST em ovócitos bovinos maturados *in vivo*.

Outro aspecto a ser considerado refere-se à estrutura do gene XIST. Como já foi relatado, a região de transcrição do gene XIST é complexa e, pelo menos em camundongos, há a expressão de mais de um RNAm em uma mesma região e, inclusive, transcrição *sense* e *antisense*, como por exemplo XIST / *Rep A* e TSIX (Lee, Davidow *et al.*, 1999; Zhao, Sun *et al.*, 2008)). Em todos os trabalhos citados anteriormente, em que a expressão de XIST foi analisada em ovócitos e embriões, utilizou-se a síntese de cDNA a partir de *primers* oligo(dT) ou randômicos, os quais se anelam em vários RNAm presentes nas células (Ross, Aviv *et al.*, 1972) e não discriminam transcritos produzidos a partir das fitas *sense* e *antisense* do DNA. A própria metodologia que utilizamos para esse experimento específico de avaliação da expressão de XIST em células individuais não faz essa discriminação, diferentemente da estratégia que utilizamos para o experimento de *SS-RT-PCR* (Figura 5), no qual foi possível a discriminação entre transcritos produzidos a partir das duas fitas do DNA. Portanto, o que se pode afirmar com relação a esses resultados de expressão em células individuais é que há a presença de transcritos produzidos ao longo dessa região do último éxon do gene XIST em bovinos, tanto transcritos de origem materna (detecção em ovócitos até embriões de 8-16-células) quanto de expressão do próprio embrião (detecção em estágio de mórula).

Diversos casos de transcrição *sense* e *antisense* num mesmo *locus* gênico em mamíferos já foram relatados na literatura. A transcrição *antisense* é frequentemente associada com a ativação ou repressão de genes relacionados ao desenvolvimento, *imprinting* genômico e mutações genéticas associadas a doenças humanas (Katayama, Tomaru *et al.*, 2005; Okada, Tashiro *et al.*, 2008; Faghihi e Wahlestedt, 2009), sendo bastante comum em *locus* de lncRNAs, modulando, através de diversos mecanismos *in cis*, a transcrição *sense* do mesmo

*locus* (Pelechano e Steinmetz, 2013). Em camundongos, o principal transcrito *antisense* do gene XIST é o TSIX, um modulador negativo de XIST (Lee, Davidow *et al.*, 1999). Existem, no entanto, estudos mais recentes que mostram a presença do gene XistAR também na espécie murina, sendo este, ao contrário de TSIX, um potente ativador de XIST (Sarkar, Gayen *et al.*, 2015). Portanto, até o momento já foram descritos em camundongos, além do próprio XIST, os transcritos *sense Rep A* (Zhao, Sun *et al.*, 2008) e *antisenses* TSIX (Lee, Davidow *et al.*, 1999) e XistAR (Sarkar, Gayen *et al.*, 2015).

As evidências da presença de transcritos *antisense* em bovinos são poucas e incertas. Até este trabalho, acreditava-se que TSIX seria um exemplo de gene degenerado em bovinos, cuja estrutura e função haviam se perdido ao longo da evolução dos mamíferos (Chureau, Prissette *et al.*, 2002; Dindot, Kent *et al.*, 2004). Em meados da década passada, foi detectada a expressão de um transcrito *antisense* de XIST em gônadas e tecidos somáticos de bovinos, sugerindo a presença de um RNA funcional *antisense* de XIST em bovinos (Farazmand, Basrur *et al.*, 2004). Embora os resultados encontrados nesse último trabalho tenham sido de grande contribuição ao constatar a presença de um transcrito *antisense* de XIST, o fato da amplificação ter ocorrido exclusivamente no éxon 1 de XIST deixa incerto o fato do gene estar degenerado, já que foi avaliada a expressão *antisense* em apenas uma região do gene. Os resultados aqui apresentados são inéditos ao mostrar a presença de um ou mais transcritos *antisense* em bovinos produzidos a partir do primeiro e do último éxons de XIST, tanto em testículo quanto em embriões fêmeas. Como a identidade do transcrito foi confirmada por sequenciamento (Figura 22), sugere-se que pode se tratar do próprio gene TSIX (sendo, portanto transcrito ao longo de todo o gene XIST) ou outro(s) RNA(s) *antisense* ainda não caracterizado(s), necessitando, contudo, estudos mais aprofundados na estrutura gênica e no padrão de expressão para a comprovação.

Concomitantemente à presença do transcrito *antisense*, um RNA *sense* foi também detectado nesses embriões fêmeas, sugerindo a presença de XIST e/ou outros transcritos *sense*, como *Rep A*, já que este último produz um RNA *sense* na mesma região de XIST em camundongos (Zhao, Sun *et al.*, 2008). Como já discutido anteriormente, alguns trabalhos também detectaram expressão de XIST em embriões bovinos (Nino-Soto, Basrur *et al.*, 2007; Oliveira, Saraiva *et al.*, 2013;

Chen, Zhang *et al.*, 2016). A literatura é categórica ao afirmar que a transcrição desse gene ocorre exclusivamente no cromossomo X das células femininas, estando reprimido nas células de indivíduos machos (Kaneda, Takahashi *et al.*, 2017). Entretanto, a detecção do transcrito *sense* em tecido testicular é um resultado que contradiz outros estudos, sugerindo que a transcrição de XIST em bovinos machos pode estar ocorrendo de uma maneira tecido-específica (sendo, portanto, expresso em tecido testicular e talvez não sendo expresso em outros tecidos) ou que algum outro transcrito *sense* é produzido nessa região.

Conhecer o perfil dos transcritos do *locus* XIST é importante para uma primeira caracterização do padrão de expressão dos genes que se localizam nessa região durante o desenvolvimento inicial *in vitro* em bovinos. Entretanto, muitas análises ainda devem ser feitas a fim de melhor caracterizar os fatores envolvidos na ICX durante essa 'janela' de desenvolvimento, especialmente a caracterização dos transcritos *sense* e *antisense* que foram detectados no presente estudo. Independentemente das identidades dos transcritos, é possível que essa complexidade de expressão no *locus* XIST, com transcrição *sense* e *antisense*, seja uma evidência da sofisticada regulação do processo de ICX em mamíferos.

As informações obtidas ao longo desse estudo contribuirão para uma melhor compreensão dos mecanismos epigenéticos relacionados à iniciação do processo de ICX durante a embriogênese inicial em bovinos. Como as informações acerca da ICX na espécie bovina são escassas, a caracterização molecular do gene XIST nesta espécie é um passo inicial e importante para melhor entender os eventos relacionados à inativação do cromossomo X durante a embriogênese bovina, e que poderá contribuir para aprimorar os resultados das ARTs ao se prospectar marcadores moleculares para qualidade de gametas e embriões. Além disso, as informações geradas neste estudo podem contribuir para um melhor entendimento da influência dos sistemas *in vitro* de produção sobre os perfis epigenéticos e a qualidade de embriões de mamíferos. Finalmente, resultados importantes e inéditos foram gerados, mas a compreensão da totalidade do evento da ICX em *Bos taurus indicus* ainda exige muitos esforços.

## 6. CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- 1) Os resultados obtidos nesse estudo são inéditos ao caracterizar os padrões de metilação de DNA para três diferentes regiões localizadas na porção inicial do gene XIST em diferentes fases do desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* em bovinos;
- 2) O trabalho foi pioneiro ao caracterizar o padrão de metilação na região promotora do gene XIST em gametas;
- 3) Os resultados obtidos neste estudo sobre os padrões de metilação da região *Rep A* como uma possível marca epigenética para regular a expressão de transcritos alternativos são inéditos para qualquer espécie;
- 4) A DMR 1 e *Rep A* são tDMRs, se reprogramam em momentos diferentes entre si e mais tardiamente que o esperado para o início da metilação *de novo* em bovinos;
- 5) A DMR 1 e *Rep A* não são as regiões que poderiam conferir um caráter *imprinted* ao XIST em bovinos;
- 6) A metilação em *Rep A* muda durante a MIV. Assim, essa região torna-se candidata a marcador epigenético na PIVE;
- 7) O genoma paterno ganhou metilação em *Rep A* após a FIV;
- 8) O padrão de metilação em ovócitos varia muito, diferente de espermatozoide, sugerindo uma alta heterogeneidade da população dessas células (por exemplo, advindas de folículos de diferentes tamanhos, com diferentes competências);
- 9) Há presença de transcritos, tanto de origem materna quanto de origem do embrião, produzidos ao longo do último éxon do XIST;
- 10) Pela primeira vez foram mostradas transcrição *sense* e *antisense* no início e final do *locus* XIST, podendo ser um ou mais transcritos diferentes.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, J. M.; CORY, S. Untranslated nucleotide sequence at the 5'-end of R17 bacteriophage RNA. *Nature* [S.l.], v. 227, n. 5258, p. 570-4, Aug 08 1970.

AL NADAF, S. *et al.* A cross-species comparison of escape from X inactivation in Eutheria: implications for evolution of X chromosome inactivation. *Chromosoma* [S.l.], v. 121, n. 1, p. 71-8, Feb 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00412-011-0343-8>.

ALMEIDA, M. *et al.* PCGF3/5-PRC1 initiates Polycomb recruitment in X chromosome inactivation. *Science* [S.l.], v. 356, n. 6342, p. 1081-1084, Jun 09 2017. <http://dx.doi.org/10.1126/science.aal2512>.

ANAVA, S. *et al.* The soft genome. *Worm* [S.l.], v. 3, n. 4, p. e989798, Oct-Dec 2014. <http://dx.doi.org/10.4161/21624054.2014.989798>.

ANGUERA, M. C. *et al.* Tsx produces a long noncoding RNA and has general functions in the germline, stem cells, and brain. *PLoS genetics* [S.l.], v. 7, n. 9, p. e1002248, Sep 2011. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002248>.

AOKI, F. *et al.* Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Developmental biology* [S.l.], v. 181, n. 2, p. 296-307, Jan 15 1997. <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.1996.8466>.

ARIEL, M. *et al.* Gamete-specific methylation correlates with imprinting of the murine Xist gene. *Nature genetics* [S.l.], v. 9, n. 3, p. 312-5, Mar 1995. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0395-312>.

ARIYOSHI, M.; SCHWABE, J. W. A conserved structural motif reveals the essential transcriptional repression function of Spen proteins and their role in developmental

signaling. *Genes & Development* [S.l.], v. 17, n. 15, p. 1909-20, Aug 01 2003. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.266203>.

AUGUI, S. *et al.* Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nature reviews. Genetics* [S.l.], v. 12, n. 6, p. 429-42, Jun 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2987>.

AZEVEDO, J. M. Impactos do uso da S-Adenosil-L-Homocisteína (SAH) como agente desmetilante de DNA no sistema de cultivo celular de bovinos. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília. 2012.

BACHER, C. P. *et al.* Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. *Nature cell biology* [S.l.], v. 8, n. 3, p. 293-9, Mar 2006. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1365>.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* [S.l.], v. 21, n. 3, p. 381-95, Mar 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.22>.

BARAKAT, T. S. *et al.* X-changing information on X inactivation. *Experimental cell research* [S.l.], v. 316, n. 5, p. 679-87, Mar 10 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.01.015>.

BARAKAT, T. S. *et al.* The trans-activator RNF12 and cis-acting elements effectuate X chromosome inactivation independent of X-pairing. *Molecular cell* [S.l.], v. 53, n. 6, p. 965-78, Mar 20 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.006>.

BARNES, F. L.; FIRST, N. L. Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Molecular reproduction and development* [S.I.], v. 29, n. 2, p. 117-23, Jun 1991. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080290205>.

BASU, R.; ZHANG, L. F. X chromosome inactivation: a silence that needs to be broken. *Genesis* [S.I.], v. 49, n. 11, p. 821-34, Nov 2011. <http://dx.doi.org/10.1002/dvg.20792>.

BERLETCH, J. B. *et al.* Escape from X inactivation varies in mouse tissues. *PLoS genetics* [S.I.], v. 11, n. 3, p. e1005079, Mar 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1005079>.

BERLETCH, J. B. *et al.* Escape from X inactivation in mice and humans. *Genome Biology* [S.I.], v. 11, n. 6, 2010. <http://dx.doi.org/Artn 213>  
10.1186/Gb-2010-11-6-213.

BERMEJO-ALVAREZ, P. *et al.* Transcriptional sexual dimorphism in elongating bovine embryos: implications for XCI and sex determination genes. *Reproduction* [S.I.], v. 141, n. 6, p. 801-8, Jun 2011. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-11-0006>.

BERMEJO-ALVAREZ, P. *et al.* Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 107, n. 8, p. 3394-9, Feb 23 2010. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0913843107>.

BESSA, I. R. *et al.* Transcription profile of candidate genes for the acquisition of competence during oocyte growth in cattle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* [S.I.], v. 48, n. 5, p. 781-9, Oct 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.12162>.



BLAGITKO, N. *et al.* Human GRB10 is imprinted and expressed from the paternal and maternal allele in a highly tissue- and isoform-specific fashion. *Human molecular genetics* [S.I.], v. 9, n. 11, p. 1587-95, Jul 01 2000.

BOCK, C. *et al.* BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* [S.I.], v. 21, n. 21, p. 4067-8, Nov 1 2005. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti652>.

BOGDANOVIC, O. *et al.* Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nature genetics* [S.I.], Feb 29 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.3522>.

BOHACEK, J.; MANSUY, I. M. Molecular insights into transgenerational non-genetic inheritance of acquired behaviours. *Nature reviews. Genetics* [S.I.], v. 16, n. 11, p. 641-52, Nov 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3964>.

BONDY, C. A. Care of girls and women with Turner syndrome: a guideline of the Turner Syndrome Study Group. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* [S.I.], v. 92, n. 1, p. 10-25, Jan 2007. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2006-1374>.

BORENSZTEIN, M. *et al.* Xist-dependent imprinted X inactivation and the early developmental consequences of its failure. *Nature structural & molecular biology* [S.I.], v. 24, n. 3, p. 226-233, Mar 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.3365>.

BOWLES, J.; KOOPMAN, P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* [S.I.], v. 134, n. 19, p. 3401-11, Oct 2007. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.001107>.

