

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AMANDA OLIVEIRA MOURA

**CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA DO GENE *POU class 5 homeobox 1*
(*POU5F1/OCT4*) EM GAMETAS, EMBRIÕES E LINHAGENS DE
FIBROBLASTOS BOVINOS**

UBERLÂNDIA

2023

AMANDA OLIVEIRA MOURA

**CARACTERIZAÇÃO EPIGENÉTICA DO GENE *POU class 5 homeobox 1*
(*POU5F1/OCT4*) EM GAMETAS, EMBRIÕES E LINHAGENS DE
FIBROBLASTOS BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Biotécnicas e eficiência reprodutiva

Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

UBERLÂNDIA

2023

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

M929 2023	Moura, Amanda Oliveira, 1996- Caracterização epigenética do gene POU class 5 homeobox 1 (POU5F1/OCT4) em gametas, embriões e linhagens de fibroblastos bovinos [recurso eletrônico] / Amanda Oliveira Moura. - 2023. Orientador: Maurício Machaim Franco. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2023.80 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Veterinária. I. Franco, Maurício Machaim, 1957-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Ciências Veterinárias. III. Título. CDU: 619
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO PPGCVET Nº 04/2023				
Data:	06 DE FEVEREIRO DE 2023	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	17:30
Matrícula do Discente:	12112MEV001				
Nome do Discente:	AMANDA OLIVEIRA MOURA				
Título do Trabalho:	Caracterização epigenética do gene POU class 5 homeobox 1 (POU5F1/OCT4) em gametas, embriões e linhagens de fibroblastos bovinos				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	CONTROLE EPIGENÉTICO DA GAMETOGENESE E EMBRIOGENESE INICIAL				

Reuniu-se na sala 216, Campus Glória, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Márcia Marques Silveira - UFU; Robson Carlos Antunes - FAMEV/UFU e Maurício Machaim Franco - Embrapa, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Maurício Machaim Franco, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Robson Carlos Antunes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/02/2023, às 17:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Marques Silveira, Usuário Externo**, em 06/02/2023, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maurício Machaim Franco, Usuário Externo**, em 06/02/2023, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4141195** e o código CRC **24548B58**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos meus pais, Alda e Sérgio que estiveram comigo durante todo esse tempo, mesmo que de forma não presencial. Em especial minha mãe, que é minha companheira de vida para o que der e vier. Esse trabalho só foi possível graças a vocês.

Ao Prof. Dr. Maurício, meu orientador, pela orientação, amizade, ensinamentos e por toda contribuição necessária durante essa jornada. Pela oportunidade dada de crescer como pessoa e como profissional.

Aos meus amigos, em especial aos que fiz em Brasília e pretendo levar para toda vida, principalmente Thainara e Luna, minhas companheiras de bancada que me mostraram como funciona a arte da Biologia Molecular (sempre vou dever isso a vocês). Ao Júlio César, meu amigo e colega de pós-graduação que sempre me apoiou, obrigada por toda ajuda.

A toda equipe do LRA, em especial Dra. Margot, Ligiane e Nayara, além de todos que possibilitaram grande parte deste experimento, e oportunidade de tê-las como amigas. A Isabella, o pessoal da limpeza, principalmente Aninha e Dacilene pelos divertidos horários de almoço e todos os funcionários do Cenargen em geral.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por ceder o espaço e toda estrutura para a realização deste projeto. Além dos professores por compartilharem seu conhecimento durante toda a pós-graduação e participação na banca examinadora para enriquecimento do projeto.

A Universidade Federal de Uberlândia e o Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pelo curso ofertado e a oportunidade de cursá-lo.

A Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) pelo financiamento do experimento e pela bolsa de estudos concedida.

“Crê em ti mesmo, age e verá os resultados. Quando te esforças, a vida também se esforça para te ajudar.”

- Chico Xavier

RESUMO

Um dos principais mecanismos epigenéticos é a metilação do DNA, que consiste na adição de um grupo metil (CH_3) em um sítio CpG. Se a metilação do DNA ocorre numa ilha CpG dentro de um promotor gênico, há o impedimento da ligação de fatores de transcrição ao DNA e consequentemente reprime a transcrição gênica. Uma das características de um zigoto é a pluripotência celular, a partir do qual uma única célula deve ser capaz de se diferenciar em um organismo completo. Neste sentido, um dos genes de maior importância é o *POU class 5 homeobox 1 (POU5F1)* que codifica um fator de transcrição denominado OCT4 (Fator de transcrição ligante no octâmero 4), por isso também comumente chamado na literatura de gene *OCT4*. O mesmo é responsável pela manutenção da pluripotência celular e estudos mostram que sua expressão é controlada por metilação de DNA. Este trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil de metilação de uma região do gene *OCT4* situada dentro de uma ilha CpG, abrangendo a região 5'UTR, o éxon 1 e parte do íntron 1, em tipos celulares diferentes (gametas, embriões e fibroblastos), além de avaliar a expressão do gene em fibroblastos fetais e de animais adultos, já que em bovinos, uma caracterização tão ampla do gene em diferentes tecidos não havia sido realizada até o momento. No geral, o DNA na região estudada em ovócitos apresentou-se hipermetilado em relação aos espermatozoides; embriões possuem hipometilação na região estudada. Enquanto fibroblastos fetais se apresentaram hipometilados em relação a fibroblastos de animais adultos. Em se tratando de expressão gênica, não houve diferença na quantidade relativa de mRNA entre fibroblastos adultos e fetais, considerando $p < 0,05$. Os resultados encontrados mostram que quanto maior a diferenciação celular, comparando embriões, fibroblastos fetais e fibroblastos adultos, maior os níveis de metilação do DNA; em gametas, apesar de serem células altamente especializadas, foi encontrado um padrão de hipometilação do gene *OCT4* no DNA, indicando sua importância para o desenvolvimento embrionário inicial.

Palavras-chave: Epigenética; Metilação de DNA; Bovinos; OCT4; Pluripotência celular.

ABSTRACT

One of the main epigenetic mechanisms is DNA methylation, which consists of the addition of a methyl group (CH₃) to a CpG site. One of the characteristics of a zygote is cellular pluripotency, from which a single cell must be able to differentiate itself in a complete organism. In this sense, one of the most important genes is *POU class 5 homeobox 1* (*POU5F1*) which encodes a transcription factor called OCT4 (Transcription factor in octamer 4), so also commonly called in the OCT4 gene literature. It is responsible for maintaining cellular pluripotency and studies show that its expression is controlled by DNA methylation. This study aimed to characterize the methylation profile of a region of the *OCT4* gene located within a CpG island, covering the 5'UTR region, exon 1 and part of intron 1, in different cell types (gametes, embryos and fibroblasts), in addition to evaluating gene expression in fetal fibroblasts and adult animals, since in cattle, such a broad characterization of the gene in different tissues had not been performed so far. In general, DNA in the region studied in oocytes was hypermethylated in relation to spermatozoa; embryos have hypomethylation in the studied region. While fetal fibroblasts were hypomethylated in relation to adult fibroblasts. Regarding gene expression, there was no difference in the relative amount of mRNA between adult and fetal fibroblasts, considering $p < 0.05$. The results found show that the higher the cell differentiation, comparing embryos, fetal fibroblasts and adult fibroblasts, the higher the levels of DNA methylation; in gametes, which despite being highly specialized cells, a pattern of *OCT4* hypomethylation was found in DNA, indicating its importance for initial embryonic development.

Keywords: Epigenetic; DNA methylation; Cattle; OCT4; Cellular pluripotency.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da metilação de manutenção e metilação <i>de novo</i>	19
Figura 2 – Representação da atuação das TETs na desmetilação do DNA.....	21
Figura 3 – Localização dos <i>primers</i> dentro da ilha CpG do gene <i>OCT4</i>	32
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 2,0 %.....	41
Figura 5 – Perfil de metilação do gene <i>OCT4</i> nas duas regiões avaliadas em ovócitos bovinos maturados <i>in vitro</i>	42
Figura 6 – Porcentagem de metilação para o gene <i>OCT4</i>	43
Figura 7 – Perfil de metilação do gene <i>OCT4</i> em espermatozoides bovinos....	44
Figura 8 – Porcentagem de metilação do gene <i>OCT4</i> em espermatozoides bovinos.....	45
Figura 9 – Comparação do perfil de metilação de ovócitos e espermatozoides bovinos.....	46
Figura 10 – Perfil de metilação do gene <i>OCT4</i> em embriões produzidos <i>in vitro</i>	47
Figura 11 – Comparação do percentual de metilação do DNA para o gene <i>OCT4</i> de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> entre as duas regiões estudadas.....	48
Figura 12 – Perfil de metilação do gene <i>OCT4</i> para a região do primeiro éxon avaliadas em fibroblastos bovinos cultivados <i>in vitro</i>	49
Figura 13 – Comparação do percentual de metilação do gene <i>OCT4</i> em fibroblastos bovinos de animais adultos e fetos para a região do primeiro éxon.....	50
Figura 14 – Análise do percentual total de metilação da região de primeiro éxon do gene <i>OCT4</i> em fibroblastos bovinos de diferentes animais adultos em relação aos fetos.....	51
Figura 15 – Perfil de metilação do gene <i>OCT4</i> para a região do primeiro íntron avaliadas em fibroblastos bovinos cultivados <i>in vitro</i>	52

Figura 16 – Comparação do percentual de metilação de fibroblastos bovinos entre animais adultos e entre fetos para a região do primeiro íntron do gene <i>OCT4</i>	53
Figura 17 – Comparação do percentual de metilação de fibroblastos bovinos entre animais adultos e fetos para a região do primeiro íntron do gene <i>OCT4</i>	53
Figura 18 – Representação esquemática dos resultados da análise de metilação do gene <i>OCT4</i> em diferentes tecidos de bovinos.....	54
Figura 19 – Abundância relativa de mRNA do gene <i>OCT4</i> em fibroblastos fetais e adultos.....	55
Figura 20 – Correlação entre o nível de transcritos do gene <i>OCT4</i> e o percentual total de metilação das duas regiões estudadas em fibroblastos bovinos.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação da região genômica, sequências dos <i>primers</i> e tamanho do fragmento amplificado.....	34
Tabela 2 - Condições da <i>hemi-nested</i> PCR para região <i>OCT4</i> primeiro éxon	35
Tabela 3 - Condições da <i>hemi-nested</i> PCR para região <i>OCT4</i> primeiro íntron	36
Tabela 4 - Identificação do gene, sequência dos <i>primers</i> , tamanho do fragmento amplificado em pares de base, eficiência de amplificação dos <i>primers</i> e referência de acesso ao <i>Genbank</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCOs Complexo cumulus-ovócito

CH₃ Grupo metil

CL Corpo Lúteo

CpG Citosina-fosfato-Guanina

DNA Ácido desoxirribonucleico

DNMT DNA Metiltransferase

dNTP Desoxirribonucleotídeos fosfatados

D8 Dia 8

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

FIV Fecundação *in vitro*

FSH Hormônio Folículo Estimulante

LB Meio Luria-Bertani

LH Hormônio Luteinizante

M Molar

mA Miliampere

mg Miligrama

MgCl₂ Cloreto de magnésio

min Minutos

MIV Maturação *in vitro*

mL Mililitro

mm Milímetro

mM Milimolar

mRNA RNA mensageiro

NaCl Cloreto de sódio

OCT4 Fator de transcrição ligante no octâmero 4

pb Pares de base

PBS Solução salina em tampão fosfato

PCR Reação em cadeia da polimerase

pH Potencial hidrogeniônico

PIVE Produção *in vitro* de embriões

Pmol Picomol

RNA Ácido ribonucleico

RNAse Ribonuclease

rpm Rotação por minuto

s Segundo

SDS Dodecil sulfato de sódio

SPTZ - Espermatozoide

TBE Tampão Tris-Borato-EDTA

TCM-199 Meio de Cultura de Tecidos-199

TET *Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*

U Unidades

X-GAL 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

°C Graus Celsius

μ g Micrograma

μ L Microlitro

μ M Micromolar

ng Nanograma

μ m Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Epigenética	14
1.2 Metilação de DNA	17
1.3 O gene <i>OCT4</i>	23
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Obtenção do material biológico	28
3.1.1 Obtenção dos fibroblastos	28
3.1.2 Coleta dos ovócitos e maturação <i>in vitro</i>	28
3.1.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões	29
3.1.4 Espermatozoides	30
3.2 Extração do DNA genômico	30
3.2.1 Fibroblastos	30
3.2.2 Ovócitos	31
3.2.3 Embriões	31
3.2.4 Espermatozoides	31
3.3 Caracterização do perfil de metilação de DNA do gene <i>OCT4</i>	32
3.3.1 Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio	33
3.3.2 Amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio por PCR	33
3.3.3 Clonagem dos <i>amplicons</i> e extração do DNA plasmidial	36
3.3.4 Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências	37
3.4 Análise da expressão do gene <i>OCT4</i> em fibroblastos	38
3.4.1 Extração de RNA de fibroblastos	38
3.4.2 Síntese de cDNA (Transcrição Reversa)	38
3.4.3 RT-qPCR	38
3.5 Análise Estatística	39
4 RESULTADOS	41
4.1 Padrão de metilação do gene <i>OCT4</i>	41
4.1.1 Ovócitos e espermatozoides	41
4.1.2 Embriões	47
4.1.2 Fibroblastos	48

4.2 Análise de expressão gênica para o gene <i>OCT4</i>	55
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epigenética

Em meados dos anos 1940 o termo “epigenética” foi utilizado pela primeira vez por Conrad Waddigton para descrever modificações que afetam a transcrição gênica sem necessariamente alterar a sequência primária do DNA (LI, 2021). O prefixo “epi” se origina do grego, que significa “acima”, podendo ser definido como “acima da genética” ou “acima do código genético” (FRANCIS et al., 2010). Essas modificações possuem estabilidade mitótica, e posteriormente foi constatado que possuem também estabilidade meiótica, ou seja, são características químicas herdáveis (NAGY; TURECKI, 2015). Além disso, por serem características propagadas através da replicação do DNA na divisão e multiplicação celular, são marcas importantes na memória das células (GJALTEMA; ROTS, 2020).

Todas as células do organismo possuem o mesmo código genético, porém cada tipo celular se comporta de uma forma diferente e possui funções distintas. Isso pode ser explicado através da epigenética que faz uma regulação gênica onde a célula mantém sua característica de expressar alguns genes e outros não através de modificações na conformação da cromatina (WILLIAMS, 2013; HOGG et al., 2020).

A arquitetura da cromatina é bastante importante na regulação da transcrição gênica, pois quanto mais compactada a fita de DNA, mais improvável a ligação física da RNA polimerase para síntese de RNA mensageiro (mRNA) e consequentemente transcrição do mesmo. Nesse sentido, a estabilidade da compactação da cromatina durante as divisões celulares é importante para a manutenção da função da célula, e essa estabilidade se dá por mecanismos epigenéticos (ALABERT; GROTH, 2012; KLEMM et al., 2019).

Atualmente, existem muitos estudos mostrando a importância da epigenética em diversas áreas, incluindo sua influência em doenças como câncer, diabetes, Alzheimer, dentre outras, e como suas modificações

podem afetar tanto a saúde quanto o desenvolvimento de humanos e animais (CHEN et al., 2017). Em bovinos, os estudos se concentram em avaliar como as biotécnicas da reprodução podem influenciar marcas epigenéticas no genoma dos animais produzidos, como por exemplo, embriões clones, onde uma série de anomalias fetais e placentárias, além da baixa eficiência da técnica pode ser explicada por características epigenéticas aberrantes (SMITH, L. C. et al., 2012).

Dentre os principais mecanismos epigenéticos estão: 1) as alterações pós-traducionais das histonas (proteínas que enovelam a fita de DNA), onde as mesmas sofrem alterações químicas e físicas resultando em uma maior ou menor condensação da cromatina e assim regulando a transcrição; 2) RNAs não codantes curtos e longos, atuando sobre a cromatina e regulando a transcrição em nível pré/transcricional, e 3) metilação de DNA que consiste na adição de um grupo metil ao DNA através das DNA metiltransferases (DNMTs) (DEANS; MAGGERT, 2015)

As modificações pós-traducionais de histonas acontecem quando o –N ou –C terminal dessas proteínas sofrem alterações que podem ser acetilação, fosforilação, metilação, SUMOilação e/ou ubiquitinação (YANG et al., 2021). Essas modificações alteram a carga elétrica e as estruturas dos segmentos caudais das histonas que se conectam ao DNA, o que pode alterar o estado de condensação da cromatina e consequentemente a expressão gênica (STRAHL; ALLIS, 2000; YANG et al., 2021).

Além disso, essas alterações nas histonas podem ter efeitos indiretos como impossibilitar o acesso de complexos de remodelação da cromatina ou controlar o recrutamento de fatores de transcrição, e essas alterações continuam sendo estudadas para entendermos como elas podem afetar a transcrição do gene e condensação da cromatina quando são encontradas (LAWRENCE et al., 2016).

Em bovinos, alguns estudos de modificações de histonas se baseiam em entender como essas modificações alteram padrões de expressão gênica em blastocistos e desenvolvimento de técnicas que auxiliam a visualização de como acontece a remodelação da cromatina através dessas

alterações proteicas (ORG et al., 2019). Outro estudo, também em bovinos, realizado em 2020, mostrou a dinâmica de acetilação e metilação de histonas por imunocoloração em ovócitos maturados *in vitro*, zigotos e embriões em estágio de pré-implantação, demonstrando que tanto a dinâmica quanto os locais de acetilação e metilação de histonas na cromatina mudam ao longo do desenvolvimento embrionário, possibilitando estudos posteriores para entendermos como essas dinâmicas das alterações de histonas podem influenciar no desenvolvimento e sucesso da reprodução em bovinos (WU et al., 2020).

Estudos recentes, principalmente nos últimos 10 anos, mostram que não só as proteínas estão envolvidas na transcrição gênica, mas também os RNAs não codantes, que possuem influência em processos fisiológicos. Os sequenciamentos de nova geração, assim como a bioinformática demonstram que esses RNAs alteram a transcrição de DNA em diferentes níveis, podendo ser microRNAs, RNAs longos não codificantes (lncRNAs) e RNAs circulares (circRNAs) (PANNI et al., 2020).

RNAs não codantes curtos são caracterizados por possuírem menos de 200 nucleotídeos e não fazerem codificação de proteína (JOSHI; RAJENDER, 2020), dentre estes estão os microRNAs que são moléculas de RNA pequenas, com aproximadamente 22 nucleotídeos que regulam a expressão de mRNAs, se ligando a região 3'UTR impedindo a tradução, modulando assim a expressão gênica por inibir a tradução e consequentemente a síntese proteica (MEISTER GUNTER; TUSCHL THOMAS, 2004).

Os microRNAs também interagem com os RNAs longos não codificantes, sendo que estes são RNAs que possuem como principais características seu tamanho (mais de 200 nucleotídeos) e não codificam proteína. Os RNAs longos não codificantes podem exercer regulação transcricional ou pós transcricional dos genes (DYKES; EMANUELI, 2017). Já os circRNAs são produtos do *splicing*, não são codificados e têm conformação fechada por ligação covalente, são estruturas simples e

geralmente possuem sequências repetitivas (KISHORE; KARUNAGARAN, 2022).

Os estudos mais recentes buscam entender como os RNAs não codificantes podem atuar na espermatogênese de humanos, roedores, bovinos e ovinos, além de tentarem utilizá-los como marcadores moleculares da infertilidade masculina (JOSHI; RAJENDER, 2020). Especialmente em bovinos, os estudos mais atuais envolvendo RNAs não codificantes relacionam os mesmos com regulação da miogênese em músculo esquelético (CHEN et al., 2019), e também no leite materno indicando que os mesmos possuem funções imunológicas para desenvolvimento do neonato (SHOME et al., 2021).

A metilação de DNA é descrita como uma marca epigenética que provoca a inibição da transcrição gênica, mas isso nem sempre é o que ocorre, pois essa inibição acontece dependente do local no genoma em que acontece a metilação. Geralmente esse mecanismo inibe fisicamente a ligação de fatores de transcrição no gene ou recruta enzimas que modificam a conformação da cromatina (JONES, 2012; BAUBEC; SCHÜBELER, 2014; ZAFON et al., 2019).

1.2 Metilação de DNA

A descoberta do mecanismo de metilação do DNA em mamíferos surgiu quase que na mesma época em que foi descrita a função do DNA. Em 1948, uma citosina modificada foi encontrada, por Rollin Hotchkiss em um timo de bezerro. Várias hipóteses foram levantadas na época onde a principal delas foi de que a metilação de DNA influencia na expressão gênica afetando a afinidade de fatores de transcrição com a fita de DNA, além de que os padrões de metilação variam de acordo com o diferente tipo celular (HOTCHKISS, 1948; HOLLIDAY; PUGH, 1975). Apenas nos anos 1980 foram publicados estudos que mostraram a influência da metilação de DNA no silenciamento e expressão gênica (COMPERE; PALMITER, 1981).

Muitos grupos de pesquisa estudaram a função da metilação de DNA através do seu padrão em diferentes tecidos, e para isso, utilizaram genes de interesse que são expressos especificamente em um grupo celular, como genes que codificam a albumina e β -globina. Nesses estudos, foi encontrado que a metilação varia no mesmo organismo quando em tecidos diferentes, onde os genes estavam hipermetilados em células que não produzem albumina e β -globina e hipometilado em tecidos que produzem as substâncias, concluindo que o percentual de metilação é inversamente proporcional a expressão gênica, ou seja, um gene metilado não é expresso e um gene desmetilado é codificado (MURRAY; THOMPSON, 1980; MATTEI et al., 2022).

A metilação é a ligação covalente de um grupo metil (CH_3) em um sítio CpG (Citosina-fosfato-Guanina), ou seja, em citosinas seguidas por guaninas através de enzimas denominadas DNMTs (*DNA methyltransferases*), onde a DNMT1 faz a manutenção da metilação de DNA, enquanto as DNMTs 3A e 3B são responsáveis pela metilação *de novo* (MOORE et al., 2013). E recentemente estudos mostraram que a DNMT3L aumenta a especificidade da ligação do grupo metil mantendo assim a especificidade das DNMTs 3A e 3B, sendo descrita principalmente em células germinativas e timo de adultos (CHATTOPADHYAYA; GHOSAL, 2022). A metilação de DNA é uma marca epigenética reversível e herdável (SKVORTSOVA et al., 2018). É um dos principais mecanismos epigenéticos envolvidos com o *imprinting* genômico, a inativação do cromossomo X e regulação de genes relacionados com o desenvolvimento embrionário inicial (MORGAN et al., 2004).

A metilação de manutenção de DNA ocorre de forma semiconservativa, pois durante a replicação das fitas, a enzima DNMT1 copia o padrão de metilação da fita molde para a fita que acabou de ser sintetizada, e assim a metilação de manutenção ocorre em células que estão sendo replicadas. Já a metilação *de novo* acontece através das DNMT3A e DNMT3B para estabelecimento de novos padrões de metilação em células novas ainda em formação, ou seja, ocorre a adição de um grupo metil em fitas de DNA que

estavam anteriormente desmetiladas (Figura 1) (BIRD, 2002; CHATTOPADHYAYA; GHOSAL, 2022).

