

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE DNA ASSOCIADO À NUCLEOSSOMOS EM
ESPERMATOZOIDES DE TOURO

Sávio Ferreira Borges

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE DNA ASSOCIADO À NUCLEOSSOMOS EM
ESPERMATOZOIDES DE TOURO

Sávio Ferreira Borges

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE DNA ASSOCIADO À NUCLEOSSOMOS EM
ESPERMATOZOIDES DE TOURO

Sávio Ferreira Borges

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em: ___/___/____.

Edgar Silveira Campos
Coordenador do curso de Biotecnologia

Uberlândia – MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MÉTODOS DE ISOLAMENTO DE DNA ASSOCIADO À NUCLEOSSOMOS EM
ESPERMATOZOIDES DE TOURO

Sávio Ferreira Borges

Aprovado pela Banca Examinadora em: ___/___/_____ Nota:

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti
Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 18 de julho de 2018.

*À minha mãe Zigmaní Aparecida Ferreira, por quem tenho
imensa admiração e gratidão, que com carinho me
incentivou e me apoiou ao longo da minha trajetória.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser minha força e estar ao meu lado em todos os momentos.

À minha família, por cuidarem de mim e por me apoiarem e não medirem esforços para que eu conquistasse meus sonhos. Amo todos vocês!

Ao Álvaro Junior, pelo companheirismo. No qual me apoiou, me ouviu, me incentivou e motivou a realizar todos os meus objetivos, estando ao meu lado em todos os momentos em que precisei. Muito obrigado! E à sua família, que me acolheu de forma muito carinhosa.

Ao meu orientador professor Dr. Marcelo Emílio Beletti, pela dedicação, paciência e os valiosos ensinamentos que vou levar para toda a vida.

Aos professores que me deram aula durante a graduação, colegas de curso e demais cursos e aos meus amigos, em especial Larissa Caroline, Matheus Sampaio, Diná dos Anjos, Luana Felix, Ruth Gabriela e Cícero Junior, que fizeram parte desta jornada e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Luiz Gruppi, do laboratório de Biologia da Reprodução, pela eterna paciência e auxílio no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas do laboratório de Biologia da Reprodução, LABGEN e LADEVI, pela disponibilidade e paciência em me ajudar em vários momentos.

De maneira geral a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. A ajuda de vocês foi fundamental.

Muito obrigado!

RESUMO

Durante a espermatogênese a cromatina é reprogramada, onde a maioria dos nucleossomos são substituídos por protaminas. Recentemente, foi descoberto que no genoma espermático existem nucleossomos concentrados em regiões específicas. Porém ainda são necessárias informações sobre essa preservação de nucleossomos em espermatozoide bovino. Metodologias usando DTT, digestão com Nuclease Micrococcal e centrifugação para separar os fragmentos contendo os nucleossomos já são realizadas com espermatozoide de mamíferos, porém alguns resultados são questionáveis. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar métodos para isolar DNA nucleossomal. Utilizou-se concentrações de Triton X 100 para permeabilizar membranas e o DTT para descondensar a cromatina, Micrococcal e/ou sonicação para fragmentar a cromatina e centrifugação ou imunoprecipitação para isolar o DNA nucleossomal. Os resultados indicam que a concentração de Triton X 100 a 3 % e 40 mM de DTT por 120 horas é o método mais eficiente para descondensar e permitir o acesso de macromoléculas na cromatina espermática. A cromatina foi melhor fragmentada com Micrococcal associada a sonicação e o método mais específico para capturar fragmentos de DNA nucleossomal foi o de imunoprecipitação com beads magnéticos.

Palavras-chave: cromatina, histonas, espermatozoide, nucleossomo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	3
2.1. Amostras de sêmen.....	3
2.2. Permeabilização de membrana celular e acesso a cromatina espermática.....	4
2.2.1. Método A.....	4
2.2.2. Método B.....	4
2.3. Imunoprecipitação de cromatina de espermatozoide	5
2.3.1. Preparação dos Dynabeads e Anticorpos	6
2.3.2. Imunoprecipitação da cromatina	6
2.3.2.1. Método IP-1.....	6
2.3.2.2. Método IP-2.....	7
2.3.2.3. Método IP-3.....	7
2.3.2.4. Método IP-4.....	8
2.3.3. Eluição das amostras	8
2.3.4. Purificação do DNA	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
3.1. Permeabilização de membrana celular e fragmentação da cromatina.....	9
3.2. Imunoprecipitação de cromatina	12
3.3. Considerações gerais	13
4. CONCLUSÃO	14
REFERÊNCIAS	15
ANEXOS.....	17

LISTA DE TABELAS

1. **Tabela 1:** Composição do tampão de permeabilização utilizado em cada grupo do método B.....5
2. **Tabela 2:** Quantificação de DNA extraído de nucleossomos de espermatozoide bovino pelo método A e B.....9
3. **Tabela 3:** Quantificação de DNA extraído de nucleossomos de espermatozoide bovino pelos diferentes métodos de imunoprecipitação testados.....12

1. INTRODUÇÃO

Ao final da espermatogênese, as células germinativas masculinas sofrem um processo de reorganização morfológica importante que é necessário para a fertilização. Como parte da reorganização nuclear, a cromatina é amplamente reprogramada de forma controlada espacial e temporalmente, ocorrendo à remoção da maioria dos nucleossomos e incorporação de protaminas (Royo, 2016), possibilitando um grau surpreendente na compactação nuclear para preservação da integridade do genoma paterno e facilitando a motilidade espermática (Emelyanov; Fyodorov, 2016). As protaminas são proteínas altamente básicas que efetivamente neutralizam a carga negativa do DNA mediando, assim, uma compactação intensa da cromatina no núcleo do espermatozoide (Royo, 2016). Elas são ricas em arginina e cisteína, e a grande quantidade de arginina que as protaminas possuem promove sua forte ligação ao DNA; já as cisteínas formam com facilidade as ligações dissulfeto inter e intra-protamina contribuindo com a compactação da cromatina (Rathke et al., 2014).

