



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL DE METILAÇÃO DO ÉXON 1 DO GENE *XIST* EM CÉLULAS DA  
LINHAGEM ESPERMATOGÊNICA DE BOVINOS**

**ROSANA CAMARGO NISHIMURA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASILIA/DF**  
**JUNHO DE 2012**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL DE METILAÇÃO DO ÉXON 1 DO GENE *XIST* EM CÉLULAS DA  
LINHAGEM ESPERMATOGÊNICA DE BOVINOS**

**ROSANA CAMARGO NISHIMURA**

**ORIENTADORA: MARGOT ALVES NUNES DODE**

**COORIENTADOR: MAURÍCIO MACHAIM FRANCO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 73/2012**

**BRASILIA/DF**  
**JUNHO DE 2012**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

NISHIMURA, R.C. **Perfil de metilação do éxon 1 do gene *XIST* em células da linhagem espermatogênica de bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 71p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pela autora à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. A autora e sua orientadora reservam para si os direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora ou da sua orientadora. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

NISHIMURA, Rosana Camargo. **Perfil de metilação do éxon 1 do gene *XIST* em células da linhagem espermatogênica de bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2012.

1. Reprogramação Epigenética. 2. Espermatogênese. 3. Bissulfito de Sódio. 4. Bovino. I. Dode, M.A.N. II. PhD.

CDD ou CDU  
Agris/FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL DE METILAÇÃO DO ÉXON 1 DO GENE *XIST* EM CÉLULAS DA  
LINHAGEM ESPERMATOGÊNICA DE BOVINOS**

**ROSANA CAMARGO NISHIMURA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS  
ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**MARGOT ALVES NUNES DODE, Ph.D (EMBRAPA CENARGEN)  
(ORIENTADORA)**

---

**SAMUEL REZENDE PAIVA, DOUTORADO (EMBRAPA CENARGEN)  
(EXAMINADOR INTERNO)**

---

**CARLOS FREDERICO MARTINS, DOUTORADO (EMBRAPA CERRADOS)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

**BRASÍLIA/DF, 25 DE JUNHO DE 2012**

Dedico aos meus pais, Shiro e Celina, e irmãs Dolores, Elisa e Carolina, que sempre me incentivaram a buscar o que eu queria, mesmo que isso me levasse para longe. Amo muito vocês!

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãs pelo apoio, sempre.

Ao Hjalmar Fugmann por ter sido tão presente todos os dias, mesmo de longe. Por ter me apoiado, incentivado e ajudado durante este tempo.

A minha orientadora Margot Alves Nunes Dode e meu coorientador Maurício Machaim Franco por terem acreditado em mim e estarem sempre dispostos a ensinar.

Aos colegas de Embrapa Grazieli Marinheiro Machado, Juliana Mayumi de Azevedo, que tiveram toda a paciência de me ensinar a trabalhar com FIV logo que cheguei. Ao José de Oliveira Carvalho Neto, que sempre se dispôs a responder as muitas dúvidas que eu tinha em um mesmo dia. A Allice Rodrigues Ferreira por me ensinar a trabalhar com tempo real. A Isabela, Juliana, José e Anelise, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Porque como dizia o meu avô, ninguém cresce sozinho! Sou realmente grata a vocês!

Aos amigos Isabela, Juliana, Ana Luiza, Allice, José Carvalho, José Spricigo, Heitor, Sidney, Andrei, Pablo, Otávio, Thiago, Valquíria, Karollyne, Anelise, com quem tive o prazer de conviver e dar boas risadas.

Agradeço em especial aos Doutores Carlos Frederico Martins e Samuel Rezende Paiva por fazerem parte da banca, pelas sugestões e correções que aprimoraram este trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Embrapa Cenargen pelo suporte para o desenvolvimento deste trabalho.

A UnB pelo curso oferecido.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. ESPERMATOGÊNESE	5
3.2. REPROGRAMAÇÃO EPIGENÉTICA	9
3.3. GENE <i>XIST</i> E INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO 2	35
1. RESUMO	36
2. ABSTRACT	38
3. INTRODUÇÃO	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO	42
4.2. EXTRAÇÃO DE DNA DOS ESPERMATOZÓIDES DA CABEÇA E CAUDA DO EPIDÍDIMO	48
4.3. EXTRAÇÃO DE DNA DOS ESPERMATÓCITOS E ESPERMÁTIDES ALONGADAS	49
4.4. TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO	49
4.5. AMPLIFICAÇÃO POR PCR E PURIFICAÇÃO	49
4.6. CLONAGEM DOS PRODUTOS DA PCR E SEQUENCIAMENTO	50
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1. RESULTADOS	52
5.2. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1.1. Representação das mudanças que ocorrem durante as divisões meióticas envolvendo os espermatócitos primários e secundários (adaptado de Knobil & Neill, 2006).	7
1.2. Representação do nível de metilação na reprogramação epigenética de camundongo, onde a linha vermelha representa os genes não imprinted do genoma materno, a linha azul, os genes não imprinted do genoma paterno, e a linha preta os genes <i>imprinted</i> (adaptado de Santos & Dean, 2004).	11
1.3. Representação das alterações nos nucleossomos durante a espermiogênese, onde há a troca das histonas canônicas por variantes, seguida de proteínas de transição, e por fim, por protaminas (Gaucher et al., 2010).	14
1.4. Localização da região XIC e de genes que fazem parte da regulação da transcrição de <i>XIST</i> (Tian et al., 2010).	16
1.5. Figura 1.5: Representação esquemática da inativação do cromossomo X (adaptado de Jeon et al., 2012).	20
<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
2.1. Testículos dentro do escroto prontos para o transporte até o laboratório.	42
2.2. Remoção do testículo de dentro da bolsa escrotal e túnica vaginal.	43
2.3. A e B: coleta de espermatozóides da cabeça do epidídimo. C e D: coleta de espermatozóides da cauda do epidídimo.	44
2.4. Parênquima testicular exposto para retirada de fragmentos.	45
2.5. Maceração dos fragmentos de parênquima testicular e filtragem em malha de 80 µm.	45
2.6. Gradiente de percoll 30-20% com suspensão celular após a centrifugação.	46
2.7. Representação da placa de petri preparada para a coleta de espermatócitos e espermátides alongadas.	47
2.8. A: Espermatócitos. B: Espermátides alongadas.	47
2.9. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. As bandas de 405 pb (seta) do gene <i>XIST</i> são produtos oriundos do	53

PCR interno.

- 2.10. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo, Os fragmentos de 605 pb confirmam a clonagem, A banda circulada em azul possui um tamanho em pb menor, mostrando que a clonagem não aconteceu. 53
- 2.11. Análise comparativa feita pelo software BiQ Analyser da sequência do gene *XIST* depositada no *GenBank*, e a uma sequência do presente experimento. As sequências somente em alaranjado indicam sítios CpGs em que as citosinas estavam metiladas e por isso, não foram substituídas por timinas; as sequências em alaranjado e roxo, representam os sítios CpGs não estão metilados, e portanto a citosina foi substituída por uma timina. A figura mostra os 17 sítios CpGs presentes na região genômica avaliada. 54
- 2.12. Análise da metilação no éxon 1 do gene *XIST*. Cada linha representa um clone. Os círculos brancos representam citosinas não metiladas, os pretos, citosinas metiladas, e os cinzas, onde não foi possível a identificação A: espermátócito, B: espermátide alongada, C: cabeça de epidídimo, D: cauda de epidídimo. 56
- 2.13. Porcentagem de metilação (média±erro padrão) entre os grupos espermátócitos (15,7%±14,54), espermátides alongadas (1,96%±1,96), espermatozóides de cabeça de (74,09%±6,78) e espermatozóides da cauda do epidídimo (45,09%±20,19). O grupo da cabeça de epidídimo apresentou maior metilação do que o grupo espermátócitos (P=0,00335) e o de espermátides alongadas (P=0,00752). 57
- 2.14. Porcentagem de metilação (média±erro padrão) entre os grupos espermátócitos/espermátides alongadas (11,11±9,67) e espermatozóides de cabeça/cauda de epidídimo (68,29±6,92). <sup>a,b</sup> P=0,00103. 58

**ÍNDICE DE TABELAS**

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
2.1. Descrição dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para DNA tratado com bissulfito de sódio.	50
2.2. Número de clones utilizados para a análise de metilação de espermátócitos e espermátides alongadas, por réplica.	55
2.3. Número de clones utilizados para a análise de metilação de espermatozóides da cabeça e da cauda do epidídimo, por réplica.	55

**ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**µl** – Microlitros  
**5mC** – 5-metilcitosina  
**ABP** – Proteína ligadora de andrógeno  
**ATR** – Proteína de reparo de DNA ataxia telangiectasia and Rad3 related  
**BRCA1** – Proteína supressora de tumor breast cancer 1  
**BSA** – Albumina sérica bovina  
**CGP** – Células germinativas primordiais  
**CTCF** – Fator ligante de CCCTC  
**DMR** – Região diferencialmente metilada  
**DNA** – Ácido desoxirribonucleico  
**DNMT1** – DNA metiltransferase 1  
**DNMT3A** – DNA metiltransferase 3A  
**DNMT3B** – DNA metiltransferase 3B  
**DNMT3L** – DNA metiltransferase 3L  
**dNTP** – Desoxirribonucleotídeo trifosfatado  
**dpc** – Dias pós coito  
**FSH** – Hormônio folículo estimulante  
**g** – Força gravitacional  
**GnRH** – Hormônio librador de ganadotrofina  
**H2A** – Histona H2A  
**H2AX** – Histona da família H2A, membro X  
**H2B** – Histona H2B  
**H3** – Histona H3  
**H3K27me3** – Trimetilação da lisina 27 da histona H3  
**H3K4** – Lisina 4 da histona H3  
**H3K9ac** – Acetilação da lisina 9 da histona H3  
**H3K9me3** – Trimetilação da lisina 9 da histona H3  
**H4** – Histona H4  
**HAT** – Enzima histona acetil transferase  
**HDAC** – Enzima histona desacetilase  
**ICX** – Inativação do cromossomo X  
**IMCS** – Inativação meiótica dos cromossomos sexuais  
**IPTG** – Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside  
**iRNA** – RNA de interferência  
**JPX** – Transcrito JPX, ativador de *XIST*  
**LB** – Meio Luria Bertani  
**LH** – Hormônio luteinizante  
**MCI** – Massa celular interna  
**MgCl<sub>2</sub>** – Cloreto de magnésio  
**ml** – Mililitros  
**mM** – Milimolar  
**NaCl** – Cloreto de sódio  
**NANOG** – NANOG homeobox  
**ng** – Nanogramas  
**OCT4** – Octamer-binding transcription factor 4  
**pb** – Pares de base  
**PBS** – Solução salina em tampão fosfato

**PCR** – Reação em cadeia da polimerase  
**PRC2** – Polycomb repressive complex 2  
**PVP** – Polyvinylpyrrolidona  
**REX1** – Zinc finger protein 42 homolog  
**RNA** – Ácido ribonucleico  
**RNF12** – Ring finger protein, LIM domain interacting  
**RPM** – Rotações por minuto  
**SDS** – Dodecil sulfato de sódio  
**SOX2** – Sex determining region Y – box2  
**TSIX** – Gene anti-sense ao *XIST*  
**U** – Unidades  
**Xa** – Cromossomo X ativo  
**X-Gal** - 5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside  
**Xi** – Cromossomo X inativo  
**XIC** – Centro de inativação do cromossomo X  
**XIST** – Transcrito específico do X  
**Xp** – Cromossomo X paterno  
 **$\gamma$ H2AX** – Histona H2AX fosforilada