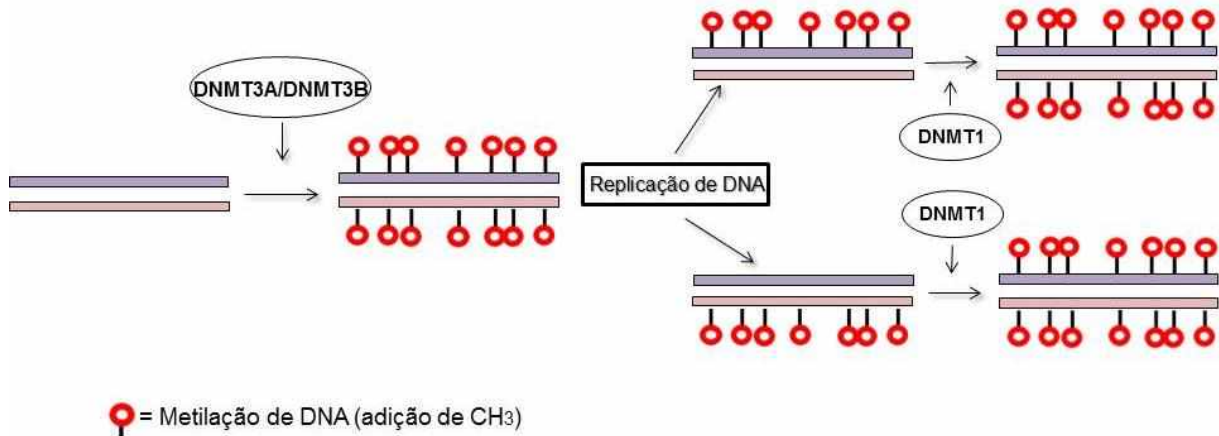


Figura 1 - Representação esquemática da metilação de manutenção e metilação *de novo*. A figura acima representa como as DNMTs 3L, 3A e 3B agem na metilação *de novo* na adição dos grupos metil (CH₃) em DNA desmetilado; e como a DNMT1 age na metilação de manutenção na replicação de DNA. Fonte: a autora (2023).

O silenciamento gênico pela metilação de DNA ocorre porque quando localizada em regiões de promotores gênicos, acontece a repressão do gene pela inibição da ligação de fatores de transcrição na fita de DNA que seria codificada, e, além disso, o grupo metil atrai proteínas com afinidade ao DNA metilado, causando compactação de cromatina e consequente não transcrição do DNA (ATTWOOD et al., 2002; BUCK-KOEHN TOP; DEFOSSEZ, 2013). Porém, quando a metilação se encontra ao longo do gene, após a região promotora, a mesma não possui efeito repressivo na expressão gênica por não impedir a ligação de fatores de transcrição ao DNA, além de garantir estabilidade cromossômica (BESTOR et al., 2015; MUSHTAQ et al., 2021).

O grupo metil (CH₃) é retirado de uma S-adenosil metionina (SAM) e é ligado ao carbono 5 da citosina (MOORE et al., 2013). Aproximadamente 70 – 80% dos sítios CpGs do genoma encontram-se metilados, porém as denominadas ilhas CpGs (região rica em sítios CpGs) permanecem em sua maioria desmetiladas quando encontradas em células germinativas, embriões em estágios iniciais e até mesmo em tecidos somáticos (CHAKRABORTY; VISWANATHAN, 2018).

Uma ilha CpG é descrita como uma região com aproximadamente 200 pares de base onde se encontram 50% ou mais de citosinas seguidas por guaninas (GARDINER-GARDEN; FROMMER, 1987). Aproximadamente 70% das ilhas CpGs estão situadas dentro de promotores gênicos, principalmente de genes relacionados com manutenção celular. Evolutivamente, em camundongos e humanos essas regiões foram altamente conservadas, indicando sua importância para o genoma (SAXONOV et al., 2005; ILLINGWORTH et al., 2010).

Ocorre um silenciamento gênico estável quando uma ilha CpG situada dentro de um promotor gênico está metilada (MOHN et al., 2008). Durante a formação dos gametas e início do desenvolvimento do embrião, ocorre a metilação diferencial das ilhas CpGs em genes *imprinted*, fator importante para formação das diferenças celulares em tecidos e desenvolvimento do conceito no início da gestação (SHEN et al., 2007; WEBER et al., 2007; MOHN et al., 2008).

O processo de desmetilação ativa de DNA acontece mediado pelas *Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenases*, as chamadas TETs, descrita pela primeira vez como TET1, é um catalisador que converte 5-metilcitosina (5mC) em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) (TAHILIANI et al., 2009). Acontece então a oxidação sequencial de 5mC em 5hmC, depois em 5-formilcitosina (5fC) e por fim em 5-carboxilcitosina (5caC), sendo que todas essas citosinas oxidadas possuem leitores específicos, sugerindo efeitos na regulação gênica (ROSS; BOGDANOVIC, 2019). Além disso, as enzimas TDG (*Thymine DNA Glycosylases*) reconhecem a 5fC e 5caC, reparando as mesmas e formando uma nova citosina não metilada (HE et al., 2011).

Em vertebrados, principalmente em mamíferos, existem três TETs, que são TET1, TET2 e TET3, e a principal diferença entre elas é seu sítio catalítico e o tipo celular específico de atuação (MELAMED et al., 2018). Estudos mostram a importância das TETs na pluripotência celular para desenvolvimento embrionário inicial e reprogramação epigenética em camundongos e *zebrafish*, as mesmas são responsáveis pela desmetilação

de agentes que regulam a gastrulação e desenvolvimento do embrião em estágio inicial em diversos vertebrados (Figura 2) (ROSS; BOGDANOVIC, 2019).

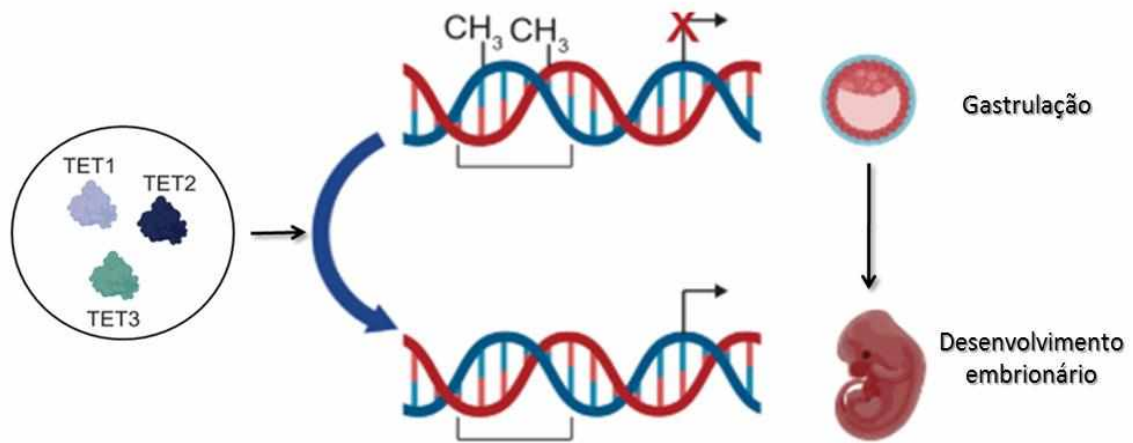


Figura 2 – Representação da atuação das TETs na desmetilação do DNA. A figura acima representa de forma esquemática como as enzimas TETs agem na desmetilação de regiões regulatórias no início do desenvolvimento embrionário. Adaptado de (ROSS; BOGDANOVIC, 2019).

A desmetilação também pode ocorrer de forma passiva por meio de replicação celular quando a DNMT1 para de atuar na metilação de manutenção (SEISENBERGER et al., 2013). Logo após a fecundação, o padrão de metilação do DNA do zigoto sofre alterações, nas quais o genoma paterno é desmetilado de forma ativa e o genoma materno de forma passiva (TIEDEMANN et al., 2021).

A reprogramação epigenética acontece nos mamíferos de forma que o genoma sofre uma reprogramação, e a metilação de DNA é um dos principais mecanismos relacionados a esse evento. Essa reprogramação acontece em duas ondas, a primeira começa ainda na fase intrauterina, na gametogênese, e a segunda durante o desenvolvimento embrionário inicial (REIK et al., 2001).

A primeira onda de reprogramação epigenética ocorre na gametogênese, onde as células germinativas primordiais (CGPs) precisam de uma remodelação de marcas epigenéticas que ocorrem através da desmetilação. Essa remodelação em camundongos acontece

aproximadamente a partir do dia 7 após a fecundação, o que coincide com o período de migração das CGPs para a crista genital (SAITOU et al., 2012). Essa desmetilação acontece inicialmente de forma passiva (entre o dia 8 e 9 após a fecundação) seguida de uma desmetilação ativa (entre o dia 10 e 13 após a fecundação) através das TET1 e TET2, e nesse mesmo período também ocorre a desmetilação dos genes *imprinted* (MACDONALD; MANN, 2014).

A gametogênese se inicia ainda neste período nas fêmeas, onde começa a meiose que se completa na puberdade, já nos machos a gametogênese é iniciada apenas na puberdade, mas as CGPs já começam a ter um padrão de metilação definido através da metilação *de novo* (LEE et al., 2014).

Nos machos, as CGPs entram em estado de quiescência até aproximadamente o quinto dia pós-parto, quando são formadas as proespermátogônias que não sofrem meiose até a chegada da puberdade (HILSCHER et al., 1974; EWEN; KOOPMAN, 2010), mas ao nascimento, as células que formarão os gametas já se encontram em um padrão de metilação bem estabelecido (REIK et al., 2001). Nas fêmeas, os folículos começam a ser recrutados e os ovócitos neles contidos passam pela metilação *de novo*, mas apenas na puberdade essa metilação atinge os níveis esperados para o gameta feminino. E assim, no momento da fecundação, os gametas tanto femininos quanto masculinos já possuem um padrão de metilação fortemente estabelecido (XIA; XIE, 2020).

A segunda onda de reprogramação epigenética acontece logo após a fecundação, onde ocorre uma desmetilação global tanto do genoma paterno, de forma ativa através das TETs, quanto do genoma materno, de forma passiva através das primeiras divisões celulares sem a atuação da DNMT1 (SMITH, Z. D. et al., 2012; MACDONALD; MANN, 2014). Após essa desmetilação global, ocorre a metilação *de novo*, que em bovinos acontece no estágio de 8-16 células (FERREIRA; FRANCO, 2012) coincidindo com a ativação do genoma do embrião, estabelecendo o padrão de metilação do genoma embrionário através das DNMTs 3A, 3B e 3L (DEAN et al., 2001;

SASAKI; MATSUI, 2008; FERREIRA; FRANCO, 2012; MALLONA et al., 2021).

A metilação é responsável por parte do controle de expressão gênica no organismo, controlando a diferenciação tecidual no início do desenvolvimento embrionário, assim é esperado que padrões de metilação dos tecidos também sejam diferentes. Apesar de cada tecido possuir esse padrão único, não é possível reconhecer o mesmo apenas pelo padrão de metilação, pois durante o desenvolvimento esse padrão pode ser alterado ou mantido por influência externa ou até mesmo pelo envelhecimento celular (RAKYAN et al., 2004; ECKHARDT et al., 2006; MEISSNER et al., 2008; ILLINGWORTH et al., 2010).

Estudos recentes mostram que alguns genes controlados por metilação de DNA estão possivelmente relacionados com o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos através da sua capacidade de ativação da pluripotência celular (ZHOU et al., 2016). Dentre estes, um dos mais importantes, possivelmente controlado por metilação é o gene *OCT4* (*Octamer-binding transcription factor 4*) (GUERRA et al., 2019).

1.3 O gene *POU5F1*

A partir da fecundação, o zigoto, uma célula única deve ser capaz de formar um organismo inteiro e diferenciado a partir de uma só estrutura. Cada tecido deve ser diferenciado e ter sua respectiva função, e a capacidade de uma célula se diferenciar em outras é chamada de pluripotência celular (OSORNO et al., 2012; LIU et al., 2020).

Um dos genes mais importantes na pluripotência celular além de *NANOG*, *SOX2*, *KLF4* dentre outros, é o gene *OCT4* (ROBINSON et al., 2021). O mesmo foi descoberto há mais de 25 anos (OKAMOTO et al., 1990; JERABEK et al., 2014) e é específico do desenvolvimento embrionário inicial, e, além disso, possui papel de extrema relevância na produção de Células Tronco Induzidas (iPSCs) e estudos mostram que é o único que não

pode ser substituído por membros da mesma família na reprogramação celular (JERABEK et al., 2014).

O chamado *Octamer-binding transcription factor 4* (*OCT4* ou também chamado de *OCT3* ou *OTF3*) possui em bovinos uma estrutura que conta com 5 éxons e 4 íntrons, contendo 4500 nucleotídeos (“*Bos taurus* isolate L1 Dominette 01449 registration number 42190680 bre - Nucleotide - NCBI”) e está localizado no cromossomo 23 em bovinos (“Cow bosTau9 chr23:27,982,798-27,987,297 UCSC Genome Browser v440”). O mesmo é responsável pela manutenção da totipotência em células tronco embrionárias e massa celular interna do blastocisto, onde sua expressão começa a ser acentuada a partir do estágio de 8 células. É o gene atribuído à manutenção das células primordiais germinativas (WU; SCHÖLER, 2014; SIMMET et al., 2018).

OCT4 se refere à isoforma *OCT4A* ou *OCT4B* em camundongos e *OCT4A*, *OCT4B* e *OCT4B1* em humanos (ZHANG et al., 2020), um fator de transcrição codificado por um gene denominado *POU5F1* (*POU class 5 homeobox 1*) da família *POU* que tem como característica a ligação em seus genes-alvo em um octâmero (ATGCAAAT) (JERABEK et al., 2014; WU; SCHÖLER, 2014; ZEINEDDINE et al., 2014).

Estudos mostram que a quantificação relativa de mRNA do gene possui diferentes níveis ao longo do desenvolvimento embrionário dependendo do estágio de diferenciação dos tecidos, em que nas células do trofoblasto essa quantificação é baixa e nas células mesodérmicas e endodérmicas primordiais é alta (NIWA et al., 2005), demonstrando que a expressão do gene diminui conforme a diferenciação celular (HISEY et al., 2021).

Além disso, é um gene único em vertebrados que possui homologia entre as espécies, sendo que em bovinos a proteína codificada possui 90,6% e 81,7% de homologia com seus ortólogos em humanos e camundongos, respectivamente (EIJK, VAN et al., 1999).

Em suas primeiras descrições, o gene *OCT4* estava expresso em ovócitos imaturos, embriões em estágios iniciais de desenvolvimento e

carcinomas (HERR et al., 1988; LENARDO et al., 1989). Posteriormente se mostrou também como um regulador no estágio pré-implantação (HISEY et al., 2021). Estudos mais recentes buscam entender como o gene contribui para a pluripotência celular e vias de diferenciação, pois as regiões que regulam a pluripotência sofrem influências diretas ou contribuição do *OCT4* para seu funcionamento (AMBROSETTI et al., 1997; MOHIUDDIN et al., 2020). Além disso, também foi descrito como um dos fatores mais importantes na maturação ovocitária e resistência a tratamentos de câncer em humanos (ROSNER et al., 1990; ZHANG et al., 2020).

Estudos mostram que o gene *OCT4* é controlado por modificações epigenéticas que alteram a conformação da cromatina, como a metilação. Em humanos e camundongos, quando a região promotora e primeiro éxon encontram-se hipermetiladas em células do trofoblasto ou em células-tronco embrionárias, há uma condensação da cromatina levando a não transcrição do gene (ZHANG et al., 2008, 2020).

Modificações de histonas como acetilação da H3K56 também podem alterar a transcrição do gene, pois esta se mostra muito estável em linhagens de células-tronco em camundongos (TAN et al., 2013). Também foram encontrados altos níveis de acetilação da H3K9 na região promotora do gene em culturas celulares formadas a partir de células-tronco humanas (GUO et al., 2014).

A fosforilação também altera a expressão gênica do *OCT4*, pois o mesmo interage com o gene *SOX2* na pluripotência celular, e a fosforilação impede essa interação, inibindo a manutenção da pluripotência em células-tronco embrionárias (DAI et al., 2014; ABULAITI et al., 2017). Outra modificação que pode alterar a expressão do gene *OCT4* é a ubiquitinação, pois assim que a proteína transcrita pelo ribossomo sofre essa modificação, ela é degradada, geralmente esse mecanismo acontece de forma regulatória em células diferenciadas (SHI; JIN, 2010; LIAO et al., 2013).

RNAs não codantes também participam da regulação gênica do *OCT4*, inclusive podendo ser utilizados como marcadores moleculares no grau de

invasão de cânceres não diferenciado em humanos, outros também podem ter atividade anti-metastática (ZHANG et al., 2020).

Em 2006, as primeiras células-tronco induzidas (iPSCs) formadas a partir de células totalmente diferenciadas, foram descritas através de uma expressão acentuada de fatores de transcrição relacionados com a totipotência celular (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Atualmente, a formação de iPSCs acontece por uma reprogramação de genes envolvidos na pluripotência celular, como o *OCT4*, que interagem com outros fatores de transcrição também envolvidos com a renovação celular (HERREROS-VILLANUEVA et al., 2014; KUMAR, 2015). Ocorre assim uma sequência de *feedbacks* positivos entre os transcritos de *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* para a formação dessa pluripotência (LOH et al., 2006; MASUI et al., 2007).

Em bovinos, o gene *OCT4* não interage com o gene *SOX2* durante o desenvolvimento embrionário inicial, como acontece em humanos (GOISSIS; CIBELLI, 2014), mas semelhante a camundongos, transcritos do *OCT4* estão presentes no ovócito e vão diminuindo seus níveis até o estágio 8-16 células em bovinos, quando acontece a ativação do genoma embrionário (KUROSAKA et al., 2004; GRAF et al., 2014). No estágio de mórula, foram encontrados níveis de mRNA do gene em praticamente todas as células (WUENSCH et al., 2007; SIMMET et al., 2018).

Estudos mais recentes em bovinos buscaram avaliar a presença do gene *OCT4* em embriões clones utilizando o mesmo como marcador de qualidade embrionária e viabilidade das células-tronco embrionárias (SIMMET et al., 2018). Além disso, também foram feitos estudos em diversos tecidos como coração, pulmão, fígado, cérebro e cerebelo para avaliar as modificações epigenéticas do gene *OCT4* em bovinos em diferentes etapas da gestação para entender como ocorre a influência do mesmo no desenvolvimento embrionário e reprogramação celular (ZHOU et al., 2016).

Na produção animal, estudos que avaliaram células diferenciadas como fibroblastos e seu padrão epigenético do gene *OCT4*, foram voltados

para as biotécnicas da reprodução, já que é a célula de eleição na Transferência Nuclear de Célula Somática (TNCS), sendo assim, é importante estudar como marcas epigenéticas em diversos genes podem contribuir para o sucesso da técnica (SINGINA et al., 2021).

2 OBJETIVOS

- Caracterizar o perfil de metilação da região 5'UTR, do éxon 1 e do íntron 1 do gene *POU5F1/OCT4* em gametas, embriões e linhagens de fibroblastos de pele bovinos;
- Quantificar a expressão do gene *POU5F1/OCT4* em linhagens de fibroblastos de pele de animais adultos e fetos;
- Correlacionar a quantidade relativa de mRNA com o percentual de metilação do gene *POU5F1/OCT4* entre fibroblastos de pele de animais adultos e de fetos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este experimento foi regulamentado pela Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 (“Base Legislação da Presidência da República - Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008”), e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA (CEUA/CENARGEN) sob protocolo CEUA Nº 007/2022 (Anexo 1). Todo o experimento foi realizado na EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Laboratório de Reprodução Animal (LRA).

3.1 Obtenção do material biológico

3.1.1 Obtenção dos fibroblastos

Foram utilizados fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*, oriundos de 2 animais adultos da raça Nelore, sendo 1 fêmea e 1 macho pertencentes à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Além de 4 fetos oriundos de abatedouro, sendo 3 machos e 1 fêmea, obtidos por biópsia de pele através de técnica bem estabelecida no LRA. Resumidamente, as células foram cultivadas em meio Dubelcco's Minimum Eagle Medium (DMEM-GIBCO® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 110 mg/L piruvato, 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos, em garrafas de 25 cm², a 39°C e 5% de CO₂ em ar. Após o estabelecimento do cultivo celular, as células foram congeladas em meio de cultivo contendo DMSO (Dimetil Sulfóxido) (Sigma®) em palhetas de 0,25 mL. Para isso, foram estocadas em ultrafreezer a -80°C por 24 horas e posteriormente transferidas para nitrogênio líquido, onde ficaram armazenadas até sua utilização.

3.1.2 Coleta dos ovócitos e maturação *in vitro*

Foram utilizados ovócitos oriundos de ovários de abatedouro. Os ovários foram obtidos em abatedouro local e transportados em solução salina (NaCl 0,9%) suplementado com penicilina G (100 UI/mL) e sulfato de

estreptomicina (100 ng/mL) a 35°C. Complexos Cumulus-Ovócitos (CCOs) foram aspirados de folículos de 3-8 mm de diâmetro.

Somente os CCOs que apresentaram citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do cumulus foram utilizados. Os CCOs selecionados (graus I e II) foram transferidos em número de 20-25 para uma gota de 200 µL de meio de maturação, coberta com óleo de silicone e incubados por 22 horas a 39°C e 5% de CO₂ em ar. O meio de maturação é constituído de TCM 199 com sais de Earl (Invitrogen®, CA, USA) suplementado com 10% de SFB (Invitrogen®, CA, USA), 0,01 UI/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) (Sigma® Carlsbad, CA, USA), 0,1mg/mL de Glutamina e antibiótico (Amicacina, 0,075 mg/mL).

Após 22 horas de maturação *in vitro* (MIV), os ovócitos foram desnudos utilizando hialuronidase (Sigma® Carlsbad, CA, USA). Os ovócitos foram avaliados quanto à presença do primeiro corpúsculo polar (CP) sob estereomicroscópio (ZEISS®- Stemi SV11) e apenas os que apresentaram CP foram utilizados para as avaliações moleculares. Após sua seleção, foram armazenados 2 pools de 60 ovócitos cada e armazenados a -80°C em PBS.

3.1.3 Produção *in vitro* de embriões

Assim como descrito anteriormente para a coleta dos ovócitos, os ovários também foram advindos de abatedouro, e após aspiração folicular foi realizada a MIV por 22 horas dos CCOs selecionados. Após a maturação, os CCOs foram colocados em gotas de 50 µL de meio de fecundação *Tyrode's albumin lactate pyruvate* [TALP (PARRISH et al., 1995)] suplementado com 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina e 10 µg/mL de heparina, cobertas com óleo de silicone.

