



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

**PERFIL TRANSCRICIONAL AO LONGO DO *LOCUS* DO TRANSCRITO  
ESPECÍFICO DO X INATIVO (*XIST*) NA PLACENTA DE BOVINOS**

**Aluna: Paloma Soares de Castro**

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

**UBERLÂNDIA - MG  
2020**



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

**PERFIL TRANSCRICIONAL AO LONGO DO *LOCUS* DO TRANSCRITO  
ESPECÍFICO DO X INATIVO (*XIST*) NA PLACENTA DE BOVINOS**

**Aluna: Paloma Soares de Castro**

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

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

**UBERLÂNDIA - MG**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C355 2020	Castro, Paloma Soares de, 1993- PERFIL TRANSCRICIONAL AO LONGO DO <i>LOCUS</i> DO TRANSCRITO ESPECÍFICO DO X INATIVO ( <i>XIST</i> ) NA PLACENTA DE BOVINOS [ recurso eletrônico] / Paloma Soares de Castro. - 2020.  Orientador: Maurício Machaim Franco. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.727">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.727</a> Inclui bibliografia.  1 . Genética. I. Franco, Maurício Machaim, 1965-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pósgraduação em Genética e Bioquímica. III. Título.  CDU: 575
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**PERFIL TRANSCRICIONAL AO LONGO DO *LOCUS* DO TRANSCRITO  
ESPECÍFICO DO X INATIVO (*XIST*) NA PLACENTA DE BOVINOS**

**ALUNA: Paloma Soares de Castro**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

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

**Examinadores:**

Dr<sup>a</sup>. Vivian Alonso Goulart

Dr. Álvaro Fabrício Lopes Rios

**Data da Defesa:** 29/12/2020

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



---

Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela saúde, proteção, coragem e força para trilhar este caminho.

Aos meus pais, Geraldo e Suzana, pelo amor incondicional em todos os momentos da minha vida. Pelo apoio e incentivo para eu concluir mais essa etapa. Obrigada por não medirem esforços e sempre me ajudarem a conquistar os meus sonhos. Agradeço à minha irmã, Sabrina, pela companhia e amizade durante toda essa jornada.

Ao meu orientador, Dr. Maurício Machaim Franco, pela oportunidade de aprender por meio dos seus ensinamentos. Obrigada pela paciência, confiança, orientação e amizade durante toda esta trajetória. E por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional, no qual você é um exemplo para mim.

Ao meu namorado, Charles, pelo amor, compreensão e incentivo a todo momento.

Aos amigos que fiz em Brasília e que fazem parte do Laboratório de Reprodução Animal (LRA), obrigada pelo convívio, momentos de descontração, amizade e apoio demonstrado. Em especial, a Luna e a Thainara, por tanta ajuda, pelo carinho, irmandade e todos os momentos que estavam ao meu lado. A amizade de todos vocês estará sempre em minha memória e coração.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por proporcionar toda a estrutura e pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica pelo curso de mestrado ofertado, e a todos os professores que dele fazem parte. Um agradecimento especial à secretária do programa, Janaína de Souza Mota, pela disponibilidade e ajuda de sempre.

*A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste*

*trabalho, a minha sincera gratidão!*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
1.1 EPIGENÉTICA E OS RNA NÃO CODANTES.....	13
1.2 INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X.....	16
1.3 O GENE <i>XIST</i> .....	22
2. OBJETIVOS .....	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO .....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	28
3.1 Obtenção do material biológico .....	28
3.2 Extração de RNA total e tratamento com DNase .....	28
3.3 Síntese de cDNA.....	29
3.4 PCR em tempo real fita-específica [Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (SS-RT-PCR)].....	31
3.5 Clonagem dos produtos da PCR e extração do DNA plasmidial.....	32
3.6 Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências .....	33
4. RESULTADOS .....	34
4.1 Caracterização da expressão gênica sense e antisense por SS-RT-PCR para o locus <i>XIST</i> .....	34
5. DISCUSSÃO .....	63
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	67
7. REFERÊNCIAS.....	68
8. ANEXOS .....	77

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Representação das diferentes formas nas quais os lncRNAs podem ser localizados e transcritos.....	15
<b>Figura 2-</b> Compensação da produção gênica entre os sexos homo e heterogamético.....	17
<b>Figura 3-</b> Representação do lncRNA <i>XIST</i> e suas três variantes.....	31
<b>Figura 4-</b> Representação da técnica SS-RT-PCR que foi utilizada para analisar os transcritos sense e antisense ao longo do locus <i>XIST</i> .....	32
<b>Figura 5-</b> Resultado da SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando os <i>primers</i> RepA (éxon 1) no locus <i>XIST</i> no cotilédone fetal de fêmea.....	35
<b>Figura 6-</b> Alinhamento dos <i>amplicons</i> do C+, sense e antisense do éxon 1 (RepA) do locus <i>XIST</i> em cotilédone fetal de fêmea nas variantes X2 (A) e X3 (B), utilizando a ferramenta BLASTN.....	37
<b>Figura 7-</b> Resultado da SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando <i>primers</i> bXIST (éxon 1) no locus <i>XIST</i> no cotilédone fetal de fêmea.....	38
<b>Figura 8-</b> Alinhamento dos <i>amplicons</i> do C+, sense e antisense do éxon 1 (bXIST) do locus <i>XIST</i> em cotilédone fetal de fêmea na variante X2, utilizando a ferramenta BLASTN.....	39
<b>Figura 9-</b> Resultado da SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando <i>primers</i> TSIXM (éxon 4) no locus <i>XIST</i> no cotilédone fetal de fêmea.....	41
<b>Figura 10-</b> Alinhamento dos <i>amplicons</i> sense e do C+ do éxon 4 (TSIXM) do locus <i>XIST</i> em cotilédone fetal de fêmea nas variantes X1 (A), X2 (B) e X3 (C), utilizando a ferramenta BLASTN.....	44

<b>Figura 11-</b> Resultado da SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando <i>primers</i> TSIXU (éxon 6) no <i>locus XIST</i> no cotilédone fetal de fêmea.....	45
<b>Figura 12-</b> Alinhamento dos <i>amplicons</i> do C+ e sense do éxon 6 (TSIXU) do <i>locus XIST</i> em cotilédone fetal de fêmea nas variantes X1, X2 e X3, utilizando a ferramenta BLASTN.....	47
<b>Figura 13-</b> Resultado da SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando <i>primers</i> RepA (éxon 1) no <i>locus XIST</i> no cotilédone fetal de macho. ....	49
<b>Figura 14-</b> Alinhamento dos <i>amplicons</i> do C+ e sense do éxon 1 (RepA) do <i>locus XIST</i> em cotilédone fetal de macho nas variantes X2 e X3, utilizando a ferramenta BLASTN.....	51
<b>Figura 15-</b> Resultado da SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando <i>primers</i> bXIST (éxon 1) no <i>locus XIST</i> no cotilédone fetal de macho. ....	52
<b>Figura 16-</b> Alinhamento dos <i>amplicons</i> do C+ e sense do éxon 1 (bXIST) do <i>locus XIST</i> em cotilédone fetal de macho na variantes X2, utilizando a ferramenta BLASTN.....	53
<b>Figura 17-</b> Resultado da SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando <i>primers</i> TSIXM (éxon 4) no <i>locus XIST</i> no cotilédone fetal de macho. ....	54
<b>Figura 18-</b> Alinhamento dos <i>amplicons</i> sense do éxon 4 (TSIXM) do <i>locus XIST</i> em cotilédone fetal de macho na variantes X1 (A), X2 (B) e X3 (C) utilizando a ferramenta BLASTN. ....	57
<b>Figura 19-</b> Resultado da SS-RT-PCR ( <i>Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> ) relacionado com a presença de transcritos	

sense e antisense utilizando *primers* TSIXU (éxon 6) no *locus XIST* no cotilédone fetal de macho. .... 58

**Figura 20-** Alinhamento dos *amplicons* do C+ e sense do éxon 6 (TSIXU) do *locus XIST* em cotilédone fetal de macho nas variantes X1 (A), X2 (B) e X3 (C) utilizando a ferramenta BLASTN..... 61

**Figura 21-** Síntese dos resultados obtidos nos cotilédones fetais de fêmea.. ..... 62

**Figura 22-** Síntese dos resultados obtidos nos cotilédones fetais de macho.. ..... 62

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

cDNA- DNA complementar  
CGP- Célula germinativa primordial  
Ct- Ciclo *threshold*  
CTCF- Fator de ligação à CCCTC  
DNA- Ácido desoxirribonucleico  
DNase- Desoxirribonuclease  
ENOX/*JPX*- Vizinho expresso de *XIST*  
EZH2- Enhancer do homólogo 2 de Zeste  
FTX- Five prime do *XIST*  
H2AK119ub1- Ubiquitinação da lisina 119 da histona H2A  
H3K27ac- Acetilação da lisina 27 da histona H3  
H3K9ac- Acetilação da lisina 9 da histona H3  
H3K27me3- Trimetilação da lisina 27 da histona H3  
H3K4me3- Trimetilação da lisina 4 da histona H3  
H3K4me2- Dimetilação da lisina 4 da histona H3  
H4ac- Acetilação da histona H4  
ICSM- Inativação Cromossômica Sexual Meiótica  
ICX- Inativação do Cromossomo X  
IPTG- Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo  
JARID2- Domínio de interação contendo *Jumonji* e *AT-Rich* tipo 2  
Kb- Quilobase  
LB- Meio Luria-Bertani  
lncRNA- RNA longo não-codante  
M- Molar  
mA- Miliampere  
Mb- Megabase  
MCI- Massa Celular Interna  
mg- Miligrama  
miRNA- Micro RNA  
mL- mililitro  
mM- Milimolar

mRNA- RNA mensageiro  
NANOG- *Nanog homeobox*  
ng- Nanograma  
OCT4- Fator de transcrição ligante no octâmero 4  
pb- Pares de base  
PCR- Reação em cadeia da polimerase  
piRNA- Piwi-interacting RNA  
PRC1- Complexo Repressivo Policomb tipo 1  
PRC2- Complexo Repressivo Policomb tipo 2  
q.s.p- Quantidade suficiente para  
RBP- Proteínas de Ligação ao RNA  
RepA- *Repeat A*  
RLIM- Proteínas *Ring Finger*, interação com o domínio LIM  
RNA – Ácido ribonucleico  
rRNA- RNA ribossômico  
ncRNA – RNA não-codante  
RNAse – Ribonuclease  
RNF12- Proteína *Ring Finger*  
rpm – Rotação por minuto  
RSX- RNA do X silenciado  
RT – Transcrição reversa  
siRNA- RNA interferente pequeno  
SOX2- (região determinante do sexo Y)- box 2  
SS-RT-PCR – RT-PCR de fita específica  
TE- trofoectoderma  
TBE- Tampão Tris-Borato-EDTA  
TRAs- Técnicas de reprodução assistida  
tRNA- RNA transportador  
*TSIX* – RNA antisense de *XIST*  
TSX – *Testes-specific* ligado a X  
Xa- Cromossomo X ativo  
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 do X inativo

*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

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µm – Micrômetro

µM – Micromolar

ng – Nanograma

## RESUMO

A inativação do cromossomo X (ICX) ocorre como forma de compensar o desequilíbrio entre os sexos homo e heterogaméticos em relação à expressão gênica. Em camundongos está estabelecido que o RNA longo não-codante (lncRNA) Transcrito Específico do X Inativo (*XIST*) é essencial para o início do processo da ICX. O transcrito antisense mais conhecido no *locus XIST* de camundongos é o transcrito *TSIX*, um modulador negativo para *XIST*. No entanto, em bovinos esses eventos ainda não estão totalmente estabelecidos. Com isso, o objetivo deste estudo foi caracterizar os padrões de transcrição fita-específica ao longo do *locus XIST* na placenta fetal de bovinos. O RNA total foi isolado a partir de amostras de cotilédones fetais de fêmea e macho utilizando o Kit de Purificação PureLink™ RNA Mini (Ambion, Austin, TX, USA). Para detectar a transcrição fita-específica, o cDNA foi sintetizado usando primers *forward* e *reverse* específicos para duas regiões do éxon 1, para o éxon 4 e para o éxon 6 do gene *XIST* usando o GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). Como controle positivo, foi utilizado cDNA sintetizado usando Oligo(dT) e *random primers*. Como controle negativo, foi realizado um cDNA utilizando Oligo(dT) e *random primers* na ausência da enzima transcriptase reversa. A análise da PCR em tempo real fita-específica (SS-RT-PCR) foi realizada em um Sistema de PCR Fast Realtime 7500 (Applied Biosystems) usando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e os mesmos pares de primers que foram usados para a síntese do cDNA. Cada amostra de cDNA (n=10) foi amplificada e analisada em duplicata e interpretada qualitativamente, como presença ou ausência de expressão. Foram identificadas as três isoformas de *XIST* (X1, X2 e X3), porém somente a isoforma X2 abrange todos os primers. A especificidade de cada amplicon foi confirmada pelo tamanho em gel de agarose (éxon 1 RepA- 139bp, éxon 1 bXIST - 172bp, éxon 4 TSIXM - 96pb e éxon 6 TSIXU - 159pb), pela análise da curva de *melting* e sequenciamento. Foi detectada transcrição sense ao longo de todo o *locus XIST* (éxons 1, 4 e 6) para os *amplicons* provenientes dos cotilédones fetais de macho e fêmea e transcrição antisense somente no éxon 1 (RepA e bXIST) derivado de cotilédone fetal de fêmea. Possivelmente os transcritos sense sejam o lncRNA *XIST* e que o transcrito antisense expresso no

éxon 1 não seja o *TSIX*, mas sim o homólogo de *XistAR* ou outros RNAs ainda não caracterizados. Os resultados mostram a importância da caracterização como auxílio para compreensão da ICX em bovinos. Além disso, apresenta a relevância de se levar em conta a possibilidade de expressão de transcritos antisense quando se propõe a realizar estudos de expressão gênica, especialmente em *locus* de ncRNA, onde a transcrição das duas cadeias de DNA é mais frequente.

Palavras-chave: Inativação do cromossomo X, RNAs não codantes, *XIST*, transcrição sense, transcrição antisente

## ABSTRACT

X chromosome inactivation (XCI) occurs as a way of compensating the imbalance between the homo and heterogametic sexes with respect to the gene expression. In mouse, it is established that the long non-coding RNA (lncRNA) X-inactive specific transcript (*XIST*) is essential to the initiation of the XCI process. The most well-known antisense transcript in the mouse *XIST* locus is the *TSIX*, a negative modulator to *XIST*. However, in cattle these events are not yet totally established. Thus, the aim of this study was to characterize the patterns of strand-specific transcription along the *XIST* locus in the bovine foetal placenta. Total RNA was isolated from a female and male cotyledon samples using the PureLink™ RNA Mini Purification Kit (Ambion, Austin, TX, USA). To detect strand-specific transcription, the cDNA was synthesized using forward and reverse primers specific for two regions of exon 1, exon 4 and exon 6 of *XIST* gene using the GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). As positive control, cDNA synthesized using Oligo(dT) and random primers was used. As negative control, it was performed a cDNA using Oligo(dT) and Random primers in the absence of the reverse transcriptase enzyme. Strand-Specific real-time PCR (SS-RT-PCR) analysis were run in a 7500 Fast RealTime PCR System (Applied Biosystems) using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and the same primer pairs that were used to synthesize cDNA.

A análise da reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa específica de cadeia (SS-RT-PCR) foi executada em um sistema 7500 Fast RealTime PCR (Applied Biosystems) usando o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e os mesmos pares de primer que foram usados para sintetizar cDNA. Each cDNA sample (n= 10) was amplified and analyzed in duplicate and interpreted qualitatively, as presence or absence of expression. The three *XIST* isoforms (X1, X2, and X3) were identified, but only the X2 isoform covers all primers. The specificity of each amplicon was confirmed by the size of agarose gel (Exon 1 RepA – 139pb, exon 1 b*XIST*- 172bp, exon 4 *TSIXM*- 96pb, and exon 6*TSIXU* - 159bp) and by the melting curve and sequencing analysis. Sense transcription was detected throughout the *XIST* locus (exon 1, 4 and 6) for amplicons from male and female foetal cotyledons and antisense transcription only

in exon 1 (RepA and bXIST) derived from female foetal cotyledon. Possibly the sense transcripts are the lncRNA *XIST* and that the antisense transcript expressed in exon 1 is not *TSIX*, but the *XistAR* homolog or other uncharacterized RNAs. The results show the importance of characterization as an aid to understand XCI in cattle. Also, it presents the relevance to take into account the possibility of antisense expression when it is proposed to perform gene expression studies, especially in non-coding RNA loci, where transcription from the two DNA strands is frequent.

Key-words: X chromosome inactivation, non-coding RNA, *XIST*, Antisense transcription, Sense transcription.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 EPIGENÉTICA E OS RNAs NÃO CODIFICANTES

No início da década de 40 o termo Epigenética foi cunhado por Conrad Waddington e no seu sentido literal, significa “acima da genética” e refere-se a área da genética que estuda as modificações químicas da cromatina que influenciam a atividade gênica sem alterar a estrutura primária do DNA, sendo capaz de levar a mudanças potencialmente herdáveis no fenótipo (BANTA; RICHARDS, 2018; DUPONT; ARMANT; BRENNER, 2009).

As marcas epigenéticas, distintivamente da sequência do genoma, são reversíveis e dinâmicas, sendo capazes de variar entre os tipos de tecidos e células, idade e desenvolvimento e podem estar susceptíveis a estímulos ambientais como a exposição a fatores nutricionais, fatores físicos (temperatura, comportamento, estresse), fatores químicos (medicamentos e toxinas) e efeitos estocásticos, exercendo um efeito na expressão gênica, modificando a acessibilidade da maquinaria de transcrição ao DNA (FAULK; DOLINOY, 2011; HÜBEL; MARZI; BREEN; BULIK, 2019).

Os mecanismos epigenéticos ocorrem tanto a nível de DNA quanto de histonas, alterando a estrutura da cromatina e possibilitando ao DNA uma menor ou maior compactação regulando assim os padrões de expressão gênica. Os principais mecanismos epigenéticos podem ser classificados em três grupos: 1) metilação do DNA; 2) modificações pós-traducionais das histonas (acetilação, fosforilação, metilação, ADP-ribosilação, ubiquitinação, sumoilação, etc) e 3) RNAs não codificantes (SMOLLE; WORKMAN, 2013). Esses processos são essenciais para o desenvolvimento normal e diferenciação das linhagens celulares (HANDY DIANE; CASTRO; LOSCALZO, 2011), dentre outras funções.

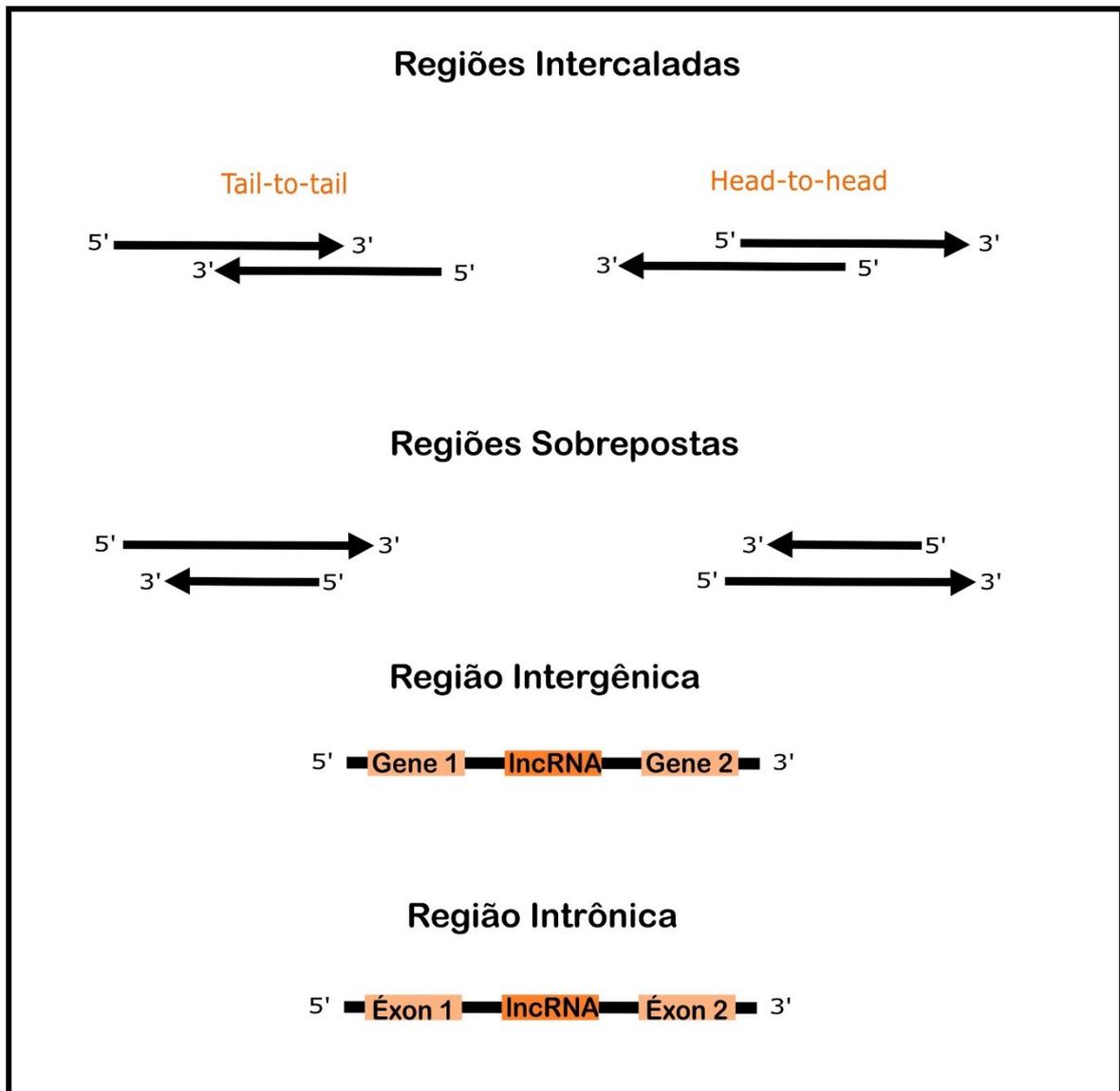
Apenas 2 % do genoma de eucariotos constituem regiões codificadoras de proteínas (DI MAURO; CATALUCCI, 2017), ou seja, a maioria das moléculas de RNA não são traduzidas em proteínas, as quais são conhecidas como RNAs não-codificantes (ncRNAs). Os ncRNAs provenientes de um *locus* gênico podem regular a transcrição em cis ou em trans e assim influenciar a expressão e estabilidade do gene. Em geral, os ncRNAs se unem com outros elementos que

regulam a estrutura e função do genoma (KHOSRAVIANI; OSTROWSKI; MEKHAIL, 2019).

Com base no tamanho, os ncRNAs são classificados em dois grupos: (I) Os pequenos ncRNAs, com tamanho inferior a 200 nucleotídeos, dos quais fazem parte os *transfer RNAs* (tRNA), *ribosomal RNA* (rRNA), *small interfering RNAs* (siRNAs), *PIWI-interacting RNA* (piRNAs) e os *microRNAs* (miRNAs); e (II) RNAs longos não-codantes (lncRNA), que possuem um tamanho superior a 200 nucleotídeos (DI MAURO; CATALUCCI, 2017; GOMES; NOLASCO; SOARES, 2013).