## RESUMO

### PERFIL DE METILAÇÃO DO ÉXON 1 DO GENE *XIST* EM CÉLULAS DA LINHAGEM ESPERMATOGÊNICA DE BOVINOS

Rosana Camargo Nishimura<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB, DF, <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Embriões de mamíferos sofrem duas ondas de reprogramação, uma no zigoto, onde os genomas maternos e paternos são desmetilados e em seguida metilados *de novo*, e outra nas células germinativas primordiais. Acredita-se que a metilação *de novo* nas células germinativas masculinas esteja estabelecida ainda antes do nascimento, no entanto, como e quando esse processo ocorre em bovinos ainda não foi estabelecido. Sendo assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar se há reprogramação epigenética durante a espermatogênese através da avaliação do perfil de metilação da região do éxon 1 do gene *XIST* em diferentes células espermáticas. Foram utilizados espermátócitos, espermátides alongadas e espermatozóides da cabeça e cauda do epidídimo coletados de testículos obtidos em abatedouro. As células coletadas tiveram o seu DNA extraído e em seguida tratado com bissulfato de sódio. O DNA tratado foi amplificado através de PCR *nested*, e o produto amplificado foi inserido em um vetor e clonado em bactérias. O DNA plasmidial foi extraído e sequenciado. As sequências do experimento foram comparadas com a sequência do gene

*XIST* depositada no *GenBank*, e aquelas que apresentaram taxa de conversão do bissulfito de sódio  $\geq 95\%$  e homologia  $\geq 97\%$  com a sequência do *GenBank* foram utilizadas. Para a comparação do nível de metilação entre os grupos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com nível de significância de  $P < 0,05$ . O grupo dos espermatócitos, espermátides alongadas, espermatozóides de cauda e cabeça de epidídimo apresentaram  $15,70\% \pm 14,54$ ,  $1,96\% \pm 1,96$ ,  $74,09\% \pm 6,78$  e  $45,09\% \pm 20,19$  de metilação, respectivamente, sendo que o grupo da cabeça de epidídimo apresentou-se mais metilado do que os grupos espermatócitos e espermátides alongadas ( $P < 0,01$ ). Quando foram formados e comparados dois grupos, um com espermatócitos e espermátides alongadas, e outro com espermatozoides de cabeça e cauda de epidídimo, a análise mostrou haver diferença entre eles ( $P < 0,01$ ) com relação a percentagem de metilação. Os resultados sugerem que a reprogramação epigenética em bovinos ainda está ocorrendo durante a formação do espermatozóide.

Palavras chave: 1. Reprogramação Epigenética. 2. Espermatogênese. 3. Bissulfito de Sódio. 4. Bovino.

## ABSTRACT

### METILATION PROFILE OF *XIST* GENE EXON 1 IN BOVINE SPERMATOGENIC CELLS

Rosana Camargo Nishimura<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine – UnB, DF, <sup>2</sup>Embrapa Genetic  
Resources and Biotechnology

Mammalian embryos undergo two waves of genome reprogramming, the first in the zygote, when paternal and maternal genomes are demethylated and, just after, re-methylated, and the second in the primordial germ cells. It is believed that re-methylation is reestablished in male germ cells before birth, however, it is not clear when and how this process occurs in bovine. Thus, this work aimed to verify if there is epigenetic reprogramming during spermatogenesis through the evaluation of the methylation profile of *XIST* gene exon 1 in different spermatogenic cells. Spermatocytes, elongated spermatids and spermatozoa from epididymis head and tail were collected from bovine testes obtained from a slaughterhouse. The collected cells had their DNA extracted and treated with bisulfite. The treated DNA was amplified through nested PCR, and the product was inserted on a vector and cloned in bacteria. The plasmidial DNA was extracted and sequenced. The sequences of the experiment were compared with the sequence of gene *XIST* from the *GenBank* and those that presented bisulfite conversion rate of  $\geq 95\%$  and homology of  $\geq 97\%$  with the sequence from *GenBank* were utilized. To compare the methylation level between the groups Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used, with significance level of  $P < 0.05$ . The spermatocytes,



elongated spermatids and spermatozoa from epididymis head and tail groups presented  $15.70\% \pm 14.54$ ,  $1.96\% \pm 1.96$ ,  $74.09\% \pm 6.78$  and  $45.09\% \pm 20.19$  of methylation respectively. The epididymis head group was more methylated than spermatocytes and elongated spermatids groups ( $P < 0.01$ ). When arranged in two groups, one with spermatocytes and elongated spermatids, and another with epididymids spermatozoa, and compared, it was observed that the methylation level was different ( $P < 0.01$ ) between them. These results suggest that epigenetic reprogramming is still occurring during spermatozoa formation.

Keywords: 1. Epigenetic Reprogramming. 2. Spermatogenesis. 3. Bisulfite. 4. Cattle.

## **CAPÍTULO 1**

## 1. INTRODUÇÃO

A epigenética é a uma área da genética relativamente recente, e tem como alvo os mecanismos de regulação gênica não baseados na sequência primária do DNA e que são herdáveis (Reik, 2007). Os mecanismos epigenéticos participam da formação de eucromatina e heterocromatina, bem como no silenciamento de genes e até mesmo cromossomo (Wutz, 2011).

Durante o desenvolvimento inicial do embrião, o genoma sofre duas grandes reprogramações. Uma que acontece logo após a fecundação, onde os genomas paterno e materno são desprogramados e logo em seguida programados novamente (Oswald et al., 2000; Wossidlo et al., 2010), permitindo a formação de células totipotentes, que darão origem à todos os outros tipos celulares do indivíduo em formação (Surani et al., 2007). A outra reprogramação acontece nas células germinativas primordiais, que darão origem a linhagem germinativa (Sasaki & Matsui, 2008; Seki et al., 2005). Neste momento, as marcas de genes *imprinted* e não *imprinted* são retiradas e substituídas por outras, de acordo com o sexo do embrião (Hajkova, 2011).

Atualmente sabe-se que as marcas epigenéticas são passíveis de alterações causadas por influência do ambiente, diferentemente da sequência contida no DNA (Whitelaw & Whitelaw, 2008). Sabe-se que a exposição a alguns tipos de substância, a dieta, aplicação de hormônios, podem alterar o padrão epigenético, e em alguns casos levar ao surgimento de câncer (Weidman et al., 2007) e infertilidade (Rajender et al., 2011). Acreditava-se que esses “erros” no epigenoma não fossem transmitidos às gerações seguintes, já que, ao passar pelos ciclos de reprogramação, essas anormalidades poderiam ser corrigidas. Contudo, existem relatos demonstrando que essas alterações podem sim ser transmitidas e ainda persistirem por pelo menos três gerações seguintes (Anway et al., 2005).

Durante o momento da reprogramação o genoma está mais suscetível as influências ambientais, já que naturalmente esse é um período em que marcas estão sendo retiradas e adicionadas. Portanto, é muito importante que nessa fase se tenha as condições mais adequadas para que a reprogramação ocorra corretamente (Lin et al., 2008; Shen et al., 2012).

As informações a respeito da reprogramação nas células germinativas são basicamente oriundas de estudos em camundongos. Dados da literatura afirmam que o início e o final da reprogramação em machos se dão ainda durante a vida fetal e, portanto, ao nascer esse processo já estaria pronto (Reik et al., 2001; Faulk & Dolinoy, 2011). No entanto, estudos com camundongos (Oakes et al., 2007) e humanos (Marques et al., 2011) demonstraram que alguns genes teriam uma reprogramação mais tardia, acontecendo somente após a puberdade, durante a espermatogênese.

O fato de ainda haver reprogramação durante a espermatogênese sugere que a maior suscetibilidade à alterações epigenéticas das células espermáticas, que ocorreria, principalmente durante a vida fetal, passa também a ocorrer continuamente após a puberdade. Isso, além de aumentar as possibilidades de ocorrência de alterações, cria a possibilidade de manipular fatores ambientais para alterar o fenótipo das gerações futuras. Portanto, esse tipo de informação é importante não só como conhecimento básico, mas também por possibilitar o desenvolvimento de ferramentas, tais como o uso de dietas específicas, que possam contribuir para que a reprogramação ocorra de maneira correta. Entretanto, para que esse conhecimento possa ser utilizado é necessário saber em que momento o padrão epigenético é estabelecido. Apesar de já estudado em algumas espécies, até o momento nenhum relato foi encontrado sobre esse evento em espermatozóides da espécie bovina, que tem uma grande importância econômica para o país.

Sendo assim, este trabalho buscou verificar se assim como em camundongos e humanos, a reprogramação também acontece em bovinos adultos. Para isso foi feita a avaliação do perfil de metilação do gene *XIST* durante a espermatogênese, usando diferentes células espermáticas.

## **2. OBJETIVO**

Verificar se há reprogramação epigenética durante a espermatogênese através da avaliação do perfil de metilação da região do éxon 1 do gene *XIST* em espermatócitos, espermátides alongadas e espermatozóides de cabeça e cauda de epidídimo de bovinos.

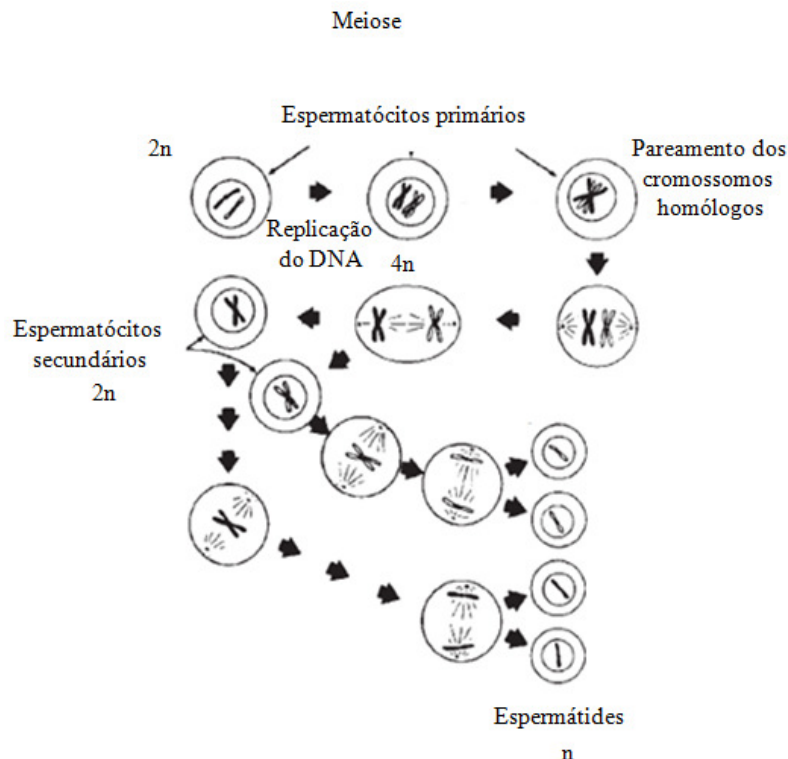
### 3. REVISÃO BIBLIGRÁFICA

#### 3.1. Espermatogênese

A espermatogênese compreende o processo de transformação das células germinativas primordiais (CGP), pouco diferenciadas, em espermatozóides, células altamente especializadas e haplóides. Esse processo começa durante o desenvolvimento inicial do embrião, com a formação das células germinativas primordiais no epitélio do endoderma dorsal do saco vitelínico, na região próxima ao alantóide ainda em desenvolvimento. Elas se deslocam até as cristas genitais, e durante esta migração há uma intensa proliferação mitótica, aumentando consideravelmente o número de células. Após a chegada nas cristas genitais as CGP passam a ser chamadas gônias (ovogônia, no caso das fêmeas, e pré-espermatogônias ou gonócitos, no caso dos machos). Enquanto a gônada ainda está indiferenciada, é composta por células mesenquimais, germinativas, células derivadas dos mesonefros e células originadas do epitélio celômico. No momento da diferenciação sexual do macho, cordões sexuais primários começam a se desenvolver da parte central para a periferia do testículo. Estes cordões continuam se proliferando e penetram na medula formando os cordões seminíferos, que contem espermatogônias e células somáticas (células de Sertoli). O crescimento dos testículos a partir deste momento é dependente da proliferação das células que já estão presentes na gônada. A diferenciação morfológica dos testículos é acompanhada por um aumento rápido da capacidade de síntese de esteróides, particularmente a testosterona (Austin & Short, 1993).