Foi utilizado sêmen de um touro já utilizado na rotina do LRA com fertilidade comprovada para a fecundação *in vitro* (FIV). As palhetas contendo o sêmen foram descongeladas a 37°C por 30 segundos. A seleção espermática foi realizada através de gradiente de Percoll (GE® Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 45:90% (400 µL em microtubo de 1,5 mL), centrifugando a 9000 g por 5 min. Após a centrifugação, o *pellet* foi

homogeneizado em 1 mL de meio Sperm-TALP e foi feita outra centrifugação por 9000 g por 5 minutos. Foi realizada a ressuspensão do novo *pellet* formado em aproximadamente 60 µL de meio Sperm-TALP, sendo utilizados 10 µL dessa ressuspensão para a inseminação dos ovócitos em cada gota.

Os potenciais zigotos foram incubados por 18 horas a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Em seguida, os prováveis zigotos foram parcialmente desnudos através de cuidadosa pipetagem, lavados e colocados em gotas de 150 µL de meio fluido do oviduto sintético (SOFaaci) (HOLM et al., 1999), suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, 0,34 mM de citrato trissódico, 2,77 mM de mio-inositol e 5% SFB (Invitrogen®) cobertas com óleo de silicone. Os embriões foram cultivados a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar.

Os embriões produzidos para este estudos foram coletados na fase de Blastocisto Expandido (Bx) no dia 8 de desenvolvimento. Após serem retirados da gota de cultivo, os embriões foram lavados 3 vezes em PBS sem cálcio e magnésio. Em seguida foram armazenados individualmente em RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) a -80°C para posterior análise de metilação de DNA.

3.1.4 Espermatozoides

Foram utilizadas amostras de sêmen de 3 touros da raça Nelore. As amostras de sêmen foram obtidas na fazenda Sucupira da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, com avaliação seminal conhecida.

3.2 Extração do DNA genômico

3.2.1 Fibroblastos

As palhetas contendo as células ficaram armazenadas em botijão contendo nitrogênio líquido até o momento da extração de DNA e RNA, que foi realizada após descongelamento das palhetas a 36°C em banho-maria por 1 minuto. A extração foi realizada utilizando o kit AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen) (Anexo 3), que possibilita a obtenção de DNA e RNA da mesma

amostra. Após o término da extração, tanto o RNA total quanto o DNA foram quantificados e armazenados a -80°C e -20°C respectivamente.

3.2.2 Ovócitos

Em cada um dos 2 *pools* de ovócitos foi adicionada pronase E (Sigma®) na concentração final de 10 mg/mL para promover a digestão da zona pelúcida. Em seguida os *pools* de ovócitos foram submetidos a uma incubação a 37°C por 30 minutos, seguida de outra incubação a 85°C por 15 minutos para inativação da enzima pronase E em termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany). A lise celular ocorreu após choque térmico, em que os ovócitos foram congelados em nitrogênio líquido e imediatamente aquecidos em termociclador a 95°C por 1 minuto. Esse processo foi repetido 5 vezes (Anexo 4).

3.2.3 Embriões

Assim como para ovócitos, a extração do DNA genômico dos embriões foi realizada através de choque térmico (Anexo 4). Foram utilizados 3 *pools* de 5 embriões cada.

3.2.4 Espermatozoides

As palhetas de sêmen de 0,5 mL ficaram armazenadas em botijão contendo nitrogênio líquido até o momento da extração de DNA genômico. Para cada extração, foi utilizada 1 palheta de sêmen de cada animal que foram descongeladas por 1 minuto a 36 °C em banho-maria. Após o procedimento de descongelamento das amostras, a extração do DNA genômico foi realizada utilizando o kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) (Anexo 5). Em seguida foi realizada a quantificação em espectrofotômetro NanoDrop® (ND- 1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA) e a avaliação da integridade do DNA em gel de agarose 0,8% e posterior armazenamento a -20°C.

3.3 Caracterização do perfil de metilação de DNA do gene *OCT4*

Foi caracterizado o perfil de metilação de DNA de parte da região 5' UTR, do primeiro éxon e da parte inicial do primeiro íntron. Por ser uma região muito grande, foi necessário dividi-la em duas regiões: primeiro éxon (parte da região 5'UTR e parte do primeiro éxon) e primeiro íntron (parte do primeiro éxon e parte do primeiro íntron), assim como descrito na Figura 3.

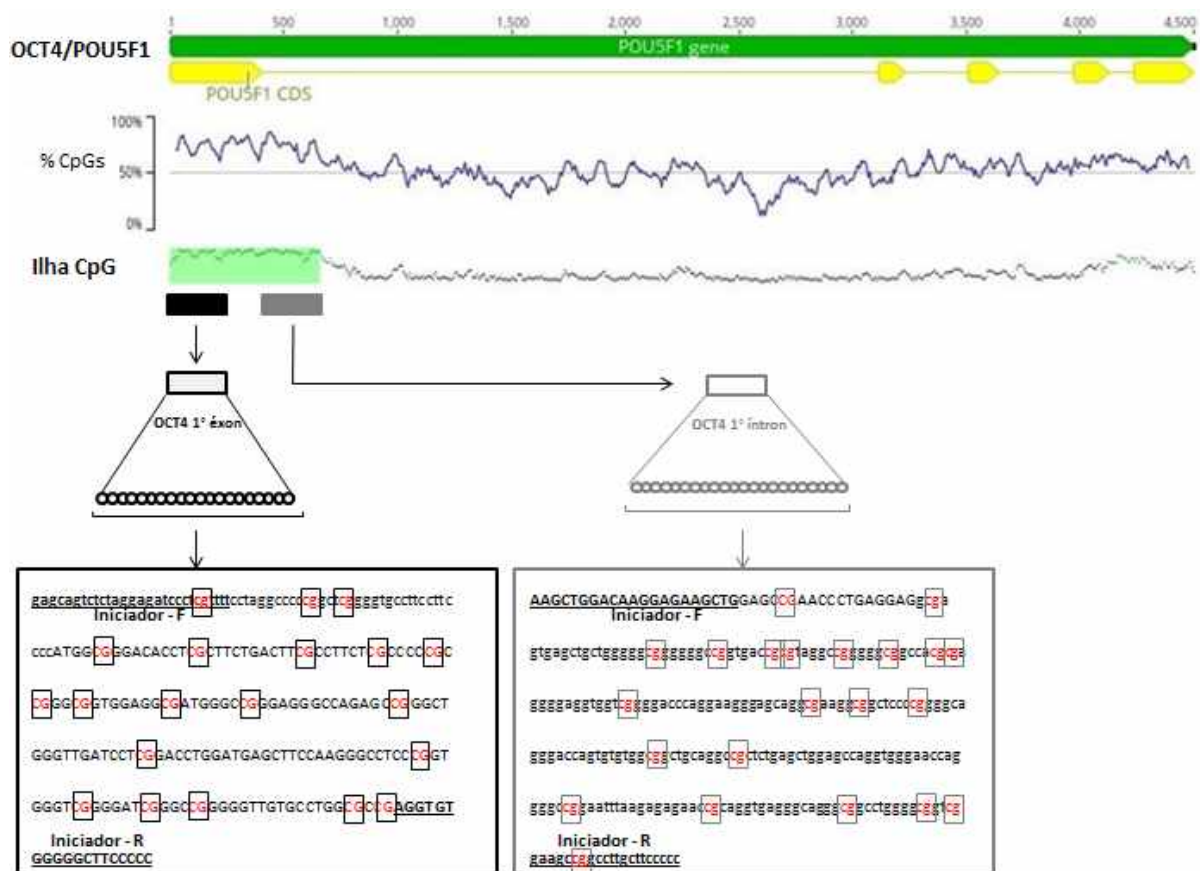


Figura 3 - Localização dos *primers* dentro da ilha CpG do gene *OCT4*. A imagem acima representa a estrutura do gene *OCT4*, onde em amarelo têm-se as representações dos 5 éxons e a linha também em amarelo representam os íntrons. A porcentagem de sítios CpGs estão representadas a seguir, bem como em verde a localização da ilha CpG encontrada no gene pelo *software* Geneious, contemplando primeiro éxon e parte do primeiro íntron. O retângulo preto logo abaixo da ilha CpG mostra de forma esquemática a localização da região amplificada do gene *OCT4* denominada neste estudo como “primeiro éxon”, enquanto o retângulo cinza mostra também de forma esquemática a região amplificada do gene *OCT4* denominada neste estudo como “primeiro íntron”. Abaixo dos respectivos retângulos é mostrado a quantidade de sítios CpGs avaliados, bem como onde se ligam os *primers* *inners* na sequência do gene. Imagem adaptada do *software* Geneious.

Essas duas regiões foram eleitas devido a porcentagem de sítios CpG presentes na sequência, além de serem regiões possivelmente relacionadas ao controle transcricional do gene por causa da sua localização.

Para essa análise do perfil de metilação, foram utilizadas alíquotas de 200 a 500 ng de DNA genômico extraído de fibroblastos e espermatozoides, além de DNA genômico obtido de 2 *pools* de 60 ovócitos maturados *in vitro*, e de 3 *pools* de 5 embriões produzidos *in vitro* em estágio de blastocisto expandido.

3.3.1 Tratamento do DNA genômico com bissulfito de sódio

O DNA genômico extraído de fibroblastos, espermatozoides, ovócitos e embriões foram tratados com bissulfito de sódio utilizando o kit EZ DNA Methylation Lightning (Zymo), seguindo as recomendações do fabricante (Anexo 6). Após o tratamento, as amostras de DNA foram armazenadas a -80°C.

3.3.2 Amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio por PCR

O DNA genômico tratado com bissulfito de sódio foi submetido à amplificação por PCR para duas regiões do gene *OCT4*, ambas localizadas dentro de uma ilha CpG, como já mostrado acima (Figura 1). A referência de acesso de ambas as regiões no UCSC é NM_174580.5 (“Cow bosTau9 chr23:27,982,798-27,987,297 UCSC Genome Browser v440”). Foi realizada *hemi-nested* PCR para as duas regiões utilizando o termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). As sequências dos *primers* utilizados nas reações, localização dos mesmos na sequência do gene e o tamanho dos fragmentos amplificados estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências e posição dos *primers*, tamanho dos *amplicons* e número de CpGs analisadas.

Região genômica	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Localização dos <i>primers</i> na sequência NM_174580.5	Tamanho do <i>amplicon</i>	Número de CpGs
OCT4 (Primeiro éxon) externo	F: TTTGGGTGGAGATTTTGGTTTTT R: AAAAAAACCCCCACACCTC	770-1185	415 pb	
OCT4 (Primeiro éxon) interno	F:GAGTAGTTTTTAGGAGATTTTYGTTTT	938-1185	247 pb	20
OCT4 (Primeiro íntron) externo	F: TTTTGYTTTTATGATTTGTGTGGAG R: AAAAAAACAAAACCRACCTCC	1188-1652	464 pb	
OCT4 (primeiro íntron) interno	F: AAGTTGGATAAGGAGAAGTTGG	1366-1652	286 pb	22

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

Os *primers* utilizados para ambas as regiões foram desenhados utilizando a ferramenta Bissulfite Primer Seeker (<http://www.zymoresearch.com/tools/bisulfite-primer-seeker>).

As reações de amplificação para a região *OCT4* primeiro éxon foram realizadas utilizando tampão da Taq 1 X; dNTP 0,1 mM (de cada nucleotídeo); 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 0,25 µM de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), sendo o volume de cada reação ajustado para 20 µL com água ultrapura. Todas as reações de amplificação para essa região foram conduzidas com um passo de desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos e extensão final de 72°C por 15 minutos. A quantidade MgCl₂ e as condições de amplificação para todas as amostras estudadas (espermatozoides, ovócitos, embriões e fibroblastos), tanto para reação de PCR *out* (1ª reação) quanto *inner* (2ª reação), estão especificadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições da *hemi-nested* PCR para região *OCT4* primeiro éxon.

Material Biológico	Reação	MgCl ₂ (mM)	DNA (μL)	Número de ciclos de amplificação	Desnaturação	Anelamento	Extensão
Fibroblastos e Espermatozoides	1°	1,5	2 μL	35	94°C 40 s.	58°C 1 min.	72°C 1 min.
	2°	1,5	0,5 μL *	28	94°C 40 s.	59°C 1 min.	72°C 1 min.
Ovócitos	1°	1,5	2 μL	45	94°C 40 s.	58°C 1 min.	72°C 1 min.
	2°	1,5	1 μL *	45	94°C 40 s.	56,5°C 1 min.	72°C 1 min.
Embriões	1°	1,5	2 μL	40	94°C 40 seg.	60°C 1 min.	72°C 1 min.
	2°	1,0	0,5 μL *	29	94°C 40 s.	59,9°C 1 min.	72°C 1 min.

* Este volume de DNA é oriundo da 1° reação. °C: graus Celsius; s: segundos; min: minutos.

A reação de *hemi-nested* PCR para amplificação da porção *OCT4* primeiro intron também foi realizada utilizando tampão da Taq 1 X; dNTP 0,1 mM (de cada nucleotídeo); 1 U de Taq DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 0,25 μM de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), sendo o volume de cada reação ajustado para 20 μL com água ultrapura. Todas as reações de amplificação para essa região também foram conduzidas com um passo de desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos e extensão final de 72°C por 15 minutos. A quantidade MgCl₂ e as condições de amplificação para todas as amostras estudadas (espermatozoides, ovócitos, embriões e fibroblastos), tanto para reação de PCR *out* (1ª reação) quanto *inner* (2ª reação), estão especificadas na Tabela 3.

Tabela 3. Condições da *hemi-nested* PCR para região *OCT4* primeiro íntron.

Material Biológico	Reação	MgCl ₂ (mM)	DNA (μL)	Número de ciclos de amplificação	Desnaturação	Anelamento	Extensão
Fibroblastos e Espermatozoides	1°	1,0	2 μL	35	94°C 40 s.	52°C 1 min.	72°C 1 min.
	2°	1,0	0,25 μL *	29	94°C 40 s.	60°C 1 min.	72°C 1 min.
Ovócitos	1°	1,5	2 μL	45	94°C 40 s.	56°C 1 min.	72°C 1 min.
	2°	1,5	1 μL *	45	94°C 40 s.	59,5°C 1 min.	72°C 1 min.
Embriões	1°	1,0	2 μL	40	94°C 40 s.	50°C 1 min.	72°C 1 min.
	2°	1,0	0,25 μL *	29	94°C 40 s.	55°C 1 min.	72°C 1 min.

* Este volume de DNA é oriundo da 1° reação. °C: graus Celsius; s: segundos; min: minutos.

Todo o volume das PCRs foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2,0% em corrente elétrica constante de 400 mA e 100 V e corado com Brometo de Etídio (10mg/mL) em meio Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 X. Utilizou-se o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Os *amplicons* foram recortados do gel e purificados utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante (Anexo 7). Em seguida, as amostras purificadas foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® (ND- 1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

3.3.3 Clonagem dos *amplicons* e extração do DNA plasmidial

Após a purificação e quantificação em espectrofotômetro, os *amplicons* foram inseridos no vetor TOPO TA Cloning® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A transformação foi realizada em

bactérias *Escherichia coli* DH5 α por choque térmico e o produto foi espalhado em placas de petri 90 x 15 mm contendo meio Luria-Bertani (LB) ágar com ampicilina 100 μ g/mL, 20 μ L de X-Gal a 40 mg/mL e 4 μ L de IPTG 0,1 M, seguida por inversão das placas e incubação em estufa a 37°C por 12 a 16 horas e a 4°C por no mínimo duas horas. Todo o protocolo está descrito no Anexo 8.

Utilizando um palito de madeira estéril, foram retiradas colônias brancas da placa de cultivo e estas foram depositas em tubo cônico de 15 mL contendo 3 mL de meio LB contendo ampicilina a concentração final de 100 μ g/mL. Os tubos permaneceram sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas em agitador (New Brunswick Scientific Co, NJ, USA) (Anexo 8). Aproximadamente metade do conteúdo dos tubos foi utilizado para a extração do DNA plasmidial. Para isso foi utilizado o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega), de acordo com as normas do fabricante (Anexo 9). O DNA plasmidial purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (ND1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

A confirmação da presença do inserto (*amplicon*) no vetor foi verificada através da digestão enzimática utilizando a endonuclease de restrição EcoRI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Para a digestão foram utilizadas 2 U de enzima e 5 μ L de DNA plasmidial purificado. A reação ocorreu a 37°C *overnight*. Após esse período, a reação foi colocada em gel de agarose 2,0% corado com Brometo de Etídio 10 mg/mL, utilizando o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para confirmação do tamanho do inserto.

3.3.4 Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências

As amostras de DNA plasmidial contendo os insertos foram diluídas a 120 ng/ μ L e posteriormente foram sequenciadas pelo método de Sanger utilizando o *primer* universal M13 *reverse*. A qualidade do sequenciamento foi analisada utilizando o programa Chromas®. Para a quantificação do padrão de metilação foi utilizado o programa QUMA (Kumaki, Oda e Okano, 2008), comparando as sequências obtidas com uma sequência referência depositada no UCSC do gene OCT4 (NM_174580.3). Neste estudo, consideraram-se para avaliação apenas sequências que apresentaram no mínimo 95% de conversão pelo bissulfito de

sódio (quando se observou a taxa de conversão das citosinas não seguidas de guanina) e sequências com o mínimo de 95% de identidade (quando comparadas com a sequência referência).

3.4 Análise da expressão do gene *OCT4* em Fibroblastos

3.4.1 Extração de RNA de fibroblastos

A extração do RNA total ocorreu juntamente com a extração de DNA genômico utilizando o kit AllPrep DNA/RNA Micro Kit (Qiagen) (Anexo 3), e posteriormente as amostras de RNA foram armazenadas a -80°C.

3.4.2 Síntese de cDNA (Transcrição Reversa)

O RNA extraído foi submetido à síntese de cDNA utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega) para um volume final de 30µL de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando 643,5 ng de RNA para cada amostra de fibroblastos e os *primers* Oligo dT e Random *primer* (0,67 µM de cada) (Anexo 10).

3.4.3 RT-qPCR

Os níveis de mRNA do gene *OCT4* foram analisados por RT-qPCR. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, USA), usando o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega).

Para a determinação da eficiência de amplificação do par de *primers* utilizado foi realizada uma curva de diluição seriada, onde amostras de cDNA foram diluídas em água ultrapura onde foram realizadas 5 diluições de 1:4. Cada amostra foi amplificada em triplicata e a especificidade da reação foi confirmada através da temperatura de *melting* e tamanho do produto da PCR em gel de agarose 2,0%.

Os *primers* foram desenhados (Tabela 4) na ferramenta PrimerQuest Tool (<https://www.idtdna.com/PrimerQuest>), utilizando as sequências descritas no

GenBank (Tabela 4). As reações foram preparadas utilizando-se 12,5 µL de GoTaq qPCR Master Mix; 0,2 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*); 2 µL de cDNA e a reação foi completada para 25 µL com água ultrapura. As condições da PCR foram 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e de anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto.

Para a normalização dos dados foram utilizados dois genes endógenos, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) e β -*Actin* (*ACTB*), utilizando a média geométrica do *Ct* (*cycle threshold*) e das suas eficiências de amplificação. Como amostra de referência para fibroblastos foi considerada como grupo controle um dos fetos, que recebeu valor de ratio 1. A abundância relativa de mRNA do gene *OCT4* foi calculada e comparada entre os grupos testados utilizando o método de $\Delta\Delta C_t$, com correção da eficiência pelo método de Pfaffl (PFAFFL, 2001).

Tabela 4. Sequência dos *primers*, tamanho do fragmento amplificado em pares de base, eficiência de amplificação dos *primers* e referência de acesso ao *Genbank*.

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do <i>amplicon</i>	Eficiência de amplificação dos <i>primers</i> (%)	Referência no <i>GenBank</i>
OCT4	F: GCAGAAGAGGATCACACTAGGA R: CTGAGCTGCAAAGCCTCAAA	117 pb	94,175	NM_174579.4
GAPDH	F: GCGTGGAACACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT	119 pb	101,988	NM_001034034.2
ACTB	F:GGCACCCAGCACAATGAAGATCAA R: ATCGTACTCCTGCTTGCTGATCCA	134 pb	109,929	NM_173979.3

F: *forward*; R: *reverse*; pb: pares de base.

3.5 Análise Estatística

Os dados de quantificação do padrão de metilação e da quantidade de transcritos para o gene *OCT4* foram submetidos a testes de normalidade. Todos os dados obtidos apresentaram distribuição não normal, sendo assim, foi utilizado o teste de *Mann-Whitney* para análise comparativa entre duas amostras, enquanto para as comparações múltiplas, usou-se o teste de *Kruskal-Wallis*.

Para análises de correlação, os dados que apresentaram distribuição normal, foi realizado o coeficiente de correlação de *Pearson*, e os dados que apresentaram distribuição não normal, foi utilizado o coeficiente de correlação de *Spearman*. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) e a ferramenta QUMA (Kumaki, Oda e Okano, 2008), considerando-se o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os produtos de PCR amplificados e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% foram purificados após confirmação do tamanho dos *amplicons* das regiões de primeiro éxon e primeiro íntron, como mostra a Figura 4.

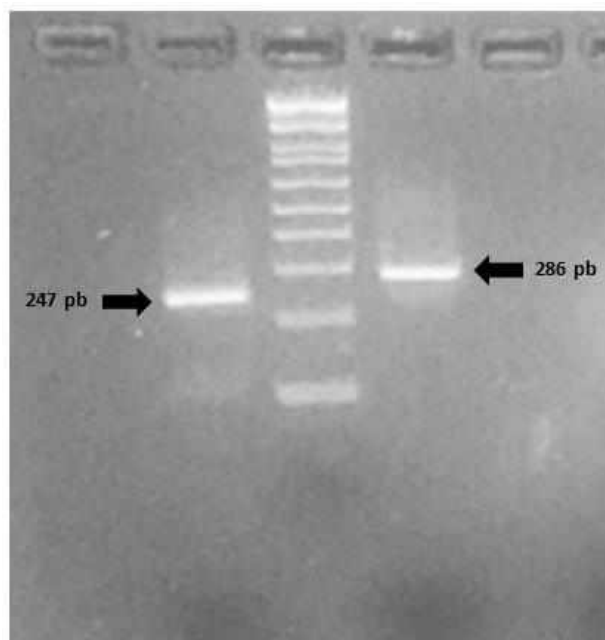


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 2,0 %. A figura mostra dois *amplicons* específicos para as regiões primeiro éxon (à esquerda) e primeiro íntron (à direita) amplificados a partir de DNA de fibroblastos (pb: pares de base). A linha ao meio mostra o padrão de bandas do marcador 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.1 Padrão de metilação do gene *OCT4*

Ao todo foram analisados 42 sítios CpGs nos tecidos, sendo 20 no primeiro éxon e 22 no primeiro íntron.

4.1.1 Ovócitos e Espermatozoides

Em relação à região primeiro éxon, os *pools* 1 e 2 de ovócitos MII (ovócito e seu corpúsculo polar formado a partir da meiose 1) apresentaram os percentuais de metilação respectivamente $18,5\% \pm 4,4$ e $1,3\% \pm 2,7$, conforme a Figura 5. Quando comparamos ambos, houve diferença estatística entre os *pools* (Figura 6).