BRANCO, M. R. *et al.* Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nature reviews. Genetics* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 7-13, Jan 2012. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3080>.

BRIGGS, S. F. *et al.* Single-Cell XIST Expression in Human Preimplantation Embryos and Newly Reprogrammed Female Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cells* [S.I.], v. 33, n. 6, p. 1771-1781, Jun 2015. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.1992>.

BROCKDORFF, N. *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* [S.I.], v. 71, n. 3, p. 515-26, Oct 30 1992.

BROWN, C. J. *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* [S.I.], v. 71, n. 3, p. 527-42, Oct 30 1992.

BROWN, C. J.; WILLARD, H. F. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. *Nature* [S.I.], v. 368, n. 6467, p. 154-6, Mar 10 1994. <http://dx.doi.org/10.1038/368154a0>.

CAIXETA, E. S. *et al.* Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. *Reproduction, fertility, and development* [S.I.], v. 21, n. 5, p. 655-64, 2009. <http://dx.doi.org/10.1071/RD08201>.

CARREL, L.; WILLARD, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* [S.I.], v. 434, n. 7031, p. 400-404, Mar 17 2005. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03479>.

CARRELL, D. T. Epigenetics of the male gamete. *Fertility and sterility* [S.l.], v. 97, n. 2, p. 267-74, Feb 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.036>.

CARVALHO, J. O. *et al.* The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. *Molecular reproduction and development* [S.l.], v. 79, n. 2, p. 77-84, Feb 2012. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.21410>.

CERASE, A. *et al.* Xist localization and function: new insights from multiple levels. *Genome Biology* [S.l.], v. 16, p. 166, Aug 15 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0733-y>.

CHADWICK, B. P.; WILLARD, H. F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.l.], v. 101, n. 50, p. 17450-5, Dec 14 2004. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0408021101>.

CHAMBERS, S. A.; SHAW, B. R. Histone modifications accompanying the onset of developmental commitment. *Developmental biology* [S.l.], v. 124, n. 2, p. 523-31, Dec 1987.

CHANG, S. C. *et al.* Mechanisms of X-chromosome inactivation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* [S.l.], v. 11, p. 852-66, Jan 01 2006.

CHAO, W.; D'AMORE, P. A. IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine & growth factor reviews* [S.l.], v. 19, n. 2, p. 111-20, Apr 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.01.005>.

CHARLESWORTH, B.; CHARLESWORTH, D. The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B*,

*Biological sciences* [S.I.], v. 355, n. 1403, p. 1563-72, Nov 29 2000.  
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2000.0717>.

CHAUMEIL, J. *et al.* A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes & Development* [S.I.], v. 20, n. 16, p. 2223-37, Aug 15 2006.  
<http://dx.doi.org/10.1101/gad.380906>.

CHEN, H. *et al.* Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology* [S.I.], v. 86, n. 3, p. 868-78, Aug 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.008>.

CHEN, H. T. *et al.* Androgen receptor CAG repeats, non-random X chromosome inactivation, and loss of heterozygosity at Xq25 in relation to breast cancer risk. *Bmc Cancer* [S.I.], v. 14, Mar 1 2014. <http://dx.doi.org/Artn 144>  
10.1186/1471-2407-14-144.

CHOW, J. C. *et al.* LINE-1 activity in facultative heterochromatin formation during X chromosome inactivation. *Cell* [S.I.], v. 141, n. 6, p. 956-69, Jun 11 2010.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.042>.

CHUREAU, C. *et al.* Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. *Human molecular genetics* [S.I.], v. 20, n. 4, p. 705-18, Feb 15 2011.  
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddq516>.

CHUREAU, C. *et al.* Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine. *Genome research* [S.I.], v. 12, n. 6, p. 894-908, Jun 2002. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.152902>.

COOPER, D. N.; KRAWCZAK, M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Human genetics* [S.l.], v. 83, n. 2, p. 181-8, Sep 1989.

COSTANZI, C.; PEHRSON, J. R. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature* [S.l.], v. 393, n. 6685, p. 599-601, Jun 11 1998. <http://dx.doi.org/10.1038/31275>.

COTTON, A. M. *et al.* Landscape of DNA methylation on the X chromosome reflects CpG density, functional chromatin state and X-chromosome inactivation. *Human molecular genetics* [S.l.], v. 24, n. 6, p. 1528-39, Mar 15 2015. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddu564>.

CRICK, F. H. On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology* [S.l.], v. 12, p. 138-63, 1958.

D'CRUZ, N. T. *et al.* Putative imprinted gene expression in uniparental bovine embryo models. *Reproduction Fertility and Development* [S.l.], v. 20, n. 5, p. 589-597, 2008. <http://dx.doi.org/10.1071/RD08024>.

DA ROCHA, S. T. *et al.* Jarid2 Is Implicated in the Initial Xist-Induced Targeting of PRC2 to the Inactive X Chromosome. *Molecular cell* [S.l.], v. 53, n. 2, p. 301-16, Jan 23 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.002>.

DAELEMANS, C. *et al.* High-throughput analysis of candidate imprinted genes and allele-specific gene expression in the human term placenta. *BMC genetics* [S.l.], v. 11, p. 25, 2010. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2156-11-25>.

DANIELS, R. *et al.* XIST Expression in Human Oocytes and Preimplantation Embryos. *The American Journal of Human Genetics* [S.I.], v. 61, n. 1, p. 33-39, 1997. <http://dx.doi.org/10.1086/513892>.

DATTA, T. K. *et al.* Requirement of the transcription factor USF1 in bovine oocyte and early embryonic development. *Reproduction* [S.I.], v. 149, n. 2, p. 203-12, Feb 2015. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-14-0445>.

DE LA FUENTE, R. *et al.* X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. *Biology of Reproduction* [S.I.], v. 60, n. 3, p. 769-775, Mar 1999. <http://dx.doi.org/DOI10.1095/biolreprod60.3.769>.

DE NAPOLES, M. *et al.* Early loss of Xist RNA expression and inactive X chromosome associated chromatin modification in developing primordial germ cells. *PloS one* [S.I.], v. 2, n. 9, p. e860, Sep 12 2007. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0000860>.

DE RUIJTER, A. J. *et al.* Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal* [S.I.], v. 370, n. Pt 3, p. 737-49, Mar 15 2003. <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20021321>.

DEAN, W. *et al.* Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 98, n. 24, p. 13734-8, Nov 20 2001. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.241522698>.

DEL ARCO, A.; IZQUIERDO, M. De novo methylation causes a tissue-specific polymorphic EcoRI pattern at the human epidermal growth factor receptor gene. *The Biochemical journal* [S.I.], v. 292 ( Pt 2), p. 591-5, Jun 01 1993.

DENG, X. *et al.* X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease. *Nature reviews. Genetics* [S.I.], v. 15, n. 6, p. 367-78, Jun 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3687>.

DI MAURO, V.; CATALUCCI, D. The importance of being ncRNAs: from bit players as "junk DNA" to rising stars on the stage of the pharmaceutical industry. *Annals of translational medicine* [S.I.], v. 5, n. 6, p. 147, Mar 2017. <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2017.01.20>.

DINDOT, S. V. *et al.* Conservation of genomic imprinting at the XIST, IGF2, and GTL2 loci in the bovine. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* [S.I.], v. 15, n. 12, p. 966-74, Dec 2004. <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-004-2407-z>.

DIOGENES, M. N. *et al.* Effect of prematuration and maturation with fibroblast growth factor 10 (FGF10) on in vitro development of bovine oocytes. *Theriogenology* [S.I.], v. 102, p. 190-198, Oct 15 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.06.004>.

DISKIN, M. G. *et al.* Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Animal reproduction science* [S.I.], v. 96, n. 3-4, p. 297-311, Dec 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.08.008>.

DO, J. T. *et al.* Enhanced reprogramming of Xist by induced upregulation of Tsix and Dnmt3a. *Stem cells* [S.I.], v. 26, n. 11, p. 2821-31, Nov 2008. <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2008-0482>.

DONG, A. *et al.* Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 29, n. 2, p. 439-48, Jan 15 2001.

DONOHUE, M. E. *et al.* The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctf and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature* [S.I.], v. 460, n. 7251, p. 128-32, Jul 02 2009. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08098>.

DRIVER, A. M. *et al.* Knockdown of CDKN1C (p57(kip2)) and PHLDA2 results in developmental changes in bovine pre-implantation embryos. *PloS one* [S.I.], v. 8, n. 7, p. e69490, 2013. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069490>.

DUPONT, C.; GRIBNAU, J. Different flavors of X-chromosome inactivation in mammals. *Current opinion in cell biology* [S.I.], v. 25, n. 3, p. 314-21, Jun 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2013.03.001>.

DUPONT, C. *et al.* Characterization of Histone Modifications Associated with Inactive X-Chromosome in Trophoblast Stem Cells, eXtra-Embryonic Endoderm Cells and in In Vitro Derived Undifferentiated and Differentiated Epiblast Like Stem Cells. *PloS one* [S.I.], v. 11, n. 12, p. e0167154, 2016. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0167154>.

DUSZCZYK, M. M. *et al.* The Xist RNA A-repeat comprises a novel AUCG tetraloop fold and a platform for multimerization. *RNA* [S.I.], v. 17, n. 11, p. 1973-82, Nov 2011. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.2747411>.

DUTHIE, S. M. *et al.* Xist RNA exhibits a banded localization on the inactive X chromosome and is excluded from autosomal material in cis. *Human molecular genetics* [S.I.], v. 8, n. 2, p. 195-204, Feb 1999. <http://dx.doi.org/Doi10.1093/Hmg/8.2.195>.



EGLIN, R. M.; REISINE, T. Screening for compounds that modulate epigenetic regulation of the transcriptome: an overview. *Journal of biomolecular screening* [S.l.], v. 16, n. 10, p. 1137-52, Dec 2011. <http://dx.doi.org/10.1177/1087057111417871>.

ELISAPHENKO, E. A. *et al.* A dual origin of the Xist gene from a protein-coding gene and a set of transposable elements. *PloS one* [S.l.], v. 3, n. 6, p. e2521, 2008. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002521>.

ENGREITZ, J. M. *et al.* The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science* [S.l.], v. 341, n. 6147, p. 1237973, Aug 16 2013. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1237973>.

ESCAMILLA-DEL-ARENAL, M. *et al.* Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. *Human genetics* [S.l.], v. 130, n. 2, p. 307-27, Aug 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-011-1029-2>.

FAGHIHI, M. A.; WAHLESTEDT, C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nature reviews. Molecular cell biology* [S.l.], v. 10, n. 9, p. 637-43, Sep 2009. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2738>.

FAGUNDES, N. S. *et al.* Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in *Bos taurus indicus* oocytes with different developmental competencies. *Molecular human reproduction* [S.l.], v. 17, n. 2, p. 85-91, Feb 2011. <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/gaq075>.

FANG, J. *et al.* Ring1b-mediated H2A ubiquitination associates with inactive X chromosomes and is involved in initiation of X inactivation. *The Journal of biological*

*chemistry* [S.I.], v. 279, n. 51, p. 52812-5, Dec 17 2004.  
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C400493200>.

FARAZMAND, A. *et al.* Expression of XIST sense and antisense in bovine fetal organs and cell cultures. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 275-83, 2004.

FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything. *Epigenetics* [S.I.], v. 6, n. 7, p. 791-797, 2014. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.6.7.16209>.

FEIL, R. *et al.* Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse Igf2 and H19 genes. *Development* [S.I.], v. 120, n. 10, p. 2933-43, Oct 1994.

FERREIRA, A. R. *et al.* Characterization of allele-specific expression of the X-linked gene MAO-A in trophectoderm cells of bovine embryos produced by somatic cell nuclear transfer. *Genetics and molecular research : GMR* [S.I.], v. 14, n. 4, p. 12128-36, 2015. <http://dx.doi.org/10.4238/2015.October.5.26>.

FERREIRA, A. R. *et al.* Allele-specific expression of the MAOA gene and X chromosome inactivation in in vitro produced bovine embryos. *Molecular reproduction and development* [S.I.], v. 77, n. 7, p. 615-21, Jul 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.21192>.

FRANCO, M. M. *et al.* Characterisation of the methylation pattern in the intragenic CpG island of the IGF2 gene in *Bos taurus indicus* cumulus cells during in vitro maturation. *Journal of assisted reproduction and genetics* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 115-20, Jan 2014. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-013-0106-y>.

FRANCO, M. M. *et al.* The role of CCCTC-binding factor (CTCF) in genomic imprinting, development, and reproduction. *Biology of reproduction* [S.l.], v. 91, n. 5, p. 125, Nov 2014. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.114.122945>.

FROST, J. M.; MOORE, G. E. The Importance of Imprinting in the Human Placenta. *PLoS genetics* [S.l.], v. 6, n. 7, Jul 2010. [http://dx.doi.org/ARTN e1001015](http://dx.doi.org/ARTN%20e1001015)  
10.1371/journal.pgen.1001015.

FURLAN, G.; ROUGEULLE, C. Function and evolution of the long noncoding RNA circuitry orchestrating X-chromosome inactivation in mammals. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* [S.l.], v. 7, n. 5, p. 702-22, Sep 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/wrna.1359>.

GAO, F. *et al.* De novo DNA methylation during monkey pre-implantation embryogenesis. *Cell research* [S.l.], v. 27, n. 4, p. 526-539, Apr 2017. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2017.25>.

GAO, Y. *et al.* Dynamic changes in epigenetic marks and gene expression during porcine epiblast specification. *Cellular reprogramming* [S.l.], v. 13, n. 4, p. 345-60, Aug 2011. <http://dx.doi.org/10.1089/cell.2010.0110>.

GEBERT, C. *et al.* The bovine IGF2 gene is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. *Genomics* [S.l.], v. 88, n. 2, p. 222-9, Aug 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.03.011>.

GEBERT, C. *et al.* DNA methylation in the IGF2 intragenic DMR is re-established in a sex-specific manner in bovine blastocysts after somatic cloning. *Genomics* [S.l.], v. 94, n. 1, p. 63-9, Jul 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.03.004>.