Os lncRNAs podem ser encontrados no núcleo, citoplasma e mitocôndrias, estarem ou não poliadenilados, participarem de mecanismos de *splicing* normal e alternativo, sendo capazes de gerar várias isoformas (QUINN; CHANG, 2016) e são normalmente transcritos de qualquer fita do DNA na direção sense ou antisense dentro de um *locus* codificador de proteínas (CARNINCI; KASUKAWA; KATAYAMA; GOUGH *et al.*, 2005; CONSORTIUM; BIRNEY; STAMATOYANNOPOULOS; DUTTA *et al.*, 2007).

Diante disso, os lncRNAs podem ser transcritos em regiões intercaladas e sobrepostas, na orientação cauda-cauda (*tail-to-tail*) e cabeça-cabeça (*head-to-head*), além de poderem se localizar em regiões intrônicas e intergênicas (VADAIE; MORRIS, 2013) (Figura 1).



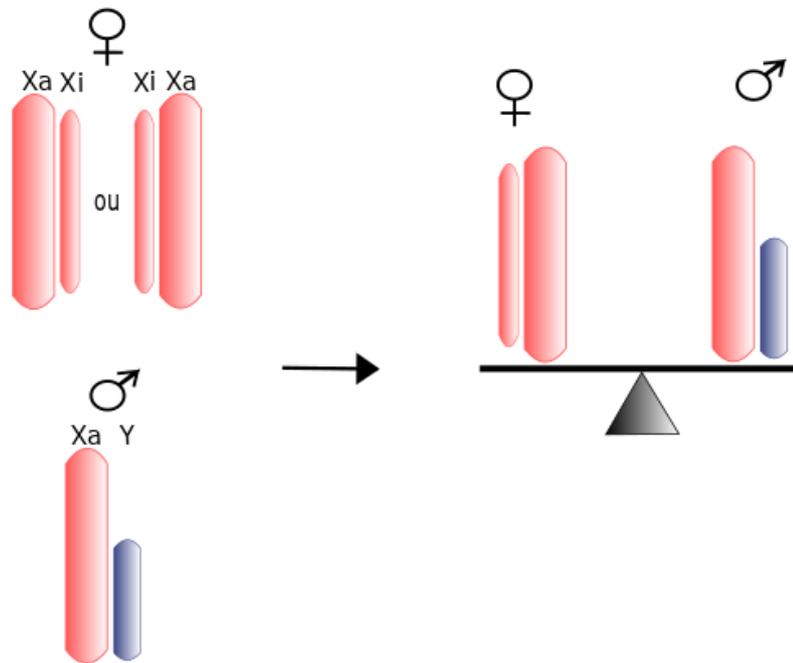
**Figura 1- Representação das diferentes formas nas quais os lncRNAs podem ser localizados e transcritos.** Figura modificada de Fernandes et al. (2019) e Dini et al. (2019). (DINI; NORRIS; ALI; LOUX *et al.*, 2019; FERNANDES; ACUÑA; AOKI; FLOETER-WINTER *et al.*, 2019)

Os lncRNAs podem atuar como *competing endogenous RNA* (ceRNA) quando exercem funções de “esponjas” de miRNAs para que a interação entre o miRNA e seu mRNA alvo seja reduzida (FURIÓ-TARÍ; TARAZONA; GABALDÓN; ENRIGHT *et al.*, 2016). Ou seja, os lncRNAs podem apresentar sequências complementares com os miRNAs e assim interferir na regulação dos genes causando um prejuízo na interação funcional dos miRNAs com os mRNAs (FERNANDES; ACUÑA; AOKI; FLOETER-WINTER *et al.*, 2019). Além disso, os

lncRNAs realizam sua função quando interagem com fatores de transcrição e ou complexos modificadores de cromatina, modulando assim a transcrição dos genes, regulando a expressão gênica (QUINODOZ; GUTTMAN, 2014). O Transcrito Específico do X Inativo (*XIST*) é um dos melhores exemplos estudados de um lncRNA que regula a expressão gênica e coordena a inativação do cromossomo X (ICX) (GALUPA; HEARD, 2015).

## 1.2 INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Em 1949 um estudo observou uma estrutura heterocromática na periferia nuclear do neurônio de gatas, hoje conhecida como corpúsculo de Barr (BARR; BERTRAM, 1949). Posteriormente, descobriu-se que o corpúsculo de Barr, na realidade, era um cromossomo X condensado, encontrado exclusivamente em células femininas (OHNO; KAPLAN; KINOSITA, 1959). Assim, em 1961, Mary Lyon propôs que este cromossomo X fosse inativado, a fim de realizar a compensação de dose para células masculinas que possuem apenas um cromossomo X em comparação com as células femininas que possuem dois (Figura 2). E esse equilíbrio de dosagem gênica entre machos e fêmeas é controlado por um mecanismo epigenético que acontece durante o desenvolvimento inicial conhecido como Inativação do Cromossomo X (LYON, 1961).



**Figura 2- Compensação da produção gênica entre os sexos homo e heterogamético.** Na inativação aleatória do cromossomo X, é possível silenciar o cromossomo X herdado da mãe ou do pai. Qualquer um dos cromossomos X de fêmea que for inativado pode equilibrar a dosagem gênica em relação ao único cromossomo X ativo no macho. Cromossomo X está desenhado em rosa; Cromossomo Y em azul; Xa, cromossomo X ativo; Xi, cromossomo X inativo. Figura modificada de Payer e Lee (2008). (PAYER; LEE, 2008)

Ainda que a ICX aconteça nas fêmeas de todas as espécies de mamíferos, existem estratégias diferentes para realizá-la. A ICX pode ser aleatória ou *imprinted*. No momento em que ocorre a ICX aleatória em uma célula (X materno- $X_m$  ou paterno- $X_p$ ), o cromossomo X selecionado para ser inativado permanece inativo nas células filhas após a divisão celular, resultando em um mosaicismos nos tecidos de fêmeas adultas (NESBITT, 1971). Já na ICX *imprinted*, como acontece em camundongos, não há uma escolha aleatória sobre qual cromossomo X é selecionado, mas sim o cromossomo X herdado paternalmente que será escolhido para ser inativo (TAKAGI; SASAKI, 1975).

A ICX não acontece instantaneamente, mas sim ao longo de um período de desenvolvimento. Durante esse período, o processo da ICX precisa passar por

algumas etapas específicas como contagem, escolha e iniciação da inativação (AVNER; HEARD, 2001). Na etapa de contagem, mecanismos celulares contam quantos cromossomos existem e deixa que somente um cromossomo X permaneça ativo por conjunto diploide de autossomos. O segundo estágio é a escolha. Na ICX *imprinted*, a escolha já foi pré-determinada que o cromossomo X paterno seja silenciado. Na ICX aleatória, deve haver uma escolha de qual dos dois cromossomos X (Xp ou Xm) em uma célula de fêmea será selecionado para ser inativado. O terceiro estágio é de iniciação da inativação, que depende de um lncRNA para a regulação da ICX nas diferentes espécies.

Nos marsupiais, ocorre a ICX *imprinted*, sendo que o cromossomo X a ser inativado é especificamente o paterno. Já em mamíferos placentários, como por exemplo, em roedores, ocorre a ICX *imprinted* somente antes da implantação na embriogênese inicial e nos anexos extraembrionários, sendo que depois da fase embrionária a inativação do Xp ou Xm acontece aleatoriamente (FURLAN; ROUGEULLE, 2016). A ICX exclusivamente aleatória ocorre em outras espécies de mamíferos, como coelhos e humanos (OKAMOTO; PATRAT; THÉPOT; PEYNOT *et al.*, 2011).

Entretanto, uma característica comum é a influência de um lncRNA para a regulação da ICX nas diferentes espécies. Nos mamíferos metatérios, a ICX é mediada por um lncRNA chamado RNA *on the silent X (RSX)*, enquanto nos mamíferos eutérios a ICX se inicia com o lncRNA *XIST* (FURLAN; ROUGEULLE, 2016) revestindo em *cis* o futuro cromossomo X inativo (Xi) (BORSANI; TONLORENZI; SIMMLER; DANDOLO *et al.*, 1991; BROWN; LAFRENIERE; POWERS; SEBASTIO *et al.*, 1991).

A ICX é controlada por uma região conhecida como Centro de Inativação do cromossomo X (XIC), que codifica vários lncRNAs (RUSSELL, 1963). No XIC, encontram-se os genes que são fundamentais para a ICX, sendo *XIST* e seu antisense *TSIX* os principais genes estudados (PENNY; KAY; SHEARDOWN; RASTAN *et al.*, 1996). O *XIST* desencadeia o silenciamento em *cis* (OKAMOTO; HEARD, 2009), recrutando diversos fatores epigenéticos para compactar a cromatina e silenciar a transcrição dos genes (SADO; BROCKDORFF, 2013), sendo essencial para iniciar a inativação (PENNY; KAY; SHEARDOWN; RASTAN *et al.*, 1996). Por outro lado, *TSIX* é o antisense e reprime a expressão de *XIST*,

marcando o cromossomo X ativo em *cis* (LEE; DAVIDOW; WARSHAWSKY, 1999; STAVROPOULOS; LU; LEE, 2001).

Os camundongos, entre os mamíferos eutérios, tem sido o principal modelo de estudo dos mecanismos da ICX, devido a fácil obtenção, manejo e manutenção, além do ciclo de vida ser curto e as características fisiológicas semelhantes com a espécie humana (ESCAMILLA-DEL-ARENAL; DA ROCHA; HEARD, 2011). O processo de inativação é altamente regulado, determinado primeiramente ao longo do desenvolvimento embrionário e se mantém estável durante a vida adulta (PATRAT; OUIMETTE; ROUGEULLE, 2020).

Em camundongos, o início da ICX é *imprinted*, e o Xp no estágio embrionário de 4 células é predominantemente inativado (HUYNH; LEE, 2003; NAVARRO; CHAMBERS; KARWACKI-NEISIUS; CHUREAU *et al.*, 2008; OKAMOTO; OTTE; ALLIS; REINBERG *et al.*, 2004), provavelmente porque está relacionado ao processo de Inativação dos Cromossomos Sexuais Meióticos (MSCI) que ocorre durante a fase de paquíteno na espermatogênese reprimindo transcricionalmente os genes ligados aos cromossomos X e Y (TURNER, 2007). Após o final da meiose, os cromossomos X e Y não se reativam totalmente e 85% dos genes encontram-se suprimidos no cromossomo X (NAMEKAWA; PARK; ZHANG; SHIMA *et al.*, 2006). Então, essa “cromatina sexual pós-meiótica” recebe várias marcas heterocromáticas (NAMEKAWA; PARK; ZHANG; SHIMA *et al.*, 2006; TURNER; MAHADEVAIAH; ELLIS; MITCHELL *et al.*, 2006) e devido a isso, é atribuído ao Xp um estado de “pré-inativação” quando o ovócito é fecundado (HUYNH; LEE, 2003; 2005). Essa inativação do Xp no estágio de peri-implantação se mantém nas células do trofoectoderma (TE), que dão origem aos tecidos extraembrionários, mas na massa celular interna (MCI) do blastocisto ele é reativado, possibilitando que a cromatina seja remodelada e posteriormente ocorra a inativação aleatória do cromossomo X (OKAMOTO; OTTE; ALLIS; REINBERG *et al.*, 2004; TAKAGI; SASAKI, 1975).

Em seguida, ocorre uma segunda etapa de reativação do cromossomo X. As células germinativas primordiais (CGP) que se originam da MCI passam por uma reprogramação epigenética a qual causa a reativação do cromossomo Xi (DE NAPOLES; NESTEROVA; BROCKDORFF, 2007). Deste modo, nas CGP os dois cromossomos X (Xp e Xm) continuam ativos e recebem uma marca

*imprinted*, denominada trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) para que o futuro cromossomo Xm não seja inativado após a fecundação (DE NAPOLES; NESTEROVA; BROCKDORFF, 2007; INOUE; JIANG; LU; ZHANG, 2017; LEE, 2011).

Ao analisar células-tronco embrionárias de camundongos fêmeas, observou-se uma ausência da expressão de *XIST* nos dois cromossomos X (BRUCK; BENVENISTY, 2011). Com isso, os dois cromossomos se encontram ativos e apenas ao longo da diferenciação celular é que a inativação ocorre de forma aleatória. Esse silenciamento da expressão de *XIST* pode estar relacionado com a presença de fatores de pluripotência existentes em células-tronco embrionárias ligados ao primeiro íntron de *XIST*, como SOX2, OCT4 e NANOG (NAVARRO; CHAMBERS; KARWACKI-NEISIUS; CHUREAU *et al.*, 2008).

Apesar do padrão de ICX ser bem conhecido na espécie murina, pouco se sabe sobre a inativação em outras espécies placentárias. Em humanos, ao contrário do que acontece nos camundongos, a ICX não é *imprinted*. O *XIST* é expresso no estágio de 4-8 células nos dois cromossomos X, tanto nas células da MCI como nas células do trofoectoderma e ambos os cromossomos X encontram-se ativos, demonstrando que a ICX pode acontecer em um momento mais tardio do desenvolvimento em relação aos camundongos (OKAMOTO; PATRAT; THÉPOT; PEYNOT *et al.*, 2011). Além dos humanos, equinos e coelhos também possuem característica de ICX aleatória (DENG; BERLETCH; NGUYEN; DISTECHE, 2014; ESCAMILLA-DEL-ARENAL; DA ROCHA; HEARD, 2011).

Em bovinos ainda se tem poucas informações na literatura sobre o processo da ICX em relação ao que é encontrado em camundongos. Com isso, o padrão da ICX em bovinos ainda não está bem definido. Foi observado que a ICX é *imprinted* na placenta, sendo que alguns autores sugerem um *imprinted* paterno, ou seja, o alelo paterno silenciado (DINDOT; KENT; EVERS; LOSKUTOFF *et al.*, 2004; XUE; TIAN; DU; KUBOTA *et al.*, 2002) e outros relatam *imprinted* materno (DINDOT; KENT; EVERS; LOSKUTOFF *et al.*, 2004). No entanto, outros trabalhos relatam que a ICX possui um caráter aleatório (MENDONÇA; SILVEIRA; RIOS; MANGIAVACCHI *et al.*, 2019; SU; YANG; WANG; LI *et al.*, 2011).

A expressão do *XIST* e o silenciamento dos genes ligados ao cromossomo

X são as principais consequências da ICX (YU; VAN TOL; STOUT; ROELEN, 2020). Dependendo da espécie, o início da ICX acontece em momentos distintos durante o desenvolvimento embrionário (OKAMOTO; PATRAT; THÉPOT; PEYNOT *et al.*, 2011). Em bovinos, por exemplo, o genoma embrionário é ativado por volta de 8 a 16 células (MORGAN; SANTOS; GREEN; DEAN *et al.*, 2005), e alguns estudos mostram que a transcrição do *XIST* acontece em momentos próximos a essa ativação, principalmente em embriões fêmeas, no estágio de 8 células (YU; VAN TOL; STOUT; ROELEN, 2020) e por volta de 16-32 células (RUDDOCK; WILSON; COONEY; KORFIATIS *et al.*, 2004). No entanto, transcritos do *XIST* foram detectados em embriões bovinos a partir do estágio de 2 células o que sugere ser herança materna (MENDONÇA; SILVEIRA; RIOS; MANGIAVACCHI *et al.*, 2019). Além disso, o transcrito do gene *XIST* bovino sofre *splicing* alternativo e é capaz de originar três variantes, denominadas de X1 (XR\_001495594.2), X2 (XR\_001495596.2) e X3 (XR\_001495595.2), as quais são geradas de maneira específica, dependendo da região/tecido e do sexo.

Devido à heterogeneidade que os resultados dos trabalhos realizados possuem fica entendido como é necessário mais estudos para uma melhor compreensão dos processos da ICX em bovinos. Até porque a espécie bovina possui uma grande importância econômica e o uso das técnicas de reprodução assistida (TRAs) estão sendo cada vez mais utilizadas. Porém, o uso das TRAs pode prejudicar e alterar mecanismos epigenéticos os quais são sensíveis a efeitos ambientais externos como o cultivo *in vitro*, e assim, afetar a ICX e o desenvolvimento embrionário inicial. Dessa forma, é necessário caracterizar e entender como o processo da ICX ocorre em bovinos para assim poder fornecer subsídios para o desenvolvimento das TRAs, como por exemplo, o uso de marcadores moleculares para a qualidade do embrião.

### 1.3 O GENE *XIST*

No início dos anos 90, foi descoberto um dos primeiros lncRNAs no Centro de Inativação do Cromossomo X (XIC) chamado de Transcrito específico do X inativo (*XIST*) (BROWN; BALLABIO; RUPERT; LAFRENIERE *et al.*, 1991; BROWN; LAFRENIERE; POWERS; SEBASTIO *et al.*, 1991). O gene *XIST* é um lncRNA e por isso ele não codifica proteína. Porém, seu RNA é transcrito e processado no cromossomo X a ser inativado (Xi) (BROWN; HENDRICH; RUPERT; LAFRENIÈRE *et al.*, 1992). Devido ele ser localizado exclusivamente no Xi, sugeriu-se que o *XIST* poderia estar associado com o processo de silenciamento cromossomal e ser essencial para a inativação acontecer (PENNY; KAY; SHEARDOWN; RASTAN *et al.*, 1996).

O lncRNA *XIST* de camundongos possui de 15 – 17 Kb de comprimento, pode sofrer *splicing* alternativo e ser poliadenilado (BROCKDORFF; ASHWORTH; KAY; COOPER *et al.*, 1991; BROCKDORFF; ASHWORTH; KAY; MCCABE *et al.*, 1992; BROWN; HENDRICH; RUPERT; LAFRENIÈRE *et al.*, 1992) e se acumula em *cis* no cromossomo X a ser inativado, recrutando fatores que modificam a cromatina para reprimir a expressão dos genes ligados ao cromossomo X (BROWN; HENDRICH; RUPERT; LAFRENIÈRE *et al.*, 1992; LEE; JAENISCH, 1997). De maneira tecido ou sexo-dependente, diferentes isoformas do lncRNA *XIST* podem ser geradas devido ao *splicing* alternativo (BROWN; HENDRICH; RUPERT; LAFRENIÈRE *et al.*, 1992; MA; STRAUSS, 2005; MEMILI; HONG; KIM; ONTIVEROS *et al.*, 2001).

Assim que ocorre o “espalhamento” do lncRNA *XIST* ao longo do cromossomo X a ser inativado, as primeiras modificações que ocorrem na cromatina são a desmetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3), a desacetilação da histona H4 (H4ac), a desacetilação na lisina 9 da histona H3 (H3K9ac) e a desacetilação na lisina 27 da histona H3 (H3K27ac) (CHAUMEIL; OKAMOTO; GUGGIARI; HEARD, 2002; ŻYLICZ; BOUSARD; ŽUMER; DOSSIN *et al.*, 2019). Além disso, o lncRNA *XIST* recruta para o cromossomo X a ser inativado alguns modificadores de cromatina, entre eles os Complexos Repressivo *Polycomb*, como o PRC1 e PRC2, que catalizam modificações pós-traducionais de histonas como a ubiquitinação da lisina 119 da histona H2A

(H2AK119ub1) e a trimetilação na lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), respectivamente (BROCKDORFF, 2017); assim como proteínas de ligação ao RNA (RBPs), metiltransferases de DNA e várias outras proteínas modificadoras de cromatina. Todas essas alterações na cromatina são responsáveis por manter estável o silenciamento gênico ao longo do cromossomo X inativo (ŻYLICZ; BOUSARD; ŽUMER; DOSSIN *et al.*, 2019).

Ao analisar sequências do lncRNA *XIST* de camundongos essenciais ao silenciamento, observou-se que o RNA *XIST* possui blocos de regiões repetitivas em tandem, conhecidas como *repeats* de A – F (SADO; BROCKDORFF, 2013). A ligação do RNA *XIST* em *cis* com o cromossomo X é mediada por várias dessas regiões ao longo do transcrito e dentre essas regiões, o *Repeat A (RepA)* se mostrou indispensável para o silenciamento, enquanto outras regiões regulam a localização do lncRNA *XIST* e são encarregados de espalhá-lo ao longo do X a ser inativado. (WUTZ; RASMUSSEN; JAENISCH, 2002).

A região *RepA*, localizada dentro do éxon 1 do gene *XIST*, transcreve o lncRNA *RepA* o qual é fundamental para a ativação transcricional do gene *XIST* e o início do silenciamento do cromossomo X, pois o RNA *RepA* se liga a subunidades do PRC2 como EZH2 e SUZ12 e recruta proteínas repressivas do complexo Polycomb para o cromossomo X a ser inativado (ZHAO; SUN; ERWIN; SONG *et al.*, 2008). Em seguida, o *Repeat B*, presente no RNA *XIST*, estabiliza essas proteínas durante a fase de manutenção do silenciamento gênico no cromossomo Xi, fazendo com que o RNA *RepA* não seja mais necessário (COLOGNORI; SUNWOO; WANG; WANG *et al.*, 2020).

Outros lncRNAs fazem parte do XIC, como o *TSIX*, um lncRNA de 40 kb em camundongos, antisense e repressor de *XIST*, caracterizado em 1999 (LEE; DAVIDOW; WARSHAWSKY, 1999), regulado pelo *X-inactivation intergenic transcription elements (XITE)* situado cerca de 20 a 30 kb downstream de *XIST* (OGAWA; LEE, 2003). *TSIX* também atua em *cis* e é essencial para regular as primeiras etapas antes da ICX, como a definição da escolha do cromossomo X que vai ser inativado (LEE; DAVIDOW; WARSHAWSKY, 1999).

*TSIX* enriquece a região promotora de *XIST* com marcas epigenéticas repressivas, como a trimetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) e metilação do DNA, formando um padrão heterocromático no promotor de *XIST* e estabelece

marcas epigenéticas ativadoras como a dimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me2) e a repressão da trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) nas regiões ao longo do *XIST*, promovendo assim um padrão de eucromatina (NAVARRO; PAGE; AVNER; ROUGEULLE, 2006) (SUN; DEATON; LEE, 2006). Com isso, o *XIST* fica impedido de transcrever. Em contrapartida, quando o *TSIX* é regulado negativamente, o promotor de *XIST* é enriquecido com fatores relacionados a cromatina aberta, como a H3K4me2 e a acetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9ac) (NAVARRO; PAGE; AVNER; ROUGEULLE, 2006). Dessa maneira, a ausência de *TSIX*, associada à expressão de *XIST* determina a escolha de qual cromossomo X deve ser inativado. (LEE; DAVIDOW; WARSHAWSKY, 1999; LEE; LU, 1999).

Outro elemento que faz parte do XIC é o *expressed neighbour of XIST* (ENOX/*JPX*), um ncRNA transcrito em sentido oposto de *XIST* que atua em *trans* e se encontra a aproximadamente 10 kb *upstream* do *XIST* de camundongos. *JPX* é um gene que escapa da inativação e é fundamental para a ativação do *XIST*, a qual acontece por meio da ligação do RNA *JPX* à proteína CTCF (JOHNSTON; NEWALL; BROCKDORFF; NESTEROVA, 2002; SUN; DEL ROSARIO; SZANTO; OGAWA *et al.*, 2013; TIAN; SUN; LEE, 2010).

O CTCF é uma proteína de ligação ao DNA e desempenha um papel importante, pois se liga ao promotor do *XIST*, servindo como repressor do mesmo. A proteína CTCF e o RNA *JPX* se interagem de forma antagônica, de modo que no início da ICX o RNA *JPX* é superexpresso e se liga a CTCF retirando-a do promotor de *XIST* e assim permitindo que o *XIST* seja transcrito nesse mesmo cromossomo. Da mesma maneira, quando o CTCF está superexpresso, ele diminui a regulação positiva do *XIST*, servindo como um fator de bloqueio. Desta forma, a transcrição do lncRNA *XIST* é regulada pelas interações que acontecem entre o seu promotor, o CTCF e o *JPX* (SUN; DEL ROSARIO; SZANTO; OGAWA *et al.*, 2013).