Já em relação à região de primeiro íntron, os *pools* 1 e 2 de ovócitos MII os percentuais de metilação foram $43,8\% \pm 4,7$ e $53,9\% \pm 1,6$, respectivamente (Figura 5), apresentando também diferença estatística entre os *pools* (Figura 6). Dessa forma, os *pools* em ambas as regiões não puderam ser agrupados para análises posteriores.

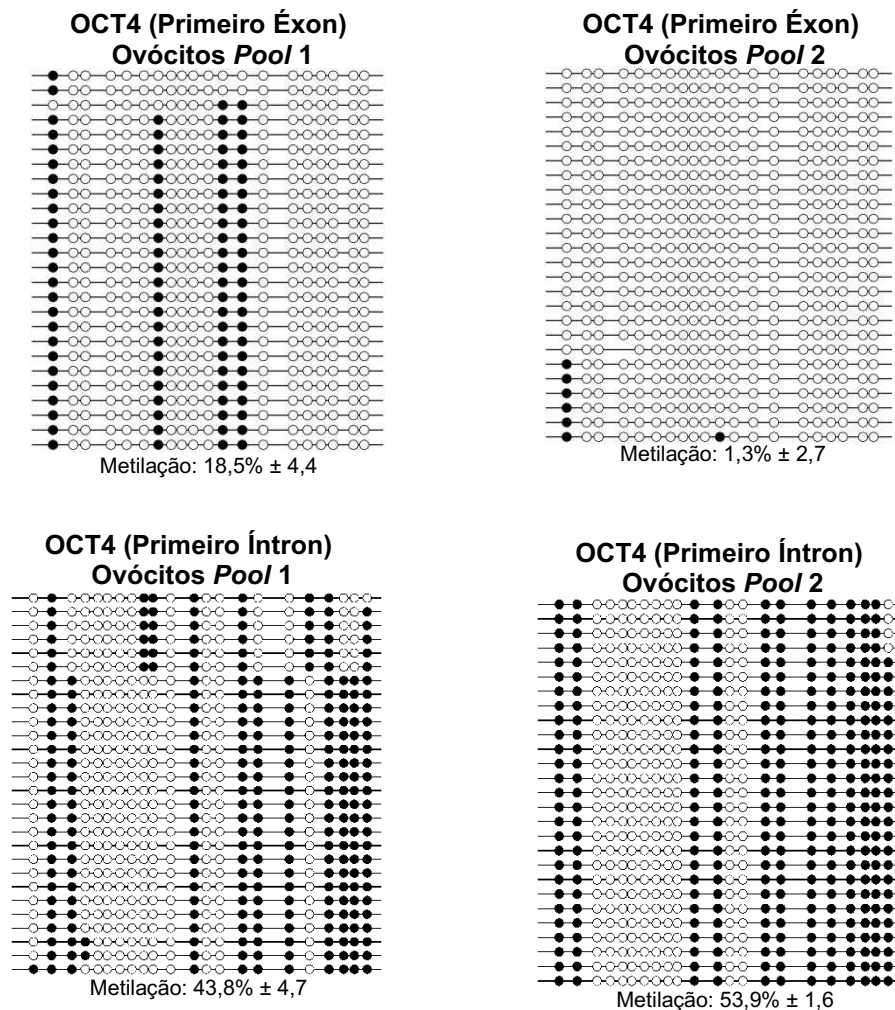


Figura 5 - Perfil de metilação do gene *OCT4* nas duas regiões avaliadas em ovócitos bovinos maturados *in vitro*. Cada *pool* de ovócitos é representado pelo número 1 e 2, e a região avaliada também está descrita na imagem. Cada linha representa um clone individual. Os círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas. As porcentagens de metilação do DNA estão representadas abaixo de cada grupo e foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão.

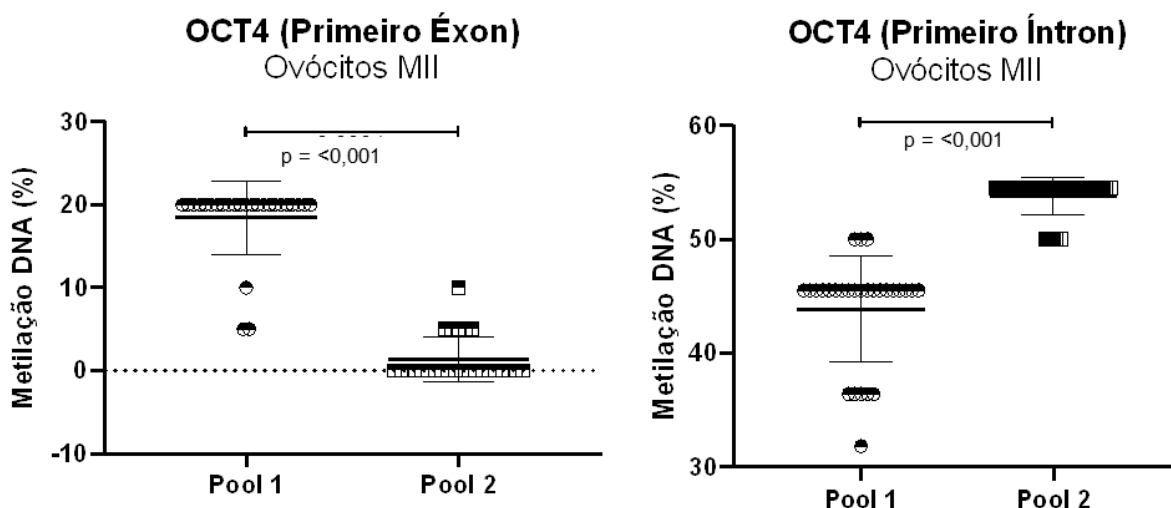


Figura 6 – Porcentagem de metilação para o gene *OCT4*. A porcentagem total de metilação das regiões está representada nos gráficos acima comparando os *pools* de ovócitos, sendo primeiro éxon e primeiro íntron. O eixo Y representa o percentual total de metilação daquela região. Ovócitos MII são ovócitos bovinos maturados *in vitro* e o valor de P está abaixo dos títulos dos respectivos gráficos.

Foram avaliados espermatozoides de 3 animais diferentes, sendo que os percentuais de metilação nos sítios CpGs analisados nos animais 1, 2 e 3 foram: 6,0 % $\pm$ 4,3; 6,1 % $\pm$ 6,3 e 7,5 % $\pm$ 7,8 respectivamente, em relação a região de primeiro éxon. Já na região do primeiro íntron os percentuais de metilação para o Animal 1 foi 6,6 % $\pm$ 4,9; Animal 2, 5,8 % $\pm$ 4,0; e animal 3 foi 7,5 % $\pm$ 5,8 (Figura 7). Não houve diferença estatística entre os animais para as duas regiões estudadas (Figura 8), e sendo assim, os animais foram agrupados para outras análises.

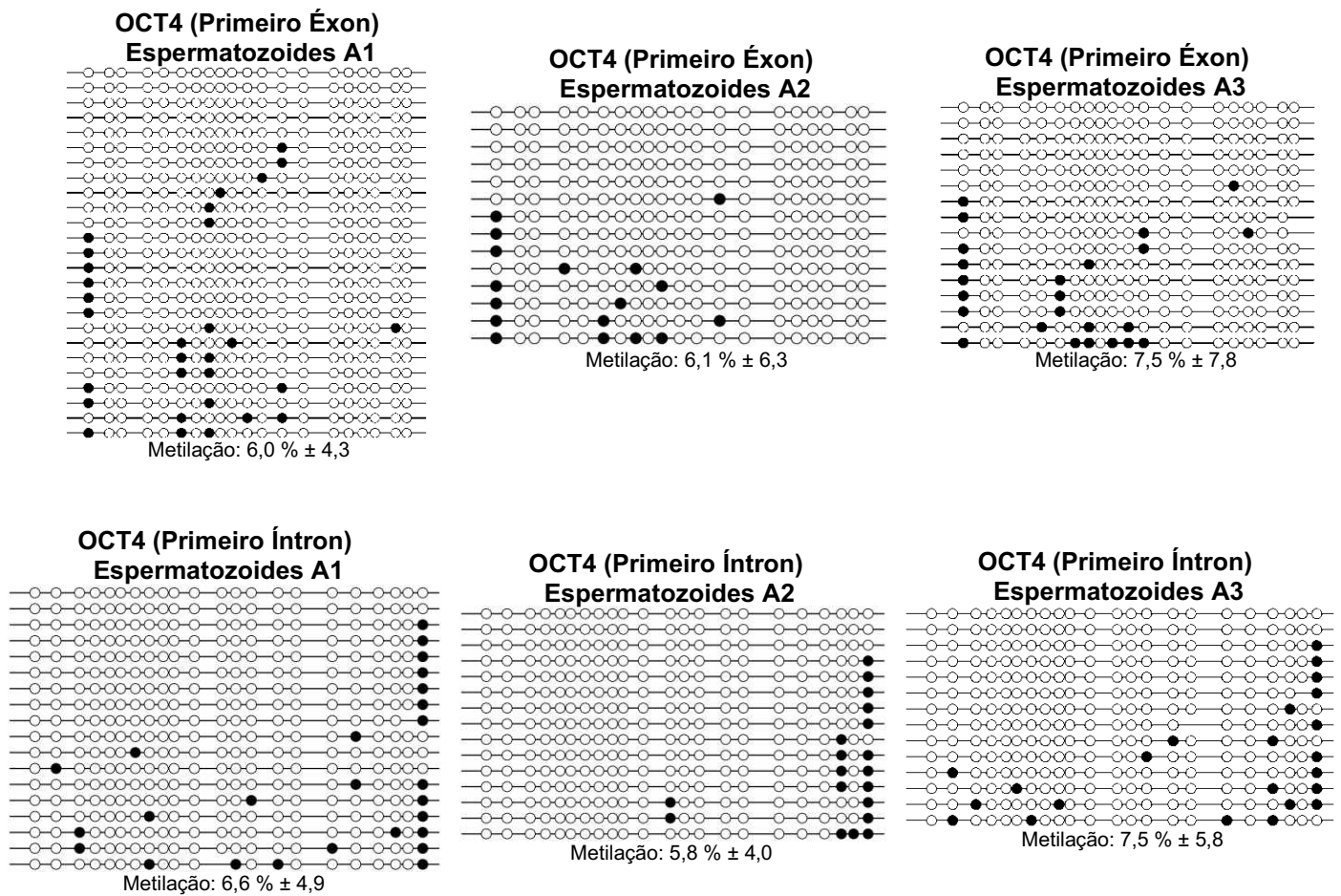


Figura 7 - Perfil de metilação do gene *OCT4* em espermatozoides bovinos. Cada amostra de cada animal é representada pelos números 1, 2 e 3 (A1: Animal 1, A2: Animal 2 e A3: Animal 3) e a região avaliada também está descrita na imagem. Cada linha representa um clone individual. Os círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas. As porcentagens de metilação do DNA estão representadas abaixo de cada grupo e foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão.

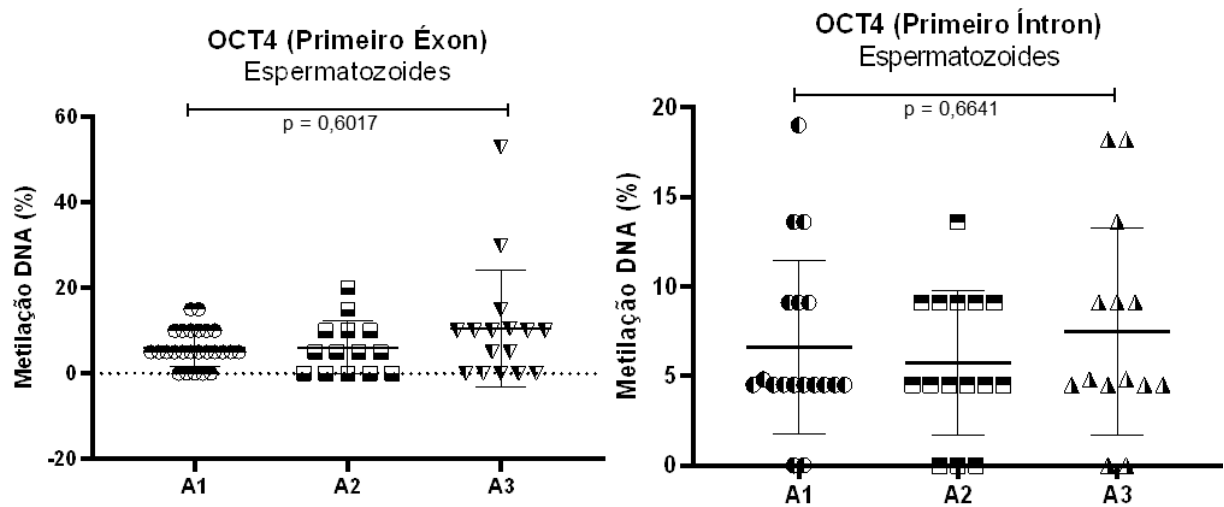


Figura 8 – Porcentagem de metilação do gene *OCT4* em espermatozoides bovinos. A porcentagem total de metilação das regiões está representada nos gráficos acima comparando as amostras extraídas dos 3 animais, sendo primeiro éxon e primeiro íntron. A1: Animal 1, A2: Animal 2 e A3: Animal 3. Os animais não apresentaram diferenças estatísticas para as duas regiões estudadas. O eixo Y representa o percentual total de metilação e o eixo X as amostras de espermatozoides dos três diferentes animais.

As amostras de DNA genômico de espermatozoides apresentaram-se menos metiladas em relação ao *pool* 1 de ovócitos em para ambas as regiões. Já em relação ao *pool* 2 de ovócitos, o DNA de espermatozoides apresentou uma porcentagem maior de metilação na região de primeiro éxon e uma porcentagem menor de metilação que os ovócitos quando comparados na região de primeiro íntron (Figura 9).

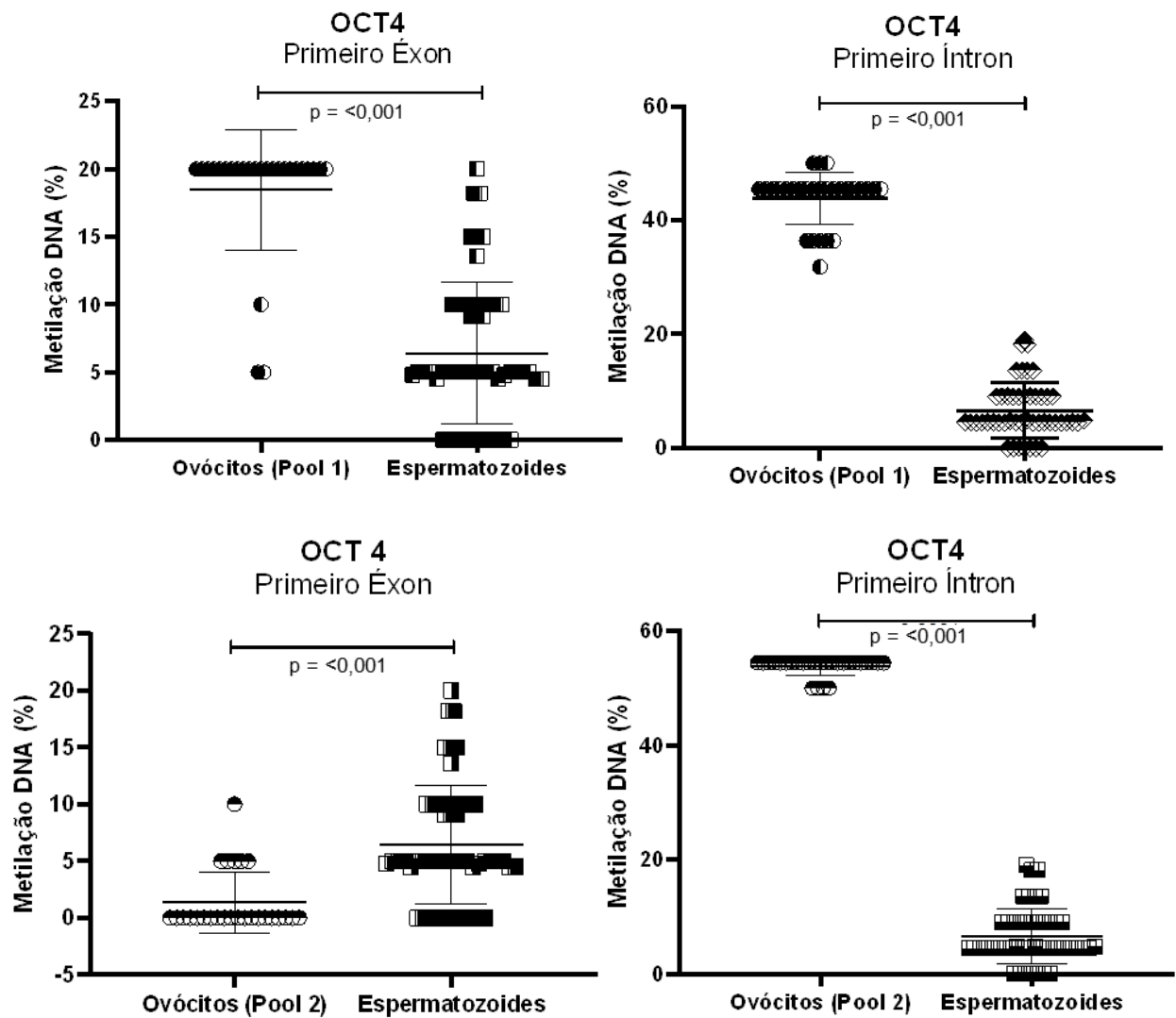


Figura 9 - Comparação do perfil de metilação de DNA de ovócitos e espermatozoides bovinos. A porcentagem total de metilação das regiões está representada nos gráficos acima. Todas as comparações apresentaram diferença estatística para as duas regiões estudadas. O eixo Y representa o percentual total de metilação.

4.1.2 Embriões

O DNA de embriões apresentou um padrão hipometilado para as duas regiões estudadas, sendo que na região primeiro éxon foram de 2,8 % $\pm$ 2,6; 1,5 % $\pm$ 2,9 e 3,3 % $\pm$ 5,8 para os *pools* 1, 2 e 3 respectivamente; enquanto para a região primeiro íntron o percentual total de metilação foi de 3,1 % $\pm$ 2,2 no *pool* 1, 7,0 % $\pm$ 2,4 no *pool* 2 e 3,6 % $\pm$ 1,9 no *pool* 3, como mostra a Figura 10.

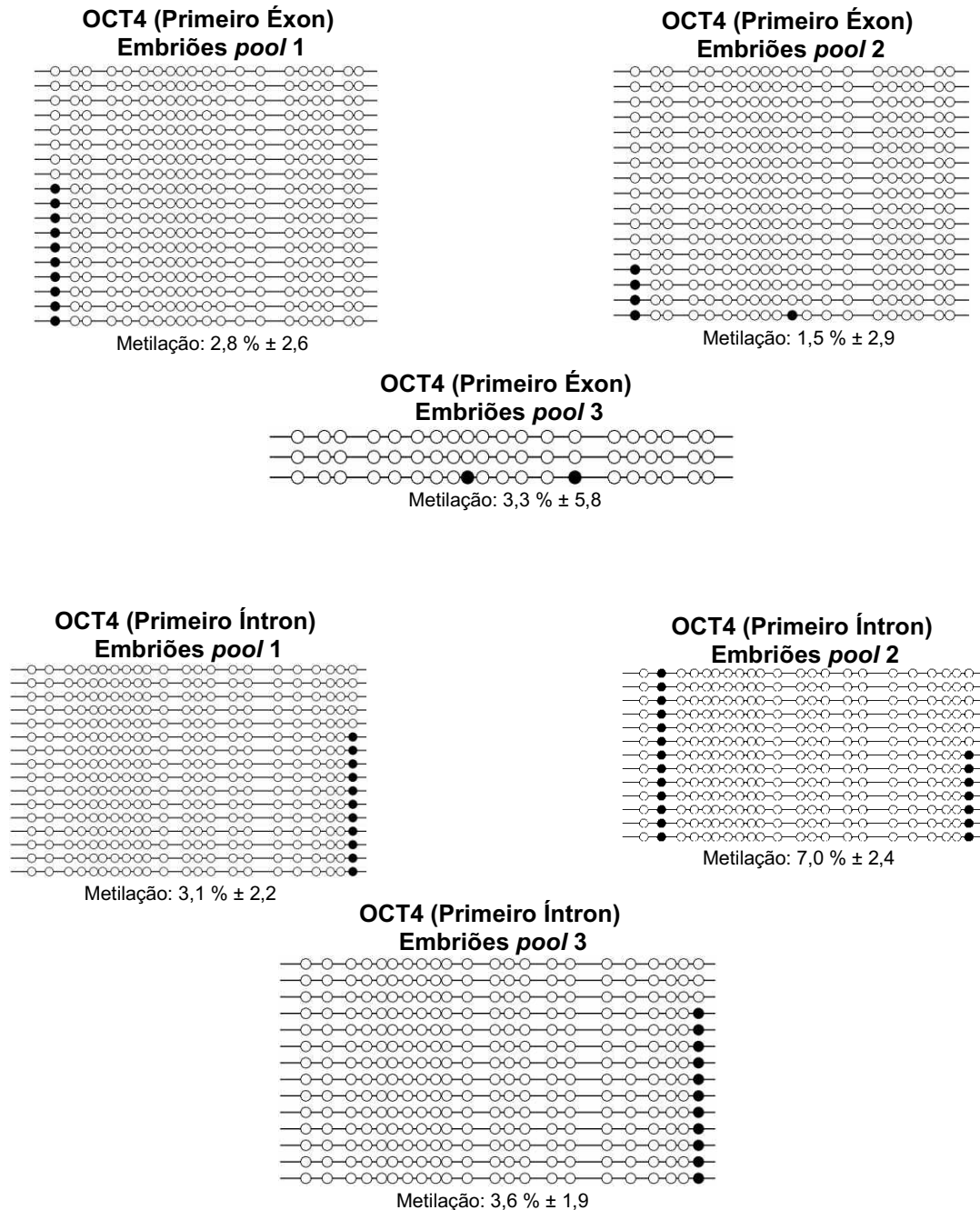


Figura 10 - Perfil de metilação do gene *OCT4* em embriões produzidos *in vitro*. Cada linha representa um clone individual. Os círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas. As porcentagens de metilação do DNA estão representadas abaixo de cada grupo e foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão.

Após as análises estatísticas, ficou constatado que em região de primeiro éxon os *pools* não apresentaram diferença estatística quando comparados entre si. Já em primeiro íntron, os *pools* tiveram significância entre si, sendo que o valor de p foi 0,0003, mas quando comparamos *pools* 1 e 3, essa diferença não foi encontrada (Figura 11).