O empacotamento do DNA nas células somáticas se dá pela unidade nucleossomal que é formada por oito monômeros protéicos, sendo dois de cada tipo de histona canônica (H2A, H2B, H3 e H4), que tem como principais funções o acondicionamento do genoma e a regulação gênica. Já a histona H1 se liga ao DNA nucleossomal e contribui na estrutura da cromatina (Rathke et al., 2014).

As células somáticas têm o nucleossomo como unidade básica da cromatina, sendo composto de octâmero envolto por aproximadamente 150 pares de bases (pb) de DNA denominada de nucleossomo, ao contrário da unidade básica da cromatina de espermatozoide de mamíferos denominado de toroide de protamina, onde sequências de DNA com aproximadamente 50.000 pb são firmemente enrolados pelas protaminas, formando assim uma estrutura em forma de “donut”. Nos mamíferos, durante a espermiogênese as histonas são substituídas, total ou parcialmente por protaminas (Belettu, 2013). Hoje, no entanto, é aceita

que a presença de histonas no núcleo espermático é fisiológica e sabe-se que, dependendo da espécie e da técnica utilizada na quantificação, essa porcentagem varia entre 2 % e 15 % nos espermatozoides dos mamíferos (Ward, 2010).

Pesquisas recentes têm sugerido que existem alças de DNA intercaladas entre os toroides, que possuem sequências de nucleossomos com regiões sensíveis a ações de nucleases. Acredita-se que estas histonas estejam distribuídas de forma regular e estratégica, associadas a regiões promotoras de genes ou mesmo a genes, e que desenvolvam um importante papel no desenvolvimento embrionário inicial e na herança epigenética paterna (Beletti, 2013; Sotolongo et al., 2003; Ward, 2010). Existem regiões que possuem nucleossomos em quantidades menores, entretanto em locais estratégicos, com grande capacidade de sinalizações epigenéticas paternas, visto que as histonas são consideradas importantes sítios de sinalização epigenética (Beletti, 2013). A retenção das histonas após a protaminação pode ocorrer em regiões pré-definidas em todo o genoma, onde as histonas podem sofrer modificações químicas intensificando a regulação gênica após a fertilização, logo, essas histonas fornecem sinalizações epigenéticas. Índícios atuais sugerem que as modificações de histonas de espermatozoides possam causar impactos no embrião, assim como durante toda a vida do animal (Jenkins et al., 2016).

O genoma espermático possui regiões contendo histonas distribuídas não aleatoriamente, e que existem nucleossomos espalhados ou concentrados em regiões específicas, incluindo áreas pobres em genes e regiões genômica funcionais (Sillaste et al., 2016). Entretanto, mais estudos são necessários no intuito de informações sobre o paradigma de preservação de nucleossomos nos espermatozoides, quantidade de cromatina ligada à histona em espermatozoide bovino e a perspectiva do uso desses conhecimentos direta e indiretamente na reprodução humana e animal.

Li e seus colaboradores (2008), compararam a eficiência de dois protocolos para imunolocalização de nucleossomos e protaminas no núcleo espermático de humanos. Seus resultados demonstram a importância de usar concentrações adequadas de ditioneitol (DTT) para o acesso de anticorpos na cromatina espermática, uma vez que o uso de concentrações inadequadas pode não ter ação eficiente na descondensação da cromatina e gerar resultados não confiáveis.

Alguns trabalhos realizados, com o intuito de compreender a prevalência da fração da cromatina ligada à histona e prováveis localizações nos espermatozoides de mamíferos, usaram DTT, digestão com enzimas de restrição e centrifugação para separar os fragmentos contendo nucleossomos (Erkek et al., 2013; Gatewood et al., 1987; Hammoud et al., 2009; Samans et al., 2014; Sillaste et al., 2016). A grande variação dos resultados entre e interespecies nestes trabalhos, sugere a possibilidade desta metodologia utilizada não ser eficiente para o objetivo proposto.

O objetivo deste trabalho foi comparar diferentes métodos de isolamento de DNA associado à nucleossomos em espermatozoide de touro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Amostras de sêmen

Em todos os experimentos foram utilizadas amostras de sêmen bovino de um único doador obtidos em central de inseminação artificial. Cada dose de sêmen congelado continha em média 40 milhões de espermatozoides. As amostras foram descongeladas a 37 °C por 60 segundos, e lavadas três vezes em Tampão Fosfato Salino (PBS) com centrifugação 600 G por 3 minutos em temperatura ambiente.

2.2 Permeabilização de membrana celular e acesso a cromatina espermática

2.2.1 Método A

Esse método foi reproduzido de acordo com Sillaste et al., (2016), sendo denominado método A com apenas um grupo (grupo A). A permeabilização da membrana celular do espermatozoide foi realizada com 0,5 % de Triton X 100 por 30 minutos e a descondensação da cromatina com 10 mM de didiotreitol (DTT) também por 30 minutos. A fragmentação da cromatina ocorreu pela ação da Nuclease Micrococcal (Thermo Scientific) com 40 U, e o fracionamento dos fragmentos de DNA nucleossomal dos fragmentos de toroides de protamina foi realizado com uma centrifugação de 10000 G por 5 minutos, onde o sobrenadante foi preservado para extração de DNA. Acrescentou na amostra 5 µL de Proteinase K (Qiagen) e incubou por 3 horas a 65 °C. Em seguida o DNA foi extraído com fenol-clorofórmio, precipitado com isopropanol e lavado com etanol 70 %. O pellet de DNA foi diluído em 20 µL de água freenuclease e quantificado no NanoDrop (ND-1000).