O *FTX* é outro ncRNA localizado no XIC de camundongos e regula *XIST* positivamente, alterando a estrutura da cromatina no seu promotor mediante a inibição da metilação do DNA, além de também acumular dimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me2) (CHUREAU; CHANTALAT; ROMITO; GALVANI *et al.*, 2010).

O RNF12 é outro ativador de *XIST*, possui ação em *trans* e codifica a E3 ubiquitina ligase (RLIM) (BARAKAT; GUNHANLAR; PARDO; ACHAME *et al.*, 2011; JONKERS; BARAKAT; ACHAME; MONKHORST *et al.*, 2009). Ele se localiza a 500 kb *upstream* de *XIST* de camundongos e é bem conservado nos mamíferos (SHIN; BOSSENZ; CHUNG; MA *et al.*, 2010). RLIM catalisa a degradação do REX1 para não bloquear o início da ICX, pois REX1 reprime a transcrição de *XIST* e promove a expressão de *TSIX* (BARAKAT; LOOS; VAN STAVEREN; MYRONOVA *et al.*, 2014; GONTAN; ACHAME; DEMMERS; BARAKAT *et al.*, 2012). Com a diminuição da expressão de REX1, o fator de transcrição multifuncional conhecido como Ying Yang 1 (YY1), que é uma proteína *zinc finger*, atua de forma relevante no processo do início e manutenção da ICX, o qual se liga ao promotor de *XIST* e controla a sua transcrição (MAKHLOUF; OUIMETTE; OLDFIELD; NAVARRO *et al.*, 2014). Além disso, YY1 serve como uma ligação para *XIST* ancorar no centro de nucleação do cromossomo Xi para atuar em *cis* (JEON; LEE, 2011).

Em suma, o gene *XIST* é positivamente ou negativamente regulado. O RNA não codificante *XITE* e o antisense *TSIX* reprimem a transcrição de *XIST* (LEE; LU, 1999; OGAWA; LEE, 2003; SADO; WANG; SASAKI; LI, 2001), enquanto o lncRNA *JPX* e a proteína E3 Ubiquitina ligase codificada pelo RNF12 regulam positivamente a transcrição de *XIST* (JONKERS; BARAKAT; ACHAME; MONKHORST *et al.*, 2009; TIAN; SUN; LEE, 2010).

Além disso, o *testes-specific X-linked (TSX)* de camundongo é outro ncRNA que se localiza na região do XIC a 40 kb e é transcrito no sentido oposto de *XIST* (SIMMLER; CUNNINGHAM; CLERC; VERMAT *et al.*, 1996), o qual atua como repressor da transcrição de *XIST* e regulador positivo de *TSIX* (ANGUERA; MA; CLIFT; NAMEKAWA *et al.*, 2011). É pouco conservado nos eutérios; inclusive nos bovinos, humanos e cães trata-se de um pseudogene (CHUREAU; PRISSETTE; BOURDET; BARBE *et al.*, 2002).

Um novo ncRNA, antisense de *XIST*, foi caracterizado em camundongos. É conhecido como *Xist Activating RNA (XistAR)*, e está localizado também no éxon 1 de *XIST*. Ao contrário de *TSIX*, que reprime a transcrição de *XIST* e é expresso no cromossomo X ativo, o *XistAR* é transcrito somente pelo cromossomo X a ser inativado, induzindo a expressão de *XIST* em *cis*, sendo essencial para a ICX

(SARKAR; GAYEN; KUMAR; MACLARY *et al.*, 2015). Outro lncRNA antisense descoberto foi o *X Active Specific Transcript (XACT)*, porém ele foi detectado em humanos e não em camundongos, sendo pouco conservado em mamíferos. O *XACT* se encontra a 40 Mb do XIC e reveste o cromossomo X ativo em células-tronco pluripotente, possuindo a função de proteger o Xa em relação a inativação, regulando a ICX ao longo da embriogênese humana (VALLOT; HURET; LESECQUE; RESCH *et al.*, 2013; VALLOT; PATRAT; COLLIER; HURET *et al.*, 2017; VALLOT; ROUGEULLE, 2013)

Juntos, as interações dos ncRNAs ao longo do desenvolvimento influenciam na expressão dos genes em vários *locus* e com a descoberta do *XIST*, uma nova área de regulação dos lncRNAs foi desenvolvida. Com isso, é possível observar as interações dos lncRNAs no XIC as quais medeiam a ICX. Contudo, é importante mais investigações, pois novos lncRNAs podem ser revelados e determinar em algumas espécies novos mecanismos da ICX.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar a expressão gênica no *locus XIST* na placenta fetal de bovinos.

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Determinar se há expressão sense e antisense ao longo do *locus XIST*, avaliando os exons 1, 4 e 6, em cotilédone da placenta bovina;
- Comparar o perfil da expressão sense e antisense entre placentas de macho e fêmea.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção do material biológico**

Amostras de tecido placentário (cotilédone fetal) de gestações produzidas a partir de inseminação artificial utilizando sêmen sexado foram coletadas de 2 partos de animais da raça Nelore (1 fêmea e 1 macho) imediatamente após a expulsão da placenta. Foram utilizadas tesoura e pinça estéreis para obtenção dos cotilédones fetais, os quais foram colocados em microtubos de 1,5 mL estéreis. Adicionou-se, então, *RNAlater* (Ambion, Austin, TX, USA), em um volume necessário para cobrir todos os fragmentos coletados e em seguida foram acondicionados em gelo até o transporte para o laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, sendo em seguida armazenados a -80°C para posterior extração do RNA.

#### **3.2 Extração de RNA total e tratamento com DNase**

A extração do RNA total das amostras de cotilédone fetal, sendo uma de fêmea e uma de macho, foi conduzida utilizando o kit PureLink™ RNA Mini (Ambion, Austin, TX, USA). Primeiramente, entre 100 a 200 mg de amostra foi macerada em nitrogênio líquido. O pó resultante foi transferido para um microtubo de 2,0 mL e adicionado 1 mL de Trizol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para cada 100 mg de tecido. Os seguintes passos do protocolo foram realizados conforme as recomendações do fabricante, realizando o tratamento com 10U de Dnase durante a extração do RNA (Anexo 1). Ao final, o RNA total purificado foi quantificado e as amostras foram novamente tratadas com RQ1 RNase-Free DNase® (Promega, Madison, WI, USA) a 37°C por 30 minutos, utilizando 2U da enzima para cada 1 µg de RNA total para assegurar que as amostras de RNA total estavam livres de contaminação com DNA genômico. A solução de parada foi adicionada seguindo de um passo de incubação a 65°C por 10 minutos para a inativação da enzima.

### 3.3 Síntese de cDNA

O RNA tratado com DNase (1µg) foi submetido a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando o Kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, W1, USA) para um volume final de 25 µL (Anexo 2).

Foram utilizados *primers* gene-específicos (*forward* ou *reverse*) nas concentrações finais de 0,5 µM para os exons 1, 4 e 6 do gene *XIST*. A sequência de *XIST Bos taurus* possui seis éxons e devido ao *splicing* alternativo é possível encontrar três isoformas: X1 ([XR\\_001495594.2](#)), X2 ([XR\\_001495596.2](#)) e X3 ([XR\\_001495595.2](#)). Os *primers* específicos RepA e bXIST (éxon 1) foram desenhados a partir da sequência de RNA *XIST* de bovinos e é possível encontrar o RepA nas variantes X2 e X3 e bXIST somente na variante X2. Já os *primers* TSIXM (éxon 4) e TSIXU (éxon 6) foram desenhados a partir da sequência reversa e complementar de *XIST* (*GenBank* XR\_001495596.2) nas três variantes (X1, X2, e X3). Representado na figura 3. Para o desenho dos *primers* foi usado a ferramenta IDT Primer Quest software (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>) e Primer-BLAST do NCBI. As sequências dos *primers* gene-específicos estão apresentadas na Tabela 1.

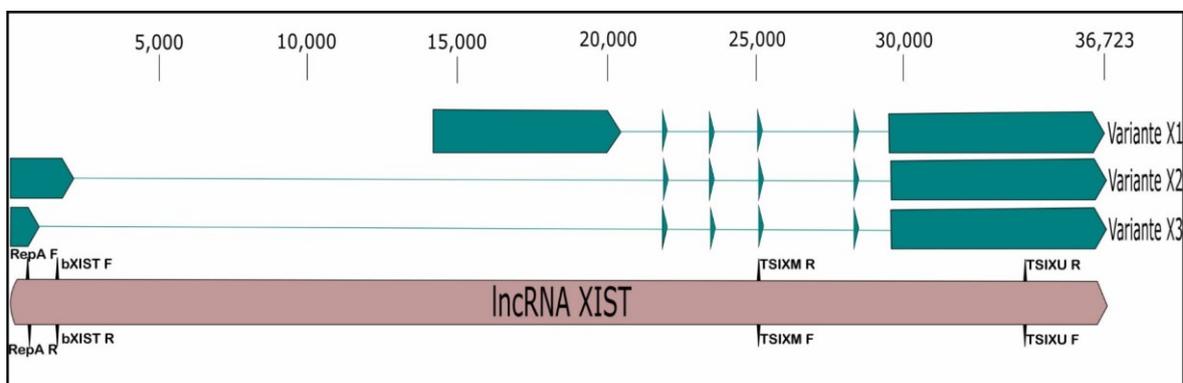
Genes	Sequência dos primers (5'-3')	Concentração dos primers	Tamanho do amplicon
RepA	F: TTTACCCAACGGGGTCATGG R: AGGGGGTACACAGCAGGTAT	200 nM	139 pb
bXIST	F: CTGCCGTGTGCATTTCTG R: AGCACGCCATCTTTAACAATG	200 nM	172 pb
TSIXM	F: GAGTTGTTGCTCAGTGGTAG R: CAGTGTTAGTGACCCATTCC	200 nM	96 pb
TSIXU	F: GGACCAGACTCCACCAAGAAA R: GAAATGGGCCTAGTCTAAAGG	200 nM	159 pb

**Tabela 1- Apresentação dos genes, sequências e concentrações dos primers forward e reverse de cada gene e tamanho dos fragmentos amplificados.**

Como controle positivo, foi realizada a síntese de cDNA utilizando um *primer* Oligo(dT)<sub>15</sub> na concentração final de 0,02µg/µl e *random primers*. Como controle negativo, para comprovar a ausência de contaminação por DNA genômico nas reações de PCR, foi realizada uma reação de síntese de cDNA com *primers* Oligo(dT) e *random primers* na ausência da enzima transcriptase reversa (RT-).

A partir de cada amostra de RNA total, foram sintetizadas 10 amostras distintas de cDNA: 1) cDNA utilizando o *primer* RepA (exon 1) *forward* (RepA F); 2) RepA (exon 1) *reverse* (RepA R); 3) *primer* bXIST (exon 1) *forward* (bXIST F); 4) bXIST (exon 1) *reverse* (bXIST R); 5) *primer* TSIXM (exon 4) *forward* (TSIXM F); 6) TSIXM (exon 4) *reverse* (TSIXM R); 7) *primer* TSIXU (exon 6) *forward* (TSIXU F); 8) TSIXU (exon 6) *reverse* (TSIXU R); 9) *primers* oligo(dT) e 10) *primers* oligo(dT) na ausência da enzima transcriptase reversa (RT-).

Os *primers* específicos para o éxon 1 (RepA e bXIST) foram desenhados a partir da sequência de *XIST*, com isso as ampliações correspondentes aos cDNAs sintetizados a partir dos *primers forward* referem-se a transcritos *antisense*, enquanto aquelas correspondentes aos cDNAs sintetizados a partir dos *primers reverse* referem-se a transcritos *sense*. Por outro lado, os *primers* específicos para o éxon 4 (TSIXM) e éxon 6 (TSIXU), que foram desenhados a partir da sequência reversa e complementar de *XIST*, mostram o contrário. Ou seja, as ampliações correspondentes aos cDNAs sintetizados a partir dos *primers forward* referem-se a transcritos *sense*, enquanto que os sintetizados a partir dos *primers reverse* referem-se a transcritos *antisense*.



**Figura 3- Representação do lncRNA *XIST* e suas três variantes.** Os primers RepA estão presentes nas variantes X2 e X3; os primers bXIST somente na variante X2. Ambos os primers se encontram no éxon 1 de *XIST*. Os primers TSIXM e TSIXU estão presentes nas três variantes, no éxon 4 e éxon 6, respectivamente. Figura adaptada do programa Geneious Prime.

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

Os cDNAs sintetizados com os *primers* fita-específicos e os controles, utilizando oligo(dT), Random e *RT-*, foram utilizados para amplificação por PCR em tempo real. As análises de SS-RT-PCR foram realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA), usando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, USA). As reações de PCR foram preparadas utilizando 12,5 µL de GoTaq®; 0,5 µL do *primer forward* (0,2 µM); 0,5 µL do *primer reverse* (0,2 µM); 2 µL de cDNA e 9,5 µL de H<sub>2</sub>O *nuclease-Free*. O volume final da reação foi de 25 µL e as condições de amplificações foram as seguintes: 95°C por 2 minutos e 30 segundos, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto. Seguidas de uma curva de dissociação (95°C por 15 segundos; 65°C por um minuto; 95°C por 30 segundos e 60°C por 15 segundos). Diferentemente, para os *primers* RepA, as condições de anelamento e extensão foram de 58°C e 72°C por 1 minuto, respectivamente. Os dados de fluorescência foram captados após cada ciclo de extensão.

Foram analisadas a expressão *sense* e *antisense* para as regiões do primeiro (RepA e bXIST), quarto (TSIXM) e sexto (TSIXU) éxons do *locus XIST*. As sequências e concentrações dos *primers* utilizadas nas reações de PCR e os tamanhos dos *amplicons*, para cada região estudada, estão mostrados na tabela 1.

A técnica de SS-RT-PCR utilizada nesse trabalho está esquematizada na Figura 4. Os *amplicons* foram submetidos à eletroforese a uma corrente elétrica constante de 50 mA em gel de agarose 2,0% corado com SYBR Safe 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



as instruções dos fabricantes. A transformação foi realizada em células DH5 $\alpha$  por choque térmico e o produto foi espalhado em placas de petri 90 x 15 mm contendo ágar com ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 40  $\mu\text{L}$  de X-Gal (Sigma) a 20  $\text{mg}/\text{mL}$  e 4  $\mu\text{L}$  de IPTG 0,1 M (Sigma), seguida por inversão das placas e incubação em estufa a 37°C por 14 horas e a 4°C por duas horas.

Duas colônias brancas de cada grupo foram selecionadas para serem cultivadas em meio Luria- Bertani (LB) líquido acrescido de ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Foi utilizado um palito de madeira estéril para a retirada da colônia da placa de cultivo e sua deposição no tubo de 15 mL contendo 3 mL de meio LB. Os tubos permaneceram sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas em agitador (New Brunswick Scientific Co, NJ, USA). Metade do conteúdo dos tubos foi utilizada para extração do plasmídeo, seguindo o protocolo do kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, USA) (Anexo 3). Em seguida os DNA plasmidiais obtidos foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop® (ND-1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA) e armazenados a -20°C até o uso.

### **3.6 Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências**

As amostras de plasmídeo contendo o DNA de interesse foram digeridas com 5 U da enzima *EcoRI* a 50 U/ $\mu\text{L}$ , 1 X de tampão H, 5  $\mu\text{L}$  de DNA e o volume da reação ajustado para 10  $\mu\text{L}$  com água deionizada. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C *overnight*.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0% corado com SYBR Safe 10  $\text{mg}/\text{mL}$  para confirmação da presença dos fragmentos de interesse. Amostras do DNA plasmidial a 80  $\text{ng}/\mu\text{L}$  contendo os insertos foram sequenciadas pelo método de Sanger/metodologia dideoxi utilizando o *primer* universal M13 *reverse*.

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?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização da expressão gênica sense e antisense por SS-RT-PCR para o locus *XIST*

Por meio da PCR em tempo real, os fragmentos foram amplificados e submetidos à eletroforese em gel de agarose e depois da confirmação do tamanho esperado dos *amplicons*, eles foram purificados e sequenciados. Com isso, a identidade dos produtos foi confirmada por três métodos: 1) Por meio do tamanho dos *amplicons* (139 pb para RepA, 172 pb para bXIST, 96 pb para TSIXM e 159 pb para TSIXU); 2) Temperatura de *melting* ( $T_m$ ) ( $\sim 81^\circ\text{C}$  para RepA,  $\sim 84^\circ\text{C}$  para bXIST,  $\sim 80^\circ\text{C}$  para TSIXM e  $\sim 77^\circ\text{C}$  para TSIXU) e 3) Sequenciamento.

Os resultados a seguir demonstram a amplificação de transcritos *sense* e *antisense* dos cotilédones fetais de fêmea. No éxon 1 de *XIST*, houve amplificação do controle positivo, o qual usou cDNA sintetizado com Oligo(dT) e *random primers*, além dos cDNAs sintetizados com *primers*-específicos RepA *forward* e RepA *reverse*, com tamanho do *amplicon* de 139 pares de bases. Os cDNAs sintetizados com oligo(dT) e *Random primers* referentes ao controle positivo, validaram as amplificações *primers*-específicas. Para o cDNA sintetizado na ausência da transcriptase reversa, usado como controle negativo, houve apenas uma amplificação inespecífica, comprovada pelo tamanho do *amplicon* e a temperatura de *melting* (Figura 5).

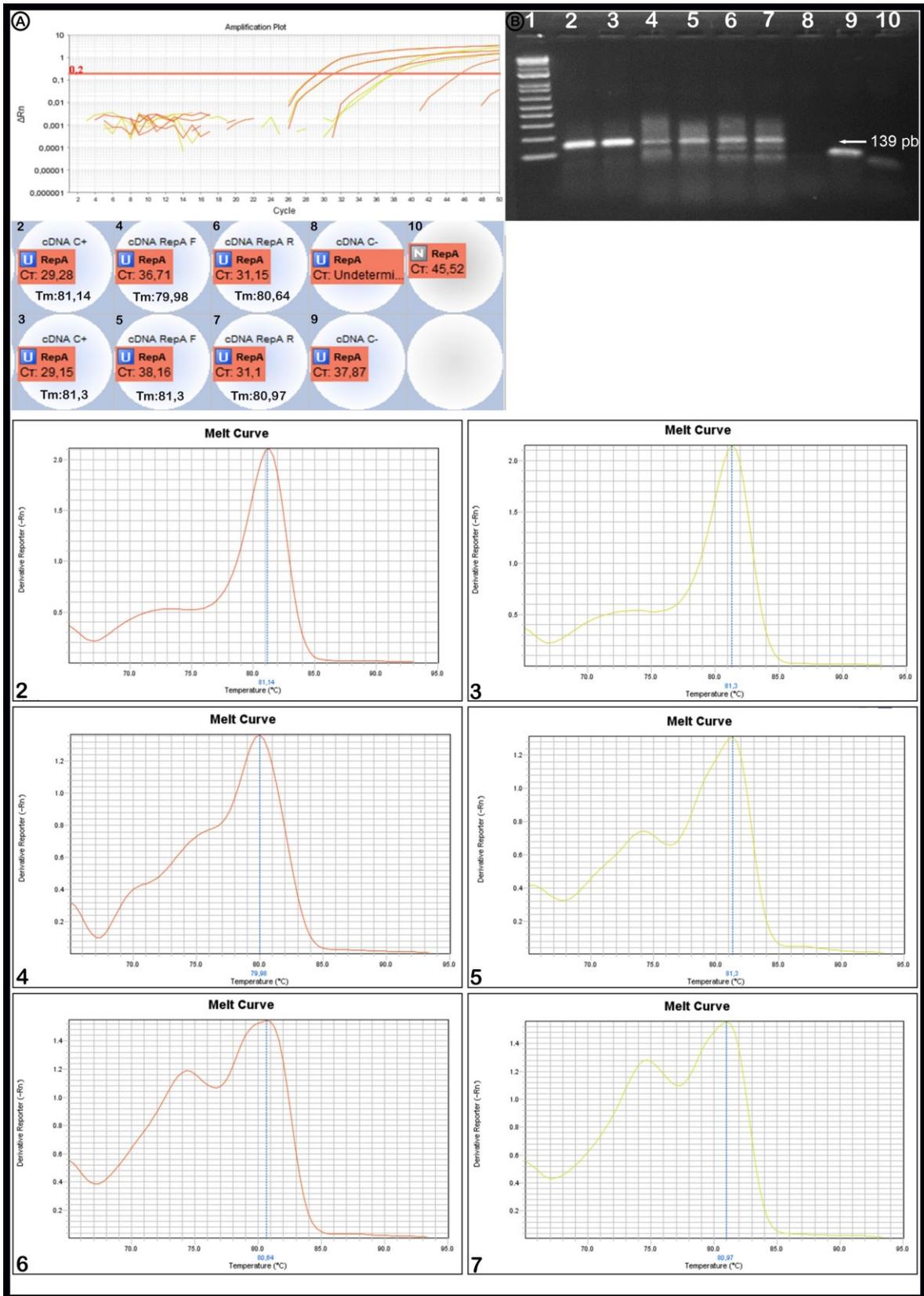
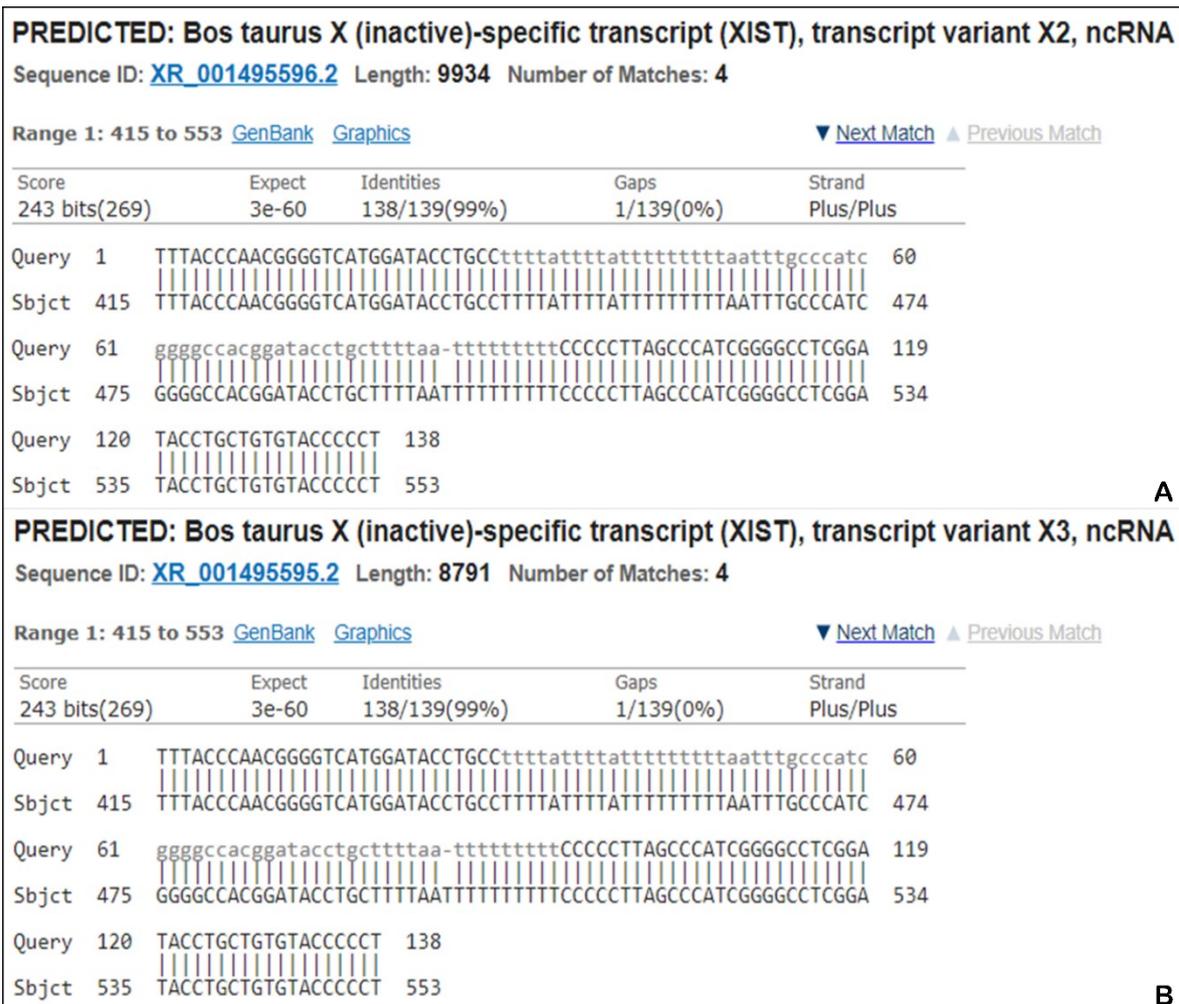


Figura 5- Resultado da SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) relacionado com a presença de transcritos sense e

**antisense utilizando os primers RepA (éxon 1) no locus XIST no cotilédone fetal de fêmea.** (A) Curvas de amplificação e valores de Ct (*threshold cycle*) a partir de cDNA sintetizado com oligo(dT) e *random primers* (C+); cDNA com *primers* gene-específicos *forward* (RepA F) e *reverse* (RepA R) e cDNA sem a presença da transcriptase reversa (C-). As amostras estão em duplicatas. (B) Eletroforese em gel de agarose 2%, demonstrando o marcador 1 kb Plus DNA Ladder-Invitrogen (1), amplificações do C+ (2-3), RepA F (4-5), RepA R (6-7), C- (8-9) e branco (10). Tamanho do *amplicon* é de 139 pares de bases. Curvas de melting dos *amplicons* C+ (2-3), RepA *Forward* (4-5) e RepA *Reverse* (6-7).