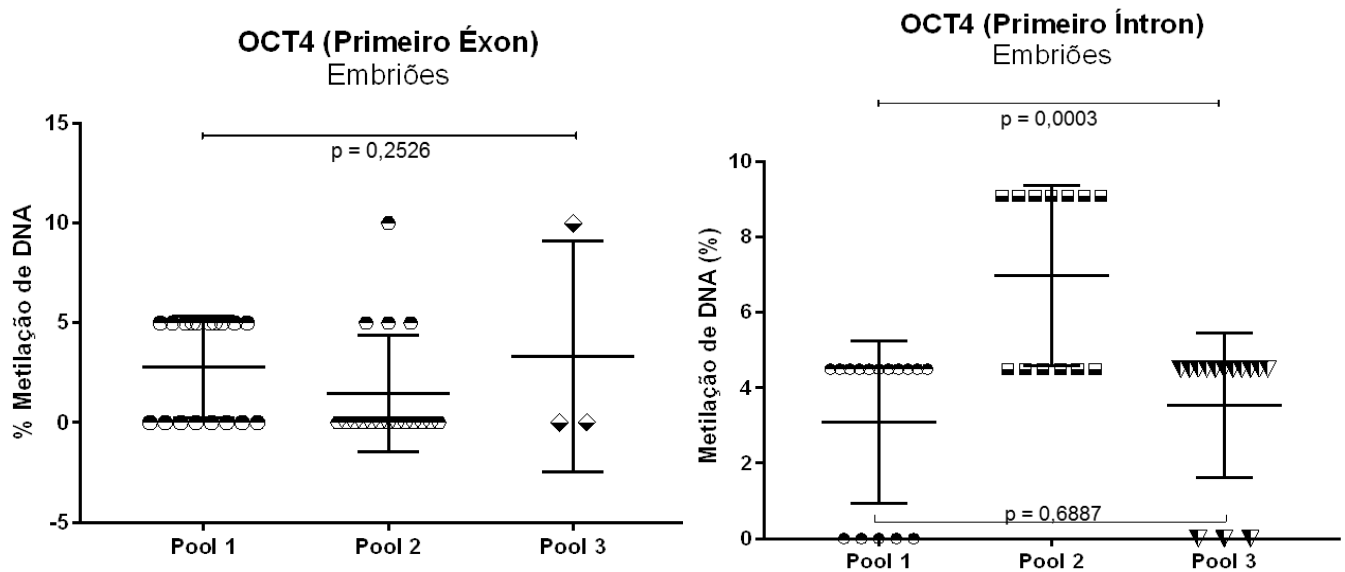


Figura 11 - Comparação do percentual de metilação do DNA para o gene *OCT4* de embriões bovinos produzidos *in vitro* entre as duas regiões estudadas. Não houve diferença estatística entre os *pools* na região de primeiro éxon, o que ocorreu na região de primeiro íntron, exceto quando comparamos *pools* 1 e 3. O eixo Y representa o percentual total de metilação daquela região e o valor de P está abaixo dos títulos dos respectivos gráficos.

4.1.3 Fibroblastos

A região do primeiro éxon apresentou $28,1 \% \pm 15,1$ e $40,2 \% \pm 17,7$ no percentual de metilação para os animais adultos (macho e fêmea respectivamente); já nos fetos o percentual de metilação da mesma região foi $13,9 \% \pm 8,7$, $13,1 \% \pm 9,6$ e $18,1 \% \pm 10,0$ para os fetos machos, enquanto para fêmea foi de $14,1 \% \pm 10,5$ (Figura 12).

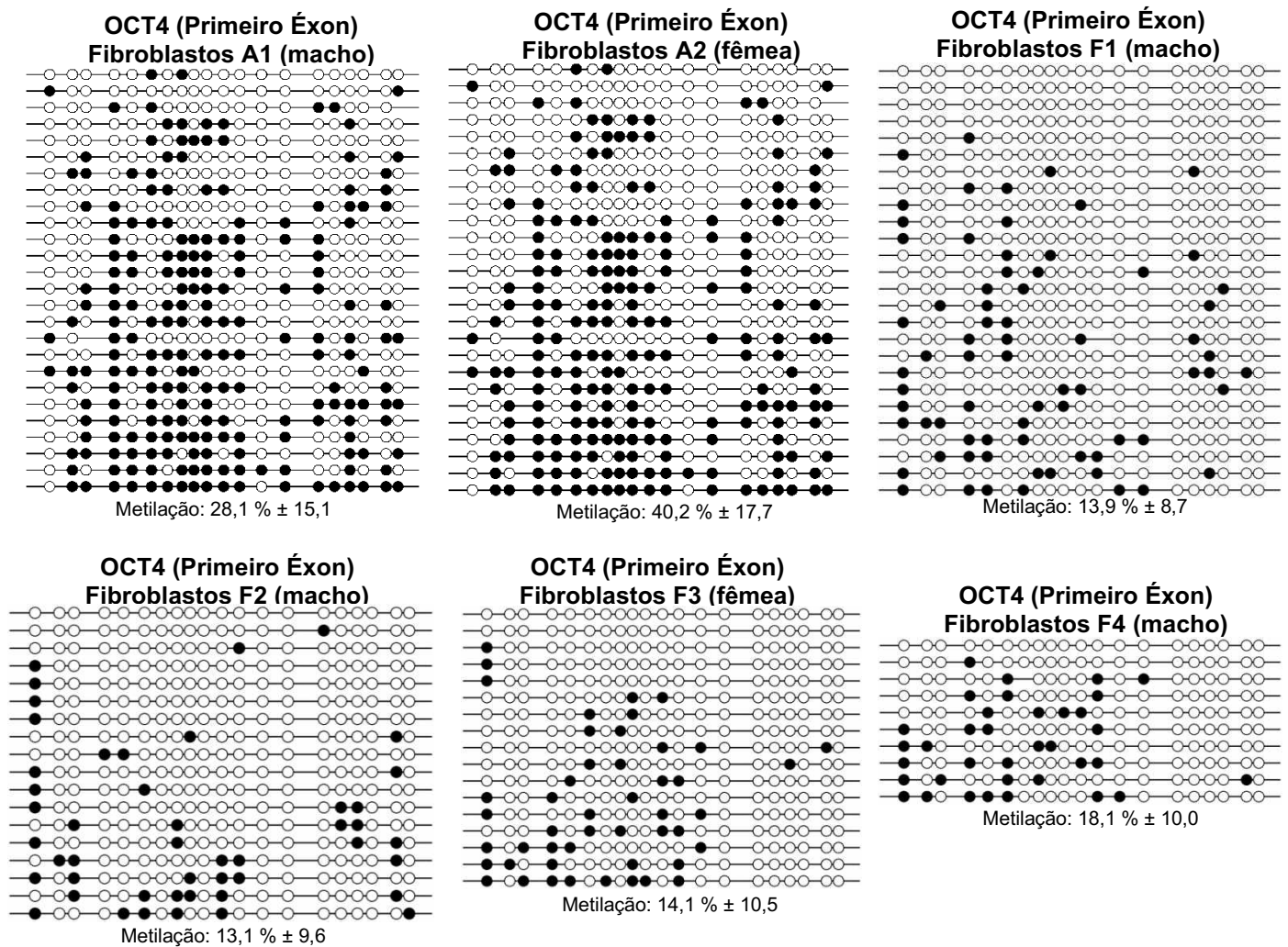


Figura 12 - Perfil de metilação do gene *OCT4* para a região do primeiro éxon avaliadas em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. Cada amostra de cada animal é representada por números e letras (A1: Animal adulto 1; A2: Animal adulto 2 e F1: Feto 1; F2: Feto 2; F3: Feto 3; F4: Feto 4). Cada linha representa um clone individual. Os círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas. As porcentagens de metilação do DNA estão representadas abaixo de cada grupo e foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão.

Quando comparados estatisticamente, os percentuais de metilação do gene *OCT4* em fibroblastos de animais adultos apresentaram diferença estatística na região de primeiro éxon, onde no macho foi constatada hipometilação de DNA na região estudada em relação à fêmea. Sendo assim, estes foram comparados individualmente em relação aos percentuais de metilação de DNA dos fibroblastos fetais que não apresentaram diferença estatística entre si (Figura 13). Em ambas as análises, o total de metilação de DNA do gene nos fibroblastos fetais se apresentaram hipometilados em relação aos percentuais de metilação de fibroblastos de animais adultos na região descrita (Figura 14).

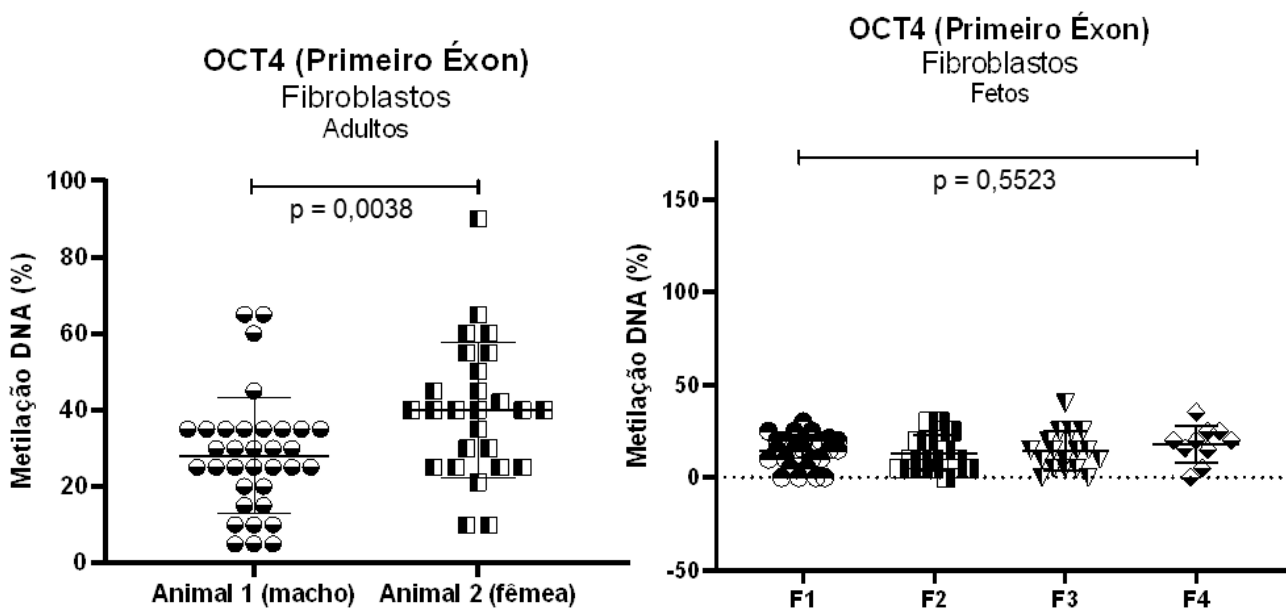


Figura 13 - Comparação do percentual de metilação do gene *OCT4* em fibroblastos bovinos de animais adultos e fetos para a região do primeiro éxon. A porcentagem total de metilação da região de Primeiro Éxon está representada nos gráficos acima comparando fibroblastos bovinos entre animais adultos e entre fetos. O eixo Y representa o percentual total de metilação daquela região. O valor de P está abaixo dos títulos dos respectivos gráficos.

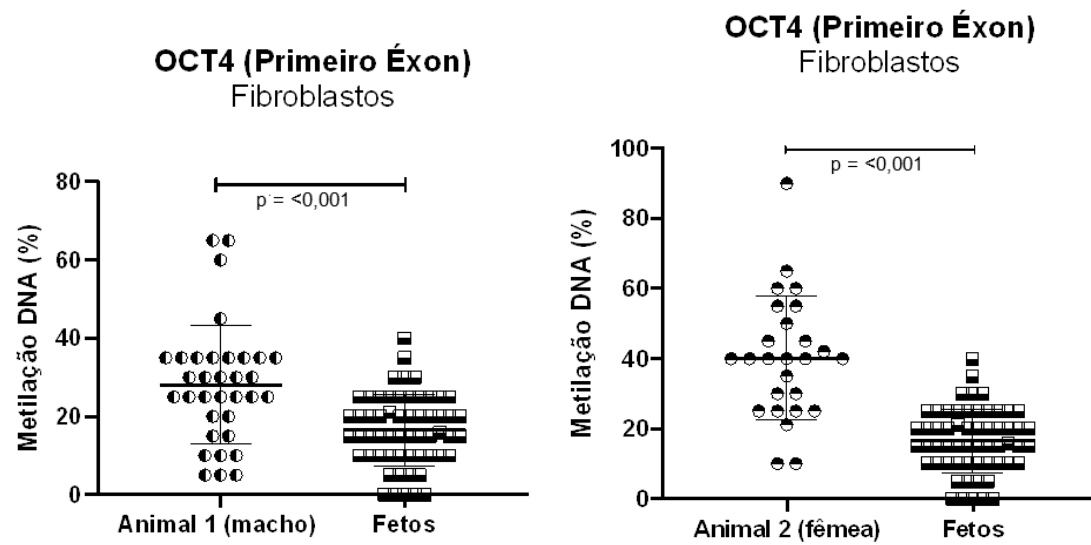


Figura 14. Análise do percentual total de metilação da região de primeiro éxon do gene *OCT4* em fibroblastos bovinos de diferentes animais adultos em relação aos fetos. A porcentagem total de metilação da região de Primeiro Éxon está representada nos gráficos acima comparando fibroblastos bovinos dos dois animais adultos avaliados com fetos. O eixo Y representa o percentual total de metilação daquela região. O valor de P está abaixo dos títulos dos respectivos gráficos.

No primeiro íntron, o percentual total de metilação de fibroblastos bovinos foi de $47,4\% \pm 8,9$ e $50,5\% \pm 13,8$ nos animais adultos (macho e fêmea respectivamente). Já em fibroblastos fetais, a porcentagem de metilação nessa região foi de $23,8\% \pm 12,4$; $19,5\% \pm 11$; $21,9\% \pm 11,9$ e $23,3\% \pm 10,4$ para os fetos 1, 2, 3 e 4 (Figura 15).

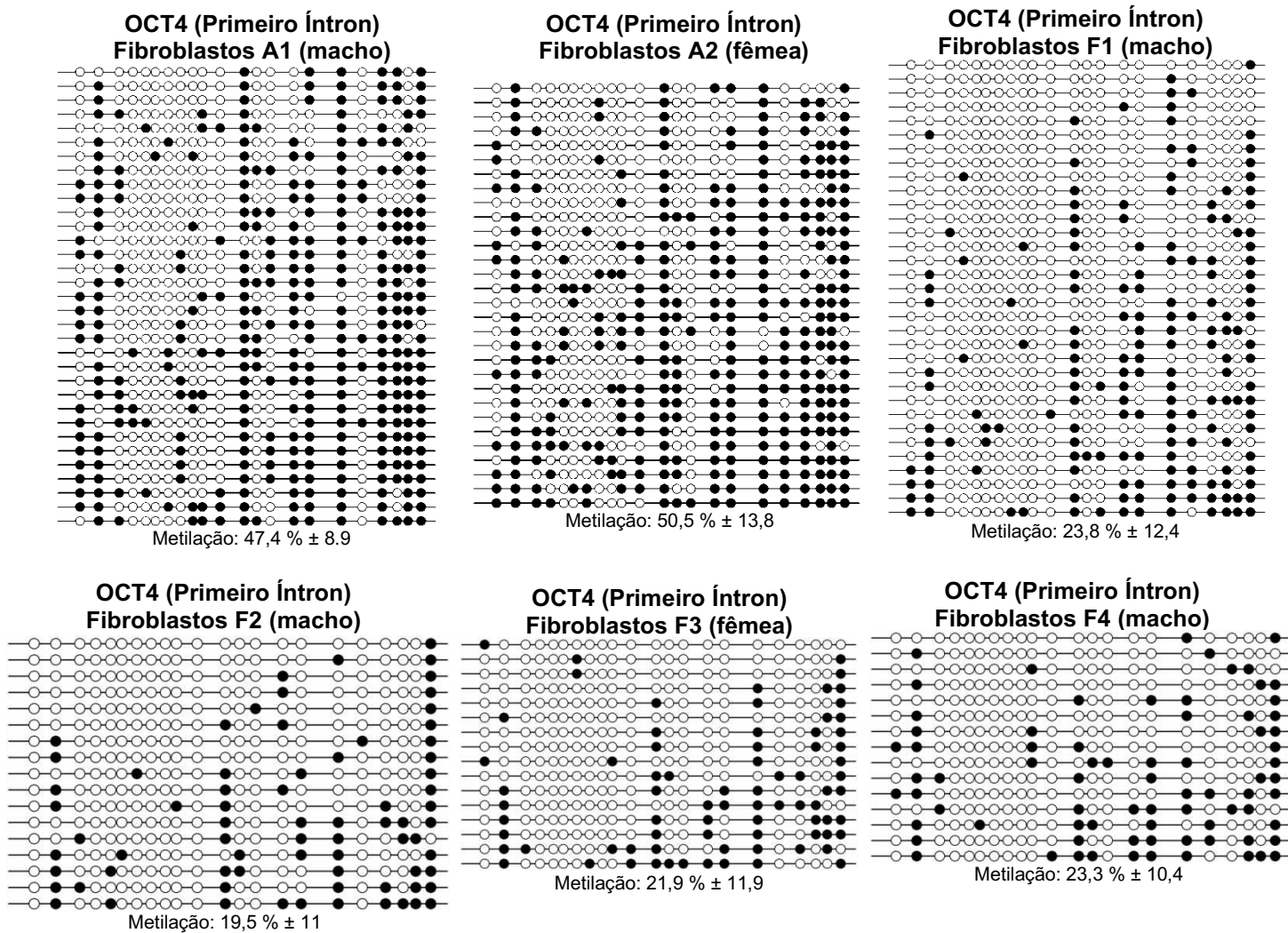


Figura 15 - Perfil de metilação do gene *OCT4* para a região do primeiro íntron avaliada em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. Cada amostra de cada animal é representada por números e letras (A1: Animal adulto 1; A2: Animal adulto 2 e F1: Feto 1; F2: Feto 2; F3: Feto 3; F4: Feto 4). Cada linha representa um clone individual. Os círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas. As porcentagens de metilação do DNA estão representadas abaixo de cada grupo e foram apresentadas como média $\pm$ desvio padrão.

Quando comparados entre si, não houve diferença estatística no percentual de metilação total da região de primeiro íntron entre animais adultos e entre fetos. Sendo assim, os mesmos foram agrupados para análises posteriores (Figura 16).

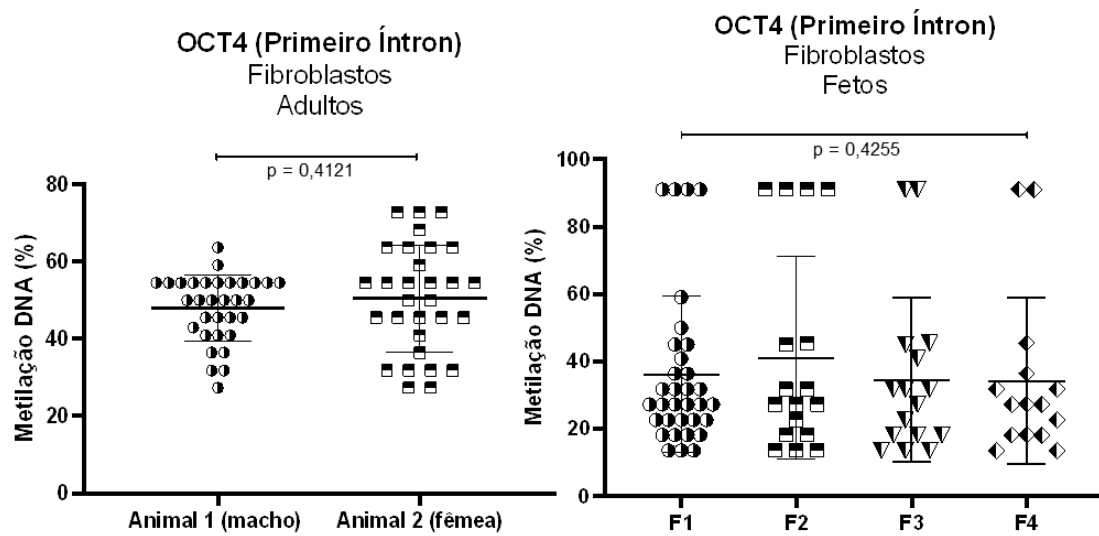


Figura 16 - Comparação do percentual de metilação de fibroblastos bovinos entre animais adultos e entre fetos para a região do primeiro íntron do gene *OCT4*. O valor de P está abaixo dos títulos dos respectivos gráficos.

Quando comparados, DNA de animais adultos apresentaram-se hipermetilados em relação aos fetos, como mostra a Figura 17.

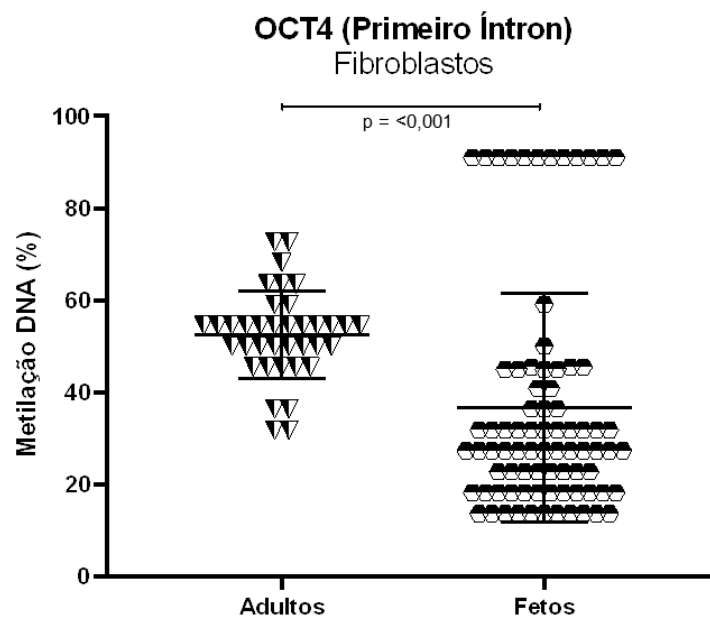


Figura 17 - Comparação do percentual de metilação de fibroblastos bovinos entre animais adultos e fetos para a região do primeiro íntron do gene *OCT4*. O valor de p está abaixo do título do gráfico.

Resumidamente, os resultados encontrados no presente trabalho indicam aumento do nível de metilação total das CpGs avaliadas ao longo da diferenciação celular no gene *OCT4*, como pode ser observado na Figura 18.