2.2.2 Método B

Esse novo método foi elaborado com intuito de melhorar o acesso da enzima micrococcal à cromatina espermática e por consequência a extração de DNA retido em nucleossomos. Para esse teste as amostras foram organizadas em cinco grupos diferentes de acordo com a concentração de Triton X 100 em seu respectivo tampão de permeabilização de membrana celular.

Para cada grupo foi utilizada uma dose de sêmen e o tampão de permeabilização de membrana celular onde cada grupo continha uma concentração de Triton X 100 diferente como mostra Tabela 1. Esse material foi incubado por 24 horas no tampão contendo Triton X 100 e 120 horas com ditiotretol (DTT). Para a fragmentação de cromatina utilizou nuclease micrococcal (Thermo Scientific) com 50 U, e o fracionamento dos fragmentos de DNA

nucleossomal dos fragmentos de toroides de protamina foi realizado com uma centrifugação de 10000 G por 5 minutos, onde o sobrenadante foi preservado para extração de DNA. Acrescentou na amostra 5 µL de Proteinase K (Qiagen) e incubou por 3 horas a 65 °C. Em seguida o DNA foi extraído com fenol-clorofórmio, precipitado com isopropanol e lavado com etanol 70 %. O pellet de DNA foi diluído em 20 µL de água freenuclease e quantificado no NanoDrop (ND-1000).

O protocolo completo dos Métodos A e B estão em Anexo.

Tabela 1: Composição do tampão de permeabilização utilizado em cada grupo do método B.

Grupos	Tampão de Permeabilização de Membrana Celular
B1	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (0,5 %)
B2	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (3,0 %)
B3	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (5,0 %)
B4	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (8,0 %)
B5	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (10,0 %)

2.3 Imunoprecipitação de cromatina de espermatozoide

Para melhorar a especificidade na captura de nucleossomos da cromatina de espermatozoides foram testados métodos diferentes de imunoprecipitação utilizando beads magnéticos, a fim de comparar qual seria melhor para obter DNA nucleossomal.

2.3.1 Preparação dos Dynabeads e Anticorpo

Para cada método utilizou 50 μL (1,5 mg) de beads magnéticos (Dynabeads, 10003 D, Invitrogen) que foram colocados em microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram colocados na raque magnética (Dynamag) para que os beads se precipitassem do restante da solução formando um pellet magnético. O sobrenadante com o restante da solução de origem foi removido e o pellet com os beads foi diluído com PBS fora da raque magnética. O material foi colocado novamente na raque para formar pellet com os beads lavados e o sobrenadante com o PBS contendo resíduos foi descartado. O pellet com beads foi diluído em uma solução de 200 μL contendo 0,02 % de Tween-20 diluído em PBS e um pool de anticorpos 2 μL anti core de histona (Ab, 7832, Abcam), 2 μL anti H4 (Ab, 10158, Abcam), 4 μL anti H2B (Ab, 1790, Abcam), e 4 μL anti H3.3 (Ab, 97968, Abcam). O bead foi incubado nessa solução por 24 horas a 4 °C no vortex e posteriormente foi colocado novamente na raque magnética para a remoção do sobrenadante. O pellet com anticorpos acoplados a beads magnéticos foi suspenso novamente com 200 μL de Tween-20 a 0,02 % e colocado na raque para descartar o sobrenadante. Essa lavagem se repetiu por mais duas vezes. Ao fim desse procedimento o pellet, contendo anticorpos acoplados aos beads magnéticos, foi reservado para as próximas etapas.

2.3.2 Imunoprecipitação da cromatina

Nessa etapa as amostras foram divididas em quatro métodos de imunoprecipitação de acordo com o procedimento de fragmentação de cromatina utilizado.

2.3.2.1 Método IP-1

Esse procedimento foi uma otimização do Método A (reproduzido de Sillaste et al., (2016)). Substituindo a última centrifugação, que é utilizada como ferramenta de separação dos

fragmentos com nucleossomos dos fragmentos com protamina, pela técnica de imunoprecipitação.

Para esse teste foram utilizadas três doses de sêmen, tampão de permeabilização de membrana celular com 0,5 % de Triton X durante 30 minutos e DTT a 10 mM, também durante 30 minutos. Para fragmentar a cromatina utilizou 40 U de micrococcal. Os fragmentos de DNA associados a nucleossomos foram capturados pelos beads magnéticos que estavam ligados a anticorpos anti histonas formando um pellet magnético que foi guardado para as etapas posteriores.

2.3.2.2 Método IP-2

Esse método foi uma otimização o Método B. A última centrifugação, que é utilizada como ferramenta de separação dos fragmentos com nucleossomos dos fragmentos com protaminas, também foi substituída pela técnica de imunoprecipitação.

Foram utilizadas três doses de sêmen, tampão de permeabilização de membrana celular do grupo B2 com 3,0 % de Triton X durante 24 horas e DTT a 40 mM durante 120 horas. Para fragmentar a cromatina utilizou 50 U de micrococcal. Os fragmentos de DNA associados a nucleossomos foram capturados pelos beads magnéticos que estavam ligados a anticorpos anti histonas formando um pellet magnético que foi guardado para as etapas posteriores.

2.3.2.3 Método IP-3

Esse método também foi uma otimização do Método B. A última centrifugação também foi substituída pela técnica de imunoprecipitação, porém para fragmentar a cromatina utilizou-se a micrococcal associada à sonicação.

Foram utilizadas três doses de sêmen, tampão de permeabilização de membrana celular do grupo B2 com 3,0 % de Triton X durante 24 horas e DTT a 40 mM durante 120 horas. Para fragmentar a cromatina, primeiramente foram realizados ciclos de sonicação na amostra e

posteriormente utilizou 50 U de micrococcal. Os fragmentos de DNA associados a nucleossomos foram capturados pelos beads magnéticos que estavam ligados a anticorpos anti histonas formando um pellet magnético que foi guardado para as etapas posteriores.

2.3.2.4 Método IP-4

Esse método foi realizado igual o Método IP-3, porém sem o uso da micrococcal.