Os *amplicons* foram sequenciados e para analisar os resultados foi usada a ferramenta BLASTN, comparando os resultados do sequenciamento com sequências referências depositadas no *GenBank* (Figura 6). Os *amplicons* do éxon 1 (RepA) sequenciados mostraram uma identidade de 99% com as sequências X2 e X3 do transcrito *XIST* bovino. Os resultados confirmam que houve expressão *sense* (*XIST*) (referente ao cDNA sintetizado com *primers reverse*) e *antisense* (a partir de cDNA sintetizado com *primers forward*) no éxon 1 do gene *XIST* em cotilédone fetal de fêmea.



**Figura 6-** Alinhamento dos *amplicons* do C+, sense e antisense do éxon 1 (RepA) do *locus XIST* em cotilédone fetal de fêmea nas variantes X2 (A) e X3 (B), utilizando a ferramenta BLASTN. As sequências dos *amplicons* do C+, RepA F e RepA R foram alinhadas com as sequências depositadas no *GenBank*.

Também no éxon 1 do gene *XIST*, agora utilizando os *primers* bXIST, houve amplificação do controle positivo, o qual usou cDNA sintetizado com Oligo(dT) e *random primers*, além dos cDNAs sintetizados com *primers*-específicos bXIST *forward* e bXIST *reverse*, com tamanho do *amplicon* de 172 pares de bases. As amplificações do controle positivo validaram as amplificações *primers*-específicas e o controle negativo e branco confirmam a ausência de contaminação por DNA genômico (Figura 7).

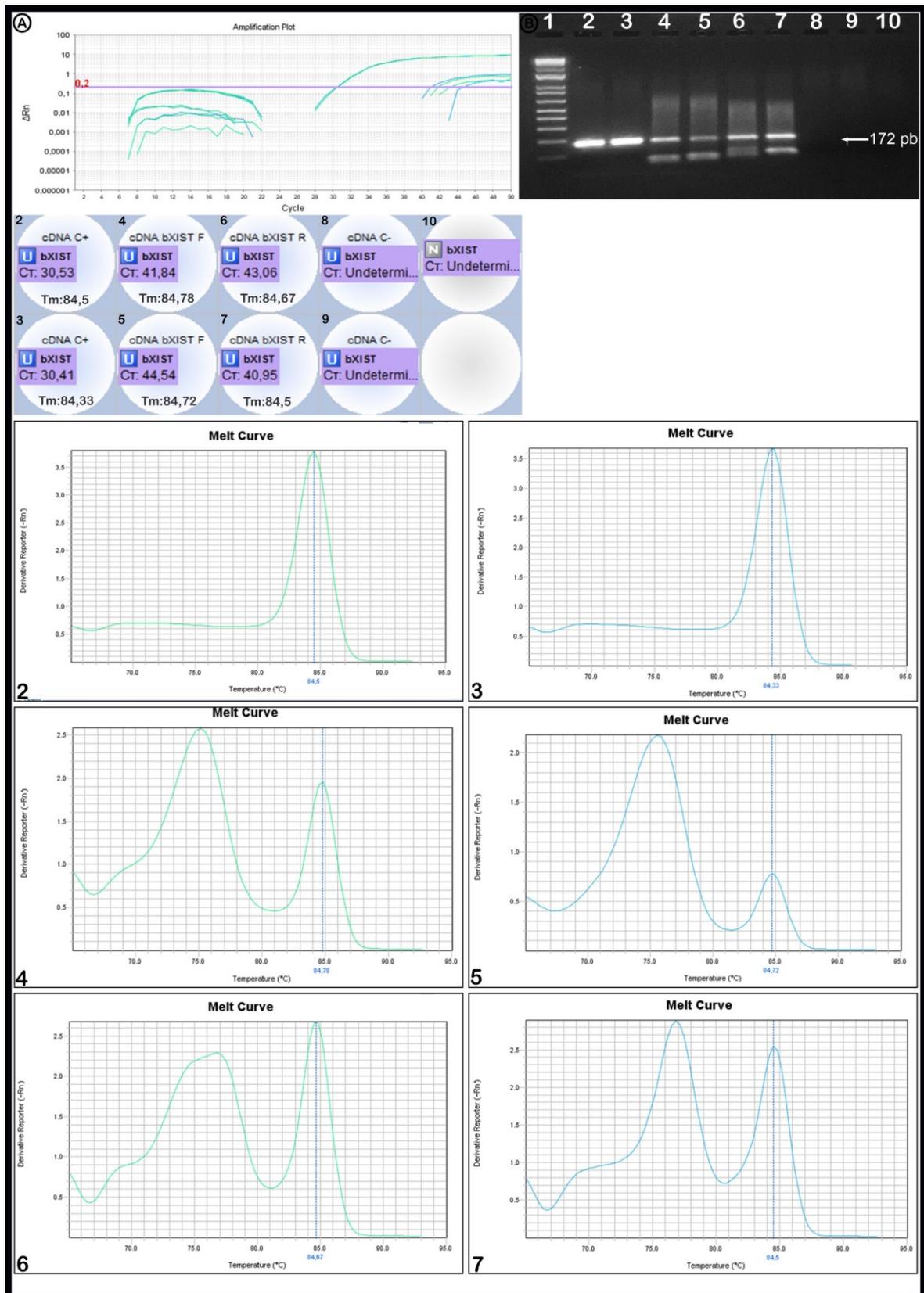


Figura 7- Resultado da SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando *primers* bXIST (éxon 1) no *locus XIST* no cotilédone fetal de

**fêmea.** (A) Curvas de amplificação e valores de Ct (*threshold cycle*) a partir de cDNA sintetizado com oligo(dT) e *random primers* (C+); cDNA com *primers* gene-específicos *forward* (bXIST F) e *reverse* (bXIST R) e cDNA sem a presença da transcriptase reversa (C-). As amostras estão em duplicata. (B) Eletroforese em gel de agarose 2%, demonstrando o marcador 1 kb Plus DNA Ladder-Invitrogen (1), ampliações do C+ (2-3), bXIST F (4-5), bXIST R (6-7), C- (8-9) e branco (10). Tamanho do *amplicon* é de 172 pares de bases. Curvas de melting dos *amplicons* C+ (2-3), bXIST *Forward* (4-5) e bXIST *Reverse* (6-7).

Os *amplicons* foram sequenciados e para analisar os resultados foi usada a ferramenta BLASTN, comparando os resultados do sequenciamento com sequências referências depositadas no *GenBank* (Figura 8). Os *amplicons* do éxon 1 (bXIST) sequenciados possuíram uma identidade de 100% com a sequência X2 do transcrito *XIST* bovino. Esses resultados confirmam que houve expressão *sense* (referente ao cDNA sintetizado com *primers reverse*) e *antisense* (a partir de cDNA sintetizado com *primers forward*) para essa posição do éxon 1 do gene *XIST* em cotilédone fetal de fêmea.

PREDICTED: Bos taurus X (inactive)-specific transcript (XIST), transcript variant X2, ncRNA				
Sequence ID: <a href="#">XR_001495596.2</a> Length: 9934 Number of Matches: 1				
Range 1: 1424 to 1595 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a>			▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
311 bits(344)	8e-81	172/172(100%)	0/172(0%)	Plus/Minus
Query 1	AGCACGCCATCTTTAACAATGCGGCAGGCCCTCCTGATGCAAAGCCCGCCAAGAATGTAA			60
Sbjct 1595	AGCACGCCATCTTTAACAATGCGGCAGGCCCTCCTGATGCAAAGCCCGCCAAGAATGTAA			1536
Query 61	CGGTCAAACACCCCTGCCACGATATCCACGTGACAAACTGCCATGATATCCACATGACAA			120
Sbjct 1535	CGGTCAAACACCCCTGCCACGATATCCACGTGACAAACTGCCATGATATCCACATGACAA			1476
Query 121	GGTCAGCCATATTGTCCTGCAGCAAAACCTATCAGGAAATGCACACGGCAG			172
Sbjct 1475	GGTCAGCCATATTGTCCTGCAGCAAAACCTATCAGGAAATGCACACGGCAG			1424

**Figura 8-** Alinhamento dos *amplicons* do C+, *sense* e *antisense* do éxon 1 (bXIST) do *locus XIST* em cotilédone fetal de fêmea na variante X2, utilizando a ferramenta BLASTN. As sequências dos *amplicons* do C+, bXIST F e bXIST R foram alinhadas com as sequências depositadas no *GenBank*.

No éxon 4 do *locus XIST* houve amplificação do controle positivo, o qual usou cDNA sintetizado com Oligo(dT) e *random primers*, além dos cDNAs sintetizados com os *primers*-específicos TSIXM *forward* e TSIXM *reverse*, com

tamanho do *amplicon* de 96 pares de bases. Com isso, observa-se pelo gel de agarose que as bandas das amostras que utilizaram cDNA sintetizado com o *primer* TSIXM *reverse* não estão muito bem definidas e demonstram ser um pouco maiores que 96 pb. Além disso, a temperatura de *melting* desses transcritos também está mais elevada, em comparação aos controles positivos e as amostras que utilizaram cDNA sintetizado com o *primer forward*. As amplificações do controle positivo validaram as amplificações *primers*-específicas e os controles negativos (RT- e PCR na ausência de cDNA) confirmaram a ausência de contaminação por DNA genômico ou cDNA. Todos esses resultados estão apresentados na figura 9.

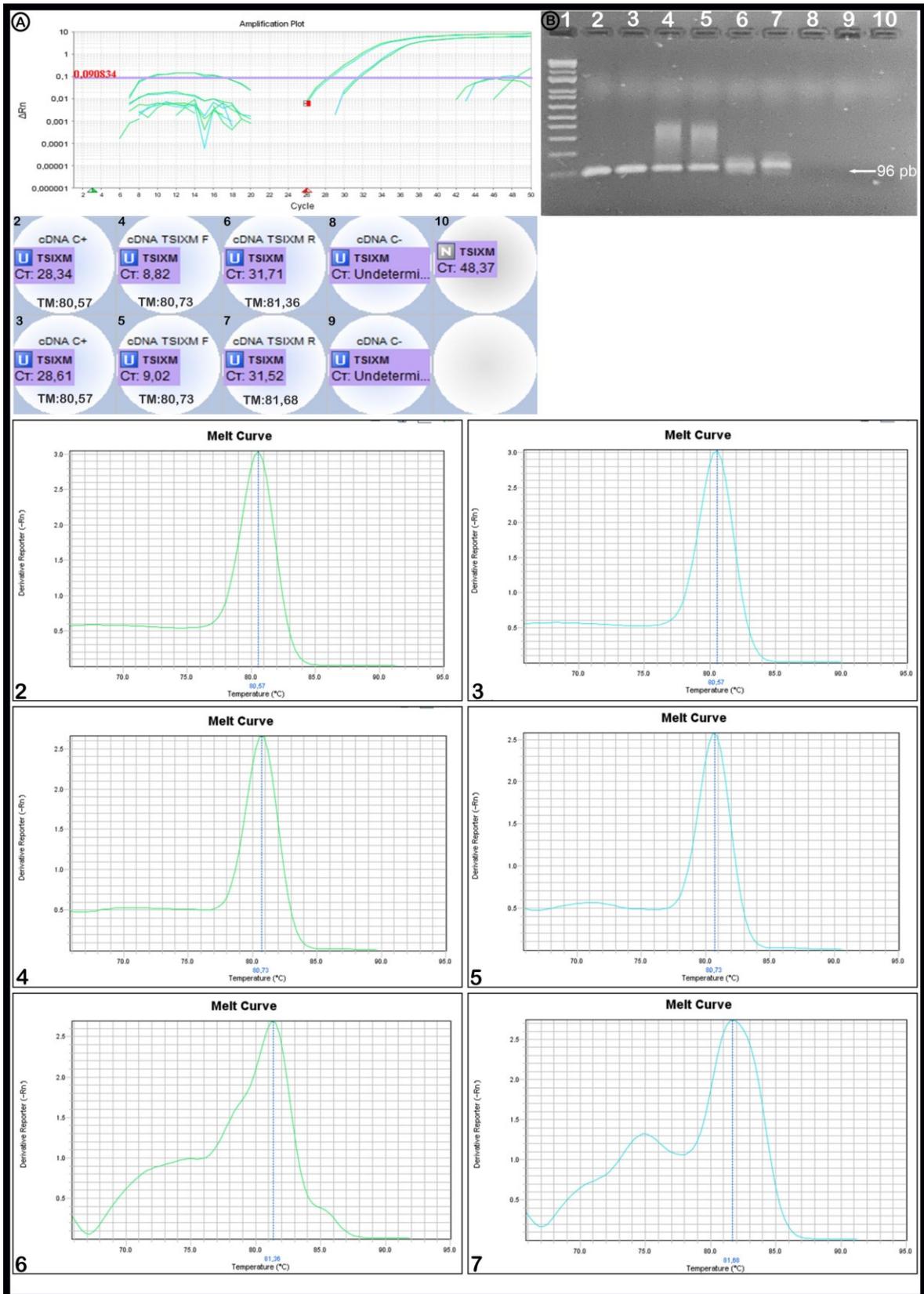


Figura 9- Resultado da SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando *primers* TSIXM (éxon 4) no *locus XIST* no cotilédone fetal de

**fêmea.** (A) Curvas de amplificação e valores de Ct (*threshold cycle*) a partir de cDNA sintetizado com oligo(dT) e *random primers* (C+); cDNA com *primers* gene-específicos *forward* (TSIXM F) e *reverse* (TSIXM R) e cDNA sem a presença da transcriptase reversa (C-). As amostras estão em duplicata. (B) Eletroforese em gel de agarose 2%, demonstrando o marcador 1 kb Plus DNA Ladder-Invitrogen (1), ampliações do C+ (2-3), TSIXM F (4-5), TSIXM R (6-7), C- (8-9) e branco (10). Tamanho do *amplicon* é de 96 pares de bases. Curvas de melting dos amplicons C+ (2-3), TSIXM *Forward* (4-5) e TSIXM *Reverse* (6-7).

Os *amplicons* foram sequenciados e as amostras do controle positivo e TSIXM *forward* apresentaram 100% de identidade com as sequências do transcrito *XIST* bovino das três variantes (X1, X2 e X3) (Figura 10). Porém, o resultado do sequenciamento das amostras que utilizaram cDNA sintetizados com o *primer reverse*, não alinhou com nenhuma sequência de *XIST* depositada no *GenBank*. Entretanto, obteve 93% de identidade com a sequência “*Ovis canadensis isolate 43U* do cromossomo 17”. Assim, os resultados indicam que houve expressão de transcritos sense (referente ao cDNA sintetizado com o *primer forward*), mas não houve detecção de transcritos antisense (a partir de cDNA sintetizado com o *primer reverse*) no éxon 4 do gene *XIST* em cotilédone fetal de fêmea.

**PREDICTED: Bos taurus X (inactive)-specific transcript (XIST), transcript variant X1, ncRNA**

Sequence ID: [XR\\_001495594.2](#) Length: 14055 Number of Matches: 1

Range 1: 6526 to 6621 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
174 bits(192)	6e-40	96/96(100%)	0/96(0%)	Plus/Minus
Query 1	GAGTTGTTGCTCAGTGGTAGTGAATCTTTCCCTGGAGGATCCTCATGCCCATCTCCAC	60		
Sbjct 6621	GAGTTGTTGCTCAGTGGTAGTGAATCTTTCCCTGGAGGATCCTCATGCCCATCTCCAC	6562		
Query 61	CTAGGAATCGTCAAAGGGAATGGGTCCTAATAACTG	96		
Sbjct 6561	CTAGGAATCGTCAAAGGGAATGGGTCCTAATAACTG	6526		

A

**PREDICTED: Bos taurus X (inactive)-specific transcript (XIST), transcript variant X2, ncRNA**

Sequence ID: [XR\\_001495596.2](#) Length: 9934 Number of Matches: 1

Range 1: 2405 to 2500 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
174 bits(192)	6e-40	96/96(100%)	0/96(0%)	Plus/Minus
Query 1	GAGTTGTTGCTCAGTGGTAGTGAATCTTTCCCTGGAGGATCCTCATGCCCATCTCCAC	60		
Sbjct 2500	GAGTTGTTGCTCAGTGGTAGTGAATCTTTCCCTGGAGGATCCTCATGCCCATCTCCAC	2441		
Query 61	CTAGGAATCGTCAAAGGGAATGGGTCCTAATAACTG	96		
Sbjct 2440	CTAGGAATCGTCAAAGGGAATGGGTCCTAATAACTG	2405		

B

**PREDICTED: Bos taurus X (inactive)-specific transcript (XIST), transcript variant X3, ncRNA**

Sequence ID: [XR\\_001495595.2](#) Length: 8791 Number of Matches: 1

Range 1: 1262 to 1357 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
174 bits(192)	6e-40	96/96(100%)	0/96(0%)	Plus/Minus
Query 1	GAGTTGTTGCTCAGTGGTAGTGAATCTTTCCCTGGAGGATCCTCATGCCCATCTCCAC	60		
Sbjct 1357	GAGTTGTTGCTCAGTGGTAGTGAATCTTTCCCTGGAGGATCCTCATGCCCATCTCCAC	1298		
Query 61	CTAGGAATCGTCAAAGGGAATGGGTCCTAATAACTG	96		
Sbjct 1297	CTAGGAATCGTCAAAGGGAATGGGTCCTAATAACTG	1262		

C

**Ovis canadensis canadensis isolou a sequência do cromossomo 17 de 43U**

ID de sequência: [CP011902.1](#) Comprimento: 72372754 Número de correspondências: 1

Faixa 1: 44700497 a 44700580 [GenBank](#) [Graphics](#) [Próxima partida](#) [Jog](#)

Ponto	Espero	Identities	Lacunas	Strand
125 bits (138)	3e-25	78/84 (93%)	0/84 (0%)	Mais menos
Consulta 8	TGCTCAGTGGTAGGTAGTCAAGAACTTTCTGCAGGACTGGCCCTAGCCTGTAGTCAA	67		
Sbjct 44700580	TGCCAGTGGTAGGTAGTCAAGAACTTTCTGCAGGACTGGCCCTAGCCTGTAGTCAA	44700521		
Consulta 68	GTGACTAGTCAGAGGAATGG	91		
Sbjct 44700520	GTGACTAGTCAGAGGAATGG	44700497		

D

**Figura 10- Alinhamento dos *amplicons* sense e do C+ do éxon 4 (TSIXM) do locus *XIST* em cotilédone fetal de fêmea nas variantes X1 (A), X2 (B) e X3 (C), utilizando a ferramenta **BLASTN**. A sequência do TSIXM *reverse* não alinhou com nenhuma sequência de *XIST*. No entanto, obteve 93% de identidade com a sequência de *Ovis canadensis* (D).**

No éxon 6 de *XIST*, houve amplificação do controle positivo, o qual usou cDNA sintetizado com Oligo(dT) e *random primers*, bem como das amostras que utilizaram cDNAs sintetizados com o *primer* TSIXU *forward*, com tamanho do *amplicon* de 159 pares de bases. No entanto, as amostras que continham cDNA sintetizado com o *primer* TSIXM *reverse*, não amplificaram. As amplificações do controle positivo validaram as amplificações *primers*-específicas e os controles negativos (RT- e PCR na ausência de cDNA) confirmaram a ausência de contaminação por DNA genômico ou cDNA. Os resultados estão apresentados na figura 11.