GEHRING, M. *et al.* DNA demethylation by DNA repair. *Trends in genetics : TIG* [S.I.], v. 25, n. 2, p. 82-90, Feb 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2008.12.001>.

GENDREL, A. V.; HEARD, E. Noncoding RNAs and epigenetic mechanisms during X-chromosome inactivation. *Annual review of cell and developmental biology* [S.I.], v. 30, p. 561-80, 2014. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122415>.

GIENI, R. S.; HENDZEL, M. J. Polycomb group protein gene silencing, non-coding RNA, stem cells, and cancer. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* [S.I.], v. 87, n. 5, p. 711-46, Oct 2009. <http://dx.doi.org/10.1139/O09-057>.

GLOBISCH, D. *et al.* Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PloS one* [S.I.], v. 5, n. 12, p. e15367, 2010. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0015367>.

GOLL, M. G. *et al.* Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* [S.I.], v. 311, n. 5759, p. 395-8, Jan 20 2006. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1120976>.

GOMES, A. Q. *et al.* Non-coding RNAs: multi-tasking molecules in the cell. *International journal of molecular sciences* [S.I.], v. 14, n. 8, p. 16010-39, Jul 31 2013. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms140816010>.

GONTAN, C. *et al.* RNF12 initiates X-chromosome inactivation by targeting REX1 for degradation. *Nature* [S.I.], v. 485, n. 7398, p. 386-90, May 17 2012. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11070>.

GOTO, T.; MONK, M. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* [S.I.], v. 62, n. 2, p. 362-78, Jun 1998.

GRANT, J. *et al.* Rxs is a metatherian RNA with Xist-like properties in X-chromosome inactivation. *Nature* [S.I.], v. 487, n. 7406, p. 254-8, Jul 12 2012. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11171>.

GRECO, S. *et al.* Noncoding RNA in age-related cardiovascular diseases. *Journal of molecular and cellular cardiology* [S.I.], v. 83, p. 142-55, Jun 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.01.011>.

GRIBNAU, J.; GROOTEGOED, J. A. Origin and evolution of X chromosome inactivation. *Current opinion in cell biology* [S.I.], v. 24, n. 3, p. 397-404, Jun 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2012.02.004>.

GUO, H. *et al.* The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* [S.I.], v. 511, n. 7511, p. 606-10, Jul 31 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13544>.

GUSEVA, N. *et al.* Antisense noncoding RNA promoter regulates the timing of de novo methylation of an imprinting control region. *Developmental biology* [S.I.], v. 361, n. 2, p. 403-11, Jan 15 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.11.005>.

HALL, J. G. Genomic imprinting. *Current opinion in genetics & development* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 34-9, Jun 1991.

\_\_\_\_\_. Genomic imprinting: nature and clinical relevance. *Annual review of medicine* [S.I.], v. 48, p. 35-44, 1997. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.med.48.1.35>.

HAMMOUD, S. S. *et al.* Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertility and sterility* [S.I.], v. 94, n. 5, p. 1728-33, Oct 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.010>.

HANSEN, P. J. *et al.* Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. *Reproduction, fertility, and development* [S.I.], v. 22, n. 1, p. 59-66, 2010. <http://dx.doi.org/10.1071/RD09212>.

HASAN, S.; HOTTIGER, M. O. Histone acetyl transferases: a role in DNA repair and DNA replication. *Journal of molecular medicine* [S.I.], v. 80, n. 8, p. 463-74, Aug 2002. <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-002-0341-7>.

HASEGAWA, Y. *et al.* The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. *Developmental cell* [S.I.], v. 19, n. 3, p. 469-76, Sep 14 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.08.006>.

HASHIMOTO, H. *et al.* Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 40, n. 11, p. 4841-9, Jun 2012. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks155>.

HE, M. *et al.* Chemical Biology for Investigating Epigenetic Functions of Lysine Acetyltransferases (KATs). *Angewandte Chemie* [S.I.], Aug 07 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201704745>.

HE, Y. F. *et al.* Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* [S.I.], v. 333, n. 6047, p. 1303-7, Sep 2 2011. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1210944>.

HEARD, E. *et al.* X-chromosome inactivation in mammals. *Annual review of genetics* [S.I.], v. 31, p. 571-610, 1997. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.31.1.571>.

HEARD, E.; DISTECHE, C. M. Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes & development* [S.l.], v. 20, n. 14, p. 1848-67, Jul 15 2006. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1422906>.

HEIJMANS, B. T. *et al.* Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.l.], v. 105, n. 44, p. 17046-9, Nov 04 2008. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806560105>.

HENDRICH, B. D. *et al.* Evolutionary conservation of possible functional domains of the human and murine XIST genes. *Human molecular genetics* [S.l.], v. 2, n. 6, p. 663-72, Jun 1993.

HOKI, Y. *et al.* A proximal conserved repeat in the Xist gene is essential as a genomic element for X-inactivation in mouse. *Development* [S.l.], v. 136, n. 1, p. 139-46, Jan 2009. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.026427>.

HOLM, P. *et al.* Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology* [S.l.], v. 50, n. 8, p. 1285-99, Dec 1998.

HONG, Y. K. *et al.* A new structure for the murine Xist gene and its relationship to chromosome choice/counting during X-chromosome inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.l.], v. 96, n. 12, p. 6829-34, Jun 08 1999.

HSIEH, C. L. Dynamics of DNA methylation pattern. *Current opinion in genetics & development* [S.l.], v. 10, n. 2, p. 224-8, Apr 2000.

HUYNH, K. D.; LEE, J. T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* [S.l.], v. 426, n. 6968, p. 857-862, Dec 18 2003. <http://dx.doi.org/10.1038/nature02222>.

\_\_\_\_\_. A continuity of X-chromosome silence from gamete to zygote. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* [S.l.], v. 69, p. 103-12, 2004. <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.2004.69.103>.

HWANG, J. Y. *et al.* Dosage compensation of X-chromosome inactivation center-linked genes in porcine preimplantation embryos: Non-chromosome-wide initiation of X-chromosome inactivation in blastocysts. *Mechanisms of development* [S.l.], v. 138 Pt 3, p. 246-55, Nov 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mod.2015.10.005>.

IDERAABDULLAH, F. Y. *et al.* Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutation research* [S.l.], v. 647, n. 1-2, p. 77-85, Dec 1 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.08.008>.

IETS. 2015 STATISTICS OF EMBRYO COLLECTION AND TRANSFER IN DOMESTIC FARM ANIMALS. International Embryo Transfer Society. Champaign. 2015. Disponível em [http://www.iets.org/pdf/comm\\_data/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_2015\\_V2.pdf](http://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_2015_V2.pdf)

IMAMURA, T. *et al.* Dynamic CpG and non-CpG methylation of the Peg1/Mest gene in the mouse oocyte and preimplantation embryo. *The Journal of biological chemistry* [S.l.], v. 280, n. 20, p. 20171-5, May 20 2005. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M501749200>.

INBAR-FEIGENBERG, M. *et al.* Basic concepts of epigenetics. *Fertility and sterility* [S.l.], v. 99, n. 3, p. 607-15, Mar 01 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.117>.



INOUE, A. *et al.* Genomic imprinting of Xist by maternal H3K27me3. *Genes & development* [S.I.], v. 31, n. 19, p. 1927-1932, Oct 1 2017. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.304113.117>.

IQBAL, K. *et al.* Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 108, n. 9, p. 3642-7, Mar 1 2011. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1014033108>.

ITO, S. *et al.* Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* [S.I.], v. 333, n. 6047, p. 1300-3, Sep 02 2011. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1210597>.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* [S.I.], v. 33 Suppl, p. 245-54, Mar 2003. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1089>.

JEON, Y.; LEE, J. T. YY1 tethers Xist RNA to the inactive X nucleation center. *Cell* [S.I.], v. 146, n. 1, p. 119-33, Jul 8 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.026>.

JEON, Y. *et al.* New and Xisting regulatory mechanisms of X chromosome inactivation. *Current opinion in genetics & development* [S.I.], v. 22, n. 2, p. 62-71, Apr 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2012.02.007>.

JOHN, R. M.; SURANI, M. A. Imprinted genes and regulation of gene expression by epigenetic inheritance. *Current opinion in cell biology* [S.I.], v. 8, n. 3, p. 348-53, Jun 1996.

JONKERS, I. *et al.* RNF12 is an X-Encoded dose-dependent activator of X chromosome inactivation. *Cell* [S.I.], v. 139, n. 5, p. 999-1011, Nov 25 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.034>.

JURKOWSKA, R. Z. *et al.* Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* [S.I.], v. 12, n. 2, p. 206-22, Jan 24 2011. <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201000195>.

KAIKKONEN, M. U. *et al.* Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular research* [S.I.], v. 90, n. 3, p. 430-40, Jun 01 2011. <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvr097>.

KANEDA, M. *et al.* Epigenetic analysis of bovine parthenogenetic embryonic fibroblasts. *The Journal of reproduction and development* [S.I.], v. 63, n. 4, p. 365-375, Aug 19 2017. <http://dx.doi.org/10.1262/jrd.2017-040>.

KANEDA, M. *et al.* Proper reprogramming of imprinted and non-imprinted genes in cloned cattle gametogenesis. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho* [S.I.], Jun 02 2017. <http://dx.doi.org/10.1111/asj.12846>.

KATAYAMA, S. *et al.* Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* [S.I.], v. 309, n. 5740, p. 1564-6, Sep 02 2005. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1112009>.

KIM, J. *et al.* Epigenetic instability of imprinted genes in human cancers. *Nucleic acids research* [S.I.], v. 43, n. 22, p. 10689-99, Dec 15 2015. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv867>.

KIM, J. S. *et al.* Reactivation of the inactive X chromosome and post-transcriptional reprogramming of Xist in iPSCs. *Journal of cell science* [S.I.], v. 128, n. 1, p. 81-7, Jan 01 2015. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.154294>.

KIRCHHOF, N. *et al.* Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biology of Reproduction* [S.I.], v. 63, n. 6, p. 1698-1705, Dec 2000. <http://dx.doi.org/DOI 10.1095/biolreprod63.6.1698>.

KOBAYASHI, H. *et al.* Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS genetics* [S.I.], v. 8, n. 1, p. e1002440, Jan 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002440>.

KOHLMAIER, A. *et al.* A chromosomal memory triggered by Xist regulates histone methylation in X inactivation. *PLoS biology* [S.I.], v. 2, n. 7, p. E171, Jul 2004. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0020171>.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. *Cell* [S.I.], v. 128, n. 4, p. 693-705, Feb 23 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.

KRIAUCIONIS, S.; HEINTZ, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* [S.I.], v. 324, n. 5929, p. 929-30, May 15 2009. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1169786>.

KUBICEK, S. *et al.* The role of histone modifications in epigenetic transitions during normal and perturbed development. *Ernst Schering Research Foundation workshop* [S.I.], n. 57, p. 1-27, 2006.

KUO, M. H.; ALLIS, C. D. Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* [S.I.], v. 20, n. 8, p. 615-26, Aug 1998.

[http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199808\)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199808)20:8<615::AID-BIES4>3.0.CO;2-H).

LAIRD, P. W. Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis. *Nature reviews. Genetics* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 191-203, Mar 2010. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2732>.

LAM, M. T. *et al.* Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends in biochemical sciences* [S.I.], v. 39, n. 4, p. 170-82, Apr 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.007>.

LEE, J. T. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [S.I.], v. 12, n. 12, p. 815-826, Dec 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3231>.

\_\_\_\_\_. Epigenetic regulation by long noncoding RNAs. *Science* [S.I.], v. 338, n. 6113, p. 1435-9, Dec 14 2012. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1231776>.

LEE, J. T. *et al.* Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nature genetics* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 400-404, Apr 1999. [http://dx.doi.org/Doi 10.1038/7734](http://dx.doi.org/Doi%2010.1038/7734).

LEE, J. T.; LU, N. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell* [S.I.], v. 99, n. 1, p. 47-57, Oct 01 1999.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* [S.I.], v. 3, n. 9, p. 662-673, Sep 2002. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg887>.

LI, G. *et al.* High frequency of the X-chromosome inactivation in young female patients with high-grade glioma. *Diagnostic Pathology* [S.I.], v. 8, Jun 19 2013. <http://dx.doi.org/Artn 101>

10.1186/1746-1596-8-101.

LI, L. *et al.* The maternal to zygotic transition in mammals. *Molecular aspects of medicine* [S.I.], v. 34, n. 5, p. 919-38, Oct 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.003>.

LI, W.; LIU, M. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *Journal of nucleic acids* [S.I.], v. 2011, p. 870726, 2011. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/870726>.

LISTER, R. *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* [S.I.], v. 462, n. 7271, p. 315-22, Nov 19 2009. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08514>.

LIU, J. H. *et al.* Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. *Molecular reproduction and development* [S.I.], v. 75, n. 4, p. 598-607, Apr 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.20803>.

LIU, M.; SCHATZ, D. G. Balancing AID and DNA repair during somatic hypermutation. *Trends in immunology* [S.I.], v. 30, n. 4, p. 173-81, Apr 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.01.007>.

LIU, Y.; LU, X. Non-coding RNAs in DNA damage response. *American journal of cancer research* [S.I.], v. 2, n. 6, p. 658-75, 2012.

LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* [S.I.], v. 69, n. 1, p. 17-22, Jan 01 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.007>.

LU, Z. *et al.* Mechanistic insights in X-chromosome inactivation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* [S.I.], v. 372, n. 1733, Nov 05 2017. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0356>.

LV, Q. *et al.* D-repeat in the XIST gene is required for X chromosome inactivation. *RNA biology* [S.I.], v. 13, n. 2, p. 172-6, Feb 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/15476286.2015.1137420>.

LYKO, F.; MALESZKA, R. Insects as innovative models for functional studies of DNA methylation. *Trends in genetics : TIG* [S.I.], v. 27, n. 4, p. 127-31, Apr 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2011.01.003>.

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

MA, M.; STRAUSS, W. M. Analysis of the Xist RNA isoforms suggests two distinctly different forms of regulation. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* [S.I.], v. 16, n. 6, p. 391-404, Jun 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-004-2464-3>.