Os gonócitos, após o povoamento da crista genital, permanecem inativos no centro dos cordões seminíferos (que formarão os túbulos seminíferos) até um pouco antes da

puberdade. Neste período, eles migram por entre as células de Sertoli até alcançar o tecido limite do túbulo e, então inicia-se uma nova multiplicação mitótica. Uma vez que essas divisões se reiniciam, os gonócitos passam a ser chamados espermatogônias. Estas são classificadas em tipo A, intermediárias e B, sendo que as células A ainda são subdivididas em A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub>. As células A<sub>0</sub> fazem mitose com duas finalidades, uma para formar novas A<sub>0</sub>, e outra para dar continuidade as divisões sincronizadas de A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> e A<sub>4</sub>, intermediárias e B (Austin & Short, 1993). Pode-se dizer que o tipo intermediário é a primeira célula comprometida, que irá seguir a diferenciação até espermatozóide (Gilbert, 2003). Em bovinos é possível a identificação de espermatogônias A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, intermediárias, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> (Barth & Oko, 1989). Logo após a última divisão mitótica da espermatogônia B, suas células filhas continuam unidas por pontes citoplasmáticas, são tetraplóides e chamadas de espermatócitos primários. Estas entrarão em meiose (Figura 1.1), e após a primeira divisão meiótica são formados os espermatócitos secundários, que por sua vez sofrem uma segunda divisão, formando as espermátides. Estas são células haplóides, e continuam interligadas por pontes citoplasmáticas. À medida que as divisões vão acontecendo, as células se distanciam cada vez mais da membrana basal e se aproximam do lúmen do túbulo seminífero (Austin & Short, 1993).



**Figura 1.1.** Representação esquemática das mudanças que ocorrem durante as divisões meióticas envolvendo os espermatócitos primários e secundários (adaptado de Knobil & Neill, 2006).

Na primeira divisão meiótica, durante a prófase I, os cromossomos duplicados se alinham com seus homólogos e o *crossing over* acontece. Este é um evento que aumenta a variabilidade genética, pois recombina o material genético paterno e materno (Knobil & Neills, 2006). Também neste momento, especificamente no paquíteno, ocorre o silenciamento gênico dos cromossomos sexuais pela inativação meiótica dos cromossomos sexuais (IMCS). Isto acontece somente na gametogênese de animais que possuem os cromossomos sexuais diferentes e, portanto o pareamento não é completo (Turner, 2007). Neste processo, a parte do cromossomo X que não está pareada com o cromossomo Y é coberta por uma proteína supressora de tumor BRCA1 (*Breast cancer 1*), que recruta a quinase ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*) que, por sua vez, fosforila a histona H2AX na serina 139 ( $\gamma$ H2AX). O acúmulo da  $\gamma$ H2AX é um importante sinal para o desencadeamento da IMCS (Turner et al., 2004), cuja consequência é a inativação do cromossomo X. Estudos indicam que os cromossomos X e Y são transcricionalmente ativos durante as divisões mitóticas e em estágios iniciais da meiose, mas se tornam transcricionalmente reprimidos a partir do estágio



de paquíteno até o final da espermatogênese (Turner, 2007). Existe a hipótese de que a IMCS desempenhe uma função no estabelecimento do silenciamento do cromossomo X de herança paterna, processo onde o cromossomo X herdado do pai torna-se inativo em embriões em desenvolvimento inicial (Huynh & Lee, 2003).

Após as divisões meióticas, a espermátide redonda passa por uma intensa remodelação para dar origem ao espermatozóide. Esse processo é chamado de espermiogênese e pode ser dividido em quatro fases distintas: golgi, capuchão, acrossoma e maturação. A fase de golgi compreende o período da formação da espermátide redonda até a formação de um grânulo acrossômico esférico associado à membrana nuclear. Na fase de capuchão o acrossoma está sendo formado. Em seguida, na fase de acrossoma, a espermátide passa por transformações morfológicas maiores, como a condensação, alongamento e remodelamento. Na fase de maturação as espermátides completam a sua diferenciação e este é um período extremamente complexo, que inclui a formação final do flagelo, do colo, condensação e modelação do núcleo (Barth & Oko, 1989).

Algumas células da linhagem espermatogênica de bovinos foram descritas por Martins (2001) quando dissociadas do tecido testicular, tendo como parâmetro o diâmetro celular e a proporção núcleo-citoplasma. Os espermatócitos primários possuem diâmetro  $>22\mu\text{m}$ , já os secundários apresentam uma forma cilíndrica, diâmetro médio de  $16,4\mu\text{m}$  e proporção núcleo-citoplasma de 1:1,5. As espermátides redondas apresentam diâmetro de  $7,6-13,4\mu\text{m}$  e proporção núcleo-citoplasma de 1:2, enquanto as em alongamento tem seu tamanho entre  $7,5-12,5\mu\text{m}$ , relação núcleo-citoplasma de 1:3 e uma visível protuberância em um de seus lados. As espermátides alongadas por sua vez, apresentam semelhança com os espermatozóides, sendo que seu diâmetro varia entre  $5.5-6.7\mu\text{m}$ . Goto e colaboradores (1996) também caracterizaram o diâmetro de algumas dessas células, sendo que os espermatócitos primários são células que apresentam diâmetro  $>20\mu\text{m}$ , enquanto as espermátides redondas, menores, apresentam diâmetro variando de  $9-11\mu\text{m}$ , um núcleo redondo e presença do grânulo acrossômico próximo ao núcleo.

No que se refere a condensação do núcleo espermático, inicialmente o DNA está envolto em octâmeros de histonas formados por duas moléculas de H2A, H2B H3 e H4. Estas proteínas são trocadas por histonas variantes, específicas de testículo. Em seguida, são trocadas novamente por proteínas de transição, e por fim, ocorre a troca por protaminas, fazendo com que a cromatina fique altamente compactada (Knobil & Neill, 2006).

Por fim, os espermatozóides formados são liberados na luz dos túbulos seminíferos (espermição) e são levados para fora do testículo através de movimentos de

cílios e contrações das paredes da rete-testis e dos ductos eferentes, chegando ao epidídimo. Este é um ducto único, longo e enovelado, que pode ser morfológicamente dividido em três partes: cabeça, corpo e cauda, embora não existam limites definidos entre as partes (Austin & Short, 1993). Durante a passagem dos espermatozóides pelo epidídimo acontecem mudanças significativas na maturação da célula, como aquisição da motilidade progressiva e da capacidade fecundante, término da condensação do núcleo (através de pontes dissulfídicas), seguida da modificação da forma do acrossoma, ligação de proteínas, alterações na superfície da membrana plasmática, fagocitose de espermatozóides defeituosos, absorção de líquido e consequente concentração e armazenamento do espermatozóides (Barth & Oko 1989).

Todo o processo da espermatogênese é regulado pela ação de hormônios, através do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular, onde o hipotálamo libera o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que estimula a secreção dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) pela adenohipófise. O LH estimula as células de Leydig a produzir testosterona. O FSH age sobre as células de Sertoli, fazendo com que haja a produção de proteína ligadora de andrógeno (ABP), que se liga à testosterona, aumentando a concentração deste hormônio no interior dos túbulos seminíferos (Junqueira & Carneiro, 1999).

### **3.2. Reprogramação epigenética**

A epigenética se refere a mecanismos de regulação da transcrição gênica que não são baseados na alteração da sequência de DNA, e que são herdáveis. Além da metilação de DNA, também são mecanismos epigenéticos as modificações de histonas (metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ADP-ribosilação, nitrilação, glicosilação), RNAs pequenos não codantes, e proteínas não histonas que se ligam à cromatina (Li, 2002; Egger et al., 2004).

As células e tecidos de organismos multicelulares adquirem uma programação diferenciada da expressão de seus genes, fazendo com que, mesmo que tenham a mesma sequência de DNA, tornem-se morfológica e funcionalmente diferentes. Acredita-se que essa diferenciação celular se deva principalmente à regulação epigenética (Li, 2002).

As marcas epigenéticas se fixam quando as células se diferenciam, no entanto, algumas células passam por uma reprogramação, onde as marcas epigenéticas são retiradas e em seguida, novas marcas são estabelecidas (Surani, 2001).

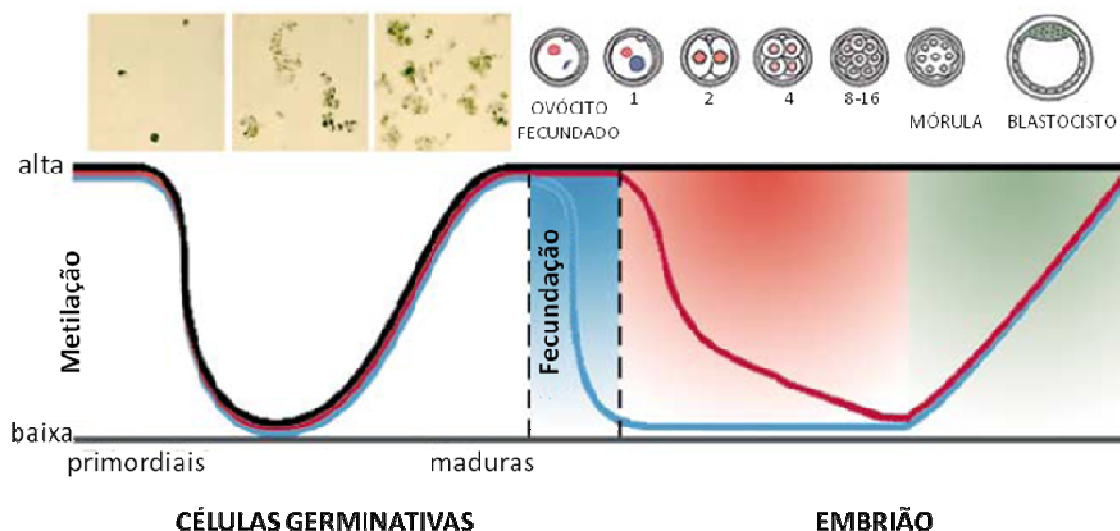
O conjunto das modificações pós-transcricionais nas extremidades N-terminais das histonas H2A, H2B, H3 e H4, é chamado de Código de Histonas. Estão relacionadas ao grau de compactação dos nucleossomos, podendo afetar a regulação gênica (Griffiths et al., 2009). A acetilação e a metilação (mono, di e trimetilação) de lisinas são as modificações mais estudadas, sendo que a histona acetilada corresponde à cromatina menos compactada, onde a possibilidade de haver transcrição é maior (Lewin, 2009). A acetilação de histonas se dá através de enzimas histona acetil transferase (HAT), e a retirada, pelas enzimas histona desacetilase (HDAC). A desacetilação juntamente com a metilação das histonas e do DNA está associada à repressão da atividade gênica (Li, 2002).

A metilação de DNA é um componente epigenético chave para estabelecer e manter o estado de expressão de um gene (Klose & Bird, 2006). Também possui um papel importante na regulação de genes durante o desenvolvimento e está envolvido em processos como o *imprinting* genômico, a inativação do cromossomo X, silenciamento de transposons e a estabilidade das estruturas de telômeros e centrômeros. A metilação é uma ligação bastante estável e se dá pela inserção de um grupo metil no carbono 5 de um dinucleotídeo CpG. Este processo é bastante importante na repressão transcricional de genes, e tem sido relacionada ao silenciamento gênico de “retrotransposons parasitas” (Yoder et al., 1997) e à manutenção da integridade estrutural de cromossomos e à prevenção de rearranjos dos mesmos. (Chen et al., 1998).