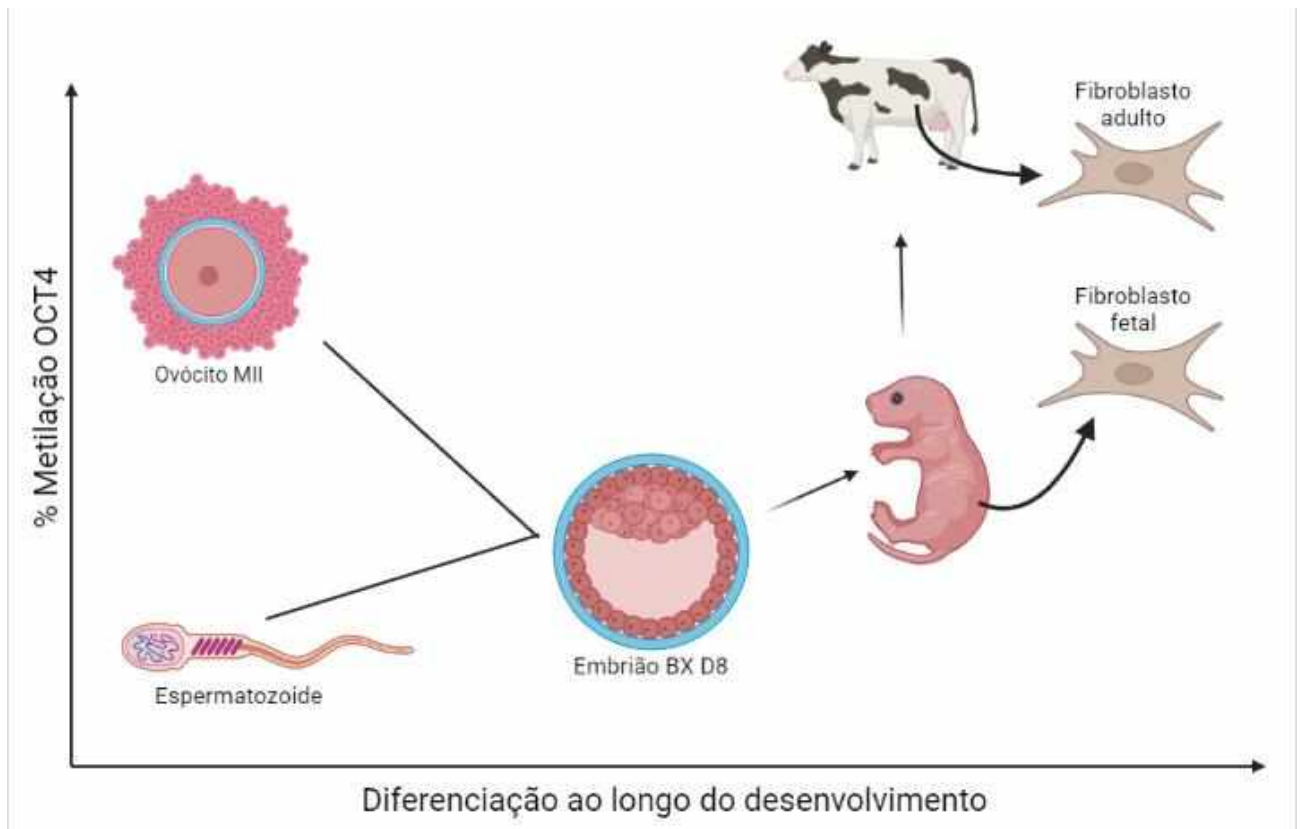


Figura 18 - Representação esquemática dos resultados da análise de metilação do gene *OCT4* em diferentes tecidos bovinos. Imagem criada no site <https://biorender.com>. Fonte: a autora (2023).

4.2 Análise de expressão gênica para o gene *OCT4*

A quantidade de transcritos do gene *OCT4* foi avaliada em fibroblastos fetais e de animais adultos de diferentes passagens celulares. E a abundância relativa de mRNA do gene *OCT4* não apresentou diferença estatística quando comparadas as células de animais adultos com células fetais ($p=0,4127$) (Figura 19).

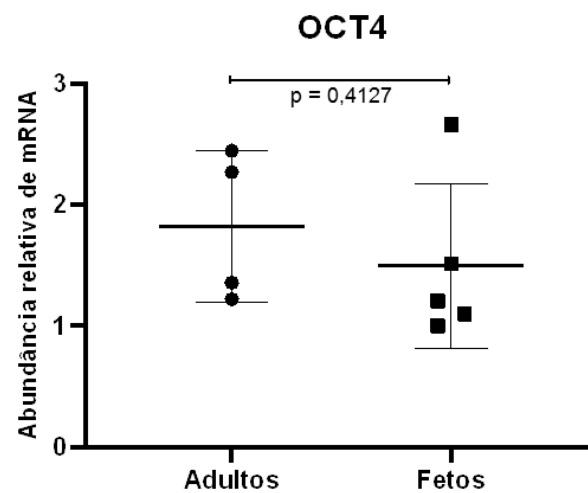


Figura 19 - Abundância relativa de mRNA do gene *OCT4* em fibroblastos fetais e adultos. O valor de p está abaixo do título do gráfico.

Foi realizado um teste de correlação para testar se o percentual total de metilação de alguma das duas regiões estudadas poderia estar correlacionado com o nível de transcritos do gene *OCT4* em fibroblastos, tanto fetais quanto adultos. Não houve diferença estatística, como mostra a Figura 20.

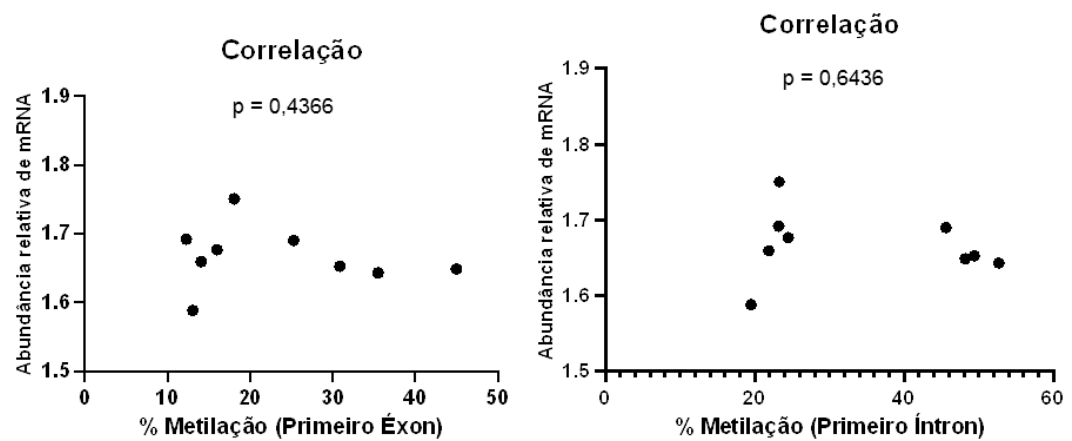


Figura 20 - Correlação entre o nível de transcritos do gene *OCT4* e o percentual total de metilação das duas regiões estudadas em fibroblastos bovinos. O eixo X representa o percentual de metilação do DNA do gene *OCT4* e o eixo Y representa a razão do valor do *cycle threshold* (Ct) do gene *OCT4* pela média geométrica dos Ct dos genes GAPDH e β -actina. O valor de P está abaixo dos títulos dos respectivos gráficos.

5 DISCUSSÃO

As regiões estudadas no gene muito possivelmente estão relacionadas com o controle da transcrição, pois estudos anteriores mostram a importância da metilação do éxon 1 no controle do gene *OCT4* (BASU et al., 2014; HAWKINS, 2014; ZHOU et al., 2016). No presente trabalho, uma região ampla do gene foi estudada, que contempla desde a porção 5'UTR, éxon 1 e parte do íntron 1, regiões onde podem ocorrer modificações epigenéticas influenciando no silenciamento ou ativação gênica através de metilação (BRENET et al., 2011).

Em gametas, que são células altamente diferenciadas, no presente estudo foi encontrado um padrão de hipometilação nas regiões estudadas do gene *OCT4*. Em ovócitos, a expressão do gene *OCT4* em humanos e em camundongos pode ser encontrada em diferentes níveis ao longo da maturação ovocitária, levantando a possibilidade do envolvimento do transcrito estar relacionado com maturação do ovócito, desenvolvimento inicial do conceito e ter relação positiva com a taxa de clivagem do blastocisto (TAKADA et al., 2020).

O que também pode acontecer em bovinos pelo padrão de hipometilação das regiões estudadas em ovócitos maturados. Além disso, em camundongos, estudos mostraram que ovócitos maturados possuem hipometilação na região promotora do gene *OCT4* (YAMAZAKI et al., 2006), e em ovócitos de mulheres sabidamente inférteis, o gene encontra-se hipermetilado na região promotora (AL-KHTIB et al., 2012).

Apesar do padrão encontrado, houve diferença estatística entre os *pools* de ovócitos maturados, e estudos mostram que até mesmo a maturação *in vitro* do gameta feminino pode causar padrões de metilação aberrantes em determinados genes (ZHU et al., 2021), sendo que um dos principais genes que tiveram sua expressão diminuída quando bovinos passaram por situações de estresse como falta de alimentação ou privação hídrica foi o *OCT4* (DIAZ et al., 2021).

Em espermatogônias, o gene *OCT4* é um dos genes utilizado como marcador molecular em humanos para avaliação da viabilidade espermática, pois em determinadas doenças genéticas causadoras de infertilidade, ocorre baixa

quantificação de transcritos do gene em gametas masculinos e tecido testicular (HULEIHEL et al., 2015; FAYOMI; ORWIG, 2018; ABOFOUL-AZAB et al., 2022).

Estudos mostraram que homens inférteis não apresentaram expressão do gene *OCT4* em espermatogônias e tecido testicular, além de outros relacionados com pluripotência, tendo baixa possibilidade de indução de células tronco com as espermatogônias ou espermátides coletadas (SADEGHIAN-NODOUSHAN et al., 2016). Já em outros estudos, realizados em camundongos, foi descrito que uma maior expressão do gene *OCT4* em células primordiais germinativas pode inviabilizar a diferenciação celular em espermatogônias causando infertilidade masculina (LI et al., 2020).

No presente estudo, foi encontrado um padrão de hipometilação na região estudada do gene *OCT4* em espermatozoides bovinos. O que já foi encontrado em outro trabalho que estudou o perfil de metilação, porém, em outras regiões do gene *OCT4* dos gametas masculinos de bovinos, e a possibilidade levantada foi de que essa hipometilação é necessária para gerar níveis mais altos de transcrição do gene no desenvolvimento inicial do conceito (KANEDA et al., 2017).

Em outro trabalho foi mostrado um padrão de hipermetilação dos genes *OCT4* e *NANOG* em espermatozoides bovinos, porém essa metilação diminui rapidamente após a fecundação (ZHANG et al., 2016). Essa diferença entre os padrões de metilação encontradas em diferentes estudos podem ser causadas pela diferença das regiões estudadas, e mais estudos são necessários para entender a causa da discrepância dos resultados obtidos (YAMANAKA et al., 2018). Já que em outro trabalho foi encontrado que embriões humanos produzidos *in vitro* com espermatozoides com padrões hipermetilados na região promotora do gene *OCT4* não chegaram ao estágio de blastocisto pelo bloqueio do desenvolvimento inicial (HAMMOUD et al., 2009).

Em embriões, ambas as regiões estudadas encontraram-se hipometiladas, o que pode ser explicado pela importância do gene nessa fase embrionária, já que estudo anterior mostrou que o gene *OCT4* tem suma importância no desenvolvimento inicial embrionário em mamíferos, manutenção do conceito após a implantação e pluripotência (NICHOLS; SMITH, 2009), e quando realizado

o *knockout* do gene em embriões de camundongos, o desenvolvimento dos mesmos não foi completo, inviabilizando a gestação (MULAS et al., 2018).

Um estudo mostrou que embriões equinos produzidos *in vitro* possuíam baixos níveis de quantificação relativa de mRNA do gene *OCT4* aos 8 dias de cultivo, enquanto os embriões produzidos *in vivo* possuíam níveis mais altos de transcritos no mesmo tempo pós fecundação. A conclusão dos autores foi que o gene *OCT4* para ter sua completa expressão em embriões precisa de contato direto com o útero, ou que até mesmo a completa expressão do gene nos embriões produzidos *in vitro* é mais atrasada, podendo começar após o dia 8 de desenvolvimento (CHOI et al., 2009). Os embriões bovinos avaliados no presente estudo, mesmo produzidos *in vitro*, tiveram padrão de metilação hipometilado na região estudada do gene no dia 8 de cultivo, podendo indicar que sua expressão poderia estar presente mesmo nesse período.

A região promotora do gene *OCT4* em células-tronco embrionárias encontra-se desmetiladas em camundongos, ao contrário de células somáticas, como fibroblastos, indicando a importância da sua expressão no desenvolvimento embrionário inicial, e, além disso, uma hipermetilação na região promotora do gene *OCT4* está relacionada com baixa taxa de clivagem (YAMAZAKI et al., 2006).

Quando se é estimulada a expressão de genes relacionados com pluripotência celular através de técnicas moleculares, temos a formação das chamadas iPCS que são células tronco induzidas, e um dos genes envolvidos nessa indução é o *OCT4*, que também é responsável pela manutenção da pluripotência de células embrionárias primordiais (HAWKINS, 2014). Como este gene pode ser controlado por metilação de DNA, pode-se encontrar hipometilação em regiões promotoras e primeiro éxon, possivelmente relacionadas à transcrição gênica, em células menos diferenciadas (ZHOU et al., 2016). Neste trabalho foi encontrado um percentual de hipometilação do gene *OCT4* em embriões quando comparados em relação a células mais diferenciadas, como fibroblastos.

Estudos utilizando GFP (*Green Fluorescent Protein*) como marcador para sinalizar *OCT4* em embriões de camundongos, mostrou que o gene possui uma expressão acentuada no início do desenvolvimento. Isso também foi extrapolado

para bovinos e humanos em outros experimentos para que se comprovasse a importância do gene, além de outros, relacionados com pluripotência celular no desenvolvimento embrionário inicial (GERRARD et al., 2005; OKITA et al., 2007; HUANG et al., 2019). No presente estudo, com o percentual de metilação total da região estudada em embriões e gametas, pode-se concluir que a hipometilação do gene *OCT4* é explicada pela sua ação no desenvolvimento embrionário e manutenção da pluripotência celular para desenvolvimento, como já foi mostrado em bovinos anteriormente.

Fibroblastos são células altamente diferenciadas e utilizadas em técnicas como TNCS (Transferência Nuclear de Célula Somática). São células epiteliais e por serem diferenciadas, possuem marcas epigenéticas bem definidas. Quando se trata de genes de pluripotência celular, é estabelecido que não existisse alta expressão destes, pois são células especializadas e incapazes fisiologicamente de se diferenciarem em outras com finalidades distintas (KIM et al., 2015; MAHMOUDI et al., 2019; GILL et al., 2022). Neste estudo, encontramos um padrão mais metilado do gene *OCT4* em fibroblastos quando comparados com padrões de metilação em embriões.

Estudos realizados anteriormente mostraram que fibroblastos fetais possuem diferença no nível de metilação global de DNA quando as passagens celulares, meios de cultivo *in vitro* e sexo do animal foram distintos (JONES; TAROCHIONE-UTT, 2004; DINIZ et al., 2022). Porém, no presente trabalho essa diferença não foi encontrada quando se testou diferentes passagens celulares e diferentes sexos.

A diferença estatística encontrada nesse estudo entre fibroblastos fetais e adultos foi também encontrada em experimentos realizados anteriormente que analisaram metilação global de DNA (XIE et al., 1999; KÜHHOLZER et al., 2001; JONES; TAROCHIONE-UTT, 2004). Porém, os fibroblastos fetais encontraram-se menos metilados em relação aos fibroblastos de animais adultos, sendo explicado por uma ação das metiltransferases, que atuaram na metilação *de novo* na segunda onda da reprogramação epigenética e ainda estão sendo expressas no período fetal (JONES; TAROCHIONE-UTT, 2004). O contrário foi encontrado no presente estudo, pois os fibroblastos de animais adultos encontraram-se

hipermetilados na região estudada do gene *OCT4* em relação aos fibroblastos fetais, o que poderia ser explicado pela grande ação do gene no desenvolvimento embrionário que ainda pode estar expresso no período fetal, diminuindo ao longo do desenvolvimento.

A quantificação relativa de mRNA do gene *OCT4* em linhagens de fibroblastos de animais adultos e fetos no presente trabalho não apresentou diferença estatística apesar da diferença no percentual total de metilação entre as amostras.

Em se tratando de correlação entre a quantificação relativa de mRNA e metilação neste trabalho, também não foi encontrado diferença estatística. Uma possível explicação seria se outra região, que não foi caracterizada no presente estudo, fosse responsável pelo controle direto da transcrição gênica, e nesse caso, seriam necessários mais estudos sobre o perfil de metilação do gene completo. Ou se a diferença no percentual de metilação da região estudada em fibroblastos fetais e adultos não foi suficiente para haver diferença na transcrição do gene.

O presente trabalho foi de caracterização de uma ampla região do gene *OCT4*, onde os resultados encontrados estão de acordo com a literatura quando outras regiões do gene foram estudadas. Porém são necessários mais estudos para entender como o perfil de metilação deste gene pode ou não controlar a expressão gênica do mesmo.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi caracterizado o perfil de metilação de uma ilha CpG do gene *OCT4*, onde o DNA embrionário nas regiões estudadas apresentou-se hipometilado em relação ao genoma de células mais diferenciadas como os fibroblastos.

Enquanto os gametas, mesmo sendo células altamente diferenciadas e com seu padrão de metilação fortemente estabelecido, possuíram um padrão de hipometilação na região estudada do gene *OCT4*.

O presente estudo contribuiu muito para entendermos como funciona um gene de suma importância na pluripotência celular e no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos.

REFERÊNCIAS

- ABOFOUL-AZAB, M.; LUNENFELD, E.; KLEIMAN, S.; et al. Determining the expression levels of CSF-1 and OCT4, CREM-1, and protamine in testicular biopsies of adult Klinefelter patients: Their possible correlation with spermatogenesis. **Andrologia**, v. 54, n. 10, p. 1–10, 2022. <https://doi.org/10.1111/and.14558>
- ABULAITI, X.; ZHANG, H.; WANG, A.; et al. Phosphorylation of Threonine343 Is Crucial for OCT4 Interaction with SOX2 in the Maintenance of Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency. **Stem Cell Reports**, v. 9, n. 5, p. 1630–1641, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.09.001>
- AL-KHTIB, M.; BLACHÈRE, T.; GUÉRIN, J. F.; LEFÈVRE, A. Methylation profile of the promoters of Nanog and Oct4 in ICSI human embryos. **Human Reproduction**, v. 27, n. 10, p. 2948–2954, 2012. <https://doi.org/10.1093/humrep/des284>
- ALABERT, C.; GROTH, A. Chromatin replication and epigenome maintenance. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 153–167, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrm3288>
- AMBROSETTI, D. C.; BASILICO, C.; DAILEY, L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 11, p. 6321–6329, 1997. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.11.6321>
- ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 2, p. 241–257, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8420-z>
- Base Legislação da Presidência da República - Lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008. Disponível em: <<https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=11794&ano=2008&ato=57aQzYE5UNRpWT7e7>>. Acesso em: 6/1/2023.
- BASU, A.; DASARI, V.; MISHRA, R. K.; KHOSLA, S. The CpG Island encompassing the promoter and first exon of human DNMT3L Gene is a PcG/TrXresponse element (PRE). **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–15, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093561>
- BAUBEC, T.; SCHÜBELER, D. Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 25, n. 1, p. 85–92, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2013.11.015>
- BESTOR, T. H.; EDWARDS, J. R.; BOULARD, M. Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 22, p. 6796–6799, 2015. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415301111>
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes and Development**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 2002. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>

Bos taurus isolate L1 Dominette 01449 registration number 42190680 bre - Nucleotide - NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_037350.1?from=27982798&to=27987297&report=genbank>. Acesso em: 24/12/2022.

BRENET, F.; MOH, M.; FUNK, P.; et al. DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014524>

BUCK-KOEHN TOP, B. A.; DEFOSSEZ, P. A. On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. **Epigenetics**, v. 8, n. 2, p. 131–137, 2013. <https://doi.org/10.4161/epi.23632>

CHAKRABORTY, A.; VISWANATHAN, P. Methylation-demethylation dynamics: Implications of changes in acute kidney injury. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/8764384>

CHATTOPADHYAYA, S.; GHOSAL, S. DNA methylation: a saga of genome maintenance in hematological perspective. **Human Cell**, v. 35, n. 2, p. 448–461, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13577-022-00674-9>

CHEN, M.; LI, X.; ZHANG, X.; et al. A novel long non-coding RNA, lncKBTBD10, involved in bovine skeletal muscle myogenesis. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 55, n. 1, p. 25–35, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11626-018-0306-y>

CHEN, Y.; HONG, T.; WANG, S.; et al. Epigenetic modification of nucleic acids: From basic studies to medical applications. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 10, p. 2844–2872, 2017. <https://doi.org/10.1039/C6CS00599C>

CHOI, Y. H.; HARDING, H. D.; HARTMAN, D. L.; et al. The uterine environment modulates trophectodermal POU5F1 levels in equine blastocysts. **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 589–599, 2009. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0394>

COMPERE, S. J.; PALMITER, R. D. DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells. **Cell**, v. 25, n. 1, p. 233–240, 1981. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90248-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90248-8)

Cow bosTau9 chr23:27,982,798-27,987,297 UCSC Genome Browser v440. Disponível em: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=bosTau9&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr23%3A27982798-27987297&hgslid=1508560357_mtiym4Jmn4PI2ZIMJgXu7NE9vln7>. Acesso em: 1/12/2022.

DAI, X.; LIU, P.; LAU, A. W.; LIU, Y.; INUZUKA, H. Acetylation-dependent regulation of essential iPS-inducing factors: A regulatory crossroad for pluripotency and tumorigenesis. **Cancer Medicine**, v. 3, n. 5, p. 1211–1224, 2014. <https://doi.org/10.1002/cam4.298>

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 24, p. 13734–13738, 2001.

<https://doi.org/10.1073/pnas.241522698>

DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What do you mean, “Epigenetic”? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887–896, 2015. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>

DIAZ, F. A.; GUTIERREZ-CASTILLO, E. J.; FOSTER, B. A.; et al. Evaluation of Seasonal Heat Stress on Transcriptomic Profiles and Global DNA Methylation of Bovine Oocytes. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. October, p. 1–10, 2021.

<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.699920>

DINIZ, W. J. S.; CROUSE, M. S.; CATON, J. S.; et al. DNA methylation dataset of bovine embryonic fibroblast cells treated with epigenetic modifiers and divergent energy supply. **Data in Brief**, v. 42, p. 108074, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.dib.2022.108074>

DYKES, I. M.; EMANUELI, C. Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 15, n. 3, p. 177–186, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.12.005>

ECKHARDT, F.; LEWIN, J.; CORTESE, R.; et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. , v. 38, 2006. <https://doi.org/10.1038/ng1909>

EIJK, M. J. T. VAN; ROOIJEN, M. A. VAN; MODINA, S.; et al. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 5, p. 1093–1103, 1999.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod60.5.1093>

EWEN, K. A.; KOOPMAN, P. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 323, n. 1, p. 76–93, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.12.013>

FAYOMI, A. P.; ORWIG, K. E. Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. **Stem Cell Research**, v. 29, n. April, p. 207–214, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.04.009>

FERREIRA, A. R.; FRANCO, M. M. Reprogramação epigenética em gametas e embriões de mamíferos. **Revista Brasileira da Reprodução dos Animais**, v. 36, n. 1, p. 3–9, 2012.

FRANCIS, N.; OLIVEIRA, P. DE; PLANELLO, A. C.; et al. **Metilação de DNA e Câncer DNA Methylation and Cancer Metilación del ADN y Cáncer**. 2010.