O protocolo completo dos Métodos IP-1, IP-2, IP-3 e IP-4 estão em Anexos.

2.3.3 Eluição das amostras

O pellet de todos os grupos contendo beads magnéticos ligados aos fragmentos de cromatina pelos anticorpos foram suspensos com 1,0 mL do tampão de lavagem (Tris pH 8,0 (50 mM); NaCl (150 mM); Triton X 100 (1,0 %) e SDS (0,1 %)) gelado e lavados na raque magnética por sete vezes. Em seguida o pellet foi lavado com tampão TE (Tris pH 8,0 (10 mM) e EDTA (1,0 mM)) duas vezes na raque magnética e o pellet final foi suspenso com 200 µL de PBS.

Foi adicionado 5 µL de Proteinase K e incubado por 3 horas a 65 °C e em seguida 15 minutos a 95 °C, dessa forma o fragmento de DNA é desassociado do bead magnético devido digestão das histonas. Em seguida a amostra é colocada na raque magnética para formação do pellet e o sobrenadante com os fragmentos soltos de DNA é coletado e guardado para o próximo passo.

2.3.4 Purificação do DNA

Acrescentou Acetato de Amônio 5 M ao sobrenadante contendo DNA, o volume de acetato de amônio foi referente à metade do volume do sobrenadante. Em seguida acrescentou três vezes desse volume resultante de Etanol 100 %. As amostras foram deixadas nessa solução por 24 horas a -20 °C. Em seguida foi centrifugada a 22.000 G por 20 minutos a 4 °C e o

sobrenadante foi descartado. O pellet foi suspenso com 1,0 mL de etanol 70 % e centrifugado novamente a 22.000 G por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet final foi suspenso em 20 µL de água freenuclease e quantificado no NanoDrop e a quantidade de DNA capturado nos quatro métodos foram comparados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Permeabilização de membrana celular e fragmentação da cromatina

A permeabilização da membrana celular e da cromatina de espermatozoide são pontos-chaves para melhorar o acesso a determinadas regiões do DNA. Dessa forma, os resultados demonstraram qual grupo do Método B, com diferentes tampões de permeabilização de membrana celular, se mostrou mais eficiente para extração de DNA associado à nucleossomos. Os resultados também nos permitem comparar o Método A que utilizou 10 mM de DTT para permeabilizar a cromatina com o Método B que em todos seus grupos aumentou essa concentração para 40 mM (Tabela 2).

Tabela 2: Quantificação de DNA extraído de nucleossomos de espermatozoide bovino pelo método A e B.

Métodos	Grupos	Quantificação de DNA (ng/µL)	Razão 260/280
A	A	3,6	5,28
B	B1	26,3	0,86
	B2	68,0	0,96
	B3	51,3	0,91
	B4	59,1	0,90
	B5	75,1	0,90

Estudos recentes com objetivos semelhantes já utilizaram técnicas para permeabilizar a célula espermática e descondensar, fragmentar e fracionar a cromatina em nucleossomos e

toroides de protamina. Para permeabilização celular e descondensação da cromatina as concentrações de Triton X 100 e DTT respectivamente, foram mínimas, o que pode ter gerado resultados não tão eficientes. Além disso, após o uso da micrococcal para fragmentar a cromatina, o isolamento dos fragmentos associados aos nucleossomos dos fragmentos presentes nos toroides de protamina foi realizado apenas por uma centrifugação de 10000 G. Nesse caso os autores afirmam que após a centrifugação os toroides de protamina estariam isolados no pellet, enquanto todo o material de DNA nucleossomal a ser sequenciado estaria no sobrenadante (Samans et al., 2014, Sillaste et al. 2016).

Em relação à concentração de Triton X 100 e DTT que pode ser usada em protocolos que precisam melhorar o acesso de macromoléculas, como o da enzima micrococcal na cromatina espermática, o nosso estudo comparou diferentes concentrações do Método B com o Método A. Grupos do Método B mostraram maior eficiência na extração de DNA de nucleossomos do que o grupo A. Dentre os grupos do Método B, os B2, B3, B4 e B5 com concentração de Triton X 100 de 3,0 %, 5,0 %, 8,0 % e 10,0 % respectivamente, foram mais eficientes que o grupo B1, que continha 0,5 % de Triton X 100 em seu tampão de permeabilização de membrana celular e apresentou apenas 26,3 ng/μL de DNA na amostra. Essa é uma evidência de que a concentração de Triton X 100 no tampão de permeabilização de membrana celular tem papel importante na extração dos nucleossomos do núcleo espermático, uma vez que para todos os grupos foi utilizada a mesma concentração de DTT.

Para quantificar concentração e a pureza de DNA na amostra utilizou-se o espectrômetro NanoDrop. Nele a concentração é estimada pela absorvância do material, enquanto a pureza da amostra é calculada pela proporção entre DNA e contaminantes. Essa proporção é demonstrada como razão 260/280 que indica que a amostra está pura quando apresenta uma razão entre 1.8 e 2.0. Caso esse valor for menor, possivelmente pode haver contaminação de proteína na amostra ou outros contaminantes como o fenol, que são moléculas que absorvem fortemente no

comprimento de onda 280 nm (Lehninger et al., 2004). Dessa forma, como o valor da razão 260/280 das amostras dos grupos B1, B2, B3, B4 e B5 se aproxima de 1, significa que a razão de DNA e contaminantes nas amostras é de aproximadamente 1:1, o que ainda mantém a grande diferença na quantidade da DNA extraído no grupo B1 em relação aos demais grupos do método B.