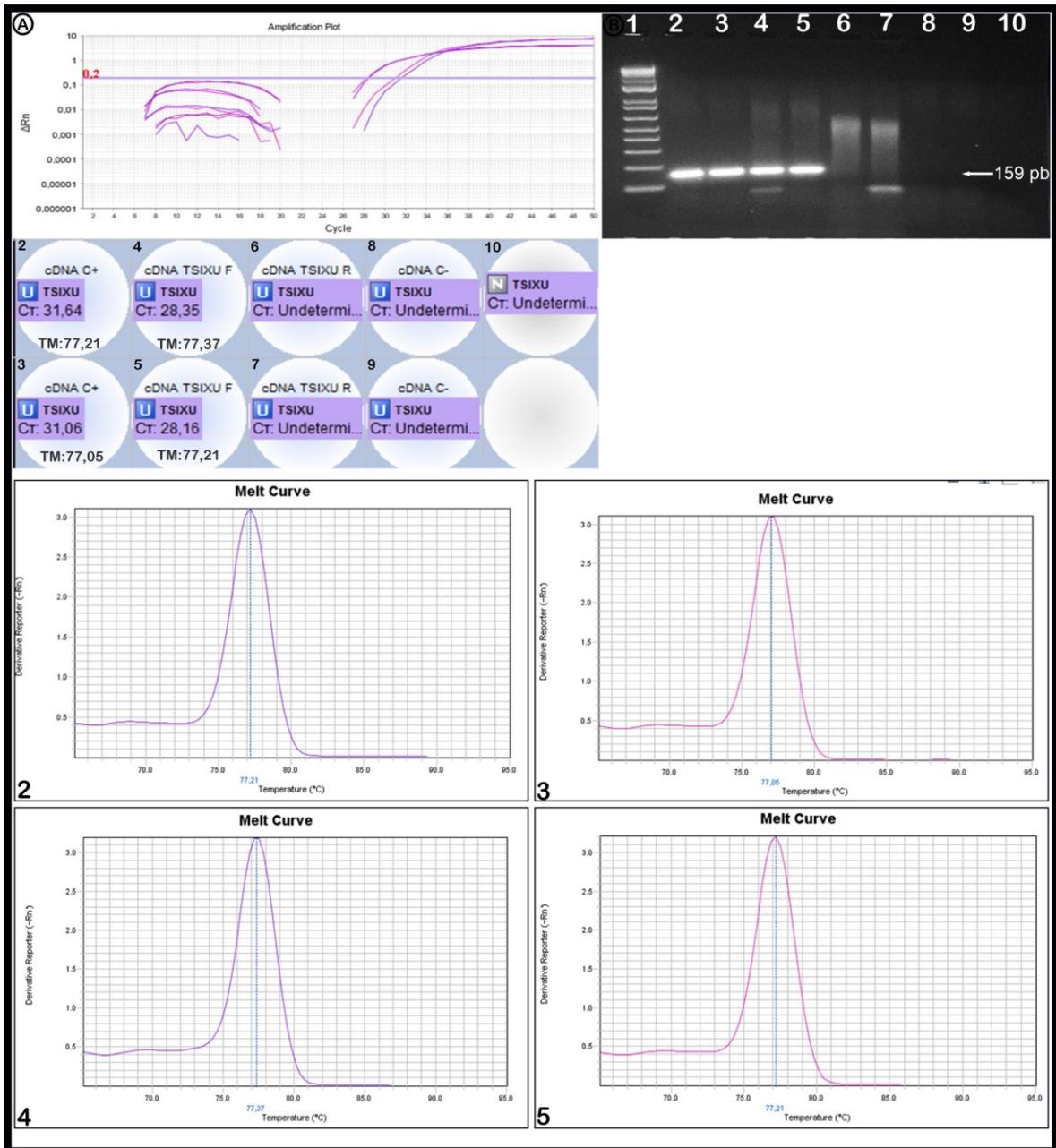
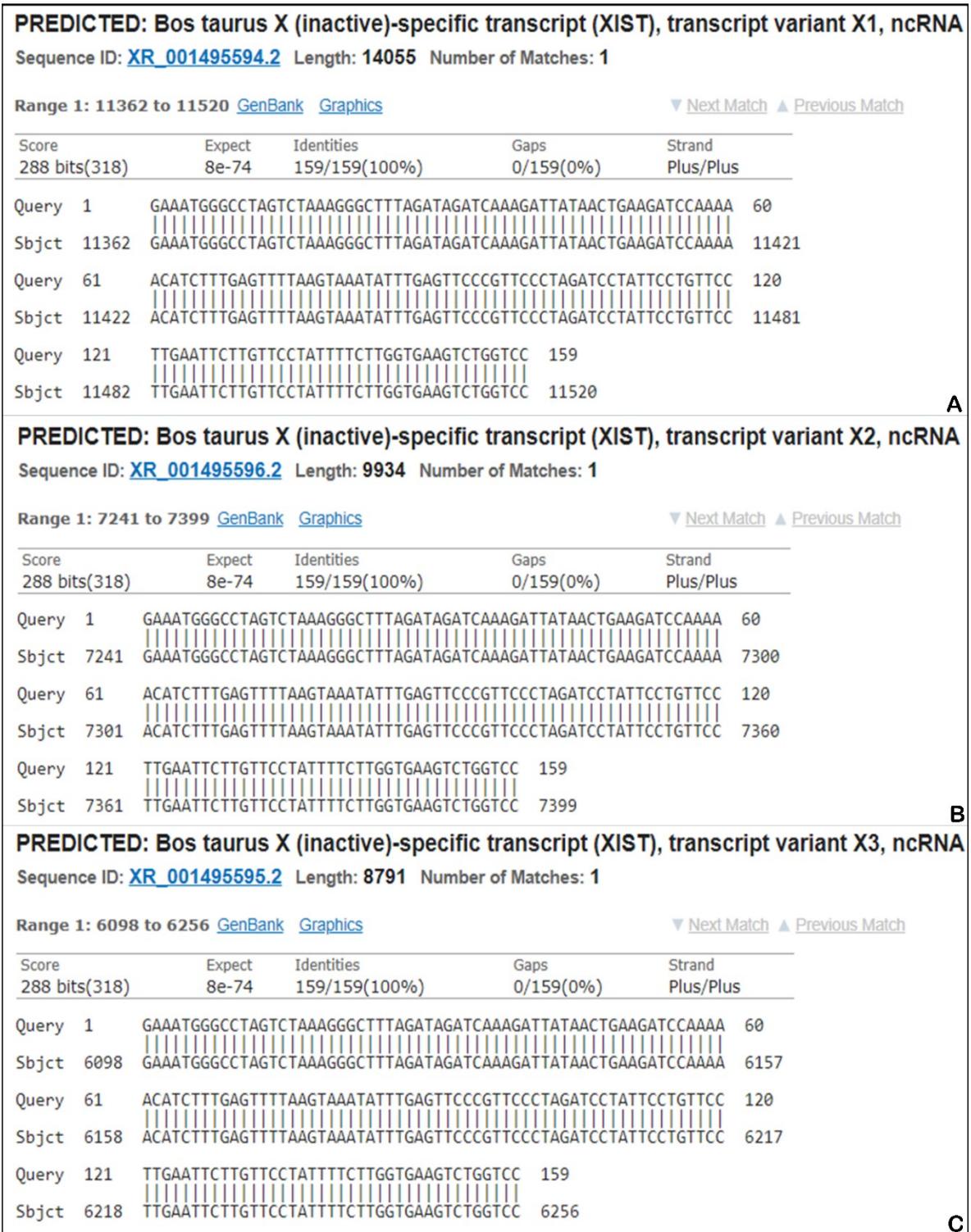


Figura 11- Resultado da SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando *primers* TSIXU (éxon 6) no *locus XIST* no cotilédone fetal de fêmea. (A) Curvas de amplificação e valores de Ct (*threshold cycle*) a partir de cDNA sintetizado com oligo(dT) e *random primers* (C+); cDNA com *primers* gene-específicos *forward* (TSIXU F) e *reverse* (TSIXU R) e cDNA sem a presença da transcriptase reversa (C-). As amostras estão em duplicata. (B) Eletroforese em gel de agarose 2%, demonstrando o marcador 1 kb Plus DNA Ladder-Invitrogen (1), amplificações do C+ (2-3), TSIXU F (4-5), TSIXU R (6-7), C- (8-9) e branco (10). Tamanho do *amplicon* é de 159 pares de bases. Curvas de *melting* dos *amplicons* C+ (2-3) e TSIXU *Forward* (4-5).

Os *amplicons* referentes aos cDNA sintetizados com o primer TSIXU *forward* e do controle positivo foram sequenciados e apresentaram 100% de identidade com as sequências dos transcritos *XIST* bovino das três variantes (X1, X2 e X3) (Figura 12). Dessa forma, os resultados confirmam que houve somente expressão sense (referente ao cDNA sintetizado com o *primer forward*) no éxon 6 do gene *XIST* em cotilédone fetal de fêmea.



**Figura 12-** Alinhamento dos *amplicons* do C+ e sense do éxon 6 (TSIXU) do *locus X1ST* em cotilédone fetal de fêmea nas variantes X1, X2 e X3, utilizando a ferramenta BLASTN.

Em relação aos resultados de cotilédone fetal de macho, observou-se que foram similares com os resultados de fêmea, exceto que para o éxon 1 (RepA e bXIST) do gene *XIST* não foi detectado nenhum transcrito antisense.

No éxon 1 de *XIST*, para RepA, houve amplificação do controle positivo, o qual usou cDNA sintetizado com Oligo(dT) e *random primers*, além dos cDNAs sintetizados com *primers* específicos RepA *forward* e RepA *reverse*. Apesar de todas as amostras terem amplificado, somente as do controle positivo e as que usaram *primer* RepA *reverse* apresentaram uma banda correta com tamanho do *amplicon* de 139 pares de bases. Além disso, as amostras que usaram o *primer* RepA *forward* demonstraram uma temperatura de *melting* um pouco menor em relação aos controles positivos e as amostras que utilizam cDNA sintetizado com *primer reverse*. Os cDNAs sintetizados com oligo(dT) e Random *primers* referentes ao controle positivo, validaram as ampliações *primers*-específicas e a não existência de amplificação dos controles negativos (RT- e PCR na ausência de cDNA) confirmaram que não ocorreu contaminação por DNA genômico ou cDNA. Os resultados estão apresentados na figura 13.

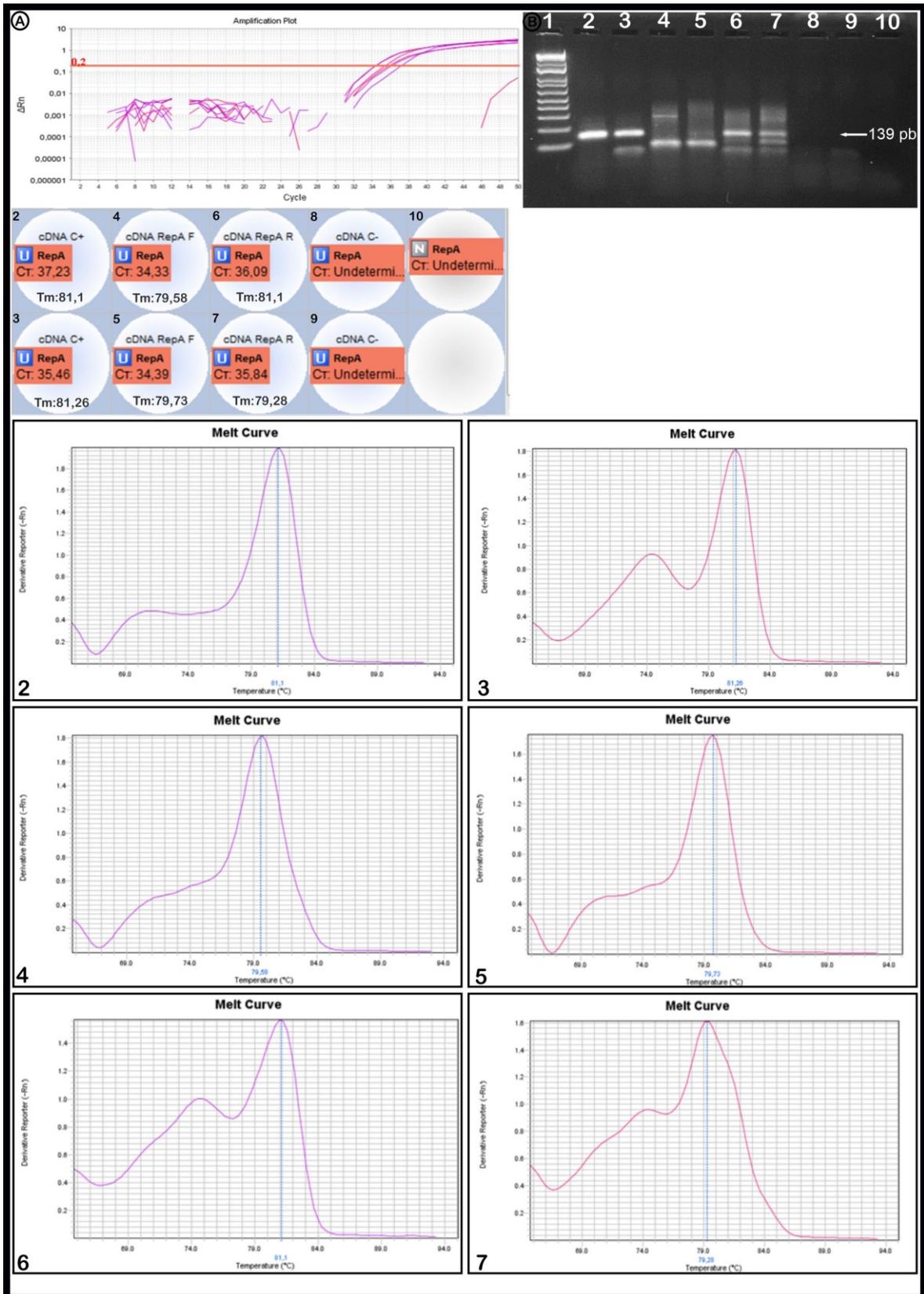
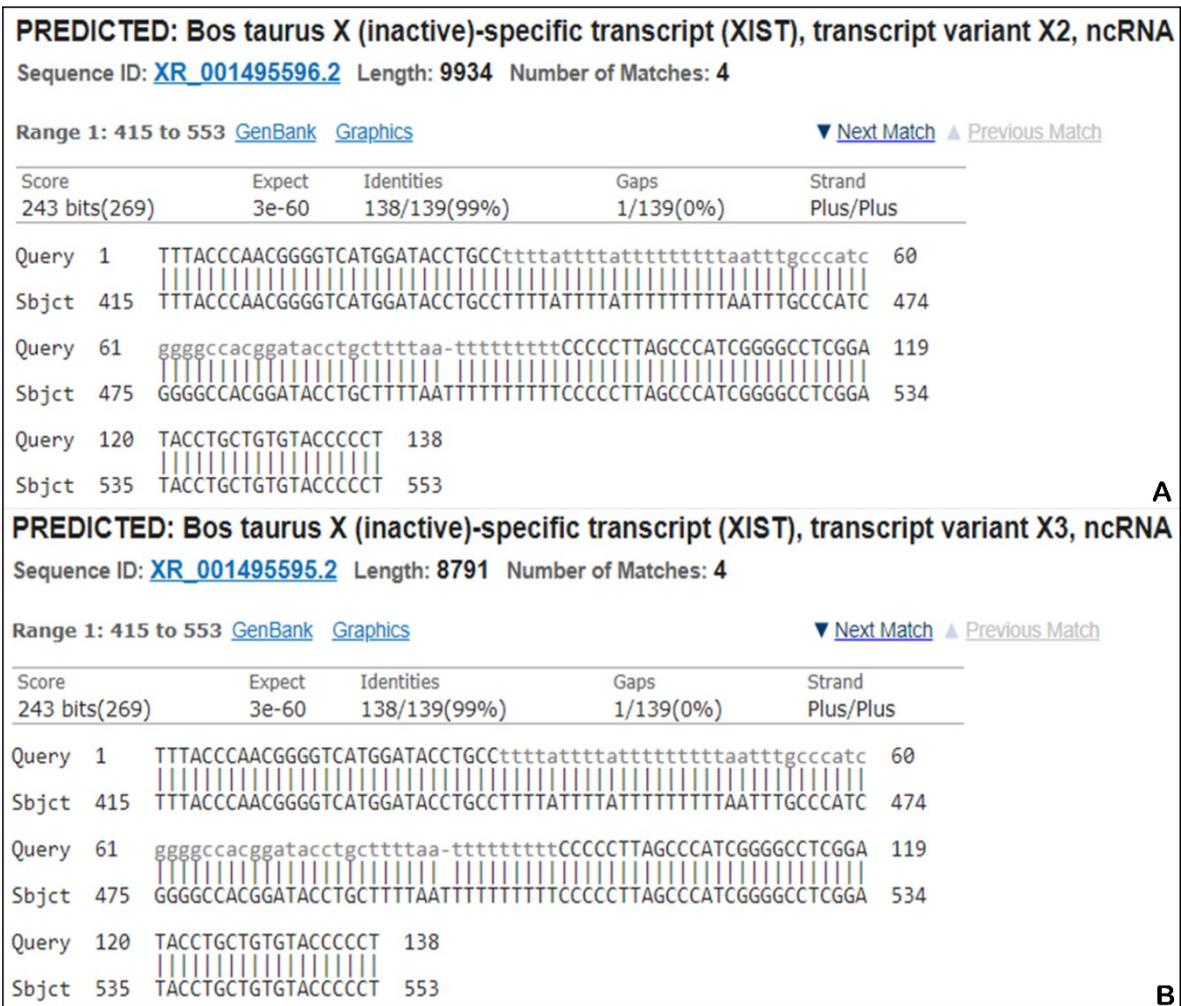


Figura 13- Resultado da SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) relacionado com a presença de transcritos sense e

**antisense utilizando primers RepA (éxon 1) no locus XIST no cotilédone fetal de macho.** (A) Curvas de amplificação e valores de Ct (*threshold cycle*) a partir de cDNA sintetizado com oligo(dT) e *random primers* (C+); cDNA com *primers* gene-específicos *forward* (RepA F) e *reverse* (RepA R) e cDNA sem a presença da transcriptase reversa (C-). As amostras estão em duplicata. (B) Eletroforese em gel de agarose 2%, demonstrando o marcador 1 kb Plus DNA Ladder-Invitrogen (1), ampliações do C+ (2-3), RepA F (4-5), RepA R (6-7), C- (8-9) e branco (10). Tamanho do *amplicon* é de 139 pares de bases. Curvas de *melting* dos *amplicons* C+ (2-3), RepA *forward* (4-5) e RepA *reverse* (6-7).

Os *amplicons* obtidos para o éxon 1 (RepA) referentes as amostras do controle positivo e RepA *reverse* foram sequenciadas e apresentaram 99% de identidade com as sequências dos transcritos XIST bovino para as variantes X2 e X3 (Figura 14). Dessa forma, os resultados mostram que houve somente detecção de transcritos sense (referente ao cDNA sintetizado com *primers reverse*) no éxon 1 do gene XIST em cotilédone fetal de macho.



**Figura 14-** Alinhamento dos *amplicons* do C+ e sense do éxon 1 (RepA) do *locus XIST* em cotilédone fetal de macho nas variantes X2 e X3, utilizando a ferramenta BLASTN.

Também no éxon 1 do gene *XIST*, utilizando os *primers* bXIST, houve amplificação do controle positivo, o qual usou cDNA sintetizado com Oligo(dT) e Random *primers* como também das amostras que usaram cDNAs sintetizados com o *primer* específico bXIST *reverse*, com tamanho do *amplicon* de 172 pares de bases. No entanto, as amostras do cDNA sintetizado com o *primer* bXIST *forward* não amplificaram. Os cDNAs sintetizados com oligo(dT) e Random *primers* referentes ao controle positivo validaram as ampliações *primers*-específicas e os controles negativos (RT- e PCR na ausência de cDNA) confirmaram a ausência de contaminação por DNA genômico ou cDNA. Os resultados estão apresentados na figura 15.

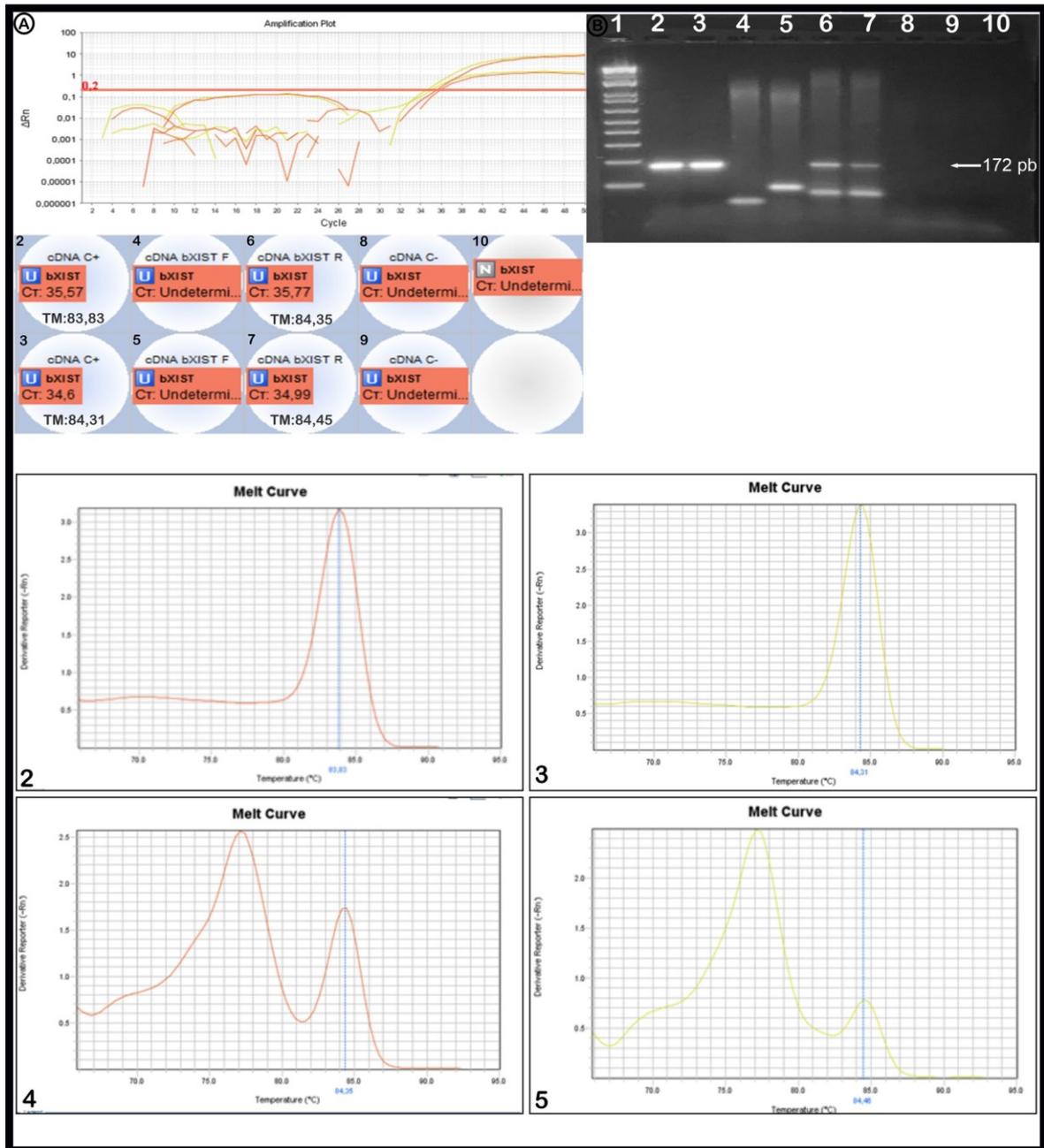
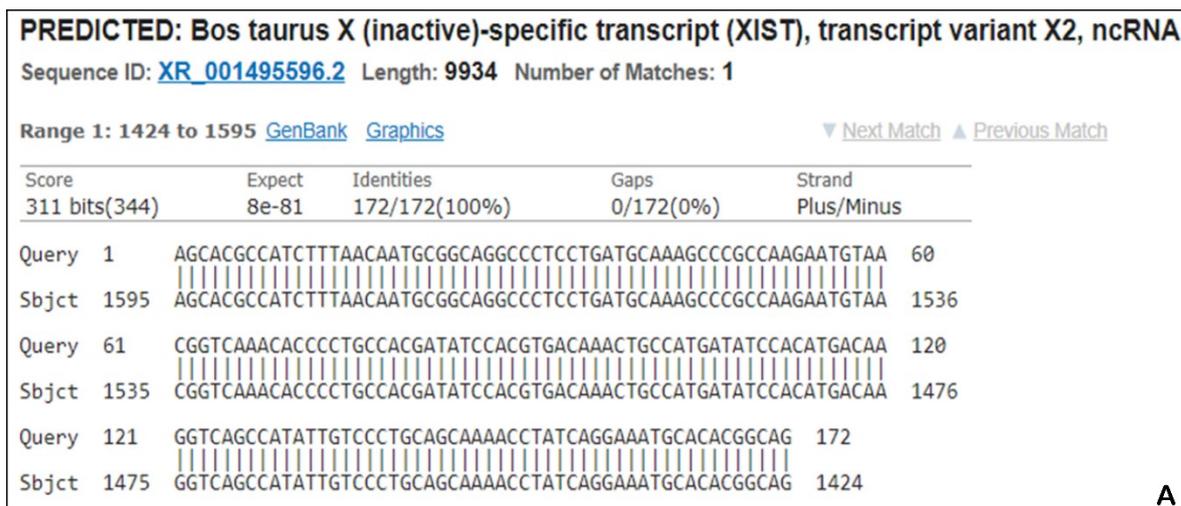


Figura 15- Resultado da SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando *primers* bXIST (éxon 1) no *locus* XIST no cotilédone fetal de macho. (A) Curvas de amplificação e valores de Ct (*threshold cycle*) a partir de cDNA sintetizado com oligo(dT) e *random primers* (C+); cDNA com *primers* gene-específicos *forward* (bXIST F) e *reverse* (bXIST R) e cDNA sem a presença da transcriptase reversa (C-). As amostras estão em duplicata. (B) Eletroforese em gel de agarose 2%, demonstrando o marcador 1 kb Plus DNA Ladder-Invitrogen (1), amplificações do C+ (2-3), bXIST F (4-5), bXIST R (6-7), C- (8-9) e branco (10). Tamanho do *amplicon* é de 172 pares de bases. Curvas de *melting* dos *amplicons* C+ (2-3) e bXIST *reverse* (4-5).