MAALOUF, W. E. *et al.* Differential acetylation of histone H4 lysine during development of in vitro fertilized, cloned and parthenogenetically activated bovine embryos. *Epigenetics* [S.I.], v. 3, n. 4, p. 199-209, Jul-Aug 2008.

MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. *Molecular reproduction and development* [S.l.], v. 81, n. 2, p. 126-40, Feb 2014. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.22220>.

MACLARY, E. *et al.* Differentiation-dependent requirement of Tsix long non-coding RNA in imprinted X-chromosome inactivation. *Nature communications* [S.l.], v. 5, p. 4209, 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5209>.

MACLARY, E. *et al.* Long noncoding RNAs in the X-inactivation center. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* [S.l.], v. 21, n. 6-7, p. 601-14, Dec 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s10577-013-9396-2>.

MAENNER, S. *et al.* 2-D structure of the A region of Xist RNA and its implication for PRC2 association. *PLoS biology* [S.l.], v. 8, n. 1, p. e1000276, Jan 2010. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1000276>.

MAK, W. *et al.* Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science* [S.l.], v. 303, n. 5658, p. 666-9, Jan 30 2004. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1092674>.

MAKHLOUF, M. *et al.* A prominent and conserved role for YY1 in Xist transcriptional activation. *Nature communications* [S.l.], v. 5, p. 4878, 2014. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms5878>.

MANIPALVIRATN, S. *et al.* Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertility and sterility* [S.l.], v. 91, n. 2, p. 305-15, Feb 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.002>.

MARAHRENS, Y. *et al.* Xist-deficient mice are defective in dosage compensation but not spermatogenesis. *Genes & development* [S.I.], v. 11, n. 2, p. 156-66, Jan 15 1997.

MARGUERON, R.; REINBERG, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature reviews. Genetics* [S.I.], v. 11, n. 4, p. 285-96, Apr 2010. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2752>.

\_\_\_\_\_. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* [S.I.], v. 469, n. 7330, p. 343-9, Jan 20 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09784>.

MARINHO, L. S. R. *et al.* Acetylation and methylation profiles of H3K27 in porcine embryos cultured in vitro. *Zygote* [S.I.], p. 1-8, Jul 11 2017. <http://dx.doi.org/10.1017/S0967199417000405>.

MCCARREY, J. R.; DILWORTH, D. D. Expression of Xist in mouse germ cells correlates with X-chromosome inactivation. *Nature genetics* [S.I.], v. 2, n. 3, p. 200-3, Nov 1992. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1192-200>.

MCDONALD, L. E. *et al.* Bisulfite genomic sequencing-derived methylation profile of the xist gene throughout early mouse development. *Genomics* [S.I.], v. 54, n. 3, p. 379-86, Dec 15 1998. <http://dx.doi.org/10.1006/geno.1998.5570>.

MCGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* [S.I.], v. 37, n. 1, p. 179-83, May 1984.

MCHUGH, C. A. *et al.* The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature* [S.I.], v. 521, n. 7551, p. 232-6, May 14 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14443>.



MELLER, V. H.; KURODA, M. I. Sex and the single chromosome. *Advances in genetics* [S.I.], v. 46, p. 1-24, 2002.

MEMILI, E. *et al.* Murine Xist RNA isoforms are different at their 3' ends: a role for differential polyadenylation. *Gene* [S.I.], v. 266, n. 1-2, p. 131-7, Mar 21 2001.

MENDONCA ADOS, S. *et al.* Characterization of the IGF2 Imprinted Gene Methylation Status in Bovine Oocytes during Folliculogenesis. *PloS one* [S.I.], v. 10, n. 10, p. e0142072, 2015. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0142072>.

MERTINEIT, C. *et al.* Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. *Development* [S.I.], v. 125, n. 5, p. 889-97, Mar 1998.

MEYER, B. J.; CASSON, L. P. *Caenorhabditis elegans* compensates for the difference in X chromosome dosage between the sexes by regulating transcript levels. *Cell* [S.I.], v. 47, n. 6, p. 871-81, Dec 26 1986.

MIN, B. *et al.* Characterization of X-Chromosome Gene Expression in Bovine Blastocysts Derived by In vitro Fertilization and Somatic Cell Nuclear Transfer. *Frontiers in genetics* [S.I.], v. 8, p. 42, 2017. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2017.00042>.

MOHANDAS, T. *et al.* Reactivation of an Inactive Human X-Chromosome - Evidence for X Inactivation by DNA Methylation. *Science* [S.I.], v. 211, n. 4480, p. 393-396, 1981. <http://dx.doi.org/DOI 10.1126/science.6164095>.

MOLYNEAUX, K.; WYLIE, C. Primordial germ cell migration. *The International journal of developmental biology* [S.I.], v. 48, n. 5-6, p. 537-44, 2004. <http://dx.doi.org/10.1387/ijdb.041833km>.

MONK, M. *et al.* Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* [S.I.], v. 99, n. 3, p. 371-82, Mar 1987.

MONK, M.; HARPER, M. I. Sequential X chromosome inactivation coupled with cellular differentiation in early mouse embryos. *Nature* [S.I.], v. 281, n. 5729, p. 311-3, Sep 27 1979.

MONKHORST, K. *et al.* X inactivation counting and choice is a stochastic process: evidence for involvement of an X-linked activator. *Cell* [S.I.], v. 132, n. 3, p. 410-21, Feb 08 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.036>.

MOORE, T. *et al.* Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse Igf2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 94, n. 23, p. 12509-14, Nov 11 1997.

MOORE, T.; HAIG, D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. *Trends in genetics : TIG* [S.I.], v. 7, n. 2, p. 45-9, Feb 1991. [http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90230-N](http://dx.doi.org/10.1016/0168-9525(91)90230-N).

MORGAN, H. D. *et al.* Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics* [S.I.], v. 14 Spec No 1, p. R47-58, Apr 15 2005. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi114>.

MURRELL, A. *et al.* Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. *Nature genetics* [S.I.], v. 36, n. 8, p. 889-93, Aug 2004. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1402>.

NAMEKAWA, S. H. *et al.* Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Current biology : CB* [S.I.], v. 16, n. 7, p. 660-7, Apr 04 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.066>.

NATHAN, D. *et al.* Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 100, n. 23, p. 13118-20, Nov 11 2003. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2436173100>.

NAVARRO, P.; AVNER, P. When X-inactivation meets pluripotency: an intimate rendezvous. *FEBS letters* [S.I.], v. 583, n. 11, p. 1721-7, Jun 05 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.043>.

\_\_\_\_\_. An embryonic story: analysis of the gene regulative network controlling Xist expression in mouse embryonic stem cells. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* [S.I.], v. 32, n. 7, p. 581-8, Jul 2010. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201000019>.

NAVARRO, P. *et al.* Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science* [S.I.], v. 321, n. 5896, p. 1693-5, Sep 19 2008. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1160952>.

NAVARRO, P. *et al.* A role for non-coding Tsix transcription in partitioning chromatin domains within the mouse X-inactivation centre. *Epigenetics & chromatin* [S.I.], v. 2, n. 1, p. 8, Jul 20 2009. <http://dx.doi.org/10.1186/1756-8935-2-8>.

NAVARRO, P. *et al.* Molecular coupling of Tsix regulation and pluripotency. *Nature* [S.I.], v. 468, n. 7322, p. 457-60, Nov 18 2010. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09496>.

NAVARRO, P. *et al.* Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program. *Genes & Development* [S.I.], v. 20, n. 20, p. 2787-92, Oct 15 2006. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.389006>.

NAVARRO, P. *et al.* Tsix transcription across the Xist gene alters chromatin conformation without affecting Xist transcription: implications for X-chromosome inactivation. *Genes & Development* [S.I.], v. 19, n. 12, p. 1474-1484, Jun 15 2005. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.341105>.

NESBIT, M. N. X chromosome inactivation mosaicism in the mouse. *Developmental biology* [S.I.], v. 26, n. 2, p. 252-63, Oct 1971.

NESTEROVA, T. B. *et al.* Xist expression and macroH2A1.2 localisation in mouse primordial and pluripotent embryonic germ cells. *Differentiation; research in biological diversity* [S.I.], v. 69, n. 4-5, p. 216-25, Jan 2002. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.690415.x>.

NESTEROVA, T. B. *et al.* Characterization of the genomic Xist locus in rodents reveals conservation of overall gene structure and tandem repeats but rapid evolution of unique sequence. *Genome research* [S.I.], v. 11, n. 5, p. 833-49, May 2001. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.174901>.

NIAKAN, K. K.; EGGAN, K. Analysis of human embryos from zygote to blastocyst reveals distinct gene expression patterns relative to the mouse. *Developmental biology* [S.I.], v. 375, n. 1, p. 54-64, Mar 01 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.12.008>.

NINO-SOTO, M. I. *et al.* Impact of in vitro production techniques on the expression of X-linked genes in bovine (*bos taurus*) oocytes and pre-attachment embryos.

*Molecular reproduction and development* [S.I.], v. 74, n. 2, p. 144-53, Feb 2007.  
<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.20575>.

NORRIS, D. P. *et al.* Evidence that random and imprinted Xist expression is controlled by preemptive methylation. *Cell* [S.I.], v. 77, n. 1, p. 41-51, Apr 08 1994.

NYE, M. D. *et al.* In vitro lead exposure changes DNA methylation and expression of IGF2 and PEG1/MEST. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* [S.I.], v. 29, n. 3, p. 544-50, Apr 2015.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.01.002>.

OGAWA, Y.; LEE, J. T. Xite, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. *Molecular cell* [S.I.], v. 11, n. 3, p. 731-43, Mar 2003.

OGAWA, Y. *et al.* Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. *Science* [S.I.], v. 320, n. 5881, p. 1336-41, Jun 6 2008.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1157676>.

OHATA, T. *et al.* Crucial role of antisense transcription across the Xist promoter in Tsix-mediated Xist chromatin modification. *Development* [S.I.], v. 135, n. 2, p. 227-35, Jan 2008. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.008490>.

OHLSSON, R. *et al.* Did genomic imprinting and X chromosome inactivation arise from stochastic expression? *Trends in genetics : TIG* [S.I.], v. 17, n. 3, p. 136-41, Mar 2001.

OHNO, S. *et al.* Somatic association of the positively heteropycnotic x-chromosomes in female mice (*Mus musculus*). *Experimental cell research* [S.I.], v. 15, n. 3, p. 616-8, Dec 1958.

OIKAWA, M. *et al.* Understanding the X chromosome inactivation cycle in mice: a comprehensive view provided by nuclear transfer. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* [S.I.], v. 9, n. 2, p. 204-11, Feb 2014. <http://dx.doi.org/10.4161/epi.26939>.

OKADA, Y. *et al.* Comparative expression analysis uncovers novel features of endogenous antisense transcription. *Human molecular genetics* [S.I.], v. 17, n. 11, p. 1631-40, Jun 01 2008. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn051>.

OKAMOTO, I.; HEARD, E. Lessons from comparative analysis of X-chromosome inactivation in mammals. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology* [S.I.], v. 17, n. 5, p. 659-69, 2009. <http://dx.doi.org/10.1007/s10577-009-9057-7>.

OKAMOTO, I. *et al.* Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science* [S.I.], v. 303, n. 5658, p. 644-9, Jan 30 2004. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1092727>.

OKAMOTO, I. *et al.* Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* [S.I.], v. 472, n. 7343, p. 370-4, Apr 21 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09872>.

OLIVA, R. *et al.* Factors affecting nucleosome disassembly by protamines in vitro. Histone hyperacetylation and chromatin structure, time dependence, and the size of the sperm nuclear proteins. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 262, n. 35, p. 17016-25, Dec 15 1987.

OLIVEIRA, C. S. *et al.* HDAC inhibition decreases XIST expression on female IVP bovine blastocysts. *Reproduction* [S.l.], v. 145, n. 1, p. 9-17, Jan 2013. <http://dx.doi.org/10.1530/REP-11-0343>.

ORR, B. A. *et al.* Decreased 5-hydroxymethylcytosine is associated with neural progenitor phenotype in normal brain and shorter survival in malignant glioma. *PloS one* [S.l.], v. 7, n. 7, p. e41036, 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041036>.

PARADOWSKA. Aberrant epigenetic modifications in the CTCF binding domain of the IGF2/H19 gene in prostate cancer compared with benign prostate hyperplasia. *International Journal of Oncology* [S.l.], v. 35, n. 01, 2009. [http://dx.doi.org/10.3892/ijo\\_00000316](http://dx.doi.org/10.3892/ijo_00000316).

PARK, C. H. *et al.* Methylation status of differentially methylated regions at Igf2/H19 locus in porcine gametes and preimplantation embryos. *Genomics* [S.l.], v. 93, n. 2, p. 179-86, Feb 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.10.002>.

PARK E-H. *et al.* The stage of embryonic genome activation in bovine embryos following in vitro fertilization. *Theriogenology* [S.l.], v. 51, p. 180-96, 1999.

PARK, J. S. *et al.* Dynamic DNA methylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* [S.l.], v. 236, n. 9, p. 2523-33, Sep 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.21278>.

PARRISH, J. J. *et al.* Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* [S.l.], v. 44, n. 6, p. 859-69, Oct 15 1995.

PASQUE, V. *et al.* Histone variant macroH2A confers resistance to nuclear reprogramming. *The EMBO journal* [S.I.], v. 30, n. 12, p. 2373-87, Jun 15 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.144>.

PAYER, B. *et al.* X-inactivation and X-reactivation: epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells. *Human genetics* [S.I.], v. 130, n. 2, p. 265-80, Aug 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-011-1024-7>.

PEETERS, S. B. *et al.* Variable escape from X-chromosome inactivation: identifying factors that tip the scales towards expression. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* [S.I.], v. 36, n. 8, p. 746-56, Aug 2014. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201400032>.

PEIPPO, J. *et al.* Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovine embryos. *Molecular human reproduction* [S.I.], v. 8, n. 10, p. 923-9, Oct 2002.

PELECHANO, V.; STEINMETZ, L. M. Gene regulation by antisense transcription. *Nature reviews. Genetics* [S.I.], v. 14, n. 12, p. 880-93, Dec 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3594>.

PENN, N. W. *et al.* The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. *The Biochemical journal* [S.I.], v. 126, n. 4, p. 781-90, Feb 1972.