O grupo A obteve ainda menos DNA extraído de nucleossomos do que o grupo B1. Levando em conta que nos dois grupos foi utilizado tampão de permeabilização de membrana celular com 0,5 % de Triton X 100, esse resultado permite comparar a ação do DTT em ambos os métodos. No grupo A, a amostra foi incubada por apenas 30 minutos em DTT com concentração de 10 mM apresentou apenas 3,6 nanogramas de DNA por microlitros de amostra, enquanto que o grupo B1 foi incubado por 120 horas com concentração de DTT de 40 mM obteve 26,3 nanogramas de DNA por microlitros após a extração de DNA do sobrenadante, ou seja, o aumento na concentração de DTT associado com o maior tempo de incubação melhorou a acessibilidade da micrococcal na cromatina do espermatozoide e conseqüentemente a sua clivagem nos espaços internucleossômicos. Dessa forma o grupo B1 conseguiu liberar mais nucleossomos para o sobrenadante do que o grupo A.

Apesar de diferente finalidade, Li et al., (2008) também demonstraram a importância da concentração de DTT para acessibilidade de macromoléculas a todas as regiões da cromatina espermática. Eles realizaram ensaios de imunofluorescência com protocolos com diferentes concentrações de DTT, a fim de revelar epítopos de proteínas nucleares antes da aplicação de anticorpos para avaliar as distribuições das histonas e protaminas no núcleo espermático, demonstraram que o uso de DTT na concentração 2,5 mmol/L é menos eficiente do que na concentração 10,0 mmol/L. Ou seja, quando utilizado a menor concentração de DTT os anticorpos não tiveram acesso a protamina e histonas de regiões mais centrais, marcando basicamente a periferia da cabeça espermática. Já com o uso de maior concentração de DTT, a

região marcada para histonas foi maior e toda a cabeça foi marcada para protamina, demonstrando maior acessibilidade dos anticorpos a regiões mais profundas.

3.2 Imunoprecipitação de cromatina

O presente trabalho comparou diferentes métodos de imunoprecipitação de cromatina de espermatozoide. O método IP-1 contém o mesmo tampão de permeabilização de membrana celular e concentração de DTT que o método A. Os métodos IP-2, IP-3 e IP-4 foram realizados com o tampão de permeabilização de membrana celular do método do grupo B2, porém em IP-2 a cromatina foi fragmentada com micrococcal, em IP-3 com micrococcal associada à sonicação e em IP-4 apenas com sonicação. O método do grupo B2 foi o escolhido por apresentar quantidade de DNA semelhante ao B3, B4 e B5, no entanto, com menor concentração de Triton X 100, pois altas concentrações de detergente poderiam interferir na imunoprecipitação. Os resultados obtidos para cada método estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3: Quantificação de DNA extraído de nucleossomos de espermatozoide bovino pelos diferentes métodos de imunoprecipitação testados.

Métodos de Imunoprecipitação	Quantificação de DNA (ng/μL)	Razão 260/280
IP-1	2,6	2,32
IP-2	0,5	-0,34
IP-3	13,5	1,38
IP-4	10,9	2,00

O método IP-1 que é o método A (Sillaste et al., 2016) associado à imunoprecipitação apresentou concentração de 2,6 ng/ μ L de DNA capturado especificamente de nucleossomos. Comparando o método A sem imunoprecipitação, o qual obteve 3,6 ng/ μ L de DNA nucleossomal utilizando-se apenas uma dose de sêmen, com o método IP-1, o qual utilizou três doses de sêmen, podemos perceber que a quantidade de DNA diminui bastante quando se fez

imunoprecipitação. O que já era esperado devido a especificidade da imunoprecipitação, além disso, sabe-se que a quantidade de DNA nucleossomal seria menor no genoma do espermatozoide maduro de mamíferos, estando associado apenas entre 1 % a 15 % de nucleossomos (Erkek et al., 2013; Gatewood et al., 1987; Hammoud et al., 2009; Samans et al., 2014; Sillaste et al., 2016). Portanto a menor quantidade capturada pelo método IP-1 é devido às diferenças entre os métodos A e B. Possivelmente o método A captura os fragmentos de DNA menos densos que migram para o sobrenadante após a centrifugação seguida da fragmentação de cromatina, independente se realmente esse fragmento está associado à nucleossomos ou não. Ao sequenciar uma amostra de DNA capturado no método A, o que foi feito por Sillaste et al., (2016) com o objetivo de sequenciar DNA retido em nucleossomo de espermatozoide, pode-se estar sequenciando genes que não são associados à nucleossomos. Samans et al., (2014) também utilizaram método semelhante e, portanto, seus resultados também podem ser questionados.

Analisando o melhor procedimento para fragmentação da cromatina, o grupo IP-3 que utiliza a sonicação para pré fragmentar a cromatina e depois a clivagem por micrococcal, mostrou-se o mais eficiente. Comparando o grupo IP-3 com o grupo IP-2 que fragmentou a cromatina apenas com micrococcal e obteve concentração de DNA muito inferior em seu resultado, o uso da sonicação pode ter facilitado ainda mais o acesso da micrococcal na cromatina espermática. Entre IP-3 e IP-4 a diferença de DNA nucleossomal é menor, porém o método IP-3 além de conseguir obter maior quantidade DNA também possui precisão no tamanho dos fragmentos de cromatina pelas clivagens da micrococcal, a qual ocorrem entre 100 pb a 200 pb, sendo que a fragmentação de cromatina apenas com sonicação do método IP-4 pode gerar fragmentos com tamanhos imprecisos.