O DNA é metilado com a ação de enzimas, formando então a 5-metilcitosina (5mC). As mais conhecidas são a DNA metiltransferase (DNMT) 1, a DNMT3A e a DNMT3B. A DNMT1 é considerada uma enzima de manutenção de metilação, que mantém os padrões de metilação global durante a replicação. Sua ação ocorre preferencialmente em citosinas de sequências CpG hemimetiladas (Li et al., 1992). As DNMT3A e 3B metilam sequências CpG não metiladas, funcionando como *de novo* metiltransferases. Existe ainda a DNMT3L, que não possui atividade catalítica, mas recruta as DNMTs 3A e 3B reconhecendo os nucleossomos que possuem a lisina 4 da histona H3 (H3K4) não metilada (Ooi et al., 2007).

Em mamíferos, após a fecundação, as marcas dos gametas são retiradas e trocadas por outras que são específicas do desenvolvimento inicial de embriões, possibilitando o estado de totipotência (Surani et al., 2007). A cromatina do espermatozóide é

descondensada, as protaminas são substituídas por histonas presentes no ovócito e o ovócito por sua vez, finaliza a meiose. Os genomas maternos e paternos são reprogramados, sendo que o paterno sofre uma desmetilação mais rápida que o materno (Oswald et al., 2000). Esta diferença acontece porque o pró-núcleo masculino sofre uma desmetilação ativa (Wossidlo et al., 2010), sendo tal fenômeno já verificado em diferentes espécies de mamíferos tais como ratos, suínos e bovinos (revisto por Santos & Dean, 2004). Já o pró-núcleo feminino é desmetilado passivamente, onde a ausência da DNMT1 no núcleo faz com que os níveis de metilação diminuam a cada replicação (Rougier et al., 1998; Bestor, 2000). Embora a metilação global do genoma diminua nesse período, algumas regiões “escapam” da desmetilação, como, por exemplo, as regiões diferencialmente metiladas (DMRs) de genes *imprinted* (Reik & Walter 2001) (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Representação do nível de metilação na reprogramação epigenética de camundongo, onde a linha vermelha representa os genes não *imprinted* do genoma materno, a linha azul, os genes não *imprinted* do genoma paterno, e a linha preta os genes *imprinted* (adaptado de Santos & Dean, 2004).

Após o período de desmetilação, inicia-se a metilação *de novo*, onde duas linhagens celulares distintas terão origem. São formados a massa celular interna (MCI), que dará origem a todos os tecidos do indivíduo adulto, e o trofoblasto, que dará origem aos tecidos extraembrionários. O nível de metilação entre essas linhagens é diferente, sendo que a MCI é hipermetilada em relação aos tecidos extraembrionários e placenta (Dean et al., 2001; Santos et al., 2002), indicando a importância da metilação na diferenciação das linhagens

celulares (Santos et al., 2002). Em camundongos, a metilação *de novo* acontece no estágio de blastocisto (Yang et al., 2007), enquanto em bovinos, este evento acontece no estágio de 8-16 células, juntamente com a ativação do genoma embrionário (Dean et al., 2001).

Dentre os vários tipos celulares derivados da MCI estão as CGPs. Nelas, a reprogramação do epigenoma também acontece. No momento em que as CGPs são especificadas, elas são epigeneticamente iguais as que estão à sua volta e terão um “destino somático” (Seki et al., 2005). Por isso possuem um estado epigenético estável, estão com o DNA altamente metilado, com um cromossomo X inativado (no caso de fêmeas), assim, devem ser desprogramadas e receber novas marcas, possibilitando a formação de gametas (Saitou et al., 2002). A linhagem de CGP inicia então uma sequência de eventos de desprogramação que terminará em um estado epigenético basal. Estes eventos acontecem durante e após a migração das células germinativas primordiais, havendo mudanças epigenéticas globais na organização da cromatina (Sasaki & Matsui, 2008). De acordo com Seki e colaboradores (2005), a perda global de metilação se inicia na migração das CGPs; no entanto, Popp e colaboradores (2010) afirmam que a maior parte dela acontece depois da colonização das gônadas e afeta entre 80% e 90% do genoma. O processo inclui a perda de marcas epigenéticas que controlam a expressão de genes somáticos e também de genes *imprinted*.

Uma das consequências desta reprogramação é a ativação do cromossomo X das fêmeas que até então estava inativo (Hayashi & Surani, 2009). Além da metilação de DNA, também acontecem alterações nas marcas das histonas, como a perda da dimetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me2) e o aumento da trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) (Hajkova et al., 2008 ; Seki et al., 2005). Embora a H3K9me2 e a H3K27me3 sejam marcas associadas à repressão transcricional, o aumento global da H3K27me3 e a diminuição da H3K9me2 estabelece uma cromatina nas CGP semelhante à encontrada em células tronco embrionárias (Surani et al., 2007).

Após atingir o estado epigenético basal, os padrões de metilação do DNA são restabelecidos de forma progressiva nas células germinativas. O momento exato e a extensão ainda não são conhecidos, mas sabe-se que a metilação *de novo* é um evento importante para a meiose. Por exemplo, caso os retrotransposons não sejam metilados *de novo* nas CGP (de embriões machos ou fêmeas) e sejam transcritos, a meiose é afetada e o alinhamento dos cromossomos homólogos ocorre de forma incorreta (Bourc'his & Bestor, 2004; De La Fuente et al., 2006; Sasaki & Matsui, 2008). Modificações nas histonas, como a metilação das lisinas 4 e 9 da histona H3 também são importantes para que a meiose progrida, tendo também

influência no pareamento dos cromossomos e a quebra do DNA para que ocorra o *crossing over* durante a prófase I (Sasaki & Matsui 2008). Além da metilação *de novo* ser importante para a meiose, ela estabelece os padrões epigenéticos para que as CGP tornem-se células gaméticas e tenham as marcas *imprinted* necessárias que correspondam ao novo indivíduo.

Em fetos de camundongos machos, após a diferenciação das CGPs em pré-espermatogônias, as células param de se dividir por mitose, e restabelecem o padrão de metilação, sendo que neste momento também são restabelecidas as marcas *imprinted* paternas (Reik et al., 2001; Kota & Feil, 2010). Em fêmeas, as CGPs se diferenciam em ovogônias (Sadeu et al., 2006), e iniciam a meiose, sendo então denominados ovócitos primários. Estes ficam retidos na prófase I da meiose, permanecendo neste estado até pouco antes da ovulação (Wang & Sun, 2007). O nível de metilação só será restabelecido durante o crescimento do ovócito, já no indivíduo adulto (Kageyama et al., 2007), sendo o período de reprogramação muito maior na fêmea.

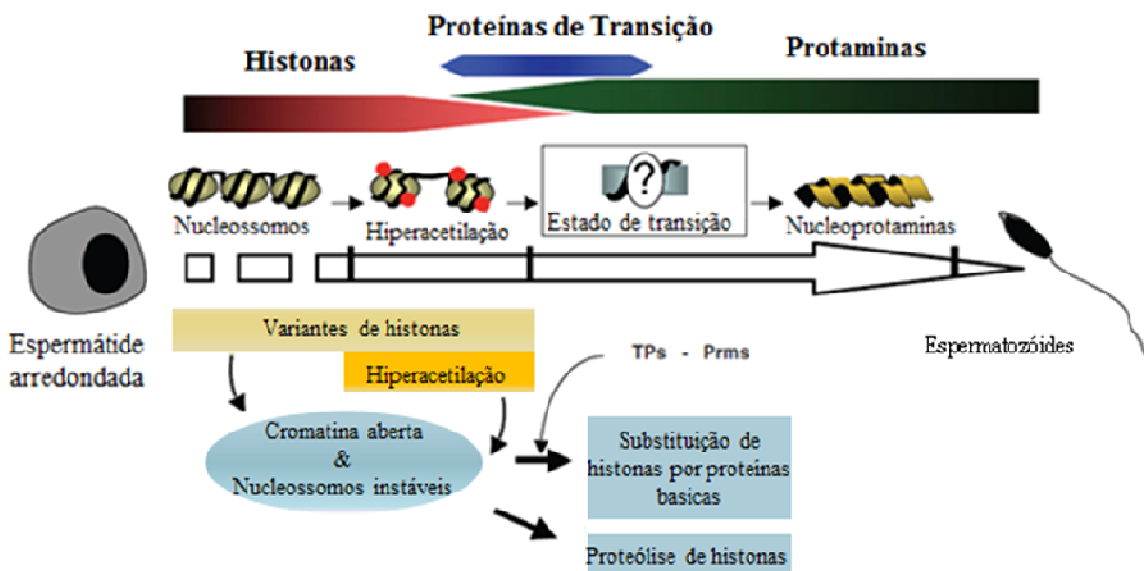
No macho a gametogênese fica então retida, até a chegada da puberdade, onde através de estímulos hormonais recomeça a proliferação mitótica, seguida da meiose. Após o término da meiose, as espermátides passam por uma intensa reorganização. Um dos processos mais significativos é a troca de grande quantidade de histonas por proteínas de transição, e, em seguida, por protaminas. Algumas regiões mantêm as histonas e acredita-se que estas regiões sejam importantes para o início do desenvolvimento do embrião ou exercem alguma função no adulto (Hales et al., 2011).

Para que as histonas sejam substituídas, acredita-se que primeiramente elas sejam trocadas por variantes, fazendo com que o nucleossomo seja menos estável, seguido de uma hiperacetilação global das histonas e por fim, uma competição para a ligação no DNA com proteínas de transição e protaminas (Gaucher et al., 2010).

Células espermatogênicas meióticas e pós-meióticas trocam quase todas as histonas canônicas (H2A, H2B, H3 e H4) por variantes, sendo que estas, em muitas espécies, são expressas exclusivamente nas células germinativas masculinas (Gaucher et al., 2010). Mesmo quando as histonas somáticas são expressas em células espermatogênicas, elas podem se combinar com as variantes, como por exemplo, a H3.3 ou a H2A.Z, levando a uma instabilidade do nucleossomo (Jin et al., 2009). A histona H1t, específica dos testículos, também é menos eficiente na compactação da cromatina e possui menos afinidade pelo DNA do nucleossomo e DNA livre (Godde & Ura, 2009). De acordo com Gaucher e colaboradores (2010), é possível que a incorporação das variantes das histonas com a capacidade de abrir a

cromatina e formar nucleossomos instáveis esteja relacionada com a criação de locais preferenciais para a retirada das histonas.

A hiperacetilação de histonas foi observada em espermátides alongadas de várias espécies (Govin et al., 2004), e esta hiperacetilação acontece quando o DNA não está sendo replicado nem transcrito, e parece que também está ligada a substituição das histonas (Hazzouri et al., 2000) (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Representação das alterações nos nucleossomos durante a espermiogênese, onde há a troca das histonas canônicas por variantes, seguida de proteínas de transição, e por fim, por protaminas (adaptado de Gaucher et al., 2010).

### 3.3. Gene *XIST* e inativação do cromossomo X

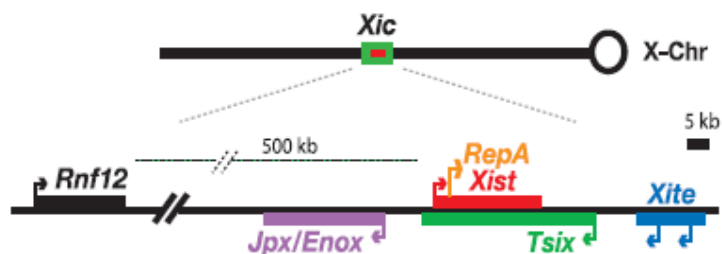
Em 1961, Mary Lyon sugeriu a hipótese de que como as fêmeas de mamíferos possuem dois cromossomos X, um deles deveria ser inativado para que houvesse uma compensação na dosagem dos genes ligados ao X de fêmeas. Isso porque os machos possuem apenas um cromossomo X e o dimorfismo dos cromossomos sexuais levaria a um desbalanço entre os sexos heterogaméticos e homogaméticos. Apesar de já terem se passado 50 anos desde a descoberta da inativação do cromossomo X (ICX) ainda se sabe pouco a respeito de seus mecanismos moleculares.