<https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2010v56n4.698>

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG Islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 196, n. 2, p. 261–282, 1987.

[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(87\)90689-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(87)90689-9)

GERRARD, L.; ZHAO, D.; CLARK, A. J.; CUI, W. Stably Transfected Human Embryonic Stem Cell Clones Express OCT4-Specific Green Fluorescent Protein and Maintain Self-Renewal and Pluripotency. **Stem Cells**, v. 23, n. 1, p. 124–133, 2005.

<https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0102>

GILL, D.; PARRY, A.; SANTOS, F.; et al. Multi-omic rejuvenation of human cells by maturation phase transient reprogramming. **eLife**, v. 11, p. 1–23, 2022.

<https://doi.org/10.7554/eLife.71624>

GJALTEMA, R. A. F.; ROTS, M. G. Advances of epigenetic editing. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 57, p. 75–81, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.04.020>

GOISSIS, M. D.; CIBELLI, J. B. Functional characterization of CDX2 during bovine preimplantation development in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 10, p. 962–970, 2014. <https://doi.org/10.1002/mrd.22415>

GRAF, A.; KREBS, S.; ZAKHARTCHENKO, V.; et al. Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 11, p. 4139–4144, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321569111>

GUERRA, J. V. DA S.; PEREIRA, B. M. DE S.; CRUZ, J. G. V. DA; et al. Genes controlled by DNA methylation are involved in wilms tumor progression. **Cells**, v. 8, n. 8, 2019. <https://doi.org/10.3390/cells8080921>

GUO, L.; ZHOU, Y.; WANG, S.; WU, Y. Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 10, p. 2009–2019, 2014. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12336>

HAMMOUD, S. S.; NIX, D. A.; ZHANG, H.; et al. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. **Nature**, v. 460, n. 7254, p. 473–478, 2009. <https://doi.org/10.1038/nature08162>

HAWKINS, K. Cell signalling pathways underlying induced pluripotent stem cell reprogramming. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 620, 2014. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.620>

HE, Y. F.; LI, B. Z.; LI, Z.; et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1303–1307, 2011. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>

HERR, W.; STURM, R. A.; CLERC, R. G.; et al. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and Caenorhabditis elegans unc-86 gene products. **Genes & development**, v. 2, n. 12 A, p. 1513–1516, 1988. <https://doi.org/10.1101/gad.2.12a.1513>

HERREROS-VILLANUEVA, M.; BUJANDA, L.; BILLADEAU, D. D.; ZHANG, J. S. Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 9, p. 2247–2254, 2014. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i9.2247>

HILSCHER, B.; HILSCHER, W.; BÖLTHOFF-OHNOLZ, B.; et al. Kinetics of gametogenesis. **Cell and Tissue Research**, v. 154, n. 4, 1974. <https://doi.org/10.1007/BF00219667>

HISEY, E.; ROSS, P. J.; MEYERS, S. A. A Review of OCT4 Functions and Applications to Equine Embryos. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 98, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103364>

- HOGG, S. J.; BEAVIS, P. A.; DAWSON, M. A.; JOHNSTONE, R. W. Targeting the epigenetic regulation of antitumour immunity. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0077-5>
- HOLLIDAY, R.; PUGH, J. E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science**, v. 187, n. 4173, p. 226–232, 1975. <https://doi.org/10.1126/science.187.4173.226>
- HOLM, P.; SHUKRI, N. N.; VAJTA, G.; et al. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. **Theriogenology**, v. 50, n. 8, p. 1285–1299, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00227-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00227-1)
- HOTCHKISS, D. THE QUANTITATIVE SEPARATION OF PURINES , SND NUCLEOSIDES BY The separation of amino acid mixtures by migration with organic solvents in filter paper has been successfully accomplished by many workers sifile:///C:/Users/Usuario/Documents/Artigos/holliday19. **Journal of Biological Chemistry**, v. 175, n. 1, p. 315–332, 1948. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)57261-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)57261-6)
- HUANG, D.; WANG, L.; TALBOT, N. C.; et al. Analyzing bovine OCT4 and NANOG enhancer activity in pluripotent stem cells using fluorescent protein reporters. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–15, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203923>
- HULEIHEL, M.; NOURASHRAFEDDIN, S.; PLANT, T. M. Application of three-dimensional culture systems to study mammalian spermatogenesis, with an emphasis on the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. 6, p. 972–980, 2015. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.154994>
- ILLINGWORTH, R. S.; GRUENEWALD-SCHNEIDER, U.; WEBB, S.; KERR, A. R. W.; JAMES, K. D. Orphan CpG Islands Identify Numerous Conserved Promoters in the Mammalian Genome. **PLoS Genet**, v. 6, n. 9, p. 1001134, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001134>
- JERABEK, S.; MERINO, F.; SCHÖLER, H. R.; COJOCARU, V. OCT4: Dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1839, n. 3, p. 138–154, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.10.001>
- JONES, K. L.; TAROCHIONE-UTT, K. D. DNA methylation in bovine adult and fetal fibroblast cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 6, n. 3, p. 259–266, 2004. <https://doi.org/10.1089/clo.2004.6.259>
- JONES, P. A. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–492, 2012. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- JOSHI, M.; RAJENDER, S. Long non-coding RNAs (lncRNAs) in spermatogenesis and male infertility. , v. 6, p. 1–18, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00660-6>
- KANEDA, M.; WATANABE, S.; AKAGI, S.; et al. Proper reprogramming of imprinted and non-imprinted genes in cloned cattle gametogenesis. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 11, p. 1678–1685, 2017. <https://doi.org/10.1111/asj.12846>

- KIM, S. J.; KOO, O. J.; PARK, H. J.; et al. Oct4 overexpression facilitates proliferation of porcine fibroblasts and development of cloned embryos. **Zygote**, v. 23, n. 5, p. 704–711, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000355>
- KISHORE, C.; KARUNAGARAN, D. Non-coding RNAs as emerging regulators and biomarkers in colorectal cancer. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 477, n. 6, p. 1817–1828, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04412-5>
- KLEMM, S. L.; SHIPONY, Z.; GREENLEAF, W. J. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 4, p. 207–220, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0089-8>
- KÜHHOLZER, B.; HAWLEY, R. J.; LAI, L.; KOLBER-SIMONDS, D.; PRATHER, R. S. Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pigs. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1695–1698, 2001. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.6.1695>
- KUMAR, D. Induced pluripotent stem cells: Mechanisms, achievements and perspectives in farm animals. **World Journal of Stem Cells**, v. 7, n. 2, p. 315, 2015. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i2.315>
- KUROSAKA, S.; ECKARDT, S.; MCLAUGHLIN, K. J. Pluripotent lineage definition in bovine embryos by Oct4 transcript localization. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 5, p. 1578–1582, 2004. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.029322>
- LAWRENCE, M.; DAUJAT, S.; SCHNEIDER, R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 1, p. 42–56, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>
- LEE, H. J.; HORE, T. A.; REIK, W. Reprogramming the methylome: Erasing memory and creating diversity. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 6, p. 710–719, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.05.008>
- LENARDO, M. J.; STAUDT, L.; ROBBINS, P.; et al. Repression of the IgH enhancer in teratocarcinoma cells associated with a novel octamer factor. **Science**, v. 243, n. 4890, p. 544–546, 1989. <https://doi.org/10.1126/science.2536195>
- LI, X.; DONG, L.; WANG, J.; et al. Effects of Zuogui Wan on testis structure and expression of c-Kit and Oct4 in rats with impaired spermatogenesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 58, n. 1, p. 44–50, 2020. <https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1693603>
- LI, Y. Modern epigenetics methods in biological research. **Methods**, v. 187, n. June 2020, p. 104–113, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.06.022>
- LIAO, B.; ZHONG, X.; XU, H.; et al. Itch, an E3 ligase of Oct4, is required for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency induction. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 7, p. 1443–1451, 2013. <https://doi.org/10.1002/jcp.24297>
- LIU, G.; DAVID, B. T.; TRAWCZYNSKI, M.; FESSLER, R. G. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 16, n. 1, p. 3–32, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09935-x>

- LOH, Y. H.; WU, Q.; CHEW, J. L.; et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v. 38, n. 4, p. 431–440, 2006. <https://doi.org/10.1038/ng1760>
- MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. W. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 2, p. 126–140, 2014. <https://doi.org/10.1002/mrd.22220>
- MAHMOUDI, S.; MANCINI, E.; XU, L.; et al. **Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing**. Springer US, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1658-5>
- MALLONA, I.; ILIE, I. M.; KAREMAKER, I. D.; et al. Flanking sequence preference modulates de novo DNA methylation in the mouse genome. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. 1, p. 145–157, 2021. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1168>
- MASUI, S.; NAKATAKE, Y.; TOYOOKA, Y.; et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 625–635, 2007. <https://doi.org/10.1038/ncb1589>
- MATTEI, A. L.; BAILLY, N.; MEISSNER, A. DNA methylation: a historical perspective. **Trends in Genetics**, v. 38, n. 7, p. 676–707, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.03.010>
- MEISSNER, A.; MIKKELSEN, T. S.; GU, H.; et al. LETTERS Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. , v. 454, 2008. <https://doi.org/10.1038/nature07107>
- MEISTER GUNTER; TUSCHL THOMAS. Meister and Tuschl 2004. **Nature Publishing Group**, v. 431, n. September, p. 343–349, 2004. <https://doi.org/10.1038/nature02873>
- MELAMED, P.; YOSEFZON, Y.; DAVID, C.; TSUKERMAN, A.; PNUELI, L. Tet enzymes, variants, and differential effects on function. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 6, n. MAR, p. 1–6, 2018. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00022>
- MOHIUDDIN, I. S.; WEI, S. J.; KANG, M. H. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 4, p. 165432, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.005>
- MOHN, F.; WEBER, M.; REBHAN, M.; et al. Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors. **Molecular Cell**, v. 30, n. 6, p. 755–766, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.007>
- MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 1, p. 23–38, 2013. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- MORGAN, H. D.; DEAN, W.; COKER, H. A.; REIK, W.; PETERSEN-MAHRT, S. K. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: Implications for epigenetic reprogramming. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 52353–52360, 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407695200>

- MULAS, C.; CHIA, G.; JONES, K. A.; et al. STEM CELLS AND REGENERATION Oct4 regulates the embryonic axis and coordinates exit from pluripotency and germ layer specification in the mouse embryo. , 2018. <https://doi.org/10.1242/dev.159103>
- MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Nucleic Acids Research Nucleic Acids Research. **Methods**, v. 12, n. 21, p. 8235–8251, 1980.
- MUSHTAQ, A.; MIR, U. S.; HUNT, C. R.; et al. Role of histone methylation in maintenance of genome integrity. **Genes**, v. 12, n. 7, 2021. <https://doi.org/10.3390/genes12071000>
- NAGY, C.; TURECKI, G. Transgenerational epigenetic inheritance: An open discussion. **Epigenomics**, 1. Aug. 2015. <https://doi.org/10.2217/epi.15.46>
- NICHOLS, J.; SMITH, A. Naive and Primed Pluripotent States. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 6, p. 487–492, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>
- NIWA, H.; TOYOOKA, Y.; SHIMOSATO, D.; et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoctoderm differentiation. **Cell**, v. 123, n. 5, p. 917–929, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.040>
- OKAMOTO, K.; OKAZAWA, H.; OKUDA, A.; et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. **Cell**, v. 60, n. 3, p. 461–472, 1990. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90597-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90597-8)
- OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 313–317, 2007. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
- ORG, T.; HENSEN, K.; KREEVAN, R.; et al. Genome-wide histone modification profiling of inner cell mass and trophoctoderm of bovine blastocysts by RAT-ChIP. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1–24, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225801>
- OSORNO, R.; TSAKIRIDIS, A.; WONG, F.; et al. The developmental dismantling of pluripotency is reversed by ectopic Oct4 expression. **Development (Cambridge)**, v. 139, n. 13, p. 2288–2298, 2012. <https://doi.org/10.1242/dev.078071>
- PANNI, S.; LOVERING, R. C.; PORRAS, P.; et al. BBA - Gene Regulatory Mechanisms Non-coding RNA regulatory networks ☆. **BBA - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1863, n. 6, p. 194417, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2019.194417>
- PARRISH, J. J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859–869, 1995. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00271-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00271-9)
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 0, 2001. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- RAKYAN, V. K.; HILDMANN, T.; NOVIK, K. L.; et al. DNA methylation profiling of the human major histocompatibility complex: A pilot study for the Human Epigenome Project. **PLoS Biology**, v. 2, n. 12, 2004. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020405>

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089–1093, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.1063443>

ROBINSON, M.; GILBERT, S. F.; WATERS, J. A.; et al. Characterization of sox2, oct4 and nanog in ovarian cancer tumor-initiating cells. **Cancers**, v. 13, n. 2, p. 1–20, 2021. <https://doi.org/10.3390/cancers13020262>

ROSNER, M. H.; VIGANO, M. A.; OZATO, K.; et al. A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. **Nature**, v. 345, n. 6277, p. 686–692, 1990. <https://doi.org/10.1038/345686a0>

ROSS, S. E.; BOGDANOVIC, O. TET enzymes, DNA demethylation and pluripotency. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 3, p. 875–885, 2019. <https://doi.org/10.1042/BST20180606>

SADEGHIAN-NODOUSHAN, F.; AFLATOONIAN, R.; BORZOUIE, Z.; et al. Pluripotency and differentiation of cells from human testicular sperm extraction: An investigation of cell stemness. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 4, p. 312–323, 2016. <https://doi.org/10.1002/mrd.22620>

SAITOU, M.; KAGIWADA, S.; KURIMOTO, K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. **Development**, v. 139, n. 1, p. 15–31, 2012. <https://doi.org/10.1242/dev.050849>

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: Reprogramming and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 2, p. 129–140, 2008. <https://doi.org/10.1038/nrg2295>

SAXONOV, S.; BERG, P.; BRUTLAG, D. L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. , 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510310103>

SEISENBERGER, S.; PEAT, J. R.; HORE, T. A.; et al. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: Building and breaking epigenetic barriers. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1609, p. 1–11, 2013. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0330>

SHEN, L.; TOYOTA, M.; KONDO, Y.; et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 47, p. 18654–18659, 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704652104>

SHI, G.; JIN, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 1, n. 5, p. 1–9, 2010. <https://doi.org/10.1186/scrt39>

SHOME, S.; JERNIGAN, R. L.; BEITZ, D. C.; CLARK, S.; TESTROET, E. D. Non-coding RNA in raw and commercially processed milk and putative targets related to growth and immune-response. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07964-w>

- SIMMET, K.; ZAKHARTCHENKO, V.; PHILIPPOU-MASSIER, J.; et al. OCT4/POU5F1 is required for NANOG expression in bovine blastocysts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 11, p. 2770–2775, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718833115>
- SINGINA, G. N.; SERGIEV, P. V.; LOPUKHOV, A. V.; et al. Production of a Cloned Offspring and CRISPR/Cas9 Genome Editing of Embryonic Fibroblasts in Cattle. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, v. 496, n. 1, p. 48–51, 2021. <https://doi.org/10.1134/S1607672921010099>
- SKVORTSOVA, K.; IOVINO, N.; BOGDANOVIĆ, O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 1. Dec. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0074-2>
- SMITH, L. C.; SUZUKI, J.; GOFF, A. K.; et al. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL.4, p. 107–114, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02063.x>
- SMITH, Z. D.; CHAN, M. M.; MIKKELSEN, T. S.; et al. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. **Nature**, v. 484, n. 7394, p. 339–344, 2012. <https://doi.org/10.1038/nature10960>
- STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–45, 2000. <https://doi.org/10.1038/47412>
- TAHILIANI, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 930–935, 2009. <https://doi.org/10.1126/science.1170116>
- TAKADA, Y.; IYYAPPAN, R.; SUSOR, A.; KOTANI, T. Posttranscriptional regulation of maternal Pou5f1 / Oct4 during mouse oogenesis and early embryogenesis. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 154, n. 6, p. 609–620, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01915-4>
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- TAN, Y.; XUE, Y.; SONG, C.; GRUNSTEIN, M. Acetylated histone H3K56 interacts with Oct4 to promote mouse embryonic stem cell pluripotency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 28, p. 11493–11498, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309914110>
- TIEDEMANN, R. L.; EDEN, H. E.; HUANG, Z.; ROBERTSON, K. D.; ROTHBART, S. B. Distinguishing Active Versus Passive DNA Demethylation Using Illumina MethylationEPIC BeadChip Microarrays. **Methods in Molecular Biology**, v. 2272, p. 97–140, 2021. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1294-1_7
- WEBER, M.; HELLMANN, I.; STADLER, M. B.; et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. , 2007. <https://doi.org/10.1038/ng1990>
- WILLIAMS, S. C. P. Epigenetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 26. Feb. 2013.

WU, G.; SCHÖLER, H. R. Role of Oct4 in the early embryo development. **Cell Regeneration**, v. 3, n. 1, p. 3:7, 2014. <https://doi.org/10.1186/2045-9769-3-7>

WU, X.; HU, S.; WANG, L.; LI, Y.; YU, H. Dynamic changes of histone acetylation and methylation in bovine oocytes, zygotes, and preimplantation embryos. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, v. 334, n. 4, p. 245–256, 2020. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22943>

WUENSCH, A.; HABERMANN, F. A.; KUROSAKA, S.; et al. Quantitative monitoring of pluripotency gene activation after somatic cloning in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 6, p. 983–991, 2007. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.058776>

XIA, W.; XIE, W. Rebooting the Epigenomes during Mammalian Early Embryogenesis. **Stem Cell Reports**, v. 15, n. 6, p. 1158–1175, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.09.005>

XIE, S.; WANG, Z.; OKANO, M.; et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. **Gene**, v. 236, n. 1, p. 87–95, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00252-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00252-8)

YAMANAKA, K. I.; YAMASHITA, K.; KHATUN, H.; et al. Normal DNA methylation status in sperm from a somatic cell cloned bull and their fertilized embryos. **Animal Science Journal**, v. 89, n. 10, p. 1406–1414, 2018. <https://doi.org/10.1111/asj.13086>

YAMAZAKI, Y.; FUJITA, T. C.; LOW, E. W.; et al. Gradual DNA demethylation of the Oct4 promoter in cloned house embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 2, p. 180–188, 2006. <https://doi.org/10.1002/mrd.20411>

YANG, J.; QIU, Q.; CHEN, L. **Histone Mutations and Cancer**. 2021. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5>

ZAFON, C.; GIL, J.; PÉREZ-GONZÁLEZ, B.; JORDÀ, M. DNA methylation in thyroid cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 26, n. 7, p. R415–R439, 2019. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0093>

ZEINEDDINE, D.; HAMMOUD, A. A.; MORTADA, M.; BOEUF, H. The Oct4 protein: More than a magic stemness marker. **American Journal of Stem Cells**, v. 3, n. 2, p. 74–82, 2014.

ZHANG, H. J.; SIU, M. K. Y.; WONG, E. S. Y.; et al. Oct4 is Epigenetically Regulated by Methylation in Normal Placenta and Gestational Trophoblastic Disease. **Placenta**, v. 29, n. 6, p. 549–554, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.03.003>

ZHANG, Q.; HAN, Z.; ZHU, Y.; CHEN, J.; LI, W. The Role and Specific Mechanism of OCT4 in Cancer Stem Cells: A Review. **International Journal of Stem Cells**, v. 13, n. 3, p. 312–325, 2020. <https://doi.org/10.15283/ijsc20097>

ZHANG, S.; CHEN, X.; WANG, F.; et al. Aberrant DNA methylation reprogramming in bovine SCNT preimplantation embryos. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–11, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep30345>

ZHOU, X. Y.; LIU, L. L.; JIA, W. C.; PAN, C. Y. Methylation profile of bovine Oct4 gene coding region in relation to three germ layers. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 3, p. 618–628, 2016. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61100-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61100-5)

ZHU, L.; MARJANI, S. L.; JIANG, Z. The Epigenetics of Gametes and Early Embryos and Potential Long-Range Consequences in Livestock Species—Filling in the Picture With Epigenomic Analyses. **Frontiers in Genetics**, v. 12, n. March, p. 1–21, 2021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.557934>

ANEXOS

ANEXO 1

	Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA/Cenargen) 
CERTIFICADO 007/2022	

Certificamos que a proposta intitulada “Caracterização Epigenética do Gene OCT4 em Gametas, Embriões e Linhagens de Fibroblastos Bovinos” registrada com o número Protocolo CEUA Nº 007/2022, sob a responsabilidade de Maurício Machaim Franco, que envolve manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA (CEUA/CENARGEN) em reunião ordinária realizada em 08 de novembro de 2022.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/11/2022 a 30/04/2023
Espécie/linhagem/raça	bovino
Nº de animais	00
Peso/Idade	-----
Sexo	-----
Origem	-----