Os *amplicons* do éxon 1 (bXIST) referentes as amostras do controle positivo e bXIST *reverse* foram sequenciados e apresentaram 100% de identidade com a sequência do transcrito *XIST* bovino na variante X2 (Figura 16). Assim, tem-se como resultado somente detecção de transcritos sense (referente ao cDNA sintetizado com o *primer reverse*) no éxon 1 do gene *XIST* em cotilédone fetal de macho.



**Figura 16-** Alinhamento dos *amplicons* do C+ e sense do éxon 1 (bXIST) do *locus XIST* em cotilédone fetal de macho na variantes X2, utilizando a ferramenta BLASTN.

No éxon 4 de *XIST*, houve amplificação do controle positivo, o qual usou cDNA sintetizado com Oligo(dT) e Random *primers*, além dos cDNAs sintetizados com os *primers* específicos TSIXM *forward* e TSIXM *reverse*, com tamanho esperado do *amplicon* de 96 pares de bases. A temperatura de *melting* das amostras que utilizaram cDNA sintetizados com o *primer* TSIXM *reverse*, demonstram ser um pouco mais elevada, em comparação aos controles positivos e as amostras que utilizaram cDNA sintetizado com o *primer forward*. As amplificações do controle positivo validaram as amplificações *primers*-específicas e os controles negativos (RT- e PCR na ausência de cDNA) confirmaram a ausência de contaminação por DNA genômico ou cDNA. Todos esses resultados estão apresentados na figura 17.

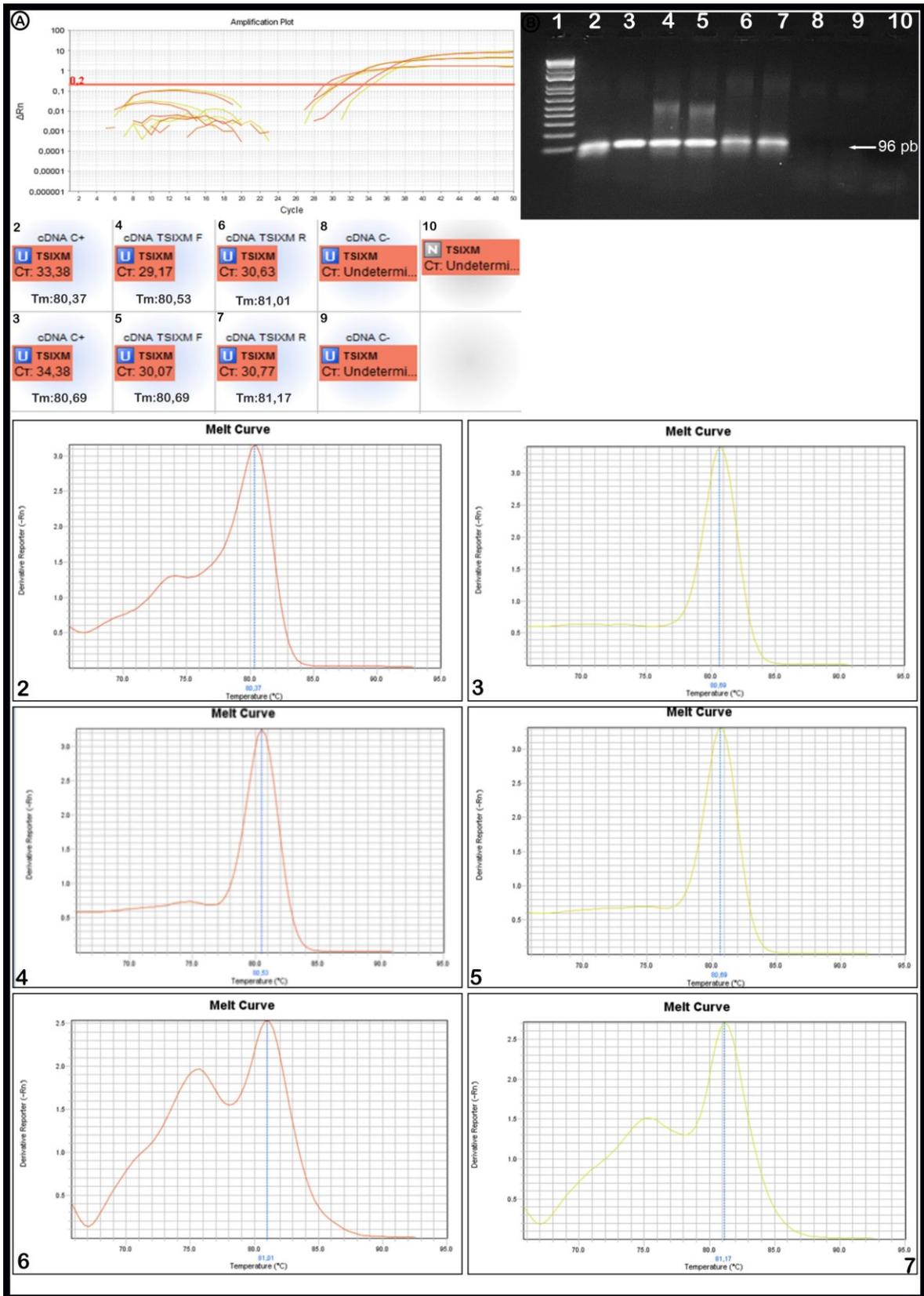


Figura 17- Resultado da SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando *primers* TSIXM (éxon 4) no *locus XIST* no cotilédone fetal de

**macho.** (A) Curvas de amplificação e valores de Ct (*threshold cycle*) a partir de cDNA sintetizado com oligo(dT) e *random primers* (C+); cDNA com *primers* gene-específicos *forward* (TSIXM F) e *reverse* (TSIXM R) e cDNA sem a presença da transcriptase reversa (C-). As amostras estão em duplicata. (B) Eletroforese em gel de agarose 2%, demonstrando o marcador 1 kb Plus DNA Ladder-Invitrogen (1), amplificações do C+ (2-3), TSIXM F (4-5), TSIXM R (6-7), C- (8-9) e branco (10). Tamanho do *amplicon* é de 96 pares de bases. Curvas de *melting* dos *amplicons* C+ (2-3), TSIXM *forward* (4-5) e TSIXM *reverse* (6-7).

Os *amplicons* do éxon 4 (TSIXM) referentes as amostras do controle positivo e TSIXM *forward* foram sequenciados e apresentaram 99% de identidade com as sequências dos transcritos *XIST* bovino para as três variantes (X1, X2 e X3) (Figura 18). Porém, o resultado do sequenciamento das amostras referentes ao cDNA sintetizado com o *primer reverse* não alinhou com nenhuma sequência de *XIST* depositada no *GenBank*. Apesar disso, obteve 93% de identidade com uma sequência de *Ovis canadensis*, da mesma maneira que ocorreu com as amostras que utilizaram o primer TSIXM *reverse* em cotilédone fetal de fêmea. Assim, os resultados indicam que houve detecção de transcritos sense (referente ao cDNA sintetizado com o *primer forward*), mas não foram detectados transcritos antisense (a partir de cDNA sintetizado com o *primer reverse*) no éxon 4 do gene *XIST* em cotilédone fetal de macho.



**Figura 18- Alinhamento dos *amplicons* sense do éxon 4 (TSIXM) do *locus XIST* em cotilédone fetal de macho na variantes X1 (A), X2 (B) e X3 (C) utilizando a ferramenta BLASTN. As amostras que utilizaram primer TSIXM reverse não alinharam com sequência do *XIST*, no entanto obteve 93% de identidade com a sequência *Ovis canadensis* (D).**

No éxon 6 do gene *XIST*, houve amplificação do controle positivo, o qual usou cDNA sintetizado com Oligo(dT) e Random *primers*, bem como das amostras que utilizaram cDNAs sintetizados com os *primers* específicos TSIXU *forward* e TSIXU *reverse*, com tamanho esperado do *amplicon* de 159 pares de bases, exceto para a amostra 6 (figura 19), que obteve uma amplificação inespecífica. As amplificações do controle positivo validaram as amplificações *primers*-específicas. Para o cDNA sintetizado na ausência da transcriptase reversa, usado como controle negativo, houve uma amplificação inespecífica (amostra 8- figura 19) comprovada pelo tamanho do *amplicon* e temperatura de *melting*. Diante disso, os controles negativos (RT- e PCR na ausência de cDNA) confirmaram a ausência de contaminação por DNA genômico ou cDNA. Os resultados estão apresentados na figura 19.

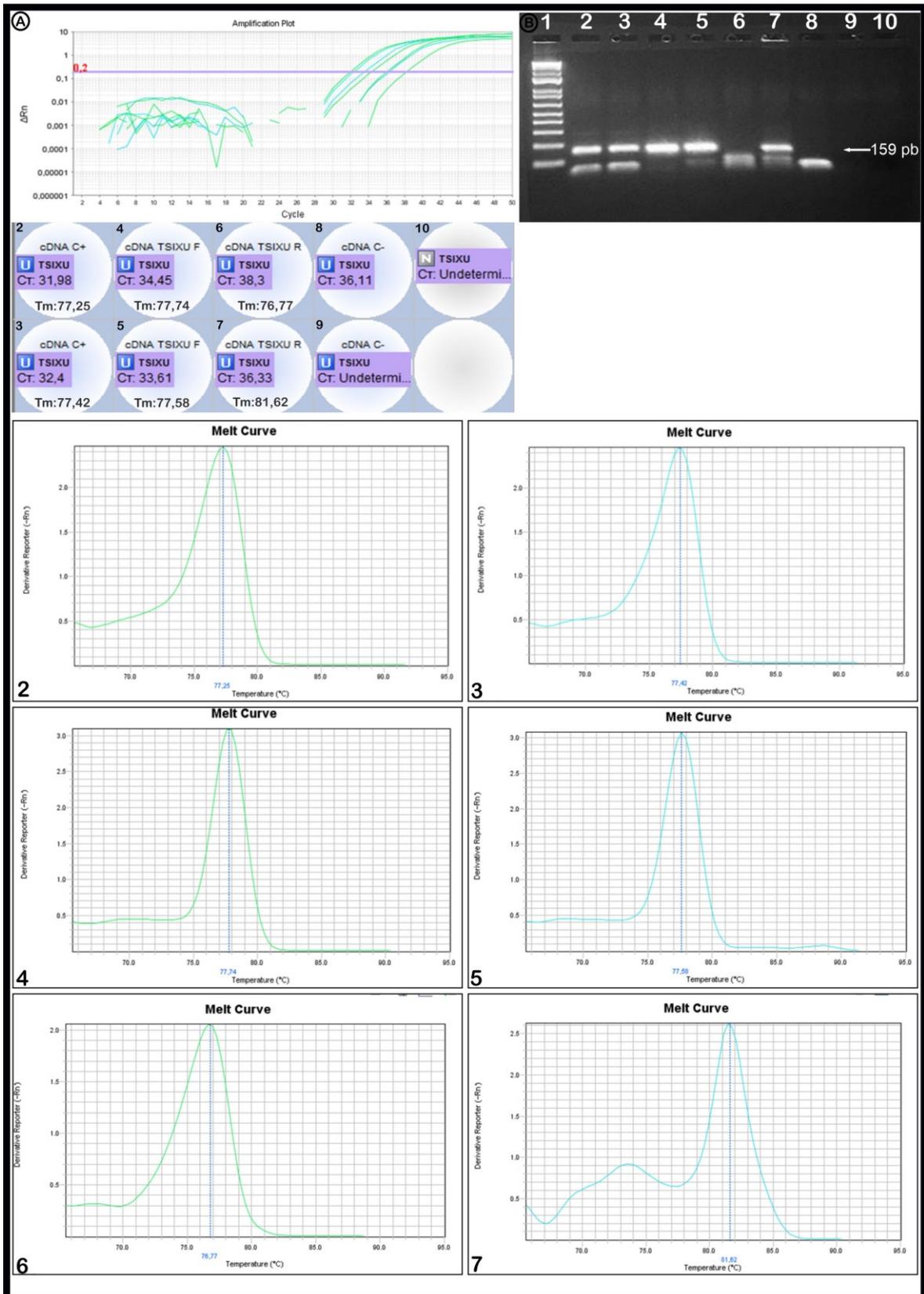


Figura 19- Resultado da SS-RT-PCR (*Strand-Specific Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) relacionado com a presença de transcritos sense e antisense utilizando *primers* TSIXU (éxon 6) no *locus XIST* no cotilédone fetal de

**macho.** (A) Curvas de amplificação e valores de Ct (*threshold cycle*) a partir de cDNA sintetizado com oligo(dT) e *random primers* (C+); cDNA com *primers* gene-específicos *forward* (TSIXU F) e *reverse* (TSIXU R) e cDNA sem a presença da transcriptase reversa (C-). As amostras estão em duplicata. (B) Eletroforese em gel de agarose 2%, demonstrando o marcador 1 kb Plus DNA Ladder-Invitrogen (1), amplificações do C+ (2-3), TSIXU F (4-5), TSIXU R (6-7), C- (8-9) e branco (10). Tamanho do *amplicon* é de 159 pares de bases. Curvas de *melting* dos *amplicons* C+ (2-3), TSIXU *forward* (4-5) e TSIXU *reverse* (6-7).

Os *amplicons* do éxon 6 (TSIXU) referentes as amostras do controle positivo e TSIXU *forward* foram sequenciados e apresentaram 100% de identidade com as sequências dos transcritos *XIST* bovino para as três variantes (X1, X2 e X3) (Figura 20). Contudo, o resultado do sequenciamento do *amplicon* que utilizou cDNA sintetizado com o *primer reverse* (linha 7 no gel – Figura 19), não alinhou com nenhuma sequência de *XIST* depositada no *GenBank*, confirmando o resultado da temperatura de *melting*, que foi diferente daquelas dos *amplicons* específicos do *locus XIST* (Figura 19). Porém, encontraram homologia com duas outras regiões das espécies *Sus scrofa* e *Felis catus*, respectivamente. Assim, os resultados indicam que houve detecção de transcritos sense (referente ao cDNA sintetizado com o *primer forward*), mas não detecção de transcritos antisense específicos (a partir de cDNA sintetizado com o *primer reverse*) no éxon 6 do gene *XIST* em cotilédone fetal de macho.

**PREDICTED: Bos taurus X (inactive)-specific transcript (XIST), transcript variant X1, ncRNA**

Sequence ID: [XR\\_001495594.2](#) Length: 14055 Number of Matches: 1

Range 1: 11362 to 11520 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
288 bits(318)	8e-74	159/159(100%)	0/159(0%)	Plus/Minus
Query 1	GGACCAGACTTCACCAAGAAAATAGGAACAAGAATTC AAGGAACAGGAATAGGATCTAGG	60		
Sbjct 11520	GGACCAGACTTCACCAAGAAAATAGGAACAAGAATTC AAGGAACAGGAATAGGATCTAGG	11461		
Query 61	GAACGGGAAC TCAAAATTTACTTAAAAC TCAAAGATGTTTTGGATCTTCAGTTATAAT	120		
Sbjct 11460	GAACGGGAAC TCAAAATTTACTTAAAAC TCAAAGATGTTTTGGATCTTCAGTTATAAT	11401		
Query 121	CTTTGATCTATCTAAAGCCCTTTAGACTAGGCCCATTTTC	159		
Sbjct 11400	CTTTGATCTATCTAAAGCCCTTTAGACTAGGCCCATTTTC	11362		

A

**PREDICTED: Bos taurus X (inactive)-specific transcript (XIST), transcript variant X2, ncRNA**

Sequence ID: [XR\\_001495596.2](#) Length: 9934 Number of Matches: 1

Range 1: 7241 to 7399 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
288 bits(318)	8e-74	159/159(100%)	0/159(0%)	Plus/Minus
Query 1	GGACCAGACTTCACCAAGAAAATAGGAACAAGAATTC AAGGAACAGGAATAGGATCTAGG	60		
Sbjct 7399	GGACCAGACTTCACCAAGAAAATAGGAACAAGAATTC AAGGAACAGGAATAGGATCTAGG	7340		
Query 61	GAACGGGAAC TCAAAATTTACTTAAAAC TCAAAGATGTTTTGGATCTTCAGTTATAAT	120		
Sbjct 7339	GAACGGGAAC TCAAAATTTACTTAAAAC TCAAAGATGTTTTGGATCTTCAGTTATAAT	7280		
Query 121	CTTTGATCTATCTAAAGCCCTTTAGACTAGGCCCATTTTC	159		
Sbjct 7279	CTTTGATCTATCTAAAGCCCTTTAGACTAGGCCCATTTTC	7241		

B

**PREDICTED: Bos taurus X (inactive)-specific transcript (XIST), transcript variant X3, ncRNA**

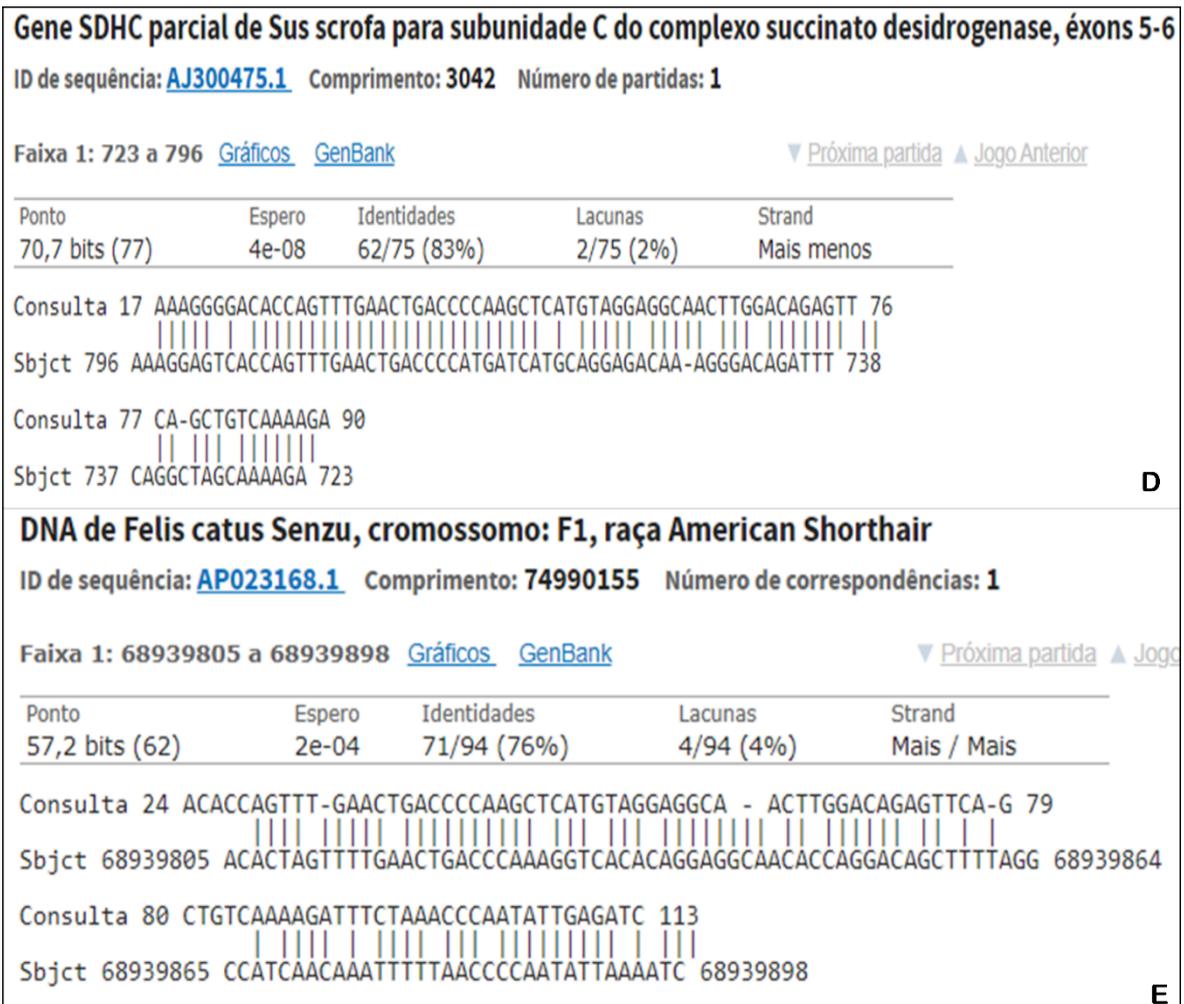
Sequence ID: [XR\\_001495595.2](#) Length: 8791 Number of Matches: 1

Range 1: 6098 to 6256 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
288 bits(318)	8e-74	159/159(100%)	0/159(0%)	Plus/Minus
Query 1	GGACCAGACTTCACCAAGAAAATAGGAACAAGAATTC AAGGAACAGGAATAGGATCTAGG	60		
Sbjct 6256	GGACCAGACTTCACCAAGAAAATAGGAACAAGAATTC AAGGAACAGGAATAGGATCTAGG	6197		
Query 61	GAACGGGAAC TCAAAATTTACTTAAAAC TCAAAGATGTTTTGGATCTTCAGTTATAAT	120		
Sbjct 6196	GAACGGGAAC TCAAAATTTACTTAAAAC TCAAAGATGTTTTGGATCTTCAGTTATAAT	6137		
Query 121	CTTTGATCTATCTAAAGCCCTTTAGACTAGGCCCATTTTC	159		
Sbjct 6136	CTTTGATCTATCTAAAGCCCTTTAGACTAGGCCCATTTTC	6098		

C

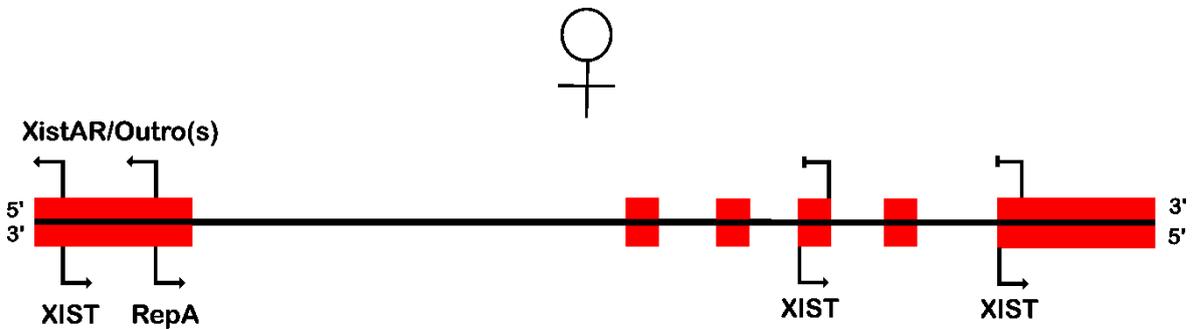


**Figura 20-** Alinhamento dos *amplicons* do C+ e sense do éxon 6 (TSIXU) do *locus XIST* em cotilédone fetal de macho nas variantes X1 (A), X2 (B) e X3 (C) utilizando a ferramenta BLASTN.