De acordo com Graves (1996) e Sharman (1971), mamíferos ancestrais teriam resolvido o problema de dosagem gênica inativando preferencialmente o X paterno ( $X_p$ ) em todas as células de fêmeas. Os mamíferos não placentários, como os marsupiais, possuem somente esta forma ancestral de compensação. Já os mamíferos placentários desenvolveram uma forma aleatória de inativação, onde ambos os cromossomos X, paterno e materno, tem chances iguais de serem inativados (Lyon, 1961).

A ICX é um evento epigenético, e é herdável ao longo das divisões celulares (Lucifero et al., 2004). Nos eucariotos, a inativação afeta aleatoriamente o cromossomo X de origem paterna ou materna durante o início do desenvolvimento, mantendo este padrão nas células filhas, portanto os indivíduos adultos são mosaicos, com expressão do cromossomo X paterno ou materno (Heard & Distèche, 2006).

O fenômeno do silenciamento do cromossomo X em fêmeas de mamíferos, tanto o *imprinted* quanto o aleatório, é controlado por uma região denominada centro de inativação do cromossomo X (XIC) (Figura 1.5). Este centro determina qual o cromossomo que será inativado, sendo que antes da inativação, a expressão de *XIST* (transcrito específico da inativação do X) pode ser detectada nos dois cromossomos, até que em um deles os transcritos se acumulam, dando início à inativação (Panning et al., 1997), e iniciando assim a transcrição monoalélica do *XIST*. Ao mesmo tempo, no outro cromossomo, inicia-se a transcrição do gene *TSIX*, anti-sense de *XIST*, inibindo a transcrição de *XIST*, e mantendo o cromossomo ativo (Casci, 2008). O RNA do gene *XIST* recobre o cromossomo que será inativado, em *cis*, dando início ao silenciamento (Penny et al., 1996).





**Figura 1.4:** Localização da região XIC e de genes que fazem parte da regulação da transcrição do gene *XIST* (Tian et al., 2010).

Em camundongos, a ICX *imprinted* se estabelece no embrião inicial e é mantida na placenta, onde o Xp é preferencialmente inativado (Huynh & Lee, 2003; Okamoto et al., 2004). Já na MCI, o Xp é reativado (Okamoto et al., 2004), para em seguida acontecer a inativação aleatória. Existem duas teorias para a ICX *imprinted*, a hipótese da pré-inativação e a hipótese da inativação *de novo*. Na hipótese da pré-inativação o Xp já estaria pré-inativado, como consequência da IMCS durante a espermatogênese (Huynh & Lee, 2003). É possível que a IMCS seja responsável pela herança da informação epigenética através do espermatozóide, já que modificações das histonas que acontecem durante a IMCS são mantidas (Hammoud et al., 2009). Na hipótese da inativação *de novo*, o Xp estaria inativo no momento da fecundação e, logo após seria rapidamente reativado, permanecendo assim até o estágio de 4 células onde haveria então uma inativação *de novo* (Okamoto et al., 2004). O processo de inativação para camundongos e bovinos é explicado na literatura por diferentes modelos (Huynh & Lee, 2003; Okamoto et al., 2004; Ferreira et al., 2010). De acordo com Ferreira e colaboradores (2010), em embriões bovinos produzidos *in vitro* os dois cromossomos X podem estar ativos nos estágios de 4, 8 e 16 células, e o Xp é inativado em mórula, sendo reativado em blastocisto expandido, provavelmente momento em que se dá a inativação aleatória.

A ICX se divide em duas fases, a primeira, em que o silenciamento gênico é estabelecido e a segunda, em que ocorre a manutenção, onde a expressão do gene *XIST* não é mais necessária (Figura 1.5). Antes do início da transcrição de *XIST*, os dois cromossomos X se pareiam (Xu et al., 2006). Fatores como CTCF (fator ligante de CCCTC) e OCT4 (*Octamer-binding transcription factor 4*) afetam o pareamento e também o número de cromossomos que serão inativados (Xu et al., 2007). Masui e colaboradores (2011) demonstraram que o pareamento é um evento breve e acontece antes do aumento da transcrição do *XIST* em um dos alelos. Em seguida, o nível de transcritos de *TSIX* diminui.

Existe ainda uma outra região dentro de XIC, a região de pareamento do X, que pode regular o pareamento dos cromossomos X (Sun et al., 2010).

Os fatores de pluripotência como OCT4, SOX2 (*Sex determining region Y – box2*) e NANOG (*Nanog homeobox*) se ligam no primeiro íntron do *XIST*, reprimindo a sua expressão (Donahoe et al., 2009). Além disso, estes fatores também controlam os níveis de *XIST* ativando o *TSIX* (Navarro et al., 2010), sendo que *OCT4* e *REX1* (*Zinc finger protein 42 homolog*) se ligam ao *XITE*, que é um *enhancer* do *TSIX* (Donahoe et al., 2009). Existem evidências de que a transcrição de *TSIX*, juntamente com a ação inibitória dos fatores de pluripotência, coopera na manutenção da repressão de gene *XIST* em células tronco não diferenciadas (Nesterova et al., 2011).

O gene *TSIX*, assim como o *XIST*, transcreve um RNA longo não codante. Ele reprime em *cis* a transcrição do *XIST*, recobrando toda a sua unidade (Lee et al., 1999). A transcrição de *TSIX*, assim como a de *XIST*, é verificada em ambos os cromossomos X, e quando se dá o início da inativação, sua expressão passa a ser monoalélica, sendo também e está associada à repressão de *XIST* no cromossomo ativo (Lee et al., 1999). Foi demonstrado que o *TSIX* inibe a expressão de *XIST* no X ativo (Xa) bloqueando a ligação do complexo RepA-PCR2, estabelecendo uma “cromatina repressiva” na região 5’ do *XIST*, estimulando a atividade da DNMT3a no promotor do *XIST* (Zhao et al., 2008; Sado et al., 2005). Esta região do promotor possui uma DMR (região diferencialmente metilada), que está localizada no éxon 1, e auxilia no controle da expressão do *XIST*. A hipometilação desta região está correlacionada à inativação do cromossomo X, enquanto a hipermetilação corresponde ao padrão que é encontrado no cromossomo ativo (Goto & Monk, 1998). A expressão do *TSIX* não se mantém durante toda a inativação, e a repressão do *XIST* no Xa é mantida com outros mecanismos, incluindo a metilação do DNA (Barr et al., 2007). Além de recrutar a metilação do DNA, o *TSIX* também está relacionado a modificações de histona como a H3K27me3 (trimetilação da lisina 27 da histona H3) próximo a região promotora do *XIST* (Nesterova et al., 2008). Ainda, o *TSIX* também pode estar envolvido na supressão do *XIST* através do recrutamento de iRNA (RNA de interferência). O transcrito de *TSIX* é complementar ao de *XIST*, e Ogawa e colaboradores (2008) demonstraram que *XIST* e *TSIX* formam um RNA dupla fita que é processado em pequenos RNAs.

A região Repeat-A está dentro do gene *XIST*, na extremidade 5’ do gene. Esta região é essencial para o acúmulo de *XIST* produzindo um transcrito não codante chamado RepA (Zhao et al 2008). Acredita-se que os transcritos RepA aumentam a expressão de *XIST* através do recrutamento do PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) e que o RNA *TSIX*

estaria competindo com o RNA RepA pelo recrutamento de PRC2, impedindo a ativação de *XIST* (Zhao et al., 2008).

Existem ainda outros genes envolvidos na regulação da expressão de *XIST*. O gene *JPX* é um regulador positivo de *XIST*. Ele também produz um transcrito longo e não codante, mas a sua ação se dá em *trans*. Tian e colaboradores (2010) sugerem que os RNAs de *JPX* e *TSIX* possuem atividades antagônicas, com os dois RNAs agindo em vias paralelas na regulação de *XIST*. O RNF12 (*ring finger protein, LIM domain interacting*) também é um regulador positivo do *XIST*. Este é um gene ligado ao X, que codifica a proteína E3 ubiquitina ligase (Jonkers et al., 2009), e está fora da região considerada XIC. Jonkers e colaboradores (2009) verificaram que o nível da proteína Rnf12 aumenta no início da ICX. A superexpressão de Rnf12 induz à expressão ectópica de *XIST* em células XY, mas a ativação de *XIST* em células XX não requer Rnf12 (Jonkers et al., 2009). Ainda são necessários mais estudos para a compreensão completa da função do gene RNF12 na ICX. Existe ainda o fator de transcrição YY1 (Ying Yang 1), que ajuda o RNA *XIST* a se ligar no Xi (Jeon & Lee, 2011).

Após todos os eventos que levam ao recobrimento do cromossomo X pelo RNA *XIST*, a inativação torna-se estável e não mais dependente de *XIST*, no entanto, esta parece ser uma molécula com várias funções, regulando não só o início do silenciamento gênico, mas também a reorganização do cromossomo X, e possivelmente o recrutamento de complexos modificadores da cromatina necessários para estabelecer marcas epigenéticas da inativação (Chow & Heard, 2009).

Após o recobrimento do Xi pelo RNA *XIST*, várias modificações de histona associadas à eucromatina, como a H3K9ac (acetilação da lisina 9 da histona H3), H3K4me2 (dimetilação da lisina 4 da histona H3), H3K4me3 (trimetilação da lisina 4 da histona H3), são perdidas, e marcas repressivas como a H3K27me3 (trimetilação da lisina 27 da histona H3), H3K9me2 (dimetilação da lisina 9 da histona H3), H4K20me1 (metilação da lisina 20 da histona H4) e H2Aub1 (ubiquitinação), são adquiridas (Heard et al., 2001), sendo que RepA associado com PRC2 direcionar a H3K27me3 no Xi (Zhao et al., 2008). Além dessas modificações de histona, o DNA do Xi é hipermetilado (Chan et al., 2011), há a incorporação da histona macro H2A (macroH2A), e o recrutamento de proteínas como SMCHD1 (*structural-maintenance of chromosomes hinge domain containing 1*), ASH2L (*ash2 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)* - proteína do grupo Trithorax), ATRX (*alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*) e hnRNP (*heterogeneous nuclear*

*ribonucleoprotein U*– fator de remodelamento de cromatina) (Escamilla-Del-Arenal et al., 2011), garantindo que o silenciamento do Xi seja mantido.

A metilação é um evento que acontece tardiamente no processo de inativação do cromossomo X, e parece estar mais relacionado à manutenção do estado inativo do que ao início do processo (Singer-Sam et al., 1990). Embora os eventos iniciais da ICX *imprinted* e aleatória sejam similares, a metilação do DNA parece ser específica da ICX aleatória, sendo que a ausência da metilação de DNA no Xi paterno *imprinted* provavelmente explique a facilidade de reversão do estado inativo na MCI (Okamoto et al., 2004) e ao mesmo tempo a grande dependência das proteínas Polcomb na ICX *imprinted* para a manutenção do silenciamento (Wang et al., 2001).

Os mecanismos exatos de como a metilação de DNA é recrutada para diferentes genes no Xi não estão claros, mas sabe-se que esta marca é de extrema importância para a manutenção do estado inativo em células somáticas (Escamilla-Del-Arenal et al., 2011), e alterações nas DNMTs levam a uma instabilidade do Xi. A DNMT1, por exemplo, é necessária para a manutenção estável da ICX durante o desenvolvimento embrionário, já que a sua mutação em camundongos fez com que a ICX não se mantivesse e tendo como consequência a morte do embrião (Sado et al., 2000), além disso, em humanos, foi relatada a instabilidade do silenciamento do cromossomo X em portadores da síndrome ICF (*immuno deficiency centromeric instability facial anomalies*), causada por um defeito na DNMT3B (Hansen et al., 2000).