PENNY, G. D. *et al.* Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature* [S.I.], v. 379, n. 6561, p. 131-7, Jan 11 1996. <http://dx.doi.org/10.1038/379131a0>.



PESSIA, E. *et al.* Mammalian X chromosome inactivation evolved as a dosage-compensation mechanism for dosage-sensitive genes on the X chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 109, n. 14, p. 5346-5351, Apr 3 2012. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1116763109>.

PLATH, K. *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science* [S.I.], v. 300, n. 5616, p. 131-5, Apr 04 2003. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1084274>.

PONTING, C. P. *et al.* Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* [S.I.], v. 136, n. 4, p. 629-41, Feb 20 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.006>.

PRICKETT, A. R.; OAKEY, R. J. A survey of tissue-specific genomic imprinting in mammals. *Molecular genetics and genomics : MGG* [S.I.], v. 287, n. 8, p. 621-30, Aug 2012. <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-012-0708-6>.

PRINCE, E. G. *et al.* Hyperexpression of the X Chromosome in Both Sexes Results in Extensive Female Bias of X-Linked Genes in the Flour Beetle. *Genome Biology and Evolution* [S.I.], v. 2, p. 336-346, 2010. <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evq024>.

PROUDHON, C. *et al.* Protection against de novo methylation is instrumental in maintaining parent-of-origin methylation inherited from the gametes. *Molecular cell* [S.I.], v. 47, n. 6, p. 909-20, Sep 28 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.010>.

QI, Q. *et al.* X chromosome inactivation in human parthenogenetic embryonic stem cells following prolonged passaging. *International journal of molecular medicine* [S.I.], v. 35, n. 3, p. 569-78, Mar 2015. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.2044>.

REIK, W.; DEAN, W. DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis* [S.I.], v. 22, n. 14, p. 2838-43, Aug 2001. [http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683\(200108\)22:14<2838::AID-ELPS2838>3.0.CO;2-M](http://dx.doi.org/10.1002/1522-2683(200108)22:14<2838::AID-ELPS2838>3.0.CO;2-M).

REIK, W. *et al.* Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* [S.I.], v. 293, n. 5532, p. 1089-93, Aug 10 2001. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1063443>.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nature reviews. Genetics* [S.I.], v. 2, n. 1, p. 21-32, Jan 2001. <http://dx.doi.org/10.1038/35047554>.

RIDEOUT, W. M., 3RD *et al.* Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* [S.I.], v. 293, n. 5532, p. 1093-8, Aug 10 2001. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1063206>.

RIISING, E. M. *et al.* Gene silencing triggers polycomb repressive complex 2 recruitment to CpG islands genome wide. *Molecular cell* [S.I.], v. 55, n. 3, p. 347-60, Aug 07 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.005>.

ROSS, J. *et al.* In vitro synthesis of DNA complementary to purified rabbit globin mRNA (RNA-dependent DNA polymerase-reticulocyte-hemoglobin-density gradient centrifugation-oligo(dT) primer). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 69, n. 1, p. 264-8, Jan 1972.

ROSS, M. T. *et al.* The DNA sequence of the human X chromosome. *Nature* [S.I.], v. 434, n. 7031, p. 325-337, Mar 17 2005. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03440>.

ROUGEULLE, C. *et al.* Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. *Molecular and cellular biology* [S.I.], v. 24, n. 12, p. 5475-84, Jun 2004. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.24.12.5475-5484.2004>.

RUDDOCK, N. T. *et al.* Analysis of imprinted messenger RNA expression during bovine preimplantation development. *Biology of Reproduction* [S.I.], v. 70, n. 4, p. 1131-5, Apr 2004. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.103.022236>.

SADO, T. *et al.* Tsix silences Xist through modification of chromatin structure. *Developmental cell* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 159-65, Jul 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.05.015>.

SANTOS, F. *et al.* Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental biology* [S.I.], v. 241, n. 1, p. 172-82, Jan 01 2002. <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.2001.0501>.

SARKAR, M. K. *et al.* An Xist-activating antisense RNA required for X-chromosome inactivation. *Nature communications* [S.I.], v. 6, p. 8564, Oct 19 2015. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms9564>.

SAUVAGEAU, M.; SAUVAGEAU, G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell stem cell* [S.I.], v. 7, n. 3, p. 299-313, Sep 03 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.002>.

SAXONOV, S. *et al.* A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 103, n. 5, p. 1412-7, Jan 31 2006. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0510310103>.

SCHAEFER, C. B. *et al.* Epigenetic decisions in mammalian germ cells. *Science* [S.I.], v. 316, n. 5823, p. 398-9, Apr 20 2007. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1137544>.

SHARMAN, G. B. Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. *Nature* [S.I.], v. 230, n. 5291, p. 231-2, Mar 26 1971.

SHEIK MOHAMED, J. *et al.* Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. *RNA* [S.I.], v. 16, n. 2, p. 324-37, Feb 2010. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.1441510>.

SHEMER, R. *et al.* Tissue-specific methylation patterns and expression of the human apolipoprotein A1 gene. *The Journal of biological chemistry* [S.I.], v. 265, n. 2, p. 1010-5, Jan 15 1990.

SHEN, C. J. *et al.* Imprinted genes and satellite loci are differentially methylated in bovine somatic cell nuclear transfer clones. *Cellular reprogramming* [S.I.], v. 15, n. 5, p. 413-24, Oct 2013. <http://dx.doi.org/10.1089/cell.2013.0012>.

SHI, Y. *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* [S.I.], v. 119, n. 7, p. 941-53, Dec 29 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.012>.

SHIN, J. *et al.* Maternal Rnf12/RLIM is required for imprinted X-chromosome inactivation in mice. *Nature* [S.I.], v. 467, n. 7318, p. 977-81, Oct 21 2010. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09457>.

SHIRANE, K. *et al.* Mouse Oocyte Methylomes at Base Resolution Reveal Genome-Wide Accumulation of Non-CpG Methylation and Role of DNA Methyltransferases. *PLoS genetics* [S.I.], v. 9, n. 4, Apr 2013. <http://dx.doi.org/ARTN e1003439>

10.1371/journal.pgen.1003439.

SHOVLIN, T. C. *et al.* Heterogeneity in imprinted methylation patterns of pluripotent embryonic germ cells derived from pre-migratory mouse germ cells. *Developmental biology* [S.I.], v. 313, n. 2, p. 674-81, Jan 15 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.007>.

SIMON, I. *et al.* Asynchronous replication of imprinted genes is established in the gametes and maintained during development. *Nature* [S.I.], v. 401, n. 6756, p. 929-32, Oct 28 1999. <http://dx.doi.org/10.1038/44866>.

SINGAL, R.; GINDER, G. D. DNA methylation. *Blood* [S.I.], v. 93, n. 12, p. 4059-70, Jun 15 1999.

SMALLWOOD, S. A. *et al.* Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nature genetics* [S.I.], v. 43, n. 8, p. 811-4, Aug 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.864>.

SMOLLE, M.; WORKMAN, J. L. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. *Biochimica et biophysica acta* [S.I.], v. 1829, n. 1, p. 84-97, Jan 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.08.008>.

SONG, X. *et al.* Dnmt1s in donor cells is a barrier to SCNT-mediated DNA methylation reprogramming in pigs. *Oncotarget* [S.I.], v. 8, n. 21, p. 34980-34991, May 23 2017. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.16507>.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* [S.I.], v. 403, n. 6765, p. 41-5, Jan 06 2000. <http://dx.doi.org/10.1038/47412>.

SU, J. M. *et al.* Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves. *Theriogenology* [S.I.], v. 75, n. 7, p. 1346-59, Apr 15 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.045>.

SUGIMOTO, M.; ABE, K. X chromosome reactivation initiates in nascent primordial germ cells in mice. *PLoS genetics* [S.I.], v. 3, n. 7, p. e116, Jul 2007. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0030116>.

SUN, B. K. *et al.* A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Molecular cell* [S.I.], v. 21, n. 5, p. 617-28, Mar 03 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.028>.

SUN, S. *et al.* Jpx RNA activates Xist by evicting CTCF. *Cell* [S.I.], v. 153, n. 7, p. 1537-51, Jun 20 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.028>.

SURFACE, L. E. *et al.* Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment. *Cell stem cell* [S.I.], v. 7, n. 3, p. 288-98, Sep 03 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.004>.

TADA, T. *et al.* Imprint switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. *Development* [S.I.], v. 127, n. 14, p. 3101-5, Jul 2000.

TAHILIANI, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* [S.I.], v. 324, n. 5929, p. 930-5, May 15 2009. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1170116>.

TAKAGI, N.; SASAKI, M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature* [S.I.], v. 256, n. 5519, p. 640-2, Aug 21 1975.

TAKAYAMA, S. *et al.* Genome methylation in *D. melanogaster* is found at specific short motifs and is independent of DNMT2 activity. *Genome research* [S.I.], v. 24, n. 5, p. 821-30, May 2014. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.162412.113>.

TEKLENBURG, G. *et al.* Cell lineage specific distribution of H3K27 trimethylation accumulation in an in vitro model for human implantation. *PloS one* [S.I.], v. 7, n. 3, p. e32701, 2012. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0032701>.

TIAN, D. *et al.* The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* [S.I.], v. 143, n. 3, p. 390-403, Oct 29 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.049>.

TUKIAINEN, T. *et al.* Chromosome X-wide association study identifies Loci for fasting insulin and height and evidence for incomplete dosage compensation. *PLoS genetics* [S.I.], v. 10, n. 2, p. e1004127, Feb 2014. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1004127>.

TURNER, J. M. *et al.* Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids. *Developmental cell* [S.I.], v. 10, n. 4, p. 521-9, Apr 2006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.009>.

TURNER, J. M. *et al.* Silencing of unsynapsed meiotic chromosomes in the mouse. *Nature genetics* [S.I.], v. 37, n. 1, p. 41-7, Jan 2005. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1484>.

VALLLOT, C. *et al.* XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. *Nature genetics* [S.I.], v. 45, n. 3, p. 239-41, Mar 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2530>.

VALLOT, C.; ROUGEULLE, C. Long non-coding RNAs and human X-chromosome regulation: a coat for the active X chromosome. *RNA biology* [S.l.], v. 10, n. 8, p. 1262-5, Aug 2013. <http://dx.doi.org/10.4161/rna.25802>.

VERONA, R. I. *et al.* Genomic imprinting: intricacies of epigenetic regulation in clusters. *Annual review of cell and developmental biology* [S.l.], v. 19, p. 237-59, 2003. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111401.092717>.

VIANA, J. H. M. *et al.* Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. *Animal Reproduction* [S.l.], v. 9, n. 1, p. 12-18, Mar 2012.

VIANA, J. H. M. *et al.* Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Animal Reproduction* [S.l.], v. 14, n. 3, p. 476-81, Sept 2017.

WANG, D. *et al.* Disruption of imprinted gene expression and DNA methylation status in porcine parthenogenetic fetuses and placentas. *Gene* [S.l.], v. 547, n. 2, p. 351-8, Sep 01 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.06.059>.

WANG, J. *et al.* Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxidants & redox signaling* [S.l.], v. 17, n. 2, p. 282-301, Jul 15 2012. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.4381>.

WIJCHERS, P. J.; FESTENSTEIN, R. J. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trends in Genetics* [S.l.], v. 27, n. 4, p. 132-140, Apr 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2011.01.004>.



WILKINSON, K. D. Protein ubiquitination: a regulatory post-translational modification. *Anti-cancer drug design* [S.l.], v. 2, n. 2, p. 211-29, Oct 1987.

WRENZYCKI, C. *et al.* In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. *Biology of reproduction* [S.l.], v. 66, n. 1, p. 127-34, Jan 2002.

WUTZ, A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. *Nature reviews. Genetics* [S.l.], v. 12, n. 8, p. 542-53, Aug 2011. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3035>.

WUTZ, A. *et al.* Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA. *Nature genetics* [S.l.], v. 30, n. 2, p. 167-74, Feb 2002. <http://dx.doi.org/10.1038/ng820>.

WUTZ, A. *et al.* Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature* [S.l.], v. 389, n. 6652, p. 745-9, Oct 16 1997. <http://dx.doi.org/10.1038/39631>.

XU, J.; ANDREASSI, M. Reversible histone methylation regulates brain gene expression and behavior. *Hormones and behavior* [S.l.], v. 59, n. 3, p. 383-92, Mar 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.019>.

XU, K. *et al.* Maternal Sall4 Is Indispensable for Epigenetic Maturation of Mouse Oocytes. *The Journal of biological chemistry* [S.l.], v. 292, n. 5, p. 1798-1807, Feb 03 2017. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M116.767061>.

XU, N. *et al.* Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctf protein. *Nature genetics* [S.I.], v. 39, n. 11, p. 1390-6, Nov 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2007.5>.

XU, N. *et al.* Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. *Science* [S.I.], v. 311, n. 5764, p. 1149-52, Feb 24 2006. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1122984>.

XUE, F. *et al.* Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. *Nature genetics* [S.I.], v. 31, n. 2, p. 216-20, Jun 2002. <http://dx.doi.org/10.1038/ng900>.

YANG, F. *et al.* Global survey of escape from X inactivation by RNA-sequencing in mouse. *Genome research* [S.I.], v. 20, n. 5, p. 614-22, May 2010. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.103200.109>.

YANG, F. *et al.* The lncRNA Firre anchors the inactive X chromosome to the nucleolus by binding CTCF and maintains H3K27me3 methylation. *Genome Biology* [S.I.], v. 16, p. 52, Mar 12 2015. <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0618-0>.

YOU, S. H. *et al.* Nuclear receptor co-repressors are required for the histone-deacetylase activity of HDAC3 in vivo. *Nature structural & molecular biology* [S.I.], v. 20, n. 2, p. 182-7, Feb 2013. <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.2476>.

YU, B. *et al.* Genome-wide, Single-Cell DNA Methylation Reveals Increased Non-CpG Methylation during Human Oocyte Maturation. *Stem cell reports* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 397-407, Jul 11 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.026>.