3.3 Considerações gerais

Os resultados presentes nesse estudo nos mostram a importância da concentração de Triton X 100 nos tampões de permeabilização da membrana celular. O grupo B2 indica que o tampão com 3,0 % de Triton X 100 em sua composição se mostra eficiente para uma boa permeabilização da membrana celular, sem comprometer a estrutura da cromatina com concentrações muito altas de detergente. A comparação dos resultados do método A com uso de DTT a 10 mM durante 30 minutos e método B usando DTT a 40 mM evidenciam a importância do DTT para acessibilidade da cromatina, pois todos os grupos do método B obtiveram maior quantidade de DNA fragmentado no sobrenadante. A comparação entre os métodos de imunoprecipitação mostrou que o método IP-3 com uso da fragmentação de cromatina por sonicação associado à micrococcal é o mais eficiente. Mesmo assim comparando a captura de DNA nucleossomal com imunoprecipitação do método IP-3 com o método A e B que utilizou apenas centrifugação e a densidade dos fragmentos de DNA, os métodos realizados indicam que o uso da imunoprecipitação com beads magnéticos captura bem menos fragmentos de DNA na amostra do que quando a separação dos fragmentos é realizada apenas por centrifugação, isso ocorre por que a captura da imunoprecipitação possui alta especificidade do anticorpo pelas histonas do nucleossomo.

4. CONCLUSÃO

A acessibilidade à cromatina de espermatozoide de touro é um fator essencial para o isolamento de DNA associado à nucleossomos utilizando enzimas de restrição e assim, as concentrações de Triton X 100 e de DTT são fatores importantes para se conseguir tal acessibilidade. Em relação aos diferentes métodos de imunoprecipitação testados, o método IP-3 que utiliza a sonicação associada com micrococcal nuclease demonstrou ser a mais eficiente, devido à sonicação ter facilitado ainda mais o acesso da micrococcal na cromatina espermática.

Com o uso da técnica de imunoprecipitação com beads magnéticos para isolamento do DNA ligado a histonas obtem-se menor quantidade de DNA do que a centrifugação utilizada em outros trabalhos, o que sugere a inespecificidade deste último método e pode justificar os resultados incoerentes dos trabalhos onde ele foi utilizado.

REFERÊNCIAS

BELETTI, M. E. Cromatina espermática: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, n.2, p.92-96, 2013.

EMELYANOV, A.V.; FYODOROV, D.V.; Thioredoxin-dependent disulfide bond reduction is required for protamine eviction from sperm chromatin. **Genes Development**, v. 30, p. 2651–2656, 2016.

ERKEK, S. et al. Molecular determinants of nucleosome retention at CpG-rich sequences in mouse spermatozoa. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 20, p. 868-875, 2013.

GATEWOOD, J.M.; et al. Sequence specific packaging of DNA in human sperm chromatin. **Science**, v. 236, p. 962-964, 1987.

HAMMOUD, S.S.; et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. **Nature**, v. 460, p. 473-478, 2009.

JENKINS, T.G.; ASTON, K.I.; JAMES, E.R.; CARRELL, D.T.; Sperm epigenetics in the study of male fertility, offspring health, and potential clinical applications. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 63, p. 69-76, 2017.

LEHNINGER, L.; *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman & Co, 4 ed., pp. 1100, 2004.

LI Y; LALANCETTE, C.; MILLER, D.; KRAWETZ S.A.; Characterization of nucleohistone and nucleoprotamine components in the mature human sperm nucleus. **Asian J Androl**, v. 10, p. 535-541, 2008.

RATHKE, C. et al. Chromatin dynamics during spermiogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, p. 155-168, 2014.

ROYO, H.; STADLER, M.B.; PETERS, A.H.; Alternative Computational Analysis Shows No Evidence for Nucleosome Enrichment at Repetitive Sequences in Mammalian Spermatozoa. **Developmental Cell**, v. 37, p. 98-104, 2016.

SAMANS, B. et al. Uniformity of nucleosome preservation pattern in Mammalian sperm and its connection to repetitive DNA elements. **Developmental Cell**, v. 30, p. 23-35, 2014.

SILLASTE, G. et al. A novel hypothesis for histone-to-protamine transition in Bostaurus spermatozoa. **Reproduction**. v. 153, p. 241–251, 2016.

SOTOLONGO, B.; LINO, E.; WARD, W.S.; Ability of hamster spermatozoa to digest their own DNA. **Biology of Reproduction**., v. 69, p. 2029-2035, 2003.

WARD, W.E.; Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p. 30-36, 2010.

ANEXOS

MÉTODO A

Esse método foi reproduzido de acordo com Sillaste et al., (2016), sendo denominado método A com apenas um grupo (grupo A). Uma dose de sêmen foi lavada com PBS e o pellet foi diluído em 100 μ L de tampão de permeabilização de membrana celular (0,5 % de Triton X 100 em PBS) e 5 μ L de Coquetel Inibidor de Proteases (PIC) (P8340 - Sigma Aldrich) por 30 minutos mantidos em gelo. Em seguida a amostra foi lavada duas vezes em 500 μ L de PBS e 5 μ L de PIC com centrifugação a 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet contendo espermatozoides com membrana permeabilizada foi incubado com ditioneitol (DTT) a 10 mM diluído em PBS e 5 μ L de PIC por 30 minutos em gelo. Em seguida o material foi lavado novamente em 500 μ L de PBS com centrifugação de 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet foi suspenso em tampão de reação contendo 5 mM de CaCl₂ (pH 8) e 40 U de nuclease micrococcal (88216, ThermoScientific), sendo incubado por 3 minutos a 37 °C para ativação da micrococcal e por 10 minutos a 65 °C para inativar a reação enzimática. Foi realizada uma nova centrifugação a 10.000 G por 5 minutos a 25 °C onde foi preservado o sobrenadante. De acordo com esse protocolo, após a centrifugação é possível obter os fragmentos de DNA em nucleossomos no sobrenadante e os toroides de protamina no pellet. Então o sobrenadante foi coletado e acrescentado de 5 μ L de Proteinase K (Qiagen) por 3 horas a 65 °C para digestão de proteínas e em seguida o DNA foi extraído com fenol-clorofórmio, precipitado com isopropanol e lavado com etanol 70 %. O pellet de DNA foi diluído em 20 μ L de água free-nuclease e quantificado no NanoDrop (ND-1000).