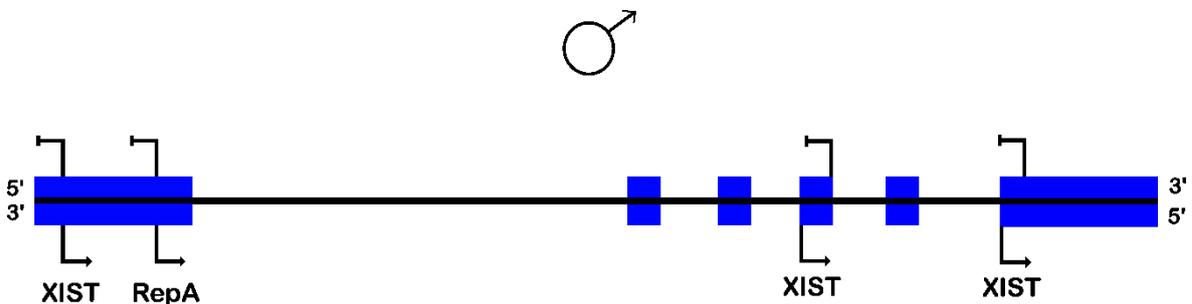
As amostras que utilizaram *primer* TSIXU reverse que alinharam com as sequências das espécies *Sus scrofa* e *Felis catus*, respectivamente (D e E).

De forma geral, os resultados dos sequenciamentos dos *amplicons* provenientes dos cotilédones fetais fêmeas mostraram que houve transcrição sense ao longo de todo o *locus XIST* (éxon 1, éxon 4 e éxon 6) e transcrição antisense somente no início do gene, no éxon 1 (RepA e bXIST). Em contrapartida, o sequenciamento dos *amplicons* oriundos dos cotilédones fetais de macho, apresentaram como resultado somente transcrição sense (*XIST*) ao longo do *locus XIST* (éxon 1, éxon 4 e éxon 6). As ampliações do controle positivo (oligo(dT) e Random *primers*) validaram as ampliações *primers-*

específicas e os controles negativos (RT- e PCR na ausência de cDNA) confirmaram a ausência de contaminação por DNA genômico ou cDNA em todas as amostras avaliadas. As figuras 21 e 22 abaixo mostra uma síntese dos resultados.



**Figura 21: Síntese dos resultados obtidos nos cotilédones fetais de fêmea.** As barras em vermelho representam os éxon 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. A fita sense mostra que houve transcrição no éxon 1 (*XIST* e *RepA*), 4 (*XIST*) e 6 (*XIST*) e a fita antisense indica que houve transcrição somente no éxon 1 (*XistAR/outro(s)*).



**Figura 22: Síntese dos resultados obtidos nos cotilédones fetais de macho.** As barras em azul representam os éxon 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. A fita sense mostra que houve transcrição no éxon 1 (*XIST* e *RepA*), 4 (*XIST*) e 6 (*XIST*), porém, não foi detectado nenhuma transcrição antisense (parte superior da figura).

## 5. DISCUSSÃO

A ICX é bem elucidada em camundongos, porém na espécie bovina ainda se tem poucas informações. Devido os bovinos possuírem uma grande importância econômica, técnicas de reprodução assistida (TRAs) como a produção *in vitro* de embriões e clonagem são cada vez mais empregadas. No entanto, o uso dessas técnicas pode alterar perfis moleculares e epigenéticos dos embriões e como consequência provocar modificações no processo da ICX, prejudicando a qualidade dos embriões. Dentre os vários problemas gerados no contexto das TRAs, alterações placentárias são muito frequentes, gerando perdas embrionárias e fetais ao longo de todo o período gestacional. Assim, a placenta deve ser um importante foco de estudo objetivando minizar essas perdas e melhorar os índices de sucesso das TRAs. O *XIST* é o principal gene que regula o processo da ICX. Assim, os resultados apresentados nesse trabalho, caracterizando o perfil transcricional ao longo do locus *XIST* na placenta bovina é importante para auxiliar na compreensão da ICX e na influência que as técnicas de reprodução causam na inativação do X em bovinos.

O *XIST* é essencial para o início e manutenção da inativação (GRIBNAU; GROOTEGOED, 2012) e quando não ocorre a ICX corretamente, o desenvolvimento normal do embrião é afetado, impedindo que ele se desenvolva. (BARAKAT; JONKERS; MONKHORST; GRIBNAU, 2010), interrompendo a gestação. Considerando que a ICX é um processo essencial para o normal desenvolvimento embrionário, a compreensão da ICX em bovinos também pode oferecer a possibilidade de identificação de marcadores moleculares epigenéticos associados à qualidade embrionária.

Nesse estudo foi escolhido duas regiões dentro do éxon 1 de *XIST* (RepA e b*XIST*) e uma região no éxon 4 (TSIXM) e éxon 6 (TSIXU), totalizando quatro regiões ao longo do locus *XIST* bovino nas quais o perfil transcricional foi caracterizado. Identificamos as três isoformas de *XIST* (X1, X2 e X3) baseado nas sequências depositadas no *GenBank*, porém, apenas a isoforma X2 abrange todos os *primers* que utilizamos. A isoforma X1 inclui somente os *primers* TSIXM e TSIXU, enquanto a isoforma X3 além do TSIXM e TSIXU, engloba o *primer* RepA. O *primer* b*XIST* é encontrado somente na variante X2, fazendo com que

somente essa variante possua todos os *primers* empregados. Utilizamos o método SS-RT-PCR, que consegue distinguir os transcritos sense e antisense, os quais compartilham a mesma região do genoma, transcrevendo em sentidos opostos. Com isso, caracterizamos a região do *locus XIST* na placenta fetal de bovinos fêmeas e machos em um nível fita-específico, pois cada uma das duas fitas de DNA do *locus* analisado pode gerar um RNA diferente. Além disso, fizemos o tratamento com a DNase em dois momentos distintos antes de ocorrer a amplificação por SS-RT-PCR para garantir uma amostra de RNA totalmente livre de contaminação com DNA genômico, obtendo maior confiabilidade na estratégia utilizada.

Os transcritos antisense normalmente possuem uma parte sobreposta ao RNA sense, podem ou não codificar proteínas e geralmente tem a função de regular os RNAs sense que não codificam proteínas (FAGHIHI; WAHLESTEDT, 2009). Como é o caso do *TSIX* em camundongos, que é um transcrito antisense e modulador negativo de *XIST*, o qual se sobrepõe ao longo de todo o lncRNA *XIST* reprimindo-o (LEE; DAVIDOW; WARSHAWSKY, 1999; LEE; LU, 1999; STAVROPOULOS; LU; LEE, 2001). Outro estudo mostrou a presença de um novo transcrito antisense de *XIST* em camundongos conhecido como *XistAR*, que ao contrário do *TSIX*, ele é expresso no cromossomo X inativo e induz a expressão de *XIST* além de ser encontrado somente no éxon 1 do *XIST* (SARKAR; GAYEN; KUMAR; MACLARY *et al.*, 2015).

Nossos resultados, avaliando os exons 1, 4 e 6, mostraram que houve transcrição sense ao longo de todo o *locus XIST* e transcrição antisense na região do éxon 1 no cotilédone fetal de fêmeas, utilizando tanto os *primers* RepA quanto os bXIST. Devido a confirmação do sequenciamento (Figuras 6, 8, 10 e 12), mostrando de 99 a 100% de homologia com o lncRNA *XIST* de *Bos taurus*, nossos resultados sugerem que os transcritos sense expressos representam o gene *XIST*. Como foi transcrito nos exons 1, 4 e 6, acreditamos que seja o mesmo RNA expresso ao longo de todo o *locus*. Porém, é possível que os transcritos sense presentes no exon 1, além de representarem o *XIST*, podem também serem transcritos de *RepA*, como em camundongos, considerando que *RepA* transcreve no mesmo sentido de *XIST* (ZHAO; SUN; ERWIN; SONG *et al.*, 2008).

Em bovinos, ainda não se tem muitas informações na literatura sobre transcrição antisense no *locus XIST*. Por essa razão, informações de outros órgãos e tecidos ou até mesmo de outras espécies de mamíferos são usadas para um melhor entendimento da ICX em bovinos. Um estudo comparou o XIC de camundongos com a espécie bovina e humana e dos 11 genes identificados na espécie murina, somente o *XIST*, *TSIX* e *JPX* foram encontrados no XIC de bovinos. Porém, não encontraram homologia entre a região promotora do *TSIX* nos bovinos e humanos em relação ao do *TSIX* de camundongos (CHUREAU; PRISSETTE; BOURDET; BARBE *et al.*, 2002). Isso levanta uma grande questão sobre o papel regulador desse gene na ICX de outros mamíferos (MIGEON, 2003).

O transcrito antisense detectado nesse trabalho pode ser o homólogo do *XistAR* de camundongos, do *XACT* encontrado em humanos ou outro(s) diferente(s) RNA(s) ainda não caracterizado(s). Um estudo de nosso laboratório mostrou a existência de vários transcritos em bovinos que se sobrepõe às regiões que possuem homologia ao gene *TSIX* e *XistAR* de camundongos e humanos (MENDONÇA; SILVEIRA; RIOS; MANGIAVACCHI *et al.*, 2019). Porém, diferentemente da espécie murina, que o *TSIX* é completamente sobreposto ao gene *XIST* (SHEVCHENKO; MALAKHOVA; ELISAPHENKO; MAZUROK *et al.*, 2011), na espécie bovina o transcrito antisense se sobrepõe somente em uma parte do *XIST* (HORVATH; SHEEDY; MERRETT; DIALLO *et al.*, 2011). Dessa forma, nossos resultados sugerem que esse transcrito antisense detectado no exon 1 não seja de *TSIX*, pois não detectamos transcrição antisense nos exons 4 e 6.

A detecção de um transcrito sense, provavelmente *XIST*, no cotilédone fetal de fêmea, está em concordância com a literatura, a qual demonstra que o *XIST* é expresso em células e tecidos de fêmeas, cumprindo o seu papel na ICX em mamíferos (BROCKDORFF; ASHWORTH; KAY; COOPER *et al.*, 1991; KANEDA; TAKAHASHI; YAMANAKA; SAITO *et al.*, 2017). Entretanto, sugerimos que o transcrito antisense identificado possa ser o homólogo do *XistAR* de camundongos, por estar presente somente no éxon 1 e esse transcrito antisense induzir a expressão de *XIST* (SARKAR; GAYEN; KUMAR; MACLARY *et al.*, 2015), o que contribui para a ICX, já que estamos analisando a placenta fetal de fêmea. Além disso, nossa interpretação está de acordo com o resultado de uma

análise *in silico* que detectou homologia de seis transcritos com o *XistAR* de camundongos, os quais se sobrepunham ao éxon 1 do *XIST* bovino (MENDONÇA; SILVEIRA; RIOS; MANGIAVACCHI *et al.*, 2019).

Em cotilédone fetal de macho, ao contrário do que se esperava, encontramos expressão de transcritos sense, provavelmente RNA *XIST*, ao longo de todo o *locus XIST* (éxons 1, 4 e 6). Porém, não identificamos nenhuma transcrição antisense. Embora avaliando tecidos diferentes, um estudo identificou em bovinos transcrição antisense no éxon 1 em gônadas de macho e tecidos somáticos (FARAZMAND; BASRUR; STRANZINGER; GRAPHODATSKAYA *et al.*, 2004) e Mendonça *et al.* (2019) identificaram, nos éxons 1, 2 e 6 de *XIST*, transcritos antisense em tecido testicular e embrião fêmea de bovinos (MENDONÇA; SILVEIRA; RIOS; MANGIAVACCHI *et al.*, 2019).

Nosso achado está em desacordo com Kaneda *et al.* (2017), que descreveu que o *XIST* não é expresso em células masculinas (KANEDA; TAKAHASHI; YAMANAKA; SAITO *et al.*, 2017). No entanto, estão de acordo com estudos como o de Sousa *et al.* (2018), que encontraram expressão de *XIST* em células masculinas de camundongos até 3 dias depois da diferenciação celular, demonstrando que a ICX ocorre em macho, ainda que seja de forma passageira, parcial e reversível (SOUSA; STUART; BATES; GHORBANI *et al.*, 2018) e com Mendonça *et al.* (2019), que detectou um transcrito sense no tecido testicular bovino e supôs que o *XIST* pode estar sendo expresso de maneira particular em cada tecido (MENDONÇA; SILVEIRA; RIOS; MANGIAVACCHI *et al.*, 2019).

Devido à complexidade que a ICX possui e o pouco conhecimento desse evento em bovinos, a caracterização e o estudo da expressão gênica dos transcritos envolvidos nesse processo são de extrema importância. O fato de termos usado o método SS-RT-PCR nos trouxe resultados significantes em relação à expressão gênica, pois conseguimos distinguir transcrição sense de antisense, o que outros estudos normalmente não fazem. Quanto maior for a quantidade de informações detalhadas que tivermos do processo da ICX, melhor vai ser a compreensão desse processo e conseqüentemente poderemos amenizar os problemas que acontece principalmente com o uso das TRAs.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No geral, os resultados desse trabalho apresentam que há transcrição sense ao longo de todo o locus *XIST* em cotilédone fetal bovino de fêmeas e machos e presença de transcritos antisense somente no início do locus *XIST* em cotilédone fetal de fêmea, contribuindo para a literatura em relação ao entendimento da ICX em bovinos.

Os resultados reforçam a importância de se avaliar com cautela resultados de estudos de expressão gênica utilizando cDNA sintetizado com *primers* Oligo(dT) e/ou randômicos, uma vez que pode haver transcrição em ambas as fitas do DNA superestimando assim os níveis de transcritos estudados. Com isso, nossos resultados mostram a relevância de se levar em conta a possibilidade de expressão de transcritos antisense quando se propõe a realizar estudos de expressão gênica, especialmente em *locus* de ncRNA, onde a transcrição das duas cadeias de DNA é mais frequente.

Estudos futuros ainda devem ser realizados com o intuito de identificar o transcrito antisense encontrado no éxon 1 e confirmar se todos os transcritos sense que foram expressos fazem parte do mesmo RNA (*XIST*). Além disso, também devem ser feitas análises dos éxons 2, 3 e 5 para obter uma informação completa de todo o *locus XIST*.

## 7. REFERÊNCIAS

ANGUERA, M. C.; MA, W.; CLIFT, D.; NAMEKAWA, S. *et al.* Tsx produces a long noncoding RNA and has general functions in the germline, stem cells, and brain. **PLoS genetics**, 7, n. 9, p. e1002248-e1002248, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002248>

AVNER, P.; HEARD, E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. **Nature Reviews Genetics**, 2, n. 1, p. 59-67, 2001/01/01 2001.

<https://doi.org/10.1038/35047580>

BANTA, J. A.; RICHARDS, C. L. Quantitative epigenetics and evolution. **Heredity**, 121, n. 3, p. 210-224, 2018/09/01 2018.

<https://doi.org/10.1038/s41437-018-0114-x>

BARAKAT, T. S.; GUNHANLAR, N.; PARDO, C. G.; ACHAME, E. M. *et al.* RNF12 activates Xist and is essential for X chromosome inactivation. **PLoS genetics**, 7, n. 1, p. e1002001-e1002001, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002001>

BARAKAT, T. S.; JONKERS, I.; MONKHORST, K.; GRIBNAU, J. X-changing information on X inactivation. **Experimental Cell Research**, 316, n. 5, p. 679-687, 2010/03/10/ 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.01.015>

BARAKAT, TAHSIN S.; LOOS, F.; VAN STAVEREN, S.; MYRONOVA, E. *et al.* The Trans-Activator RNF12 and Cis-Acting Elements Effectuate X Chromosome Inactivation Independent of X-Pairing. **Molecular Cell**, 53, n. 6, p. 965-978, 2014/03/20/ 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.006>

BARR, M. L.; BERTRAM, E. G. A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis. **Nature**, 163, n. 4148, p. 676-677, 1949/04/01 1949.

<https://doi.org/10.1038/163676a0>

BORSANI, G.; TONLORENZI, R.; SIMMLER, M. C.; DANDOLO, L. *et al.* Characterization of a murine gene expressed from the inactive X chromosome. **Nature**, 351, n. 6324, p. 325-329, 1991/05/01 1991.

<https://doi.org/10.1038/351325a0>

BROCKDORFF, N. Polycomb complexes in X chromosome inactivation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 372, n. 1733, p. 20170021, 2017/11/05 2017.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0021>

BROCKDORFF, N.; ASHWORTH, A.; KAY, G. F.; COOPER, P. *et al.* Conservation of position and exclusive expression of mouse Xist from the inactive X chromosome. **Nature**, 351, n. 6324, p. 329-331, 1991/05/01 1991.

<https://doi.org/10.1038/351329a0>

BROCKDORFF, N.; ASHWORTH, A.; KAY, G. F.; MCCABE, V. M. *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**, 71, n. 3, p. 515-526, 1992/10/30/ 1992.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90519-l](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90519-l)

BROWN, C. J.; BALLABIO, A.; RUPERT, J. L.; LAFRENIERE, R. G. *et al.* A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. **Nature**, 349, n. 6304, p. 38-44, 1991. Article.

<https://doi.org/10.1038/349038a0>

BROWN, C. J.; HENDRICH, B. D.; RUPERT, J. L.; LAFRENIÈRE, R. G. *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**, 71, n. 3, p. 527-542, 1992.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90520-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90520-M)

BROWN, C. J.; LAFRENIERE, R. G.; POWERS, V. E.; SEBASTIO, G. *et al.* Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. **Nature**, 349, n. 6304, p. 82-84, 1991/01/01 1991.

<https://doi.org/10.1038/349082a0>

BRUCK, T.; BENVENISTY, N. Meta-analysis of the heterogeneity of X chromosome inactivation in human pluripotent stem cells. **Stem Cell Research**, 6, n. 2, p. 187-193, 2011/03/01/ 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.12.001>

CARNINCI, P.; KASUKAWA, T.; KATAYAMA, S.; GOUGH, J. *et al.* The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. **Science**, 309, n. 5740, p. 1559, 2005.

<https://doi.org/10.1126/science.1112014>

CHAUMEIL, J.; OKAMOTO, I.; GUGGIARI, M.; HEARD, E. Integrated kinetics of X chromosome inactivation in differentiating embryonic stem cells. **Cytogenetic and Genome Research**, 99, n. 1-4, p. 75-84, 2002.

<https://doi.org/10.1159/000071577>

CHUREAU, C.; CHANTALAT, S.; ROMITO, A.; GALVANI, A. *et al.* Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. **Human Molecular Genetics**, 20, n. 4, p. 705-718, 2010.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddq516>

CHUREAU, C.; PRISSETTE, M.; BOURDET, A.; BARBE, V. *et al.* Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine. **Genome research**, 12, n. 6, p. 894-908, 2002.

COLOGNORI, D.; SUNWOO, H.; WANG, D.; WANG, C.-Y. *et al.* Xist Repeats A and B Account for Two Distinct Phases of X Inactivation Establishment. **Developmental Cell**, 54, n. 1, p. 21-32.e25, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.05.021>

CONSORTIUM, E. P.; BIRNEY, E.; STAMATOYANNOPOULOS, J. A.; DUTTA, A. *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. **Nature**, 447, n. 7146, p. 799-816, 2007.

<https://doi.org/10.1038/nature05874>

DE NAPOLES, M.; NESTEROVA, T.; BROCKDORFF, N. Early Loss of Xist RNA Expression and Inactive X Chromosome Associated Chromatin Modification in Developing Primordial Germ Cells. **PLOS ONE**, 2, n. 9, p. e860, 2007.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000860>

DENG, X.; BERLETCH, J. B.; NGUYEN, D. K.; DISTECHE, C. M. X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease. **Nature Reviews Genetics**, 15, n. 6, p. 367-378, 2014/06/01 2014.

<https://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**, 5, n. 6, p. 20, 2017.

<https://doi.org/10.21037/atm.2017.01.20>

DINDOT, S. V.; KENT, K. C.; EVERS, B.; LOSKUTOFF, N. *et al.* Conservation of genomic imprinting at the XIST, IGF2, and GTL2 loci in the bovine. **Mammalian Genome**, 15, n. 12, p. 966-974, 2004/12/01 2004.

<https://doi.org/10.1007/s00335-004-2407-z>

DINI, P.; NORRIS, J.; ALI, H. E.-S.; LOUX, S. C. *et al.* Landscape of Overlapping Gene Expression in the Equine Placenta. **Genes**, 10, n. 7, p. 503, 2019.

<https://doi.org/10.3390/genes10070503>

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. **Semin Reprod Med**, 27, n. 05, p. 351-357, 26.08.2009 2009.

<https://doi.org/10.1055/s-0029-1237423>

ESCAMILLA-DEL-ARENAL, M.; DA ROCHA, S. T.; HEARD, E. Evolutionary diversity and developmental regulation of X-chromosome inactivation. **Human Genetics**, 130, n. 2, p. 307-327, 2011/08/01 2011.

<https://doi.org/10.1007/s00439-011-1029-2>

FAGHIHI, M. A.; WAHLESTEDT, C. Regulatory roles of natural antisense transcripts. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 10, n. 9, p. 637-643, 2009/09/01 2009.

<https://doi.org/10.1038/nrm2738>

FARAZMAND, A.; BASRUR, P. K.; STRANZINGER, G.; GRAPHODATSKAYA, D. *et al.* Expression of XIST sense and antisense in bovine fetal organs and cell cultures. **Chromosome Research**, 12, n. 3, p. 275, 2004/04/01 2004.

<https://doi.org/10.1023/B:CHRO.0000021864.66235.81>

FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything. **Epigenetics**, 6, n. 7, p. 791-797, 2011/07/01 2011.

<https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16209>

FERNANDES, C. R. J.; ACUÑA, M. S.; AOKI, I. J.; FLOETER-WINTER, M. L. *et al.* Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. **Non-Coding RNA**, 5, n. 1, 2019.

<https://doi.org/10.3390/ncrna5010017>

FURIÓ-TARÍ, P.; TARAZONA, S.; GABALDÓN, T.; ENRIGHT, A. J. *et al.* spongeScan: A web for detecting microRNA binding elements in lncRNA sequences. **Nucleic Acids Research**, 44, n. W1, p. W176-W180, 2016.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkw443>

FURLAN, G.; ROUGEULLE, C. Function and evolution of the long noncoding RNA circuitry orchestrating X-chromosome inactivation in mammals. **WIREs RNA**, 7, n. 5, p. 702-722, 2016.

<https://doi.org/10.1002/wrna.1359>

GALUPA, R.; HEARD, E. X-chromosome inactivation: new insights into cis and trans regulation. **Current Opinion in Genetics & Development**, 31, p. 57-66, 2015/04/01/ 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.04.002>

GOMES, A. Q.; NOLASCO, S.; SOARES, H. Non-Coding RNAs: Multi-Tasking Molecules in the Cell. **International Journal of Molecular Sciences**, 14, n. 8, p. 16010-16039, 2013.

<https://doi.org/10.3390/ijms140816010>

GONTAN, C.; ACHAME, E. M.; DEMMERS, J.; BARAKAT, T. S. *et al.* RNF12 initiates X-chromosome inactivation by targeting REX1 for degradation. **Nature**, 485, n. 7398, p. 386-390, 2012/05/01 2012.

<https://doi.org/10.1038/nature11070>

GRIBNAU, J.; GROOTEGOED, J. A. Origin and evolution of X chromosome inactivation. **Current Opinion in Cell Biology**, 24, n. 3, p. 397-404, 2012/06/01/ 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.02.004>

HANDY DIANE, E.; CASTRO, R.; LOSCALZO, J. Epigenetic Modifications. **Circulation**, 123, n. 19, p. 2145-2156, 2011/05/17 2011.

<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>

HORVATH, J. E.; SHEEDY, C. B.; MERRETT, S. L.; DIALLO, A. B. *et al.* Comparative analysis of the primate X-inactivation center region and reconstruction of the ancestral primate XIST locus. **Genome research**, 21, n. 6, p. 850-862, 2011.