YUE, M. *et al.* Dynamic interplay and function of multiple noncoding genes governing X chromosome inactivation. *Biochimica et biophysica acta* [S.I.], v. 1859, n. 1, p. 112-20, Jan 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.07.015>.

YUE, M. *et al.* Xist RNA repeat E is essential for ASH2L recruitment to the inactive X and regulates histone modifications and escape gene expression. *PLoS genetics* [S.I.], v. 13, n. 7, p. e1006890, Jul 2017. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1006890>.

ZAIDI, S. K. *et al.* Architectural epigenetics: mitotic retention of mammalian transcriptional regulatory information. *Molecular and cellular biology* [S.I.], v. 30, n. 20, p. 4758-66, Oct 2010. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00646-10>.

ZHANG, L. F. *et al.* Perinucleolar targeting of the inactive X during S phase: evidence for a role in the maintenance of silencing. *Cell* [S.I.], v. 129, n. 4, p. 693-706, May 18 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.036>.

ZHANG, S. *et al.* Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. *Scientific reports* [S.I.], v. 6, p. 30345, Jul 26 2016. <http://dx.doi.org/10.1038/srep30345>.

ZHAO, J. *et al.* Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* [S.I.], v. 322, n. 5902, p. 750-6, Oct 31 2008. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1163045>.

ZHAO, L. *et al.* Molecular and DNA methylation analysis of Peg10 and Xist gene in sheep. *Molecular biology reports* [S.I.], v. 38, n. 5, p. 3495-504, Jun 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-010-0460-0>.

ZUCCOTTI, M.; MONK, M. Methylation of the mouse Xist gene in sperm and eggs correlates with imprinted Xist expression and paternal X-inactivation. *Nature genetics* [S.l.], v. 9, n. 3, p. 316-20, Mar 1995. <http://dx.doi.org/10.1038/ng0395-316>.

## **ANEXOS**

## ANEXO 1

### REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DE UMA PORÇÃO 5' DO *LOCUS* XIST DE BOVINOS

#### ***Bos taurus* X-inactivation center region, Jpx and Xist genes**

>AJ421481.1: 115.621 a 118.030

#### Dinucleotídeos CpG

Primers desenhados para metilação para a região promotora

Região promotora (de acordo com Dindot et al. 2004)

**TATAAT e ATAAAATAT:** Possíveis regiões de TATA box

Primers para metilação para a região *Repeat A* do gene XIST

Repetições em *tandem* do *Repeat A*

Primer TSIXP *forward* para expressão gênica (*SS-RT-PCR*)

Sobreposição do primer externo *reverse* para metilação para a região *Repeat A* e primer TSIXP *forward* para expressão gênica (*SS-RT-PCR*)

Primers para metilação para a região da DMR 1 do gene XIST (Liu et al. 2004)

GAGGGTTCTAACCTTAATGTATTGCCCTTCCTAGCTTCTTTGGTTCCTATG  
TCTGGTGGACAAGTTATTCATTCTGACTAAATGAGGTATTTGGATAGTTTAT  
TAACATATCAAAGCTCTACCCCCCTCCTTCCTCCTATTTCAAACCAAATTA  
AACTAAAACCTTTTCAATTTGTTACACTGTTTGGGAGAATTTTAGCATCAGTT  
ATCTAATTTGATTTACTTAA<sup>CG</sup>TCCCTATTTTACAGACAC<sup>CG</sup>AACCCATTGAA  
AACCC<sup>TTTGAAGTCATGGCTCCTGGACTAGAAATGAAGCCTACTTCCAG</sup>**TAT**  
**AAT**GTTCTTTTTTAGTATGTTGCTATTTTCTTGAACCTCTTTTTCTTGTTAC  
TGGGTAAATTTTTGAAC<sup>CG</sup>GCTAAACTACAAATATGTCTGGCTTTCAATCTT  
CTAGGCCACTCCTCTTCTATTCCCTC<sup>CG</sup>CCCTCAG<sup>TCCC</sup><sup>TCCCTCTCACTT</sup>  
<sup>CTTAAAG</sup><sup>CGCTGCAC</sup>TTTGCTG<sup>CG</sup>AC<sup>CG</sup>CCATA<sup>TTTCTTCTTTTCC</sup><sup>CG</sup>GAGAT  
GGAAGCTTATTAATATTGGATTTCTTTGCCTGTGTGGTTCTTTCTGGAACAT  
TTTCCAGACCCCAACCATGCCTTATGGCATATTTCTTGGAAAAATTACACC  
AAAAATTC**ATAAAATAT**TTTTAAAACCTGAACCTTCTTCTAGTATTTTCTT  
GACACCTTCTCAGTATTTTACAGATACTTGGGGATATTTTATAGGCAATTTTC  
CATTTTAAAGGA<sup>CG</sup>TTTTCTTTGGAATGATT**TTTGGTTGCCTCCTCTGGGTT**  
**TTTTGTGG**TTTCTTTTTCTTTTTCTCCTCTTTCTATATTATTTGCCCAT  
<sup>CGCG</sup>GCTGTGGATACCTGTTTGTAGTGTGTATATAGATAGGTAGATAGATA  
TATTATTATTGTTATTATTTTTTACCCAA<sup>CG</sup>GGGTCATGGATACCTGCCTT

TTATTTTATTTTATTTTAAATTTGCCCATCGGGGCCACGGATACCTGCTTTT  
 AATTTTATTTTATTTTCCCCCTTA GCCCATCGGGGCCTCGGATACCTGCTGTGTA  
 CCCCCTCTCTCCCTAACCTG GCCCATCGGGGCAATGGATACCTGCCTCTTT  
 TTTAAATGTGTTGTTTTTTTTTTTTTCTT GCCCATCGGGGCCTCGGATAC  
 CTGCTTTAATTTTTTTTTTTTCTT GCCCATCGGGGCCTCGGATACCTGCTTTA  
 ATTTTTTTTCTT GCCCATCGGGC CGCGGATACCTGCTTAGATTTTTGT  
 TTACACC ACCCATCGGGGC TTTATATGGTTGGAAAAGTGTTGGGTTTTGTG  
 GTT CGTTGTA CTATCTGGAATGTCTACAAAATTTTGCTGCTAAT CGTTTGTG  
 TTGTGTGAGTGGACCTA CGGCTTTGG CTGGGAGATGACTTTGCA GTTAGGCT  
 AGAGGGTTGGTTAG GCTGGGGAGGAAAGATGG CGGCCACTTCAGATTTGCG  
 CCCAGCTTGGCTGAGGGGTA ACTGTGCTAAGTATCACTAGGAAGGTAAGATG  
 AATAATG CGACAGGCAAAGGAAATGGTATGCATTGCATGAGTTAAATGTTTT  
 GAATAAGCTGACTTGGATCATGTTAGGAGCTTGGCATGAATTGTGGTATCAT  
 GAGGTGGGAAAACATAGGATCATCCTATGTCATATTACAAGGGTCTAATGGA  
 AAATGAG CGGGAGAAGAATTAGG CGCAGTGTTCAAATGG CGATTTTGACCT  
 TGCAGCATTGCTTAGCATGGCTCTCTGCTTTGTTAGAGTGTTCAAATGG CG  
 GATCCATTTTGC CGCAGTGTTCCAATGG CGGGAAGCCACATCAT GGGTGTCT  
 TTGTTCTAGTGTGCAGCATGG CGGTAGAAATATT CTGTTACATAGTAAAAGA  
 TGGC CGCTTAAGTACTTGC CGCAGTCTAAAACATGG CGGGCTTTTGTCTCTG  
 CCGTGTGCATTTCTGATAGGTTTTGCTGTCAGGGACAATATGGCTGACCTTG  
 TCATGTGGATATCATGGCAGTTTGTCA CGTGGATAT CGTGGCAGGGGTGTTT  
 GAC CGTTACATTCTTGG CGGGCTTTGCATCAGGAGGGCCTGC CGCATTGTTA  
 AAGATGG CGTGCTTTGC CGCGGACAAAGTGAAAGGAGGGATTGGCAATGTTA  
 GATTGC CGCGTGTCCCAACCAATCAGAAAGGGTGGTAGAAT CGGTCACAGCC  
 AGTTAGTGGAGGATGGAATTAGATGAGTTAGCATAGCACCT CGCTAC CGTCT  
 CTATTTCAGCCAGTCAGGATTGGC CACATTT GTACTAATCTCAGTGGGTGGTA  
 CCAAAGTCTTTCCAAGGACATTTGGCCTTTCCACCTCCTCCCTCCCCTCTCA  
 CTGGCTCCCTCCCCTCCCTCATTGCCACTTGCAGTGCTGGATATTAGGTTGT  
 GCAGGCAGAACCTCAC CGCCATTCTCT

## **ANEXO 2**

### **EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE ESPERMATOZOIDE**

#### *SALTING OUT*

1. Lavar o sêmen 2 vezes com 1 mL de PBS e centrifugar a 13.000 rpm por 30 seg;
  2. Ressuspender os espermatozoides em 300 µL de solução de lise de espermatozoides e incubar *overnight* a 55 °C;
  3. Adicionar 200 µL de solução de precipitação de proteína e levar o tubo ao vórtex por 30 segundos;
  4. Incubar no gelo por 5 minutos e centrifugar o tubo por 8 minutos a 13.000 rpm, 4 °C;
  5. Transferir o sobrenadante (SN) para um tubo novo;
  6. Adicionar 600 µL de isopropanol gelado ao SN do item anterior e inverter o tubo mais que 10 vezes;
  7. Incubar no freezer (-20 °C) por no mínimo 1 hora ou deixar preferencialmente *overnight* (ON). Se tiver que parar a extração parar nesta etapa;
  8. Centrifugar os tubos por 30 minutos a 13.000 rpm, 4 °C;
  9. Descartar o sobrenadante e acrescentar 1.200 µL de etanol 70%;
  10. Centrifugar o tubo por 10 minutos a 13.000 rpm e descartar o etanol invertendo o tubo;
  11. Centrifugar por 30 segundos para retirar o que restou do etanol com o auxílio de uma pipeta e deixar o tubo com o *pellet* secar por aproximadamente 10 minutos;
  12. Reidratar o *pellet* com 100 µL de TE, deixá-lo no banho-maria a 55 °C por 1 hora, homogeneizando o tubo nos primeiros 15 minutos. Retirar quando o *pellet* estiver dissolvido completamente;
  13. Estocar no freezer a -20 °C.
- Tampão de Lise: 50 mM de Tris pH 7,8  
5 mM de EDTA  
100 mM de NaCl  
2% de SDS  
0,3% β-Mercaptoetanol (β-ME)  
5 mM DTT  
0,5mg/mL Proteinase K (PTNaseK)  
(β-ME, DTT e PTNaseK adicionados no momento de usar)
  - Precipitação de proteínas: 6 M de NaCl
  - TE: 10 mM de Tris pH 7,5  
1 mM de EDTA



### **ANEXO 3**

#### **LISE DE OVÓCITOS PARA ACESSO AO DNA GENÔMICO**

1. Retirar amostras do freezer e descongelar em gelo;
2. Spin nos tubos para decantar o material;
3. Juntar todos os ovócitos em um tubo só, de 0,2 mL com ponteira P10;
  - a. Juntar no tubo que tiver o maior volume.
4. Dar um spin (6000 g / 15 min) no *pool* e retirar o excesso de PBS para ficar apenas 22,5 µL;
  - a. Comparar com 22,5 µL pipetados em outro tubo como referência apenas para conferir;
5. Lavar todos os tubos com os mesmos 22,5 µL de Pronase “E” (20 mg/mL) e adicionar esse volume de Pronase no *pool* final de ovócitos (concentração final de 10 mg/mL);
  - a. Homogeneizar com pipetagem;
  - b. Volume final de 45 µL;
6. Acrescentar uma gota de óleo mineral em cada uma das amostras;
7. Incubar em termociclador a 37 °C / 30 min.;
8. Incubar em termociclador a 85 °C / 15 min. Para a inativação da enzima;
9. Em seguida, choque térmico: congelamento em nitrogênio líquido e imediatamente em termociclador a 95 °C / 1 min.
  - a. Repetir essa passo por 5 vezes.
10. Retirar o óleo mineral da amostra com uma pipeta.
11. Armazenamento a -20 °C para posterior tratamento com bissulfito de sódio.

## **ANEXO 4**

### **EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE PLACENTA**

QIAamp DNA Mini and Blood Kit (Qiagen)

#### ***Antes de começar:***

- a. Todas as centrifugações devem ser realizadas em temperatura ambiente (15-25 °C);*
  - b. Equilibrar as amostras a temperatura ambiente;*
  - c. Aquecer 2 banhos-marias ou banhos secos: um a 56 °C e outro a 70 °C;*
  - d. Equilibrar Buffer AE ou água destilada a temperatura ambiente;*
  - e. Assegurar que os Buffers AW1, AW2 e QUIAGEN Protease foram preparados de acordo com as instruções;*
  - f. Se um precipitado for formado nos Buffers ATL ou AL, dissolvê-los incubando a 56 °C.*
- 
1. Retirar a amostra de tecido ou removê-lo do estoque;
    - a. Utilizar 50 mg de tecido pelas possíveis perdas que acontecerão devido ao processo com o nitrogênio líquido.
  2. Colocar o tecido em nitrogênio líquido num pilão (cadin) e macerar completamente.
  3. Colocar o tecido moído e o nitrogênio líquido em um microtubo de centrifuga de 1,5 mL; esperar o nitrogênio evaporar, mas não permitir que o tecido descongele.
  4. Adicionar 180 µL de Buffer ATL.
  5. Pipetar 20 µL de proteinase K e misturar no vórtex.
  6. Incubar as amostras a 56 °C até os tecidos lisarem completamente.
    - a. Vortexar ocasionalmente durante a incubação para a dispersão do material.
  7. Centrifugar os microtubos brevemente para remover gotículas do lado interno da tampa.
  8. Adicionar 200 µL de Buffer AL na amostra.
  9. Misturar vigorosamente no vórtex por 15 seg.
  10. Incubar as amostras a 70 °C por 10 min.
  11. Centrifugar os microtubos brevemente para remover gotículas do lado interno da tampa.
  12. Adicionar 200 µL de etanol puro (96-100%).
  13. Misturar vigorosamente no vórtex por 15 seg.
  14. Centrifugar os microtubos brevemente para remover gotículas do lado interno da tampa.
  15. Aplicar cuidadosamente a mistura (inclusive o precipitado) em uma coluna QIAamp Mini spin colocada em um tubo coletor de 2 mL.
  16. Centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto.
  17. Descartar o filtrado e o tubo coletor.
  18. Colocar a minicoluna em um novo tubo coletor de 2 mL.
  19. Adicionar cuidadosamente 500 µL de Buffer AW1.
  20. Centrifugar a 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto.