MÉTODO B

Esse novo método foi elaborado com intuito de melhorar o acesso da enzima micrococcal à cromatina espermática e por consequência a extração de DNA retido em

nucleossomos. Para esse teste as amostras foram organizadas em cinco grupos diferentes de acordo com a concentração de Triton X 100 em seu respectivo tampão de permeabilização de membrana celular:

Grupos	Tampão de Permeabilização de Membrana Celular
B1	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (0,5 %)
B2	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (3,0 %)
B3	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (5,0 %)
B4	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (8,0 %)
B5	Tris pH 8 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (10,0 %)

Para cada grupo foi utilizada uma dose de sêmen que após ser lavada com PBS o seu pellet foi suspenso em 100 μ L do seu respectivo tampão de permeabilização de membrana celular e 5 μ L de PIC. Esse material foi incubado por 24 horas a 4 °C no vortex. Em seguida a amostra foi lavada duas vezes em PBS e 5 μ L PIC com centrifugação a 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet contendo espermatozoides com membrana permeabilizada foi incubado com DTT agora a 40 mM diluído em PBS e 5 μ L de PIC por 120 horas a 4 °C no vortex. Após as 120 horas o material foi lavado com PBS e centrifugação de 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet foi suspenso em tampão de reação contendo 5 mM de CaCl₂ (pH 8,0) e 50 U de micrococcal, sendo incubado por 3 minutos a 37 °C para ativação da micrococcal e por 10 minutos a 65 °C para inativar a reação enzimática. Foi realizada uma nova centrifugação a

10.000 G por 5 minutos a 25 °C. E então o sobrenadante foi coletado e acrescentado com 5 µL de Proteinase K por 3 horas a 65 °C para digestão de proteínas e em seguida o DNA foi extraído com fenol-clorofórmio, precipitado com isopropanol e lavado com etanol 70 %. O pellet de DNA foi diluído em 20 µL de água free nuclease e quantificado no NanoDrop para comparação de qual grupo obteve maior quantidade de DNA no sobrenadante.

MÉTODO IP-1

Esse procedimento foi uma otimização do Método A (reproduzido de Sillaste et al., (2016)). Substituindo a última centrifugação, que é utilizada como ferramenta de separação dos fragmentos com nucleossomos dos fragmentos com protamina, pela técnica de imunoprecipitação.

Para esse teste foram utilizadas três doses de sêmen que foram lavadas com PBS e o pellet diluído em 300 µL de tampão de permeabilização de membrana celular (0,5 % de Triton X 100 em PBS) e 5 µL de Coquetel Inibidor de Proteases (PIC) por 30 minutos mantidos em gelo. Em seguida a amostra foi lavada duas vezes em PBS e 5 µL PIC com centrifugação a 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet contendo espermatozoides com membrana permeabilizada foi incubado com 300 µL de DTT a 10 mM em PBS e 5 µL de PIC por 30 minutos em gelo. Em seguida o material foi lavado novamente em PBS com centrifugação de 10.000 G por 3 minutos a 4°C. O pellet foi ressuscitado com 200 µL de tampão de reação contendo 5 mM de CaCl₂ (pH 8,0) e 40 U de micrococcal, sendo incubado por 3 minutos a 37 °C para ativação da micrococcal. Nesse caso a ação da micrococcal foi inativada acrescentando EGTA (pH 8,0) na solução para uma concentração final de 20 mM de EGTA, pois a inativação com alta temperatura poderia desnaturar as histonas dos nucleossomos. Então toda a solução contendo fragmentos de cromatina associados à toroides de protamina ou a nucleossomos foi utilizada para diluir o pellet de anticorpos acoplados aos beads magnéticos resultantes da etapa

descrita em 2.3.1. Acrescentou 5 μ L de PIC na solução e a amostra foi incubada por 24 horas a 4 °C em vortex para que os beads magnéticos se ligassem por meio dos anticorpos aos fragmentos de cromatina com nucleossomos. No dia seguinte a amostra foi colocada na raque magnética para formar o pellet contendo o complexo de anticorpos acoplados aos beads magnéticos ligados aos fragmentos de cromatina com nucleossomo. O sobrenadante resultante dessa imunoprecipitação contendo fragmentos de DNA associados às demais proteínas não nucleossômicas e DNA sem proteína alguma foi descartado cuidadosamente e o pellet foi preservado para as próximas etapas.

MÉTODO IP-2

Esse método foi uma otimização o Método B com o tampão de permeabilização de membrana celular do grupo B2. A última centrifugação, que é utilizada como ferramenta de separação dos fragmentos com nucleossomos dos fragmentos com protamina, foi substituída pela técnica de imunoprecipitação.

Para esse grupo também foram utilizadas três doses de sêmen lavadas com PBS. O pellet foi suspenso em 300 μ L no tampão de permeabilização de membrana (Tris pH 8,0 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (3,0 %)) e 5 μ L de PIC. Esse material foi incubado por 24 horas a 4 °C no vortex. Em seguida a amostra foi lavada duas vezes em PBS e 5 μ L PIC com centrifugação a 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet contendo espermatozoides com membrana permeabilizada foi incubado com DTT a 40 mM em PBS e 5 μ L de PIC por 120 horas a 4 °C no vortex. Após as 120 horas o material foi lavado em PBS com centrifugação de 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuspensionado em tampão de reação contendo 5 mM de CaCl₂ (pH 8,0) e 50 U de micrococcal, sendo incubado por 3 minutos a 37 °C para ativação da micrococcal. Após os 3 minutos a ação da micrococcal também foi inativada acrescentando EGTA (pH 8,0) na solução para uma concentração final de 20 mM de

EGTA, para não interferir na estrutura protéica das histonas, que pode ser afetada pela alta temperatura. Então toda a solução contendo fragmentos de cromatina associados a toroides de protamina ou a nucleossomos foi utilizada para diluir o pellet de anticorpos acoplados aos beads magnéticos resultantes da etapa descrita em 2.3.1. Acrescentou 5 μ L de PIC na solução e a amostra foi incubada por 24 horas a 4 °C em vortex para que os beads magnéticos se ligassem por meio dos anticorpos aos fragmentos de cromatina com nucleossomo. Do mesmo modo que no grupo IP-1, no dia seguinte a amostra foi colocada na raque magnética para formar o pellet que está ligado aos fragmentos de cromatina com nucleossomo, o sobrenadante foi descartado e o pellet magnético foi reservado para as próximas etapas.