Coordenação CEUA/Cenargen Embrapa Recursos
Genéticos e Biotecnologia

ANEXO 2

REPRESENTAÇÃO DA SEQUÊNCIA DO GENE OCT4

>bosTau9_refGene_NM_174580 range=chr23:27977798-27987297

OCT4 OUT PRIMEIRO ÉXON F+R

OCT4 INNER PRIMEIRO ÉXON F+R

OCT4 OUT PRIMEIRO ÍNTRON F+R

OCT4 INNER PRIMEIRO ÍNTRON F+R

ggtgtggtgtgtccaatccctctggctggacaaaggtagggagactcaggcctagtcagtcagagagcc
tggccc**cg**aaagtaggggtttccatccctgggtctggttaggtgaggggcctctggagtcaggaaagctg
gggatggaatggaagctgggtctggcagcctgcccctgggtgatgggggtggatttttagcaggctgggag
aggggtaccaggcatcacagttttgaaaagtgaagtgtagtcatgtc**cg**actctttttgaccacaca
gattgtagcc**cg**c**cg**agttcctctgtccatgggattttcccaggcaagcatactggagtggggt**cg**ccat
ttctttcttcaggagatcttcccaaccagggatacaaccaggggtctctggcattgcaggcagattct
ttatcatctgagccaccaggga**aa****cg**aatctgcccagttgtctaaatgggaactgcctaggttcctgg
actgggatgctggaggacaa**cg**gggaaggagcctgttaagaattgaggggtagccccagtgggacttg
acacatacagcataaatgtgtttgaggagttgagaggggtggctgggtctcaggtgccaggggtgtctgga
gaggggtcctgaagaa**cg**tgaggggggtatggaagggaccctcaccctgggtgtatgtgggcctggg
gagggctgggcagcctgttgggagctggaagtgaaggcc**cg**catgggggacctgcac**cg**agagtctag
gagtcctggggcctggagagggg**cctgggtggagatccctggctttcc**ccttcagacaccac**cg**ccac
cagcaggcaaacaccctc**cg**cctcagtttctcccacccccac**cg**tccttccccccacccatccaggg
gg**cg**ggggccagaggtcaaggctagtggggtgggattggggagggagagaggtgtt**gagcagtccttagg**
agatccctcg**tttt**cctaggcccc**cg**gct**cg**gggtgccttcttccccATGG**CG**GGACACCT**CG**CTTC
TGACTT**CG**CCTTCT**CG**CCCC**CG**C**CG**GG**CG**GTGGAGG**CG**ATGGGC**CG**GGAGGGCCAGAGC**CG**GGCTGGG
TTGATCCT**CG**GACCTGGATGAGCTTCCAAGGGCCTCC**CG**GTGGGT**CG**GGGAT**CG**GGC**CG**GGGGTTGTG
CCTGG**CG**C**CG****AGGTGTGGGGGCTTCCCC****CG**TGCCCC**CG**CCCTATGACTTGTGTGGAGGGATGGCCTA
CTGTG**CG**C**CG**CAGGTTGGAGTGGGGC**CG**GTGCCCCCAGG**CG**GCCTGGAGACCCCTCAGCC**CG**AGGG**CG**
AGG**CG**GGAGC**CG**GGGTGGAGAGCAACTC**CG**AGGGGGCCTCCC**CG**GACCCCTG**CG**C**CG**CACC**CG**CAGGC
GCCC**CG****AAGCTGGACAAGGAGAAGCTG**GAGC**CG**AACCTGAGGAG**cg**agtgagctgctggggg**cg**gg
gggc**cg**gtgac**cg**cgtaggc**cg**gggg**cg**gcca**cg**cgaggggaggtggt**cg**gggaccaggaaggagc
agg**cg**aagg**cg**gctccc**cg**gggcagggaccagtgtgtgg**cg**gctgcaggc**cg**ctctgagctggagcca
ggtgggaaccaggggc**cg**gaatttaagagagaac**cg**caggtgagggcaggg**cg**gcctgggg**cg**gt**cg**
aagcgggccttgcttccccct**cg**gcccttgctcaagtaggtccttccacttcttaggtctgacctggg
t**cg**ggtcactcattaccagccagcaccagacctagcttggggctctgagcccttctacc**cg**gatccct
tctgggaaatttgctccttatcagacc**cg**ggatct**cg**ggccttaggggttaagtgtggcctgaggggtga
aaacagtgttatcccagggttattgttcctgagagtctaggggtgtgactggtttctgatagaagctc
ctgtgtggatgtgtggagtctgggttttccatcaagtttagggcttgtcttcccttgaccctg
ccttg**cg**cccaa**cg**agtcaaggtcaggcagag**cg**cacaccctgacaccccttataagaaagctggaa
caccaattt**cg****cg**taattaagtaagcagtgaacagggggagaaaaggggaacaagtcactctgcaggc

cattcctcaaatggaggggttctgagggactgaagtcttctgcatctaacc**cg**ctggggactattaa
 ggatgtatcttctagctctgaggaagagacaagtgaagcaattagagatcaagtaactaagcctttaga
 cctctc**cg**gaggaggtgtgattggtttcagctgaccaagtagctctaga**cg**ctcttttgctggagg**cg**a
 ctgctgagccttgaataataatggctgccaat**cg**tggtccatttcctaagtgcctggctgtgggctca
 gtttctacatcattatctcattaac**cg**gcacaaaatctcctagggaggtattattagcctgtttcatg
 ggtcttaactgctaaatgggtgaagctagaatttgagggtttatcttattttcaaat**cg**ccaaaatatgat
 tcagaaaagc**cg**agatgggaagagctgacattttacaagtttgcaacattgggtgagcagaagttggcc
 tattttgagtttgaggggactgacatcccatcaaacagtgggttggccacaaagttcattcatgcttt
 tccataacctcttatggaaaagtgc aaatgaactttttggccaacctaatacttcttttaggtttctag
 gactgca**cg**gaggcctggctactcttctccatcttctggccacaggcctgcattggagaggctccatt
 tatccacctttgctctgtctacctttcctttcatccactgtcaaggctcaaagtctttagtagacataa
 ccaccacatgttcagtctccttctgggatggctccctgactgccccctctctgtccattaccagaa
 actcaagggtcaaattagtcacctcattcttttcacatccttacatccagtcctttggaaatacca**c**
gatctttaccttggatagacatcctgggtccctggagccttctgggtcccagttgccatcatctatgct
 gggattgctgcagttgcctccttactctgtggtcagtagacatcaactggagtgcagagtcagggtca
 tttccctgcacaaaacccttcag**cg**actttgcatttctctgagtaaaacttagtcatggtggcagctg
 caggatctg**cg**ctgctcacttctctgat**cgcg**tcagctgctcttccctttcctcagtcctttcaccct
 cctc**cg**gccatgctagctttgttgctgggtcttgctgctgactttgctactgcccacctctgggccttg
 ccacttgactccttccctttgtc aaacatgacctctgactgtcttattcaaaattgtccccctcccc
 ataattccctgctctgctttacttttgccatagcacttctaacctaactgaataagaattatttcatc
 acaatgaaagctccatggggccagggtttttgtctactttgtgtagccactgggttacagaaggtgc
 ttaatagatctgtgaaatttgcaatgaggatgcttttatattgcaaggaaataaaaaatatttt
 atttaaaaaataagggataatcagggttttaaaaaattgagcactgactatataaaaaactttattcat
 acct**cg**atgacatctgttttgtagtg**cg**gtgtgttgatgtg**cg**tatcttggtgtgttggtga
 ccttcaaagtaatctggagagaaatcagagacatgggtgctctgtatttctctagatgcaaaacttcctc
 aaattgggttaatactagagtcaaaagcttttgtagtactaaagaactaaaaggcaggagccccctt
 cctaacctgacatgtgtcctcattgaggttagagcttctctttgcattattgaatgggtgctctgcac
 tgggtggatgttgctttctgggctagatgacatttggtgttatttctgggtgttaggtgggcagctttga
 ggcagagatactctcacataccttggggccccagtggaagaggggggtgaggtggatagctgtcatatg
 ttcttacatatcctctgccttttaaaatgcagTCCCAGGACATCAAAGCTCTTCAGAAAGACCTTGAA
 CAATTTGCCAAGCTCCTAAAGCAGAAGAGGATCACACTAGGATATACCCAGGCC**CG**ATGTGGGGCTCAC
 CCTGGGGGTCTCTTTGgtgagctcctacagcatgttttgaccacaaaacacagggaactacatctg
 ccctggaatgaacatccctgaattggggcctttcctccccaccaaggagtggtggagggtgggggtg
 aggggaagatact**cg**acatggacttttgagttctctgggaagagtagc**cg**gtgtgggtcttggaagg
 gtggggacaggtggcaaggcctgtgt**cg**gtcttggtggcaaaggggccctacctgctacctcactttgc
 ttcttccaaccacctccccagGAAAGGTGTTTCAGCCAAA**CG**ACTATCTGC**CG**TTTTGAGGCTTTGCA
 GCTCAGTTTCAAGAACATGTGTAAGCTG**CG**CCCCCTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAAGCTGACAACA
ACGGAGAATCTGCAGGAGgtgaggggtgggagggagggcacagtgactgccctatctcaagtctgatttcc
 actgctttcatctctggctggcag**cgcg**ccctctaggagccagtgggccctcaatggcatgaagtgtga
 ttctctgtttctgctgagagaaggtccaggatcacttgctaaacctatctttccaggatctttttca
 tacctcctggccctagtgcacactggctgggtgctcctgaatagttgggtcttgagtcattgtccccct
 gatactgggtcctgagcagctttggggccttgctgccatttctttccttgctcatctcctccccacctg
 ctgagATATGCAAGGCAGAGACCCTTGTGCAGGCC**CG**AAAGAGAAAG**CG**GA**CG**AGTAT**CG**GAGAAC**CG**A
 GTGAGAGGCAACCTGGAGAGCATGTTCTGTCAGTGCC**CG**AAGCCCACCCTGCAGCAAATTAGCCACAT
CGCCCAGCAGCT**CG**GGCTGGAGAAAGA**CG**tgagtgcacctgtccctgtccctgtgtg**cg****cg**tctcct
 cctccctgggtgtcacacctcccagatctcaggaccaaagtccccctcc**cg**gtgcctccactcctagGTG
 GTC**CG**AGTGTGGTTTTTGCAAC**CGT****CG**CCAGAAGGGCAAA**CG**ATCAAGCAGTGACTACTCCCAAC**CG**TGA
 GGATTTTGAGGCTGCTGGGTCTCCTTTACAGGGGACC**CG**TATCCTTTCCTCTGG**CG**CCAGGGCCCC

ATTTTGGTACCCCAGGCTACCGGGGGCCCTCACTTCACTACTCTGTACTCTTCGGTCCCATTCCCTGAG
GGTGAGGCCTTTCCCTCGGTGTCTGTCACCGCTCTGGGCTCTCCTATGCATTCAAACCTGA

ANEXO 3

EXTRAÇÃO DE DNA/RNA DE FIBROBLASTOS

Allprep DNA/RNA MicroKit (Qiagen)

- **Cuidados antes de começar:**

Aquecer Buffer EB a 70°C em banho-maria.

- 1) Adicionar 350 µL de Buffer RLT Plus nas células em um tubo de 1,5 mL, vortexar por 1 minuto para homogeneização;
- 2) Transferir o homogeneizado para uma coluna Allprep DNA colocada em um tubo coletor. Centrifugar por 30 s. a >10000 rpm;
- 3) Colocar a coluna em um novo tubo coletor e armazenar em temperatura ambiente para posterior purificação de DNA (Utilizar o que foi eluído no tubo coletor do passo 2 para prosseguir com a extração de RNA no passo 4).

Extração de RNA

- 4) Adicionar 350 µL de etanol 70% no tubo coletor do passo 3 e homogeneizar bem com a pipeta, não centrifugar;
- 5) Transferir a amostra para uma coluna RNeasy MiniElute (geladeira) juntamente com um tubo coletor. Centrifugar por 15 s. em 8000 a 10000 rpm. Descartar o conteúdo do tubo coletor, reutilizar no próximo passo;
- 6) Adicionar 700 µL do Buffer RW1 na mini coluna, centrifugar por 15 s. em 8000 a 10000 rpm. Descartar o conteúdo do tubo coletor, reutilizar no próximo passo;
- 7) Adicionar 500 µL de Buffer RPE na mini coluna, centrifugar por 15 s. em 8000 a 10000 rpm. Descartar o conteúdo do tubo coletor, reutilizar no próximo passo;
- 8) Adicionar 500 µL de etanol 80% na mini coluna, centrifugar por 2 min. em 8000 a 10000 rpm. Descartar o tubo coletor junto com o conteúdo;
- 9) Colocar a mini coluna em um novo tubo coletor com a tampa aberta e centrifugar por 5 min. em velocidade máxima. Descartar o tubo coletor junto com o conteúdo;
- 10) Colocar a mini coluna em um novo tubo de 1,5 mL, adicionar 14 µL de água RNase-free diretamente no centro da coluna. Centrifugar por 1 min. em velocidade máxima.

Extração de DNA genômico

- 11) Adicionar 500 µL de Buffer AW1 na coluna Allprep DNA do passo 3. Centrifugar por 15 s. em 8000 a 10000 rpm, descartar o conteúdo do tubo coletor e reutilizar o mesmo;
- 12) Adicionar 500 µL de Buffer AW2 na mini coluna e centrifugar por 2 min. em velocidade máxima. Descartar tubo coletor e conteúdo;

- 13) Colocar a mini coluna em um novo tubo de 1,5 mL, adicionar 50 µL de Buffer EB (preaquecido a 70°C) no centro da coluna. Incubar em temperatura ambiente por 2 min. e centrifugar por 1 min. a 10000 rpm para eluição do DNA.

Quantificar e armazenar o RNA a -80°C e o DNA em -20 °C.

ANEXO 4

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE OVÓCITOS/EMBRIÕES

- 1) Retirar amostras do freezer e descongelar em gelo;
- 2) Centrifugar os tubos (4 min / 10.000 rpm) para decantar o material;
- 3) Juntar todos os *pools* em um tubo (0,2 mL, ponteira com filtro);
- 4) Retirar o excesso de PBS para ficar apenas 16 uL;
- 5) Lavar todos os tubos com PBS (ou 4 uL de Pronase *) e adicionar esse volume no *pool* de ovócitos/ embriões;
 - a. * Pronase E [50 mg/mL], concentração final de 10 mg/mL
 - b. Se diminuir o volume, completar
 - c. O pellet pode ser visível, às vezes
 - d. Volume final de 20 uL
- 6) Incubar em termociclador:
 - a. 37 °C / 30 min; - ativa a enzima
 - b. 85 °C / 15 min; - desnatura a enzima
- 7) Choque térmico (lise da membrana celular, nuclear e organelas):
 - a. Congelamento em N₂
 - b. Aquecimento a 95 °C / 1 minuto (termociclador)
 Repetir esse procedimento (A e B) por 5X.
- 8) Armazenamento a -20 °C para posterior tratamento com bissulfito de sódio.

*** Diluição PRONASE [50 mg/mL]:**

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$50 \times V1 = 10 \times 20$$

$$V1 = 200 / 50 \rightarrow \mathbf{V1 = 4 \text{ uL Pronase na reação}}$$

ANEXO 5

EXTRAÇÃO DE DNA ESPERMATOZOIDES

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)

- **Buffer 1**

150 mM NaCl

10 mM EDTA

Ajustar pH: 8.0

- **Buffer 2**

100 mM Tris Cl (pH: 8.0)

10 mM EDTA

500 mM NaCl

1% SDS

2% β -mercaptoetanol

- 1) Adicionar 50-250 μ L de sêmen descongelado ou fresco em 10 mL do Buffer 1 em um tubo de 15 mL e vortexar por 10 segundos em velocidade máxima;
- 2) Centrifugar por 10 minutos em 4000 rpm;
- 3) Cuidadosamente remover o sobrenadante, deixando aproximadamente 1 mL de pelet + Buffer 1 no tubo;
- 4) Vortexar por 10 segundos em velocidade máxima e transferir para um tubo de 2 mL;
- 5) Adicionar 500 μ L de Buffer 1 no tubo de 15 mL, vortexar para não deixar qualquer amostra aderida nas paredes do mesmo e transferir para o mesmo tubo de 2 mL do passo anterior;
- 6) Centrifugar o tubo de 2 mL contendo a amostra transferida por 2 minutos em velocidade máxima na microcentrífuga;
- 7) Cuidadosamente remover o sobrenadante e deixar o pelet.
- 8) Ressuspender o pelet em 300 μ L do Buffer 2;
- 9) Adicionar 100 μ L de Proteinase K (do kit) e incubar por 2 horas em banho-maria a 55°C (inverter o tubo esporadicamente durante as 2 horas para homogeneização);
- 10) Adicionar outros 20 μ L de Proteinase K e incubar a amostra novamente por 2 horas a 55°C (inverter o tubo esporadicamente durante as 2 horas para homogeneização);
- 11) Adicionar 400 μ L de Buffer AL e 400 μ L de Etanol 100% na amostra e homogeneizar com vortex.
- 12) Transferir a amostra para uma coluna e tubo coletor e centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, descartar o tubo coletor com o eluente;
- 13) Colocar a coluna em um novo tubo coletor e adicionar 500 μ L de Buffer AW1. Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm, descartar o tubo coletor como eluente;
- 14) Colocar a coluna em um novo tubo coletor e adicionar 500 μ L de Buffer AW2. Centrifugar por 3 minutos em velocidade máxima. Descartar o tubo coletor com o eluente;
- 15) Colocar a coluna em um novo tubo coletor (não vem no kit) e centrifugar por 1 minuto em velocidade máxima para eliminar qualquer resíduo de Buffer AW2.
- 16) Colocar a coluna em um novo tubo de 1,5 mL devidamente identificado e adicionar 100 μ L de Buffer AE diretamente no centro da coluna. Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto.
- 17) Centrifugar por 1 minuto a 8000 rpm.

Quantificar e armazenar a -20°C.

ANEXO 6

TRATAMENTO COM BISSULFITO

EZ DNA Methylation Lightning (Zymo)

- 1) Adicionar 130 uL de Lightning Conversion Reagent (geladeira, tubo marrom) em 20 uL de DNA em tubo de 0,5 mL. Dar spin.
- 2) Termociclador:
 - 98 °C / 8 minutos
 - 54 °C / 60 minutos
 - 4 ° / hold

OBS: Usar termociclador Eppendorf (o único que cabe tubo de 0.5 mL)
- 3) Adicionar 600 uL de M. Binding Buffer Zymo Spin IC column, e colocar no tubo coletor.
- 4) Colocar amostra do passo 2 na coluna, fechar a tampa e inverter 10X.
 - Centrifugar 30 seg / 10.000 g. Descartar filtrado.
- 5) Adicionar 100 uL de M. Wash Buffer na coluna.
 - Centrifugar 30 seg / 10.000 g. Descartar filtrado.
- 6) Adicionar 200 uL de L. Disulphonation buffer na coluna.
 - **Aguardar 15 a 20 minutos, TA.**
 - Centrifugar 30 seg / 10.000 g. Descartar filtrado.
- 7) Adicionar 200 uL de M. Wash Buffer.
 - Centrifugar 30 seg / 10.000 g. Descartar filtrado.
- 8) Repetir a etapa 7.
- 9) Colocar a coluna em um novo tubo (1,5 mL, não vem no kit) e identificá-lo.
- 10) Adicionar 10 uL de M. Elution Buffer diretamente no centro da coluna.
 - Centrifugar 30 seg / 10.000 g.

OBS: Armazenar amostra a -80 °C.

ANEXO 7

PURIFICAÇÃO DE DNA em gel de agarose

(Wizard SV Gel and PCR Clean-up System Kit)

- 1) Adicionar Membrane Binding Solution no tubo de 1,5 mL, contendo as bandas do gel.
 - 10 uL de solução para cada 10 mg de gel;
 - Pesar o Eppendorf vazio (antes de colocar o gel);
 - Tarar a balança;
 - Pesar o Eppendorf com o gel;
 - Fazer a conta para adicionar a solução, em relação ao peso de gel;
- 2) Vortexar e incubar entre 50 e 65 °C em banho-maria até as bandas ficarem completamente dissolvidas.
 - Misturar de vez em quando, para ajudar a dissolver.
- 3) Inserir a minicoluna no tubo coletor.
- 4) Transferir o gel dissolvido para a minicoluna e incubar a TA / 1 minuto.
- 5) Centrifugar a 16.000 g / 1 minuto, descartar o eluente e reinserir a minicoluna no tubo coletor.
- 6) Adicionar 700 uL de Membrane Wash Solution (geladeira).
- 7) Centrifugar a 16.000 g / 1 minuto, descartar o eluente.
- 8) Adicionar 500 uL de Membrane Wash Solution.
- 9) Centrifugar a 16.000 g / 5 minutos.
- 10) Esvaziar o tubo coletor e centrifugar a minicoluna a 16.000 g por 1 minuto com a tampa da centrífuga aberta, para evaporar qualquer resíduo de etanol.
- 11) Cuidadosamente transferir a minicoluna para um tubo de 1,5 mL novo.
- 12) Adicionar entre 20 e 30 uL (depende do tamanho da banda no gel e da quantidade de bandas utilizadas) de Nuclease-free water, na minicoluna.
- 13) Incubar a TA / 1 minuto.
- 14) Centrifugar a 16.000 g / 1 minuto.
- 15) Descartar a minicoluna.
- 16) Quantificar no nanodrop.
- 17) Estocar o DNA a -20 °C.

ANEXO 8

LIGAÇÃO + TRANSFORMAÇÃO E CLONAGEM BACTERIANA

- **Ligação**

TOPO TA Cloning (Invitrogen)

OCT4 (Primeiro Éxon): 1,9 ng de DNA purificado

OCT4 (Primeiro Intron): 2,2 ng de DNA purificado

X µL	H ₂ O
X µL	DNA purificado
1 µL	Solução salina
1 µL	Vetor
6 µL	Volume final

*TA por 4 hrs.

- **Transformação + clonagem bacteriana**

- 1) Adicionar 3 µL de ligação em 75 µL de bactérias competentes e incubar em gelo por 30 min.;
- 2) Choque térmico nas bactérias + ligação após a incubação: 30 s. 42°C e 2 min. 4°C;
- 3) Adicionar 150 µL de meio SOC nas bactérias transformadas e colocar no shaker a 200 rpm por 1 hora;

Cultivo em placa:

- 4) Pipetar 20 µL de x-gal e 4 µL de IPTG em uma placa com meio de cultivo, espalhar bem com alça flambada;
- 5) Deixar as placas na estufa a 37°C por no mínimo 15 min.;
- 6) Pipetar 70 µL das bactérias transformadas (após a etapa com meio SOC) na placa e espalhar bem com alça flambada;
- 7) Incubar na estufa a 37 °C por 12 a 16 hrs.

Após a incubação, guardar na geladeira embalada e identificada para posterior seleção das colônias brancas para cultivo em tubo.

ANEXO 9

EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL

PureYield Plasmid Miniprep System (Promega)

- 1) Colocar 1,5 mL da cultura de bactéria em tubo de 1,5 mL;
- 2) Centrifugar em velocidade máxima por 3 min.;
- 3) Descartar o meio e deixar o pellet formado;
- 4) Ressuspende o pellet no vórtex;
- 5) Adicionar 100 µL de Cell Lysis Buffer, fechar o tubo e inverter até que todo conteúdo esteja azul (não demorar mais que 2 min. nesse passo);
- 6) Adicionar 350 µL de Neutralization Solution (que deve estar gelado) e inverter tubo até que o conteúdo esteja completamente amarelo;
- 7) Centrifugar em velocidade máxima por 10 minutos;
- 8) Pipetar aproximadamente 900 µL do sobrenadante na coluna (descartar o pellet e o tubo) e centrifugar por 30 s. em velocidade máxima, descartar o conteúdo do tubo coletor e reutilizar o mesmo;
- 9) Adicionar 200 µL de Endotoxin Removal Wash no centro da coluna e centrifugar em velocidade máxima por 30 s. Descartar o conteúdo do tubo coletor e reutilizar o mesmo;
- 10) Pipetar 400 µL de Column Wash Solution no centro da coluna, centrifugar em velocidade máxima por 30 s. Descartar o tubo coletor;
- 11) Colocar a mini coluna em um novo tubo de 1,5 mL e adicionar 30 µL de Elution Buffer no centro da coluna;
- 12) Incubar por 1 min. em temperatura ambiente e centrifugar em velocidade máxima por 1 min., descartar a mini coluna.

Quantificar e armazenar a -20°C.

ANEXO 10**SÍNTESE DE cDNA**

GoScript Reverse Transcriptase (Promega)

1º Reação

*Utilizando 643,5 ng de RNA extraído de fibroblastos de cada animal

RNA	X µL
Oligo DT	1 µL
Random Primer	1 µL
H ₂ O	X µL
Volume final	15 µL

70°C por 5 min.

4°C por 10 s.

2º Reação

Reagente	Condição	Volume
GoScript Buffer (5X)	1 X	6 µL
MgCl ₂ (25 mM)	5 mM	6 µL
Nucleotide (10 mM)	0,5 mM	1,5 µL
RNasin	-	0,5 µL
RT	-	1 µL
	Reação anterior	15 µL
	Volume final	30 µL

25°C por 5 min.

42°C por 1 h.

70°C por 15 min.

*Armazenar a -80°C.