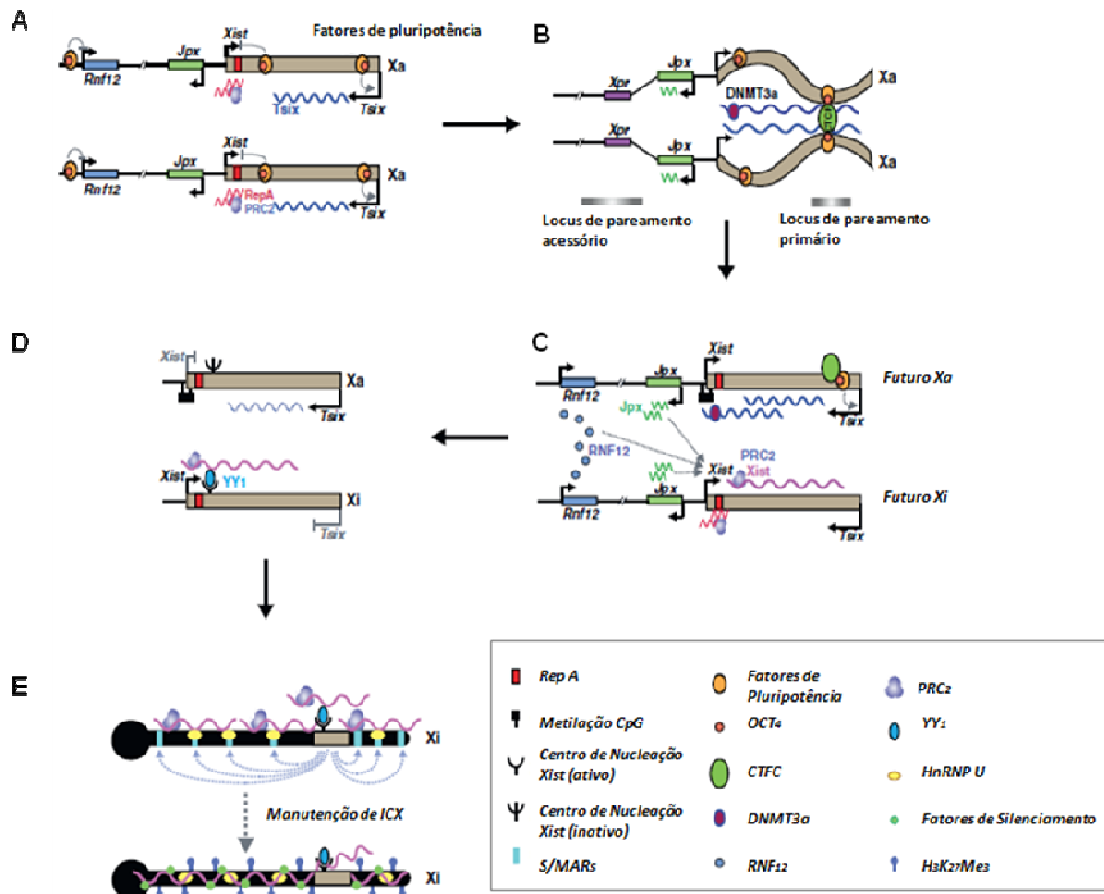


Figura 1.5: Representação esquemática da inativação do cromossomo X. **A**: em células indiferenciadas, *OCT4* e outros fatores de pluripotência reprimem a expressão de *XIST* e do ativador do *XIST* *RNF12*. Os fatores de pluripotência também ativam diretamente a expressão de *TSIX*, sendo que o *TSIX* é expresso em ambos os cromossomos, impedindo a ativação do *XIST* em *cis*. **B**: no início da diferenciação, os cromossomos X se pareiam através da interação entre *OCT4* e *CTCF*, resultando em uma distribuição desigual dos fatores de pluripotência de transcrição entre os dois cromossomos. Como resultado disso, há uma ativação do *XIST* no futuro Xi e ao mesmo tempo reprime o *TSIX* do mesmo cromossomo. *TSIX* recruta a *DNMT3A*, que metila o promotor do *XIST* e o silencia no Xa. **C**: o RNA *RepA* é expresso no futuro Xi e recruta o complexo *PRC2*. A expressão de *JPX* e *RNF12* é aumentada em ambos os cromossomos. A combinação destes três eventos leva a ativação da expressão de *XIST*. O *XIST* por sua vez recruta *PRC2* para o Xi. **D**: *YY1* liga o RNA *XIST* no Xi e media o “espalhamento” em *cis* ao longo do Xi. **E**: *XIST* ligado no Xi se espalha por meio das regiões *hnRNP* e *S/MAR*. Por fim, *XIST* recobre todo o Xi e recruta vários fatores de silenciamento para manter o estado reprimido do Xi (adaptado de Jeon et al., 2012)

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANWAY, M.D.; CUPP, A.S.; UZUMCU, M.; SKINNER, M.K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science**, v.308, p.1466-1469, 2005.

AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. Reproduction in mammals: germ cells and fertilization. Segunda edição. Grã Bretanha: Editora da Universidade de Cambridge. Volume 1, 1993.

BARR, H.; HERMANN, A.; BERGER, J.; TSAI, H.H.; ADIE, K.; PROKHORTCHOUK, A.; HENDRICH, B.; BIRD, A. Mbd2 contributes to DNA methylation-directed repression of Xist gene. **Molecular Cell Biology**, v.27, p.3750-3757, 2007.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Primeira edição. Estados Unidos. Editora da Universidade do Estado de Iowa. 1989.

BESTOR, T.H. The DNA methyltransferases of mammals. **Human Molecular Genetics**, v.9, p.2395-2402, 2000.

BOCK, C.; REITHER, S.; MIKESKA, T.; PAULSEN, M.; WALTER, J.; LENGAUER, T. BiQ Analyser: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfate sequencing. **Bioinformatics**, v.21, n.21, p.4067-4068, 2005.

BOURC'HIS, D.; BESTOR, T.H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. **Nature**, v.431, p96-99, 2004.

CASCI, T. Sensing double. **Nature Review Genetics**, v.9, p.2305, 2008.

CHAN, K.M.; ZHANG, H.; MALUREANU, L.; VAN DEURSEN, J.; ZHANG, Z. Diverse factors are involved in maintaining X chromosome inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, n.40, p.16699-16704, 2011.

CHEN, R.Z.; PETTERSSON, U.; BEARD, C.; JACKSON-GRUSBY, L.; JAENISCH, R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. **Nature**, v.395, p.89-93, 1998.

CHOW, J.; HEARD, E. Complexities of silencing a sex chromosome. **Current Opinion in Cell Biology**, v.21, p.359-366, 2009.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARCHENKO, V.; WALTER, J.; WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, p.13734-13738, 2001.

DE LA FUENTE, R.; BAUMANN, C.; FAN, T.; SCHMIDTMANN, A.; DOBRINSKI, I.; MUEGGE, K. Lsh is required for meiotic chromosome synapsis and retrotransposon silencing in female germ cells. **Nature Cell Biology**, v.8, p.1448-1454, 2006.

DONAHOE, M.E.; SILVA, S.S.; PINTER, S.F.; XU, U.; LEE, T.J. The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctf and also controls X-chromosome pairing and counting. **Nature**, 460: 128-132, 2009.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v.429, p.457-463, 2004.

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

FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything. The when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. **Epigenetics**, v.6, n.7, p.791-797, 2011.

FERREIRA, A.R.; MACHADO, G.M.; DIESEL, T.U.; CARVALHO, J.O.; RUMPF, R.; MELO, E.O.; DODE, M.A.N.; FRANCO, M.M. Allele-specific expression of X chromosome-linked gene MAO-A during pre-implantation development in bovine embryo. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.277, 2010.

GAUCHER, J.; REYNOIRD, N.; MONTELLIER, E.; BOUSSOUAR, F.; ROUSSEAUX, S.; KHOCHBIN, S. From meiosis to postmeiotic events: secrets of histone disappearance. **Federation of European Biochemical Societies Journal**, v.277, p.599-604, 2010.

GILBERT, S.F. *Biologia do Desenvolvimento*. Quinta edição. Ribeirão Preto. Editora Funpec. 2003.

GODDE, J.S.; URA, K. Dynamic alterations of linker histone variants during development. **International Journal of Developmental Biology**, v.53, p.215-224, 2009.

GOTO, K.; KINOSHITA, A.; NAKANISHI, Y.; OGAWA, K. Blastocyst formation following intracytoplasmic injection of in-vitro derived spermatids into bovine oocytes. **Human reproduction**, v.11, n.4, p.824-829, 1996.



GOTO, T.; MONK, K. Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.62, p.362-378, 1998.

GOVIN, J.; CARON, C.; LESTRAL, C.; ROUSSEAU, S.; KHOCHBIN, S. The role of histone in chromatin remodeling during mammalian spermiogenesis. **European Journal of Biochemistry**, v.271, p.3459-3469, 2004.

GRAVES, J.A. Mammals that break the rules: genetics of marsupials and monotremes. **Annual Reviews of Genetics**, v.30, p.233-260, 1996.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROL, S.B. Introdução à Genética, nona edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2009.

HAIKOVA P. Epigenetic reprogramming in the germline: towards the ground state of the epigenoma. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.366, p.2266-2273, 2011.

HAIKOVA, P.; ANCELIN, K.; WALRMANN, T.; LACOSTE, N.; LANGE, U.C.; CESARI, F.; LEE, C.; ALMOUZNI, G.; SCHNEIDER, R.; SURANI, M.A. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. **Nature**, v.452, p.877-881, 2008.

HAMMOUD, S.S.; NIX,D.A.; ZHANG, H.;PURWAR, J.; CARREL, D.T.; CAIRNS, B.R. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. **Nature**, v.40, p.473-478, 2009.

HANSEN, R.S.; STOGER, R.; WIJIMENGA, C.; STANEK, A. M.; CANFIELD T. K.; LUO, P.; MATARAZZO, M.R.; D'ESPOSITO, M.; FEIL, R.; GIMELLI, G.; WEEMAES, C. M.; LAIRD, C. D.; GARTLER, S. M. Escape from gene silencing in ICF syndrome: evidence for

advanced replication time as major determinant. **Human Molecular Genetics**, v.9, n.18, p.2575-2587, 2000.

HALES, B.F.; GRENIER, L.; LALANCETTE, C.; ROBAIRE, B.; Epigenetic programming: from gametes to blastocyst. **Clinical and Molecular Teratology**, v.91, p. 652-665, 2011.

HAYASHI, K.; SURANI, M.A. Resetting the epigenome beyond pluripotency in the germline. **Cell Stem cell**, v.4, p.493-498, 2009.

HAZZOURI, M.; PIVOT-PAJOT, C.; FAURE, A.K.; USSON, Y.; PELLETIER, R.; SELE, B.; KHOCHBIN, S.; ROUSSEAUX, S. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone deacetylases. **European Journal of Biochemistry**, v.79, p.950-960, 2000.

HEARD, E.; DISTECHE, C.M. Dosage compensation in mammals: fine tuning the expression of the X chromosome. **Genes & Development**, v.20, p.1848-1867, 2006.

HEARD E.; ROUGELLE, C.; ARNAUD, D.; AVNER, P.; ALLIS, C. D.; SPECTOR, D. L. Methylation of histone H3 at Lys-9 is an early mark on the X chromosome during X inactivation. **Cell**, v.107, p.727-738, 2001.

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

JIN, C.; ZANG, C.; WEI, G.; CUI, K.; PENG, W.; ZHAO, K.; FELSENFELD, G. H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark “nucleosome-free regions” of active promoters and other regulatory regions. **Nature Genetics**, v.41, p.491-495, 2009.