<https://doi.org/10.1101/gr.111849.110>

HÜBEL, C.; MARZI, S. J.; BREEN, G.; BULIK, C. M. Epigenetics in eating disorders: a systematic review. **Molecular Psychiatry**, 24, n. 6, p. 901-915, 2019/06/01 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41380-018-0254-7>

HUYNH, K. D.; LEE, J. T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. **Nature**, 426, n. 6968, p. 857-862, 2003/12/01 2003.

<https://doi.org/10.1038/nature02222>

HUYNH, K. D.; LEE, J. T. X-chromosome inactivation: a hypothesis linking ontogeny and phylogeny. **Nature Reviews Genetics**, 6, n. 5, p. 410-418, 2005/05/01 2005.

<https://doi.org/10.1038/nrg1604>

INOUE, A.; JIANG, L.; LU, F.; ZHANG, Y. Genomic imprinting of Xist by maternal H3K27me3. **Genes & development**, 31, n. 19, p. 1927-1932, 2017.

<https://doi.org/10.1101/gad.304113.117>

JEON, Y.; LEE, JEANNIE T. YY1 Tethers Xist RNA to the Inactive X Nucleation Center. **Cell**, 146, n. 1, p. 119-133, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.026>

JOHNSTON, C. M.; NEWALL, A. E. T.; BROCKDORFF, N.; NESTEROVA, T. B. Enox, a Novel Gene That Maps 10 kb Upstream of Xist and Partially Escapes X Inactivation. **Genomics**, 80, n. 2, p. 236-244, 2002/08/01/ 2002.

<https://doi.org/10.1006/geno.2002.6819>

JONKERS, I.; BARAKAT, T. S.; ACHAME, E. M.; MONKHORST, K. *et al.* RNF12 Is an X-Encoded Dose-Dependent Activator of X Chromosome Inactivation. **Cell**, 139, n. 5, p. 999-1011, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.034>

KANEDA, M.; TAKAHASHI, M.; YAMANAKA, K.-I.; SAITO, K. *et al.* Epigenetic analysis of bovine parthenogenetic embryonic fibroblasts. **The Journal of reproduction and development**, 63, n. 4, p. 365-375, 2017.

<https://doi.org/10.1262/jrd.2017-040>

KHOSRAVIANI, N.; OSTROWSKI, L. A.; MEKHAIL, K. Roles for Non-coding RNAs in Spatial Genome Organization. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, 7, n. 336, 2019-December-19 2019. Review.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00336>

LEE, J.; DAVIDOW, L. S.; WARSHAWSKY, D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. **Nature Genetics**, 21, n. 4, p. 400-404, 1999/04/01 1999.

<https://doi.org/10.1038/7734>

LEE, J. T. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 12, n. 12, p. 815-826, 2011/12/01 2011.

<https://doi.org/10.1038/nrm3231>

LEE, J. T.; JAENISCH, R. Long-range cis effects of ectopic X-inactivation centres on a mouse autosome. **Nature**, 386, n. 6622, p. 275-279, 1997/03/01 1997.

<https://doi.org/10.1038/386275a0>

LEE, J. T.; LU, N. Targeted Mutagenesis of *Tsix* Leads to Nonrandom X Inactivation. **Cell**, 99, n. 1, p. 47-57, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80061-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80061-6)

LYON, M. F. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, 190, n. 4773, p. 372-373, 1961/04/01 1961.

<https://doi.org/10.1038/190372a0>

MA, M.; STRAUSS, W. M. Analysis of the Xist RNA isoforms suggests two distinctly different forms of regulation. **Mammalian Genome**, 16, n. 6, p. 391-404, 2005/06/01 2005.

<https://doi.org/10.1007/s00335-004-2464-3>

MAKHLOUF, M.; OUIMETTE, J.-F.; OLDFIELD, A.; NAVARRO, P. *et al.* A prominent and conserved role for YY1 in Xist transcriptional activation. **Nature Communications**, 5, n. 1, p. 4878, 2014/09/11 2014.

<https://doi.org/10.1038/ncomms5878>

MEMILI, E.; HONG, Y.-K.; KIM, D.-H.; ONTIVEROS, S. D. *et al.* Murine Xist RNA isoforms are different at their 3' ends: a role for differential polyadenylation. **Gene**, 266, n. 1, p. 131-137, 2001/03/21/ 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00353-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00353-5)

MENDONÇA, A. D. S.; SILVEIRA, M. M.; RIOS, Á. F. L.; MANGIAVACCHI, P. M. *et al.* DNA methylation and functional characterization of the XIST gene during in vitro early embryo development in cattle. **Epigenetics**, 14, n. 6, p. 568-588, 2019/06/03 2019.

<https://doi.org/10.1080/15592294.2019.1600828>

MIGEON, B. R. Is Tsix repression of Xist specific to mouse? **Nature Genetics**, 33, n. 3, p. 337-337, 2003/03/01 2003.

<https://doi.org/10.1038/ng0303-337a>

MORGAN, H. D.; SANTOS, F.; GREEN, K.; DEAN, W. *et al.* Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, 14, n. suppl\_1, p. R47-R58, 2005.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi114>

NAMEKAWA, S. H.; PARK, P. J.; ZHANG, L.-F.; SHIMA, J. E. *et al.* Postmeiotic Sex Chromatin in the Male Germline of Mice. **Current Biology**, 16, n. 7, p. 660-667, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.066>

NAVARRO, P.; CHAMBERS, I.; KARWACKI-NEISIUS, V.; CHUREAU, C. *et al.* Molecular Coupling of Xist Regulation and Pluripotency. **Science**, 321, n. 5896, p. 1693, 2008.

<https://doi.org/10.1126/science.1160952>

NAVARRO, P.; PAGE, D. R.; AVNER, P.; ROUGEULLE, C. Tsix-mediated epigenetic switch of a CTCF-flanked region of the Xist promoter determines the Xist transcription program. **Genes & development**, 20, n. 20, p. 2787-2792, 2006.

<https://doi.org/10.1101/gad.389006>

NESBITT, M. N. X chromosome inactivation mosaicism in the mouse. **Developmental Biology**, 26, n. 2, p. 252-263, 1971/10/01/ 1971.

[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(71\)90125-4](https://doi.org/10.1016/0012-1606(71)90125-4)

OGAWA, Y.; LEE, J. T. Xite, X-Inactivation Intergenic Transcription Elements that Regulate the Probability of Choice. **Molecular Cell**, 11, n. 3, p. 731-743, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00063-7)

OHNO, S.; KAPLAN, W. D.; KINOSITA, R. Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of Rattus norvegicus. **Experimental Cell Research**, 18, n. 2, p. 415-418, 1959/10/01/ 1959.

[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(59\)90031-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(59)90031-X)

OKAMOTO, I.; HEARD, E. Lessons from comparative analysis of X-chromosome inactivation in mammals. **Chromosome Research**, 17, n. 5, p. 659-669, 2009/07/01 2009.

<https://doi.org/10.1007/s10577-009-9057-7>

OKAMOTO, I.; OTTE, A. P.; ALLIS, C. D.; REINBERG, D. *et al.* Epigenetic Dynamics of Imprinted X Inactivation During Early Mouse Development. **Science**, 303, n. 5658, p. 644, 2004.

<https://doi.org/10.1126/science.1092727>

OKAMOTO, I.; PATRAT, C.; THÉPOT, D.; PEYNOT, N. *et al.* Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. **Nature**, 472, n. 7343, p. 370-374, 2011/04/01 2011.

<https://doi.org/10.1038/nature09872>

PATRAT, C.; OUIMETTE, J.-F.; ROUGEULLE, C. X chromosome inactivation in human development. **Development**, 147, n. 1, p. dev183095, 2020.

<https://doi.org/10.1242/dev.183095>

PAYER, B.; LEE, J. T. X Chromosome Dosage Compensation: How Mammals Keep the Balance. **Annual Review of Genetics**, 42, n. 1, p. 733-772, 2008/12/01 2008.

<https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091711>

PENNY, G. D.; KAY, G. F.; SHEARDOWN, S. A.; RASTAN, S. *et al.* Requirement for Xist in X chromosome inactivation. **Nature**, 379, n. 6561, p. 131-137, 1996/01/01 1996.

<https://doi.org/10.1038/379131a0>

QUINN, J. J.; CHANG, H. Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. **Nature Reviews Genetics**, 17, n. 1, p. 47-62, 2016/01/01 2016.

<https://doi.org/10.1038/nrg.2015.10>

QUINODOZ, S.; GUTTMAN, M. Long noncoding RNAs: an emerging link between gene regulation and nuclear organization. **Trends in Cell Biology**, 24, n. 11, p. 651-663, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.08.009>

RUDDOCK, N. T.; WILSON, K. J.; COONEY, M. A.; KORFIATIS, N. A. *et al.* Analysis of Imprinted Messenger RNA Expression During Bovine Preimplantation Development1. **Biology of Reproduction**, 70, n. 4, p. 1131-1135, 2004.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.022236>

RUSSELL, L. B. Mammalian X-Chromosome Action: Inactivation Limited in Spread and in Region of Origin. **Science**, 140, n. 3570, p. 976, 1963.

<https://doi.org/10.1126/science.140.3570.976>

SADO, T.; BROCKDORFF, N. Advances in understanding chromosome silencing by the long non-coding RNA Xist. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 368, n. 1609, p. 20110325, 2013/01/05 2013.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0325>

SADO, T.; WANG, Z.; SASAKI, H.; LI, E. Regulation of imprinted X-chromosome inactivation in mice by Tsix. **Development**, 128, n. 8, p. 1275, 2001.

SARKAR, M. K.; GAYEN, S.; KUMAR, S.; MACLARY, E. *et al.* An Xist-activating antisense RNA required for X-chromosome inactivation. **Nature Communications**, 6, n. 1, p. 8564, 2015/10/19 2015.

<https://doi.org/10.1038/ncomms9564>

SHEVCHENKO, A. I.; MALAKHOVA, A. A.; ELISAPHENKO, E. A.; MAZUROK, N. A. *et al.* Variability of sequence surrounding the Xist gene in rodents suggests taxon-specific regulation of X chromosome inactivation. **PLOS ONE**, 6, n. 8, p. e22771-e22771, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022771>

SHIN, J.; BOSSENZ, M.; CHUNG, Y.; MA, H. *et al.* Maternal Rnf12/RLIM is required for imprinted X-chromosome inactivation in mice. **Nature**, 467, n. 7318, p. 977-981, 2010/10/01 2010.

<https://doi.org/10.1038/nature09457>

SIMMLER, M.-C.; CUNNINGHAM, D. B.; CLERC, P.; VERMAT, T. *et al.* A 94 kb Genomic Sequence 3' to the Murine Xist Gene Reveals an AT Rich Region Containing a New Testis Specific Gene Tsx. **Human Molecular Genetics**, 5, n. 11, p. 1713-1726, 1996.

<https://doi.org/10.1093/hmg/5.11.1713>

SMOLLE, M.; WORKMAN, J. L. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, 1829, n. 1, p. 84-97, 2013/01/01/ 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2012.08.008>

SOUSA, E. J.; STUART, H. T.; BATES, L. E.; GHORBANI, M. *et al.* Exit from Naive Pluripotency Induces a Transient X Chromosome Inactivation-like State in Males. **Cell Stem Cell**, 22, n. 6, p. 919-928.e916, 2018/06/01/ 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.001>

STAVROPOULOS, N.; LU, N.; LEE, J. T. A functional role for Tsix transcription in blocking Xist RNA accumulation but not in X-chromosome choice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 98, n. 18, p. 10232-10237, 2001.

<https://doi.org/10.1073/pnas.171243598>

SU, J.-M.; YANG, B.; WANG, Y.-S.; LI, Y.-Y. *et al.* Expression and methylation status of imprinted genes in placentas of deceased and live cloned transgenic calves. **Theriogenology**, 75, n. 7, p. 1346-1359, 2011/04/15/ 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.045>

SUN, B. K.; DEATON, A. M.; LEE, J. T. A Transient Heterochromatic State in Xist Preempts X Inactivation Choice without RNA Stabilization. **Molecular Cell**, 21, n. 5, p. 617-628, 2006/03/03/ 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.028>

SUN, S.; DEL ROSARIO, B. C.; SZANTO, A.; OGAWA, Y. *et al.* Jpx RNA activates Xist by evicting CTCF. **Cell**, 153, n. 7, p. 1537-1551, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.028>

TAKAGI, N.; SASAKI, M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. **Nature**, 256, n. 5519, p. 640-642, 1975/08/01 1975.

<https://doi.org/10.1038/256640a0>

TIAN, D.; SUN, S.; LEE, J. T. The Long Noncoding RNA, Jpx, Is a Molecular Switch for X Chromosome Inactivation. **Cell**, 143, n. 3, p. 390-403, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.049>

TURNER, J. M. A. Meiotic sex chromosome inactivation. **Development**, 134, n. 10, p. 1823, 2007.

<https://doi.org/10.1242/dev.000018>

TURNER, J. M. A.; MAHADEVIAH, S. K.; ELLIS, P. J. I.; MITCHELL, M. J. *et al.* Pachytene Asynapsis Drives Meiotic Sex Chromosome Inactivation and Leads to Substantial Postmeiotic Repression in Spermatids. **Developmental Cell**, 10, n. 4, p. 521-529, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.009>

VADAIE, N.; MORRIS, K. V. Long antisense non-coding RNAs and the epigenetic regulation of gene expression. **BMC**, 4, n. 4, p. 411, 2013.

<https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0014>

VALLOT, C.; HURET, C.; LESECQUE, Y.; RESCH, A. *et al.* XACT, a long noncoding

transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. **Nature Genetics**, 45, n. 3, p. 239-241, 2013/03/01 2013.

<https://doi.org/10.1038/ng.2530>

VALLOT, C.; PATRAT, C.; COLLIER, A. J.; HURET, C. *et al.* *XACT* Noncoding RNA Competes with *XIST* in the Control of X Chromosome Activity during Human Early Development. **Cell Stem Cell**, 20, n. 1, p. 102-111, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.014>

VALLOT, C.; ROUGEULLE, C. Long non-coding RNAs and human X-chromosome regulation. **RNA Biology**, 10, n. 8, p. 1262-1265, 2013/08/01 2013.

<https://doi.org/10.4161/rna.25802>

WUTZ, A.; RASMUSSEN, T. P.; JAENISCH, R. Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA. **Nature Genetics**, 30, n. 2, p. 167-174, 2002/02/01 2002.

<https://doi.org/10.1038/ng820>

XUE, F.; TIAN, X. C.; DU, F.; KUBOTA, C. *et al.* Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nature Genetics**, 31, n. 2, p. 216-220, 2002/06/01 2002.

<https://doi.org/10.1038/ng900>

YU, B.; VAN TOL, H. T. A.; STOUT, T. A. E.; ROELEN, B. A. J. Initiation of X Chromosome Inactivation during Bovine Embryo Development. **Cells**, 9, n. 4, p. 1016, 2020.

<https://doi.org/10.3390/cells9041016>

ZHAO, J.; SUN, B. K.; ERWIN, J. A.; SONG, J.-J. *et al.* Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome. **Science**, 322, n. 5902, p. 750, 2008.

<https://doi.org/10.1126/science.1163045>

ŻYLICZ, J. J.; BOUSARD, A.; ŽUMER, K.; DOSSIN, F. *et al.* The Implication of Early Chromatin Changes in X Chromosome Inactivation. **Cell**, 176, n. 1-2, p. 182-197.e123, 2019.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.041>

## 8. ANEXOS

### ANEXO I: Extração de RNA total.

#### PureLink™ RNA Mini

##### Para tecido:

1. Cortar (biópsia) aproximadamente 200 mg:

- a. Usar placa de petri estéril, apoiada sobre o gelo; lâmina bisturi estéril e microtubo 1,5 mL estéril.
- b. Pesar microtubo vazio – tarar balança com o microtubo vazio antes de colocar a amostra.

2. Maceração do tecido:

- a. Usar cadinho e espátula.
- b. Colocar 200 mg do tecido no cadinho, ir colocando nitrogênio líquido aos poucos e amassando a amostra, até tornar-se pó, transferir para o microtubo.
- c. Pesar amostra macerada. Os 200mg da amostra inicial, devem gerar aproximadamente 100mg finais.

3. Homogeneizar as amostras de tecido em 1mL de TRizol Reagent para cada 50-100mg de tecido.

- a. Para homogeneizar melhor e facilitar desfazer os grumos, pode-se cortar a ponta da ponteira P1000.

4. Incubar por 5 minutos no gelo para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos.

5. Adicionar 0,2 mL de clorofórmio gelado por 1 mL de TRizol usado na lise, misture no vórtex por 15 segundos e incube por 2-3 minutos no gelo.

6. Centrifugar as amostras por 15 minutos a 12000 g à 4°C.

A mistura irá se separar em uma fase mais baixa rosa que contém fenol-clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa transparente superior.

7. Transferir 600 uL da fase superior que contém o RNA para um novo tubo.

8. Adicionar um volume igual de etanol 70% gelado e misturar no vortex. Inverter o tubo para dispersar qualquer precipitado visível que se forme após a adição do etanol.

9. Transferir 600 uL da amostra para a coluna *spin cartridge* com tubo coletor.

10. Centrifugar a 12000 g por 15 segundos. Descartar o fluxo e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.

11. Transferir os outros 600 uL da amostra para a coluna e centrifugar a 12000g por 15 segundos. Descartar o fluxo e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.

12. Adicionar 350 uL de Wash Buffer I na coluna contendo o RNA ligado, centrifugar por 12000 g por 15 segundos. Descartar o fluxo e o tubo coletor, reinserir em um novo tubo coletor.

13. Adicionar 80 uL do MIX DNase na membrana e incubar em temperatura ambiente por 15 minutos.

a. O mix é preparado da seguinte forma:

10 uL RQ1 RNase-free DNase (1U/uL).

8 uL RQ1 RNase-Free DNase 10X Reaction Buffer.

62 uL RNase-free Water.

14. Adicionar 350 uL de Wash Buffer I na coluna e centrifugar a 12000 g por 15 segundos. Descartar o fluxo e o tubo coletor, reinserir em um novo tubo coletor.

15. Adicionar 500 uL de Wash Buffer II na coluna e centrifugar a 12000 g por 15 segundos. Descartar o fluxo e reinserir a coluna no mesmo tubo coletor.

16. Repetir o passo 15.

17. Centrifugar a 12000 g por 1 minuto para secar a membrana. Descartar o tubo coletor e inserir a coluna em um novo tubo.

18. Adicionar 30-100 uL RNase-free Water no centro da coluna.

19. Incubar por 1 minuto e centrifugar a 12000 g por 2 minutos.

20. Descartar coluna e estocar RNA à -80°C.

## ANEXO II: Síntese de cDNA para SS-RT-PCR

### GoScript™ Reverse Transcription System (Promega)

1. Homogeneizar cada componente antes de usar.

2.

a) Para controle positivo e controle negativo:

Reagente	Volume (µL)
RNA tratado	q.s.p 1µg
Primer Oligo(dT)	1 µL
Random Primer	1 µL
H2O Nuclease-free	q.s.p 6 µL

b) Para primers-específicos:

Reagente	Volume (µL)
RNA tratado	q.s.p 1µg
Primer gene-específico (10pmol)	1 µL
H2O Nuclease-free	q.s.p 6 µL

3. Colocar os tubos em um termociclador à 70°C por 5 minutos. Em seguida, colocar no gelo por 5 minutos.

4. Preparar mix da reação de transcrição reversa, 19 µL para cada reação de cDNA.

a) Para controle positivo e primers gene-específicos:

Componentes	Volume (µL)
GoScript™ 5X Reaction Buffer	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (5mM)	5 µL
PCR Nucleotide Mix(0,5 mM/ dNTP)	1,25 µL
RNasin ®	0,5 µL
GoScript™ Transcriptase Reversa	1,0 µL

Água Nuclease Free	6,25 µL
--------------------	---------

b) Para controle negativo:

<b>Componentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
GoScript™ 5X Reaction Buffer	5 µL
MgCl <sub>2</sub> (5mM)	5 µL
PCR Nucleotide Mix(0,5 mM/ dNTP)	1,25 µL
RNasin ®	0,5 µL
Água Nuclease Free	7,25 µL

5. Adicionar 19 µl do mix de transcrição reversa com 6 µl do Mix de RNA com primers.

6. Homogeneizar e dar spin.

7. Colocar os tubos em um termociclador à 25°C por 5 minutos, seguido de extensão à 42°C por 60 minutos e inativação à 70°C por 15 minutos.

8. Armazenar a -20°C até o uso.

### **ANEXO III: Minipreparação de Plasmídios**

#### **PureYield™ Plasmid Miniprep System**

1. Transferir as amostras do cultivo em tubo para um microtubo de 1,5 mL.
2. Centrifugar a 1300 rpm por 3 minutos.
3. Descartar sobrenadante
4. Vortexar o pellet por 30 segundos.
5. Adicionar 100 mL do Cell Lysis Buffer e misturar por inversão 6 vezes.
6. Adicionar 350 µL gelado (4- 8°C) de Neutralization Solution e misturar por inversão.
7. Centrifugar à velocidade máxima por 10 minutos.
8. Transferir o sobrenadante para a coluna sem pegar os debris.
9. Centrifugar à velocidade máxima por 30 segundos.
10. Adicionar 200 µL da Endotoxin Removal Wash na coluna.
11. Centrifugar à velocidade máxima por 30 segundos.
12. Adicionar 400 µL da Column Wash Solution na coluna.
13. Centrifugar à velocidade máxima por 30 segundos.
14. Transferir a coluna para um novo tubo de 1,5 mL.

15. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  de Elution Buffer no meio da coluna. Deixar por 1 minuto em temperatura ambiente.
16. Centrifugar por 1 minuto à velocidade máxima.
17. Armazenar em  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

## **ANEXO IV: Purificação de DNA em gel de agarose**

### **Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (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 minuto.
7. Centrifugar a 16.000 g por 1 minuto, descartar o eluído e reinserir a minicoluna no tubo coletor.
8. Adicionar 700  $\mu$ L de Membrane Wash Solution (geladeira).
9. Centrifugar a 16.000 g por 1 minuto e descartar o eluído.
10. Adicionar 500  $\mu$ L de Membrane Wash Solution.
11. Centrifugar a 16.000 g por 5 minutos.
12. Esvaziar o tubo coletor e centrifugar a minicoluna a 16.000 g por 1 minuto com a tampa da centrifuga 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  $\mu\text{L}$  (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 minuto.
16. Centrifugar a 16.000 g por 1 minuto.
17. Descartar a minicoluna.
18. Quantificar no nanodrop.
19. Estocar o DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## Anexo V: Ligação de produtos de PCR e Transformação.

### 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.uniduesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uniduesseldorf.de/Lig_Input.html);

2. Preparar tubos para ligação:

REAGENTES	VOLUME (µL)
Produto da PCR/Purificação	1 (diluído)
Solução de sal	1
Água milli-Q	3
TOPO vetor	1
Volume final	6

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 (DH5α) no gelo.

7. Adicionar 3 µL da reação de ligação no tubo contendo as células competentes (aproximadamente 80 µL) e homogeneizar gentilmente na mão.

8. Incubar em gelo por 30 minutos.

9. Dar choque térmico nas células sem agitar: 30 segundos a 42°C seguido de gelo imediatamente.

10. Adicionar 150 µL de meio SOC em temperatura ambiente nas células.

11. Agitar tubos (180 rpm no shaker) a 37°C por 1 hora.
12. Fazer mix de X-GAL (20 µL a 40 mg/mL) e IPTG (4 µL a 100 mM).
13. Pipetar 24 µL de mix em cada placa contendo LB-Ágar com ampicilina 100 µg/mL 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 minutos ou até o momento de utilizar.
16. Pipetar as células transformadas (passo 11) em cada placa.
  - a. Aproximadamente 50-70 µL 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 mínimo 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 com ampicilina (100 µg/mL).
21. Colocar sob agitação no shaker a 250 rpm a 37°C por até 16 horas.