21. Descartar o filtrado e o tubo coletor.
22. Colocar a minicoluna em um novo tubo coletor de 2 mL.
23. Adicionar cuidadosamente 500  $\mu$ L de Buffer AW2.
24. Centrifugar a 20000 g (14000 rpm) por 3 minuto.
25. Descartar o filtrado e o tubo coletor.
26. Transferir a minicoluna para um novo microtubo de centrífuga.
27. Centrifugar a 20000 g (14000 rpm) por 1 minuto.
28. Descartar o filtrado e o tubo coletor.
29. Transferir a minicoluna para um novo microtubo de centrífuga (1,5 mL).
30. Cuidadosamente eluir o DNA adicionando 200  $\mu$ L de Buffer AE ou água destilada no centro da membrana da minicoluna.
31. Incubar por 5 minuto em temperatura ambiente (15-25°C).
32. Centrifugar 6000 g (8000 rpm) por 1 minuto.

## ANEXO 5

### TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

#### EZ DNA METHYLATION-LIGHTNING KIT (ZYMO RESEARCH)

**Quantidade de DNA:** amostras contendo 100 pg – 2 µg de DNA. Quantidade ótima de 200 – 500 ng de DNA.

1. Preparar 20 µL da amostra em um tubo de PCR de 0,5 mL (se a amostra tiver um volume menor que 20 µL, completar com água Milli-Q).
2. Adicionar 130 µL de **Lightning Conversion Reagent** na amostra de DNA.
3. Misturar gentilmente e centrifugar rapidamente (spin) para evitar gotas na tampa ou nas paredes do tubo.
4. Coloque o tubo com a amostra no termociclador e proceder o seguinte programa:
  - 98 °C por 8 min.;
  - 54 °C por 60 min;
  - 4 °C por até 20 horas (*opcional*)
5. Adicionar 600 µL de **M-Binding Buffer** na coluna Zymo-Spin IC e colocar a coluna em um tubo coletor.
6. Colocar a amostra (do passo 4) na coluna contendo o M-Binding Buffer.
7. Fechar a tampa e misturar invertendo várias vezes.
8. Centrifugar em velocidade máxima ( $\geq 10.000$  g) por 30 seg. Descartar o eluído do tubo coletor.
9. Adicionar 100 µL de **M-Wash Buffer** na coluna.
10. Centrifugar em velocidade máxima por 30 seg. Descartar o eluído.
11. Adicionar 200 µL de **L-Desulphonation Buffer** na coluna.
12. Deixar agir em temperatura ambiente (20-30 °C) por 20 min.
13. Centrifugar em velocidade máxima por 30 seg.
14. Adicionar 200 µL de **M-Wash Buffer** na coluna.
15. Centrifugar em velocidade máxima por 30 seg.
16. Repetir passos 14 e 15.
17. Colocar a coluna em um tubo de 1,5 mL identificado.
18. Adicionar 10 µL de **M-Elution Buffer** diretamente na matriz da membrana.
19. Centrifugar em velocidade máxima por 30 seg. para eluir o DNA.
20. Armazenar a -20 °C (utilização rápida) ou -80 °C (estocagem por longo período).

**OBS.:** Recomendação para PCR: 1-4 µL de DNA tratado.

## **ANEXO 6**

### **PURIFICAÇÃO DE DNA EM GEL DE AGAROSE**

#### **WIZARD SV GEL AND PCR CLEAN-UP SYSTEM KIT (PROMEGA)**

1. Adicionar Membrane Binding Solution no tubo de 1,5 mL contendo as bandas do gel.
2. 10  $\mu$ L de solução para cada 10 mg de gel.
3. Vortexar e incubar entre 50 e 65°C em banho-maria até as bandas ficarem completamente dissolvidas.
4. Misturar de vez em quando para ajudar a dissolver.
5. Inserir a minicoluna no tubo coletor.
6. Transferir o gel dissolvido para a minicoluna e incubar a temperatura ambiente por 1 min.
7. Centrifugar a 16.000 g por 1 min., descartar o eluído e reinserir a minicoluna no tubo coletor.
8. Adicionar 700  $\mu$ L de Membrane Wash Solution (que está na geladeira).
9. Centrifugar a 16.000 g por 1 min. e descartar o eluído.
10. Adicionar 500  $\mu$ L de Membrane Wash Solution.
11. Centrifugar a 16.000 g por 5 min.
12. Esvaziar o tubo coletor e centrifugar a minicoluna a 16.000 g por 1 min. com a tampa da centrífuga aberta, para evaporar qualquer resíduo de etanol.
13. Cuidadosamente transferir a minicoluna para um tubo de 1,5 mL novo.
14. Adicionar entre 20 e 30  $\mu$ L (depende do tamanho da banda no gel e da quantidade de bandas utilizadas) de Nuclease- free Water na minicoluna.
15. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
16. Centrifugar a 16.000 g por 1 min.
17. Descartar a minicoluna.
18. Quantificar no nanodrop.
19. Estocar o DNA a -20°C.

## ANEXO 7

### **LIGAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR EM VETOR TOPO E TRANSFORMAÇÃO EM CÉLULAS DH5 $\alpha$**

#### **TOPO® TA CLONING® KIT WITH PCRII® (INVITROGEN)**

1. Diluir os produtos de PCR purificados utilizando a ferramenta “Ligation Calculator *in silico*”, disponível em [http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html);
2. Preparar tubos para ligação:

<b>Reagente</b>	<b>Volume (<math>\mu</math>L)</b>
Produto da PCR / Purificação	1 (diluído)
Solução de sal	1
Água milli-Q	3
TOPO vetor	1
<b>Volume final</b>	<b>6 <math>\mu</math>L</b>

3. Homogeneizar gentilmente.
4. Incubar por 4 horas a temperatura ambiente.
5. Colocar os tubos no gelo ou manter a – 20 °C.
6. Descongelar os tubos de células competentes (DH5 $\alpha$ ) no o gelo.
7. Adicionar 3  $\mu$ L da reação de ligação no tubo contendo as células competentes (aproximadamente 80  $\mu$ L) e homogeneizar gentilmente na mão.
8. Incubar em gelo por 30 min.
9. Dar choque térmico nas células sem agitar: 30 segundos a 42°C seguido de gelo imediatamente.
10. Adicionar 150  $\mu$ L de meio SOC em temperatura ambiente nas células.
11. Agitar tubos (180 rpm no shaker) a 37°C por 1 h.
12. Fazer mix de X-GAL (20  $\mu$ L a 40 mg/mL) e IPTG (4  $\mu$ L a 100 mM).
13. Pipetar 24  $\mu$ L de mix em cada placa contendo LB-Ágar com ampicilina 100  $\mu$ g/mL e e espalhar bem com uma alça de vidro bem flambada.
14. Deixar secar por alguns minutos.
15. Inverter e incubar em estufa a 37°C por 15 min. ou até o momento de utilizar.
16. Pipetar as células transformadas (passo 11) em cada placa.
  - a. Aproximadamente 50-70  $\mu$ L em cada placa.
17. Fechar a placa e inverter.
18. Incubar em estufa a 37°C por 12-16 horas.
19. Retirar as placas da estufa e incubar na geladeira por no mín. 3 horas.
20. Retirar uma colônia de bactéria branca com um palito de madeira estéril e inserir o palito dentro do tubo contendo 3mL de meio LB. LB com ampicilina (100  $\mu$ g/mL).
21. Colocar sob agitação no shaker a 250 rpm a 37°C por até 16 horas.

## **ANEXO 8**

### **MINI PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO**

#### **QIAPREP SPIN MINIPREP KIT (QIAGEN)**

##### ***Cuidados antes de começar:***

- a) Adicionar *LyseBlue* no *Buffer P1* na proporção de 1:1000 (opcional);
  - b) Adicionar a *RNAseA* fornecida pelo kit no *Buffer P1*, misturar e estocar entre 2-8 °C;
  - c) Adicionar *etanol* (96-100%) no *Buffer PE* (atenção para volume);
  - d) Centrifugações a 13.000 rpm.
- 
1. Centrifugar 1,5 mL de meio com bactérias cultivadas *overnight* por 3 min.
  2. Ressuspender o *pellet* de bactérias em 250 µL de *Buffer P1*.
    - a. Misturar vigorosamente para evitar qualquer traço de material celular.
  3. Adicionar 250 µL de *Buffer P2* e misturar totalmente invertendo os tubos 4-6 vezes até a solução ficar clara e viscosa.
  4. Adicionar 350 µL de *Buffer N3* e misturar imediatamente e totalmente invertendo os tubos 4-6 vezes.
    - a. A solução ficará nebulosa.
    - b. Se utilizar o reagente *LyseBlue*, a solução voltará a ficar incolor.
  5. Centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm (17900 g).
  6. Aplicar o sobrenadante na coluna *QIAprep spin*.
  7. Centrifugar por 60 seg. a 13.000 rpm (17900 g) e descartar o eluído.
  8. Lavar a coluna *QIAprep spin* adicionando 750 µL de *Buffer PE*.
  9. Centrifugar por 60 seg. a 13.000 rpm (17900 g) e descartar o eluído.
  10. Centrifugar novamente por 60 seg. a 13.000 rpm (17900 g) e descartar o eluído.
  11. Transferir a coluna *QIAprep spin* para um tubo de 1,5 mL.
  12. Adicionar 50 µL de *Buffer EB* no centro da coluna e deixar agir por no mínimo 2 min.
  13. Centrifugar por 60 seg. a 13.000 rpm (17900 g).
  14. Descartar a minicoluna.
  15. Quantificar no nanodrop.
  16. Estocar o DNA a -20 °C.

## **ANEXO 9**

### **ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS INDIVIDUAIS**

#### **SINGLE CELL-TO-CT™ QRT-PCR KIT (AMBION)**

1. Preparar o *mix* para lise celular para cada amostra: 9 µL de *Single Cell Lysis Solution* + 1 µL de *Single Cell DNase I*;
2. Adicionar uma célula no tubo contendo 10 µL do *mix* de tampão de lise e incubar à temperatura ambiente por 5 min.;
3. Adicionar 1 µL do *Single Cell Stop Solution* e incubar à temperatura ambiente por 2 min.;
4. Preparar o *mix* para a reação de transcrição reversa (RT): 3 µL de *Single Cell VILO™ RT Mix* e 1,5 µL de *Single Cell SuperScript® RT*;
5. Adicionar 4,5 µL do *mix* RT em cada amostra e conduzir a reação de transcrição reversa: 25°C por 10 min; 42°C por 60 min; e 85°C por 5 min.;
6. Fazer um *pool* de TaqMan® Gene Expression Assays para os alvos de interesse, diluindo os ensaios em água nuclease free para uma concentração final de 0,2X para cada ensaio;
7. Preparar o *mix* para a reação de pré-amplificação: 5 µL de *Single Cell PreAmp Mix* e 6 µL de 2X *pooled TaqMan® Gene Expression Assays*;
8. Adicionar 11 µL do *mix* de pré-amplificação em cada amostra e conduzir a reação: 95°C por 10 min; 14 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 4 min.; e 99°C por 10 min.;
9. Preparar uma diluição de todas as amostras pré-amplificadas usando água nuclease free (1:10);
10. Preparar a reação para a PCR: 12,5 µL de 2X *TaqMan Master Mix*, 1,25 µL de *TaqMan® Gene Expression Assay*, 1,25 µL de água nuclease free e 10 µL de produto pré-amplificado diluído (1:10);
11. Conduzir a PCR em tempo real: 50°C por 2 min.; 95°C por 10 min; 45 ciclos de 95°C por 5 seg e 60°C por 1 min.



## **ANEXO 10**

### **EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE OVÓCITOS, CÉLULAS DO *CUMULUS* E EMBRIÕES**

#### **RNeasy® Plus Micro Kit (QIAGEN)**

##### **Extração de RNA de pequenas amostras**

O material a ser submetido a extração de RNA deverá estar armazenado a -80 °C, -20 °C ou Nitrogênio líquido), em RNAlater (um mínimo de volume possível).

Transferir todo o conteúdo dos microtubos onde estão acondicionados individualmente os ovócitos, *cumulus* ou embriões para um único microtubo, para formação de *pools*. Para isso:

- ⇒ *Spin* 10 segundos nos microtubos com as amostras, na rotação máxima da centrífuga, para possibilitar que a amostra vá para o fundo do tubo
- ⇒ Retirar os microtubos da centrífuga e colocar em uma *rack*, no gelo;
- ⇒ Transferir o conteúdo de todos os microtubos que se deseja fazer um *pool* para um único microtubo;
- ⇒ Lavar os microtubos com 7 µL de RNAlater ou solução de lise (passando o mesmo volume em todos os tubos) e em seguida depositá-lo no tubo contendo as amostras.

Todo o procedimento de bancada deve ser realizado em temperatura ambiente (20-25 °C). Não refrigerar a centrífuga a menos de 20 °C.