JEON, Y.; LEE, J.T. YY1 tethers Xist RNA to the inactive X nucleation center. **Cell**, v.146, p.119-133, 2011.

JEON, Y.; SARMA, K.; LEE, J.T. New and Xisting mechanisms of X chromosome inactivation. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.22, p.1-10, 2012.

JONKERS, I.; BARAKAT, T.S.; ACHAME, E.M.; MONKHORST, K.; KENTER, A.; RENTMEESTER, E.; GROSVELD, F.; GROOTEGOED, J.A.; GRIBNAU, J. RNF12 is an X-Encoded dose-dependent activator of the X chromosome inactivation. **Cell**, v.139, p.999-1011, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J.; *Histologia Básica*. Nona Edição. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 1999.

KAGEYAMA, S.; LIU, H.; KANEKO, N.; OOGA, M.; AOKI, F. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. **Reproduction**, v.133, p.85-94, 2007.

KLOSE, R.J.; BIRD, A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in Biochemical Sciences**, v.31, p.89-97, 2006.

Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Terceira edição. Estados Unidos. Editora Elsevier Academic Press Publications, 2006.

KOTA, S.K.; FEIL, R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. **Developmental Cell**, v.19, p.675-686, 2010.

LEE, J.T.; DAVIDOW, L.S.; WARSHAWSKY, D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation center. **Nature Genetics**, v.21, p.400-404, 1999.

LEWIN, B. Genes IX, Nona edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2009.

LI, E.; BESTOR, T.H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v.69, p.915-926, 1992.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.662-673, 2002.

LIN, L.; LI, Q.; ZHANG, L.; DAI, Y.; LI, L. Aberrant epigenetic changes and gene expression in cloned cattle dying around birth. **Developmental Biology**, v.8, n.14, p.1-19, 2008.

LUCIFERO, D.; CHAILLER, J.R.; TRALER, J.M. Potential significance of genomic *imprinting* defects of reproduction and assisted reproductive technology. **Human Reproduction Update**, v.10, p.3-18, 2004.

LYON, M.F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, v.190, p.372-373. 1961.

MARQUES, C.J.; PINHO, M.J.; CARVALHO, F.; BIÈCHE, I.; BARROS, A.; SOUSA, M. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. **Epigenetics**, v.6, n.11, p.1354-1361. 2011.

MARTINS, C.F. Avaliação do potencial de produção de embriões bovinos pela técnica de injeção intracitoplasmática de células espermáticas (intracytoplasmic sperm injection, ICSI). Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Campus de Botucatu. 2001.

MASUI, O.; BONNET, I.; LE BACCON, P.; BRITO, I.; POLLEX, T.; MURPHY, N.; HUPE, P.; BARILLOT, E.; BELMONT, A.S.; HEARD, E. Live-cell chromosome dynamics and outcome of X chromosome pairing events during ES cell differentiation. **Cell**, v.145, p.447-458, 2011.

NAVARRO, P.; OLDFIELD, A.; LEGOUPI, J.; FESTUCCIA, N.; DUBOIS, A.; ATTIA, M.; SCHOORLEMMER, J.; ROUGEULLE, C.; CHAMBERS, I.; AVNER, P. Molecular coupling of Tsix regulation and pluripotency. **Nature**, v.268, p.457-460, 2010.

NESTEROVA, T.B.; POPOVA, B.C.; COBB, B.S.; NORTON, S.; SENNER, C.E.; TANG, Y.A.; SPRUCE, T.; RODRIGUEZ, T.A.; SADO, T.; MERKENSCHLAGER, M.; BROCKDORFF, N. Dicer regulates Xist promoter methylation in ES cells indirectly through transcriptional control of Dnmt3a. **Epigenetics and Chromatin**, v.1, n.2, p.1-21, 2008.

NESTEROVA, T.B.; SENNER, C.E.; SCHNEIDER, J.; ALCAYNA-STEVENSON, T.; TATTERMUSCH, A.; HEMBERGER, M.; BROCKDORFF, N. Pluripotency factor binding and Tsix expression act synergistically to repress XIST in undifferentiated embryonic stem cells. **Epigenetics & Chromatin**, v.4:17, 2011.

OAKES, C.C.; LA SALLE, S.; SMIRAGLIA, D.J.; ROBAIRE, B.; TRASLER, J.M. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis germ cells. **Developmental Biology**, v.307, p.368-379, 2007.

OGAWA, Y.; SUN, B.K.; LEE, J.T. Intersection of the RNA interference and X-inactivation pathways. **Science**, v.320, p.1336-1341, 2008.

OOI, S.K.; QIU, C.; BERNSTEIN, E.; LI, K.; YANG, Z.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; TEMPST, P.; LIN, S.P.; ALLIS, C.D.; CHENG, X.; BESTOR, T.H. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. **Nature**, v.448, p.714-717, 2007.

OKAMOTO, I.; OTTE, A.P.; ALLIS, C.D.; REINBERG, D.; HEARD, E. Epigenetic dynamics of *imprinted* X inactivation during early mouse development. **Science**, v.303, p.644-649, 2004.

OSWALD, J.; ENGEMANN, S.; LANE, N.; MAYER, W.; OLEK, A.; FUNDELE, R.; DEAN, W.; REIK, W.; WALTER, J. Active demethylation of the paternal genome on mouse zygote. **Current Biology**, v.10, p.475-478, 2000.

PANNING, B.; DAUSMAN, J.; JAENISCH, R. X chromosome inactivation is mediated by RNA stabilization. **Cell**, v.90, p.907-916, 1997.

PENNY, G.D.; KAY, G.F.; SHEARDOWN, S.A.; RASTAN, S.; BROCKDORF, N. Requirement for XIST in X chromosome inactivation. **Nature**, v.379, p.131-137, 1996.

POPP, C.; DEAN, W.; FENG, S.; COKUS, S.J.; ANDREWS, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S.E.; REIK, W. Genome-wide erasure of DNA methylation on mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. **Nature**, v.463, p.1101-1105, 2010.

RAJENDER, S.; AVERY, K.; AGARWAL, A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. **Mutation Research**, v.727, p.62-71, 2011.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v.24, p.425-32, 2007.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v.293, p.1089-1093, 2001.

REIK, W.; WALTER, J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. **Nature Genetics**, v.27, p.255-256, 2001.

ROUGIER, N.; BOURC'HIS, D.; GOMES, D.M.; NIVELAU, A.; PLACHOT, M.; PALDI, A.; VIEGAS-PEQUIGNOT, E. Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. **Genes and Development**, v.12, p.2108-2113, 1998.

SADEU, J.C.; CORTVRIND, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMTZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.85, p.1130-1141, 2006.

SADO, T.; FENNER, M.H.; TAN, S.S.; SHIODA, T.; LI, E. X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. **Developmental Biology**, v.225, p.294-303, 2000.

SADO, T.; HOKI, Y.; SASAKI, H. Tsix silences XIST through modification of chromatin structure. **Development Cell**, v.9, p.159-165, 2005.

SAITOU, M.; BARTON, S.C.; SURANI, M.A. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. **Nature**, v.418, p.293-300, 2002.

SANTOS, F.; DEAN, W.; Epigenetic reprogramming during early development in mammals. **Reproduction**, v.127, n.6, p.643-651, 2004.

SANTOS, F.; HENDRICH, B.; REIK, W.; DEAN, W. Dynamic reprogramming of DNA methylatoin in the early mouse embryo. **Developmental Biology**, v.41, p.172-182, 2002.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetics events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p.120-140, 2008.

SEKI, Y., HAYASHI, K., ITOH, K., MIZUGAKI, M., SAITOU, M., MATSUI, Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. **Developmental Biology**, v.278, p.440-458, 2005.

SCOTT, K.A.; YAMAZAKI, Y.; YAMAMOTO, M.; LIN, Y.; MELHONR, J.; KRAUSE, E.G.; WOODS, S.C.; YANAGIMACHI, R.; SAKAI, R.R.; TAMASHIRO, K.L.K. Glucose parameters are altered in mouse offspring produced by assisted reproductive technologies and somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v.83, n.2, p.220-227, 2010.

SHARMAN, G.B. Late DNA replication in the paternally derived X chromosome of female kangaroos. **Nature**, v.230, p.231-232, 1971.



SUN, S.; FUKUE, Y.; NOLEN, L.; SANDREYEV, R.I.; LEE, J.T. Characterization of Xpr (Xprct) reveals instability but no effects on X-chromosome pairing or XIST expression. **Transcription**, v.1, p.46-56, 2010.

SURANI, M.A. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. **Nature**, v.414, p.122-128, 2001.

SURANI, M.A.; HAYASHI, K.; HAJKOVA, P. Genitic and epigenetic regulators of pluripotency. **Cell**, v.128, p.747-762, 2007.

TIAN, D.; SUN, S.; LEE, J.T.; The long non coding RNA Jpx is a molecular switch for X chromosome inactivation. **Cell**, v.143, p.390-403, 2010.

TURNER, J.M.A. Meiotic sex chromosome inactivation. **Development**, v.134, p. 1823-1831, 2007.

TURNER, J.M.; APRELIKOVA, O.; XU, X.; WANG, R.; KIM, S.; CHANDRAMOULI, G.V.; BARRET, J.C.; BURGOYNE, P.S.; DENG, C.X. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and meiotic chromosome inactivation. **Current Biology**, v.14, p.2135-2142, 2004.

WANG, J.; MAGER, J.; CHEN, Y.; SCHNEIDER, E.; CROSS, J.C.; NAGY, A.; MAGNUSON, T. Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene. **Nature Genetics**, v.28, p.371-375, 2001.

WANG, Q.; SUN, Y.Q.; Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.1-12, 2007.

WEIDMAN, J.R.; DOLINOY, D.C.; MURPHY, S.K.; JIRTLE, R.L. Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. **The Cancer Journal**, v.13, n.1, p.9-16, 2007.

WHITELAW, N.C.; WHITELAW, E. Transgenerational epigenetic inheritance in health and disease. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.18, p.273-279, 2008.

WOSSIDLO, M.; ARAND, J.; SEBASTIANO, V.; LEOIKOV, K.; BOIANI, M.; REINHARDT, R.; SCHOLER, H.; WALTER, J. Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. **EMBO Journal**, v.29, p.1877-1888, 2010.

WUTZ, A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. **Nature**, v.12, p.542-553, 2011.

XU, N.; TSAI, C.L.; LEE, J.T. Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation. **Science**, v.311, p.1149-1152, 2006.

XU, N.; DONAHOE, M.E.; SILVA, S.S.; LEE, J.T. Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription of Ctcf protein. **Nature Genetics**, v. 39, p.1390-1396, 2007.

YANG, X.; SMITH, S.L.; TIAN, X.C.; LEWIN, H.A.; RENARD, J.P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications of therapeutic cloning. **Nature Genetics**, v.39, n.3, p.295-302, 2007.

YODER, J.A.; WALSH, C.P.; BESTOR, T.H. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. **Trends in Genetics**, v.13, p.335-340, 1997.

ZHAO, J.; SUN, B.K.; ERWIN, J.A.; SONG, J.J.; LEE, J.T. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. **Science**, v.322, p. 750-756, 2008.