MÉTODO IP-3

Esse método também foi uma otimização do Método B com o tampão de permeabilização de membrana celular do grupo B2. A última centrifugação também foi substituída pela técnica de imunoprecipitação, porém para fragmentar a cromatina utilizou-se a micrococcal associada à sonicação.

Foram utilizadas três doses de sêmen lavadas com PBS. O pellet foi suspenso em 300 μ L no tampão de permeabilização de membrana (Tris pH 8,0 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA (1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (3,0 %)) e 5 μ L de PIC. Esse material foi incubado por 24 horas a 4 °C no vortex. Em seguida a amostra foi lavada duas vezes em PBS e 5 μ L PIC com centrifugação a 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet contendo espermatozoides com membrana permeabilizada foi incubado com DTT a 40 mM em PBS e 5 μ L de PIC por 120 horas a 4 °C no vortex. Após as 120 horas a amostra foi lavada em PBS com centrifugação de 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. Para que não ocorressem perturbações na estrutura dos nucleossomos durante a sonicação, nesse caso foi feito o crosslink da cromatina com formaldeído 1,0 % em PBS por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida a reação do

formaldeído foi interrompida com 57 μ L de glicina 1,5 M por 5 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi lavada duas vezes em PBS com centrifugação de 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuspendido em tampão de reação contendo 5 mM de CaCl₂ (pH 8) ainda sem a micrococcal. E então foi colocada no sonicador para a primeira fragmentação de cromatina antes da micrococcal. Esse material foi sonificado por 10 ciclos em água com gelo, cada ciclo de 30 segundos com sonicador ligado na potência máxima e 30 segundos desligado. A amostra foi agitada por 30 segundos no vortex e sonificada novamente com os mesmos 10 ciclos anteriores. Após a sonificação foi acrescentado 50 U de micrococcal, incubou por 3 minutos a 37 °C para ativação da micrococcal. Após os 3 minutos a ação da micrococcal foi inativada acrescentando EGTA (pH 8,0) na solução para uma concentração final de 20 mM de EGTA. Esta solução contendo fragmentos de cromatina foi utilizada para diluir o pellet de anticorpos acoplados aos beads magnéticos resultantes da etapa descrita em 2.3.1. Acrescentou 5 μ L de PIC na solução e a amostra foi incubada por 24 horas a 4 °C em vortex para que os beads magnéticos se ligassem por meio dos anticorpos aos fragmentos de cromatina com nucleossomo. Do mesmo modo que no grupo IP-1 e IP-2, no dia seguinte a amostra do grupo IP-3 foi colocada na raque magnética para formar o pellet com os fragmentos de cromatina do nucleossomo. O conteúdo do pellet foi reservado para as próximas etapas e o sobrenadante foi descartado.

MÉTODO IP-4

Esse método foi uma otimização do Método B com o tampão de permeabilização de membrana celular do grupo B2, porém para a fragmentação da cromatina utilizou-se apenas a sonificação.

Foram utilizadas três doses de sêmen lavadas com PBS. O pellet foi suspenso em 300 μ L no tampão de permeabilização de membrana (Tris pH 8,0 (50 mM); HCl (140 mM); EDTA

(1,0 mM); Glicerol (10,0 %) e Triton X 100 (3,0 %) e 5 µL de PIC. Esse material foi incubado por 24 horas a 4 °C no vortex. Em seguida a amostra foi lavada duas vezes em PBS e 5 µL PIC com centrifugação a 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet contendo espermatozoides com membrana permeabilizada foi incubado com DTT a 40 mM em PBS e 5 µL de PIC por 120 horas a 4 °C no vortex. Após as 120 horas a amostra foi lavada em PBS com centrifugação de 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. Para que não ocorressem perturbações na estrutura dos nucleossomos, nesse caso foi feito o crosslink da cromatina com formaldeído 1,0 % em PBS por 10 minutos em temperatura ambiente, em seguida a reação foi interrompida com 57 µL de Glicina 1,5 M por 5 minutos em temperatura ambiente. A amostra foi lavada duas vezes em PBS com centrifugação de 10.000 G por 3 minutos a 4 °C. O pellet foi ressuscitado em tampão de reação contendo 5 mM de CaCl₂ (pH 8) sem a presença da micrococcal. E então foi colocada no sonicador para a primeira fragmentação de cromatina antes da micrococcal. Esse material foi sonificado por 10 ciclos em água com gelo, cada ciclo de 30 segundos com sonicador ligado na potência máxima e 30 segundos desligado. A amostra foi agitada por 30 segundos no vortex e sonificada novamente com os mesmos 10 ciclos anteriores. Após a sonificação a amostra foi incubada por 3 minutos a 37 °C mesmo sem a presença da micrococcal. Esta solução contendo fragmentos de cromatina foi utilizada para diluir o pellet de anticorpos acoplados aos beads magnéticos resultantes da etapa descrita em 2.3.1. Acrescentou 5 µL de PIC na solução e a amostra foi incubada por 24 horas a 4 °C em vortex para que os beads magnéticos se ligassem por meio dos anticorpos aos fragmentos de cromatina com nucleossomo. Do mesmo modo que no grupo IP-1, IP-2 e IP-3 no dia seguinte a amostra do grupo IP-4 foi colocada na raque magnética para formar o pellet com os fragmentos de cromatina do nucleossomo. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi preservado para as próximas etapas comuns a todos os grupos.