1. Centrifugar o microtubo com a amostra a 6.250 rpm por 2 minutos.
2. Retirar o sobrenadante, deixando o menor volume possível.
3. Adicionar 75 µL de *Buffer RLT Plus* (amostras < 100.000 células).
  - a. Fazer o mais rápido possível, para evitar degradação;
  - b. Pipetar pelo menos 10 vezes, delicadamente, para soltar o *pellet* e as células fazerem contato com o tampão; a dissolução incompleta do *pellet* pode levar a uma lise ineficiente.
4. Transferir o lisado para um tubo de 1,5 mL, aferir o volume da amostra e ajustar o volume final para 350 µL com *Buffer RLT Plus*.
5. Homogeneizar no vórtex por 1 minuto.
6. Transferir o lisado homogeneizado para um tubo coletor (2 mL) com coluna *gDNA eliminator* (filtro, borda roxa), fornecido pelo kit.
  - a. Centrifugar por 30 segundos a 10.000 rpm;
  - b. Descartar a coluna e guardar o filtrado.
7. Adicionar 1 volume de *Etanol 70%* ao filtrado – homogeneizar bem com a pipeta.
8. Transferir o lisado homogeneizado, incluindo algum precipitado, para a coluna *RNeasy MinElute* (rosa), encaixada em outro tubo coletor (2 mL, sem tampa) – fechar a tampa da coluna gentilmente.
  - a. Centrifugar por 15 segundos a 10.000 rpm;
  - b. Descartar o filtrado, reutilizar o tubo coletor e a coluna na etapa 9.
9. Adicionar 700 µL de *Buffer RW1* na coluna *RNeasy MinElute* – fechar a tampa da coluna gentilmente.
  - a. Centrifugar por 15 segundos a 10.000 rpm;

- b. Descartar o filtrado, reutilizar o tubo coletor e a coluna na etapa 10.
- 10. Adicionar 500 µL de *Buffer RPE* na coluna *RNeasy MinElute* – fechar a tampa da coluna gentilmente.
  - a. Centrifugar por 15 segundos a 10.000 rpm;
  - b. Descartar o filtrado, reutilizar o tubo coletor e a coluna na etapa 11.
- 11. Adicionar 500 µL de *Etanol 80%* na coluna *RNeasy MinElute* – fechar a tampa da coluna gentilmente.
  - a. Centrifugar por 2 minutos a 10.000 rpm;
  - b. Descartar o filtrado e o tubo coletor, reutilizar a coluna na etapa 12.
- 12. Colocar a coluna *RNeasy MinElute* em um novo tubo coletor (2 mL).
  - a. Abrir a tampa da coluna e colocar na centrífuga em posição favorável ao sentido da rotação da centrifugação;
  - b. Centrifugar por 5 minutos a velocidade máxima (13.500 rpm);
  - c. Descartar o filtrado e o tubo coletor, reutilizar a coluna na etapa 13.
- 13. Colocar a coluna *RNeasy MinElute* em um tubo de 1,5 mL fornecido pelo kit.
  - a. Adicionar 14 µL de *água RNase free* (kit), diretamente no centro da membrana da coluna;
  - b. Centrifugar por 1 minuto a velocidade máxima (13.500 rpm);
  - c. Medir (com pipetador) o volume de RNA eluído.
- 14. Armazenar os microtubos com o RNA eluído a -80 °C ou proceder à síntese de cDNA.

## **ANEXO 11**

### **EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE TECIDOS**

#### **TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Thermo)**

1. Coletar uma biópsia de aproximadamente 200 mg:
  - a. Usar placa de petri estéril, apoiada sobre gelo; lâmina bisturi estéril e tubo 1,5 mL estéril.
  - b. Pesar microtubo vazio – tarar a balança com o microtubo vazio antes de colocar a amostra.
2. Maceração do tecido:
  - a. Usar cadinho e pistilo.
  - b. Colocar 200 mg do tecido no cadinho (ainda congelado) e macerar com nitrogênio líquido.
  - c. Pesar a amostra macerada. Os 200 mg da amostra inicial devem gerar aproximadamente 100 mg finais.
3. Homogenizar com pipetador P1000 as amostras de tecido em 1 mL de *TRizol Reagent* para cada 50-100 mg de tecido.
  - a. Para homogenizar melhor e facilitar desfazer os grumos, pode-se cortar a ponta da ponteira P1000.
  - b. Deixar a amostra bem homogênea.
4. Incubar por 5 minutos no gelo.
5. Adicionar 0,2 mL de clorofórmio gelado para cada 1 mL de TRizol utilizado na lise.
6. Misture no vórtex por 15 segundos.
7. Incubar no gelo por 2-3 minutos.
8. Centrifugar as amostras por 15 minutos a 12 000 g a 4°C.
  - a. A mistura irá se separar em uma fase orgânica rosa embaixo, uma interfase e uma fase aquosa transparente superior.
9. Transferir 600 µL da fase superior que contém o RNA para um novo tubo.
10. Adicionar igual volume de etanol 70% gelado.
11. Inverter o tubo para dispersar qualquer precipitado visível que se forme após a adição do etanol.
12. Transferir 600 µL da amostra para a coluna *spin cartridge* com tubo coletor.
13. Centrifugar a 12.000 g por 15 segundos.
14. Descartar o filtrado e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.
15. Transferir o restante da amostra para a coluna e centrifugar a 12.000g por 15 segundos.
16. Descartar o filtrado e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.
17. Adicionar 350 µL de *Wash Buffer I* na coluna contendo o RNA ligado.
18. Centrifugar por 12.000 g por 15 segundos.
19. Descartar o filtrado e o tubo coletor e reinserir a coluna em um novo tubo coletor.
20. Adicionar 80 µL do MIX DNase (10 µL de DNase (1 U / µL) + 8 µL de *Buffer* 10 X + 62 µL de água RNase *free*) na membrana.
21. Incubar em temperatura ambiente por 15 minutos.
22. Adicionar 350 µL de *Wash Buffer I* na coluna.
23. Centrifugar a 12.000 g por 15 segundos.

24. Descartar o filtrado e o tubo coletor, reinserir a coluna em um novo tubo coletor.
25. Adicionar 500  $\mu$ L de *Wash Buffer II* na coluna.
26. Centrifugar a 12.000 g por 15 segundos.
27. Descartar o filtrado e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.
28. Repetir os passos 25 e 26.
29. Centrifugar a 12.000 g por 1 minuto com a tampa da coluna aberta para secar a membrana.
30. Descartar o tubo coletor e inserir a coluna em um novo tubo de 1,5 mL (não fornecido pelo kit).
31. Adicionar 30-100  $\mu$ L de *RNase-free Water* (do kit) no centro da coluna.
32. Incubar por 1 minuto.
33. Centrifugar a 12.000 g por 2 minutos.
34. Descartar a coluna e estocar o RNA a -80°C.

## ANEXO 12

### SÍNTESE DE cDNA para *SS-RT-PCR*

#### SUPERSCRIPT III FIRST-STRAND SYNTESIS FOR RT-PCR (INVITROGEN)

1. Preparar as amostras em tubo de 0,2 mL:

Reagente (estoques)	cDNA <i>forward</i>	cDNA <i>reverse</i>	cDNA oligo dT	cDNA <i>RT-</i>
Água DEPC	q.s.p. 10 µL	q.s.p. 10 µL	q.s.p. 10 µL	q.s.p. 10 µL
10 mM dNTP mix	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Primer Oligo(dT) 50 µM	-	-	1 µL	1 µL
Primer <i>forward</i> 2 µM	1 µL	-	-	-
Primer <i>reverse</i> 2 µM	-	1 µL	-	-
RNA total	Aproximadamente 6,7 embriões ou 2,5 µg de RNA de tecido testicular	Aproximadamente 6,7 embriões ou 2,5 µg de RNA de tecido testicular	Aproximadamente 6,7 embriões ou 2,5 µg de RNA de tecido testicular	Aproximadamente 6,7 embriões ou 2,5 µg de RNA de tecido testicular

2. Incubar a 65°C por 5 min. (termociclador já aquecido);
3. Colocar no gelo por no mínimo 1 minuto.
4. Preparar *mix* da reação: 2 µL de 10X *RT Buffer*, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de *RNase OUT* 40 U/µL;
5. Pipetar 9 µL do *mix* em cada amostra;
6. Adicionar 1 µL de SuperScript III 200 U/ µL em cada amostra, **exceto** no tubo "cDNA *RT-*" (substituir por água DEPC);
7. Incubar a 50°C por 50 min e 85°C por 5 min.;
8. Adicionar 1 µL de RNase H em cada tubo;
9. Incubar a 37°C por 20 min;
10. Armazenar a -20°C.

### ANEXO 13

**Valores de *p* referentes ao teste de Mann-Whitney para os níveis de metilação da DMR 1 do gene XIST.** Foram feitas comparações múltiplas entre os diferentes grupos estudados (espermatozoides, ovócitos imaturos, ovócitos maturados, embriões de 8-16 células, mórula, massa celular interna – MCI – e trofoectoderma – TE – de blastocistos expandidos, placenta fêmea A, placenta fêmea B, placenta macho A e placenta macho B).

	Esperma- tozoides	Ovócitos imaturos	Ovócitos maturados	Embriões 8-16 células	Mórulas	Blastocisto MCI	Blastocisto TE	Placenta Fêmea A	Placenta Fêmea B	Placenta Macho A	Placenta Macho B
<b>Espermato- zoides</b>	1,000										
<b>Ovócitos imaturos</b>	< 0,001*	1,000									
<b>Ovócitos maturados</b>	< 0,001*	0,339	1,000								
<b>Embriões 8- 16 células</b>	1,000	< 0,001*	< 0,001*	1,000							
<b>Mórula</b>	1,000	< 0,001*	< 0,001*	1,000	1,000						
<b>Blastocisto MCI</b>	1,000	< 0,001*	< 0,001*	1,000	1,000	1,000					
<b>Blastocisto TE</b>	1,000	< 0,001*	< 0,001*	1,000	1,000	1,000	1,000				
<b>Placenta Fêmea A</b>	< 0,001*	0,989	0,031*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	1,000			
<b>Placenta Fêmea B</b>	< 0,001*	0,996	0,995	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	0,696	1,000		
<b>Placenta Macho A</b>	< 0,001*	0,783	0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	1,000	0,271	1,000	
<b>Placenta Macho B</b>	< 0,001*	0,848	0,004*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	1,000	0,352	1,000	1,000

\* Valores considerados significativos ( $p < 0,05$ )

## **ANEXO 14**

**Valores de *p* referentes ao teste de Mann-Whitney para os níveis de metilação da DMR 1 da região do *Rep A* do gene *XIST*.** Foram feitas comparações múltiplas entre os diferentes grupos estudados (espermatozoides, ovócitos imaturos, ovócitos maturados, embriões de 8-16 células, mórula, massa celular interna – MCI – e trofoectoderma – TE – de blastocistos expandidos, placenta fêmea A, placenta fêmea B, placenta macho A e placenta macho B).

	<b>Esperma- tozoides</b>	<b>Ovócitos imaturos</b>	<b>Ovócitos maturados</b>	<b>Embriões 8-16 células</b>	<b>Mórula</b>	<b>Blastocisto MCI</b>	<b>Blastocisto TE</b>	<b>Placenta Fêmea A</b>	<b>Placenta Fêmea B</b>	<b>Placenta Macho A</b>	<b>Placenta Macho B</b>
<b>Espermato- zoides</b>	1,000										
<b>Ovócitos imaturos</b>	1,000	1,000									
<b>Ovócitos maturados</b>	< 0,001*	< 0,001*	1,000								
<b>Embriões 8- 16 células</b>	< 0,001*	< 0,001*	0,879	1,000							
<b>Mórula</b>	< 0,001*	< 0,001*	0,114	1,000	1,000						
<b>Blastocisto MCI</b>	0,998	0,979	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	1,000					
<b>Blastocisto TE</b>	0,988	0,923	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	1,000	1,000				
<b>Placenta Fêmea A</b>	0,703	0,856	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	0,222	0,112	1,000			
<b>Placenta Fêmea B</b>	< 0,001*	< 0,001*	0,751	1,000	1,000	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	1,000		
<b>Placenta Macho A</b>	< 0,001*	< 0,001*	0,636	1,000	0,999	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	1,000	1,000	
<b>Placenta Macho B</b>	< 0,001*	< 0,001*	0,289	1,000	1,000	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	1,000	1,000	1,000

\* Valores considerados significativos ( $p < 0,05$ )

## ANEXO 15

**Deteção de transcritos XIST e GAPDH em ovócitos e blastômeros individualizados de embriões bovinos fêmeas.** O sinal “✓” indica a detecção dos transcritos de XIST e GAPDH. As letras maiúsculas indicam os diferentes ovócitos e os embriões dentro do mesmo estágio de desenvolvimento (2-Células, 4-Células, 8-16 Células e Mórula). Letras iguais seguidas por números diferentes indicam blastômeros diferentes de um mesmo embrião. Foi calculado o Ct médio dos embriões individuais, tanto para o XIST quanto para o GAPDH.

Ovócitos MII						
	A	B	C	D	E	Ct médio
<b>XIST</b>	✓	✓	✓	✓	✓	27,805
<b>GAPDH</b>	✓	✓	✓	✓	✓	15,865

2-Células															
	A1	A2	Ct médio	B1	B2	Ct médio	C1	C2	Ct médio	D1	D2	Ct médio	E1	E2	Ct médio
XIST	✓	✓	26,097	✓	✓	27,078	✓	✓	27,740	✓	✓	25,742	✓	✓	28,184
GAPDH	✓	✓	28,539	✓	✓	30,670	✓	✓	28,325	✓	✓	18,586	✓	✓	22,601

4-Células																									
	A1	A2	A3	A4	Ct médio	B1	B2	B3	B4	Ct médio	C1	C2	C3	C4	Ct médio	D1	D2	D3	D4	Ct médio	E1	E2	E3	E4	Ct médio
XIST				✓	28,947	✓	✓			26,589	✓	✓	✓	✓	27,977	✓	✓	✓	✓	26,978	✓	✓	✓	✓	26,536
GAPDH				✓	25.229	✓	✓			22,142	✓	✓	✓	✓	22,029	✓	✓	✓	✓	24,344	✓	✓	✓	✓	21,992

8-16-Células																															
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	Ct médio	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	Ct médio	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	Ct médio
XIST	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	27,847	✓	✓	✓	✓			✓		✓	✓	26,981	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	27,479
GAPDH	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	29,119	✓	✓	✓	✓			✓		✓	✓	23,978	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	25,398

Mórula																																			
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	Ct médio	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B21	B22	B23	Ct médio
XIST	✓					✓			✓		30,903							✓		✓		✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		26,935
GAPDH	✓					✓	✓	✓	✓	✓	28,140							✓		✓		✓	✓			✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓		29,391