## **CAPÍTULO 2**

## 1. RESUMO

### PERFIL DE METILAÇÃO DO ÉXON 1 DO GENE *XIST* EM CÉLULAS DA LINHAGEM ESPERMATOGÊNICA DE BOVINOS

Rosana Camargo Nishimura<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – UnB, DF, <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Embriões de mamíferos sofrem duas ondas de reprogramação, uma no zigoto, onde os genomas maternos e paternos são desmetilados e em seguida metilados *de novo*, e outra nas células germinativas primordiais. Acredita-se que a metilação *de novo* nas células germinativas masculinas esteja estabelecida ainda antes do nascimento, no entanto, como e quando esse processo ocorre em bovinos ainda não foi estabelecido. Sendo assim, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar se há reprogramação epigenética durante a espermatogênese através da avaliação do perfil de metilação da região do éxon 1 do gene *XIST* em diferentes células espermáticas. Foram utilizados espermátócitos, espermátides alongadas e espermatozóides da cabeça e cauda do epidídimo coletados de testículos obtidos em abatedouro. As células coletadas tiveram o seu DNA extraído e em seguida tratado com bissulfato de sódio. O DNA tratado foi amplificado através de PCR *nested*, e o produto amplificado foi inserido em um vetor e clonado em bactérias. O DNA plasmidial foi extraído e sequenciado. As sequências do experimento foram comparadas com a sequência do gene

*XIST* depositada no *GenBank*, e aquelas que apresentaram taxa de conversão do bissulfito de sódio  $\geq 95\%$  e homologia  $\geq 97\%$  com a sequência do *GenBank* foram utilizadas. Para a comparação do nível de metilação entre os grupos foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com nível de significância de  $P < 0,05$ . O grupo dos espermatócitos, espermátides alongadas, espermatozóides de cauda e cabeça de epidídimo apresentaram  $15,70\% \pm 14,54$ ,  $1,96\% \pm 1,96$ ,  $74,09\% \pm 6,78$  e  $45,09\% \pm 20,19$  de metilação, respectivamente, sendo que o grupo da cabeça de epidídimo apresentou-se mais metilado do que os grupos espermatócitos e espermátides alongadas ( $P < 0,01$ ). Quando foram formados e comparados dois grupos, um com espermatócitos e espermátides alongadas, e outro com espermatozoides de cabeça e cauda de epidídimo, a análise mostrou haver diferença entre eles ( $P < 0,01$ ) com relação a percentagem de metilação. Os resultados sugerem que a reprogramação epigenética em bovinos ainda está ocorrendo durante a formação do espermatozóide.

Palavras chave: 1. Reprogramação Epigenética. 2. Espermatogênese. 3. Bissulfito de Sódio. 4. Bovino.

## 2. ABSTRACT

### METILATION PROFILE OF *XIST* GENE EXON 1 IN BOVINE SPERMATOGENIC CELLS

Rosana Camargo Nishimura<sup>1</sup>, Margot Alves Nunes Dode<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine – UnB, DF, <sup>2</sup>Embrapa Genetic  
Resources and Biotechnology

Mammalian embryos undergo two waves of genome reprogramming, the first in the zygote, when paternal and maternal genomes are demethylated and, just after, re-methylated, and the second in the primordial germ cells. It is believed that re-methylation is reestablished in male germ cells before birth, however, it is not clear when and how this process occurs in bovine. Thus, this work aimed to verify if there is epigenetic reprogramming during spermatogenesis through the evaluation of the methylation profile of *XIST* gene exon 1 in different spermatogenic cells. Spermatocytes, elongated spermatids and spermatozoa from epididymis head and tail were collected from bovine testes obtained from a slaughterhouse. The collected cells had their DNA extracted and treated with bisulfite. The treated DNA was amplified through nested PCR, and the product was inserted on a vector and cloned in bacteria. The plasmidial DNA was extracted and sequenced. The sequences of the experiment were compared with the sequence of gene *XIST* from the *GenBank* and those that presented bisulfite conversion rate of  $\geq 95\%$  and homology of  $\geq 97\%$  with the sequence from *GenBank* were utilized. To compare the methylation level between the groups Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used, with significance level of  $P < 0.05$ . The spermatocytes,

elongated spermatids and spermatozoa from epididymis head and tail groups presented  $15.70\% \pm 14.54$ ,  $1.96\% \pm 1.96$ ,  $74.09\% \pm 6.78$  and  $45.09\% \pm 20.19$  of methylation respectively. The epididymis head group was more methylated than spermatocytes and elongated spermatids groups ( $P < 0.01$ ). When arranged in two groups, one with spermatocytes and elongated spermatids, and another with epididymids spermatozoa, and compared, it was observed that the methylation level was different ( $P < 0.01$ ) between them. These results suggest that epigenetic reprogramming is still occurring during spermatozoa formation.

Keywords: 1. Epigenetic Reprogramming. 2. Spermatogenesis. 3. Bisulfite. 4. Cattle.



### 3. INTRODUÇÃO

A epigenética é a uma área da genética relativamente recente, e tem como alvo os mecanismos de regulação gênica não baseados na sequência primária do DNA e que são herdáveis (Reik, 2007). Os mecanismos epigenéticos participam da formação de eucromatina e heterocromatina, bem como no silenciamento de genes e até mesmo cromossomo (Wutz, 2011).

Durante o desenvolvimento inicial do embrião, o genoma sofre duas grandes reprogramações. Uma que acontece logo após a fecundação, onde os genomas paterno e materno são desprogramados e logo em seguida programados novamente (Oswald et al., 2000; Wossidlo et al., 2010), permitindo a formação de células totipotentes, que darão origem à todos os outros tipos celulares do indivíduo em formação (Surani et al., 2007). A outra reprogramação acontece nas células germinativas primordiais, que darão origem a linhagem germinativa (Sasaki & Matsui, 2008; Seki et al., 2005). Neste momento, as marcas de genes *imprinted* e não *imprinted* são retiradas e substituídas por outras, de acordo com o sexo do embrião (Hajkova, 2011).

Atualmente sabe-se que as marcas epigenéticas são passíveis de alterações causadas por influência do ambiente, diferentemente da sequência contida no DNA (Whitelaw & Whitelaw, 2008). Sabe-se que a exposição a alguns tipos de substância, a dieta, aplicação de hormônios, podem alterar o padrão epigenético, e em alguns casos levar ao surgimento de câncer (Weidman et al., 2007) e infertilidade (Rajender et al., 2011). Acreditava-se que esses “erros” no epigenoma não fossem transmitidos às gerações seguintes, já que, ao passar pelos ciclos de reprogramação, essas anormalidades poderiam ser corrigidas. Contudo, existem

relatos demonstrando que essas alterações podem sim ser transmitidas e ainda persistirem por pelo menos três gerações seguintes (Anway et al., 2005).

Durante o momento da reprogramação o genoma está mais suscetível as influências ambientais, já que naturalmente esse é um período em que marcas estão sendo retiradas e adicionadas. Portanto, é muito importante que nessa fase se tenha as condições mais adequadas para que a reprogramação ocorra corretamente (Lin et al., 2008; Shen et al., 2012).

As informações a respeito da reprogramação nas células germinativas são basicamente oriundas de estudos em camundongos. Dados da literatura afirmam que o início e o final da reprogramação em machos se dão ainda durante a vida fetal, e portanto, ao nascer esse processo já estaria pronto (Reik et al., 2001; Faulk & Dolinoy, 2011). No entanto, estudos com camundongos (Oakes et al., 2007) e humanos (Marques et al., 2011) demonstraram que alguns genes teriam uma reprogramação mais tardia, acontecendo somente após a puberdade, durante a espermatogênese.

O fato de ainda haver reprogramação durante a espermatogênese sugere que a maior suscetibilidade à alterações epigenéticas das células espermáticas, que ocorreria, principalmente durante a vida fetal, passa também a ocorrer continuamente após a puberdade. Isso, além de aumentar as possibilidades de ocorrência de alterações, cria a possibilidade de manipular fatores ambientais para alterar o fenótipo das gerações futuras. Portanto, esse tipo de informação é importante não só como conhecimento básico, mas também por possibilitar o desenvolvimento de ferramentas, tais como o uso de dietas específicas, que possam contribuir para que a reprogramação ocorra de maneira correta. Entretanto, para que esse conhecimento possa ser utilizado é necessário saber em que momento o padrão epigenético é estabelecido. Apesar de já estudado em algumas espécies, até o momento nenhum relato foi encontrado sobre esse evento em espermatozoides da espécie bovina, que tem uma grande importância econômica para o país.

Sendo assim, este trabalho buscou verificar se assim como em camundongos e humanos, a reprogramação também acontece em bovinos adultos. Para isso foi feita a avaliação do perfil de metilação do gene *XIST* durante a espermatogênese, usando diferentes células espermáticas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material biológico

As células espermáticas utilizadas (espermatozóides da cabeça e cauda do epidídimo, espermátides alongadas e espermatócitos) foram obtidas de testículos de bovinos anelados, coletados em abatedouros da região de Brasília/DF.

Após o abate, os testículos foram fixados com barbante para impedir sua saída da bolsa escrotal (Figura 2.1). O transporte do abatedouro ao laboratório foi realizado em caixa térmica com gelo.



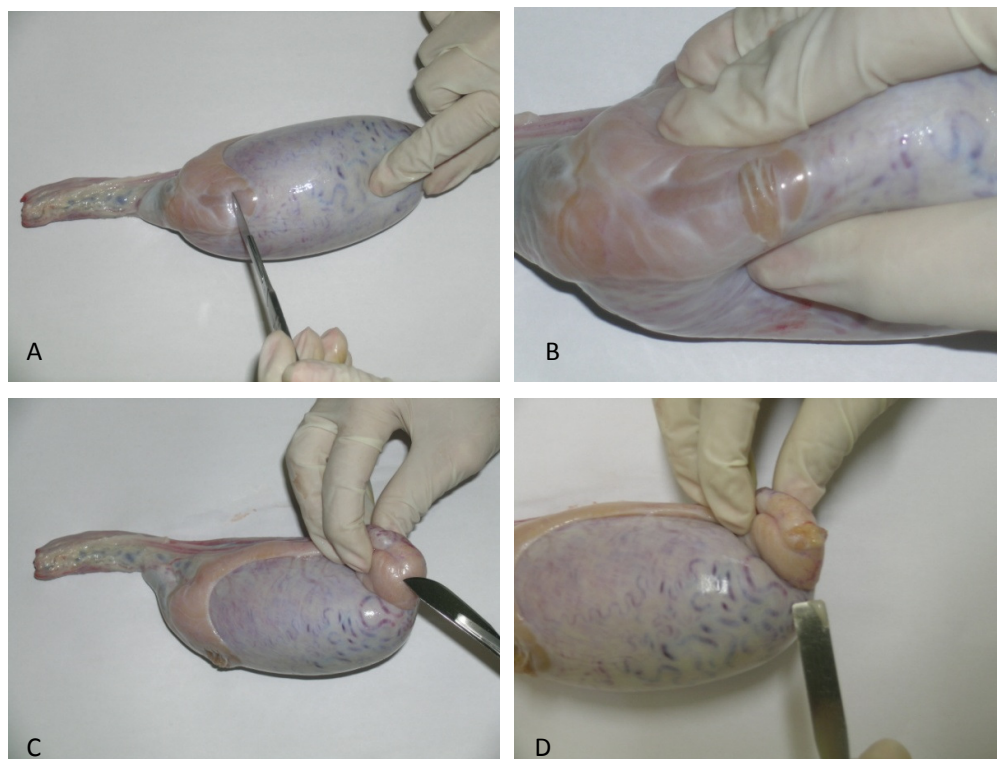
**Figura 2.1** – Testículos dentro do escroto prontos para o transporte até o laboratório.

No laboratório os testículos foram removidos de dentro do escroto, aspergidos com álcool 70%, e então a túnica vaginal foi retirada (Figura 2.2).



**Figura 2.2** – Remoção do testículo de dentro da bolsa escrotal e túnica vaginal.

Para se ter acesso aos espermatozoides da cabeça e cauda do epidídimo, após a localização dessas porções foram feitos vários cortes com bisturi e a região foi pressionada manualmente para que os espermatozoides fossem liberados. Estes foram coletados com auxílio de espátula e depositados em tubos contendo 1 ml de solução salina em tampão fosfato (PBS) (Figura 2.3).



**Figura 2.3** – A e B: coleta de espermatozóides da cabeça do epidídimo. C e D: coleta de espermatozóides da cauda do epidídimo.

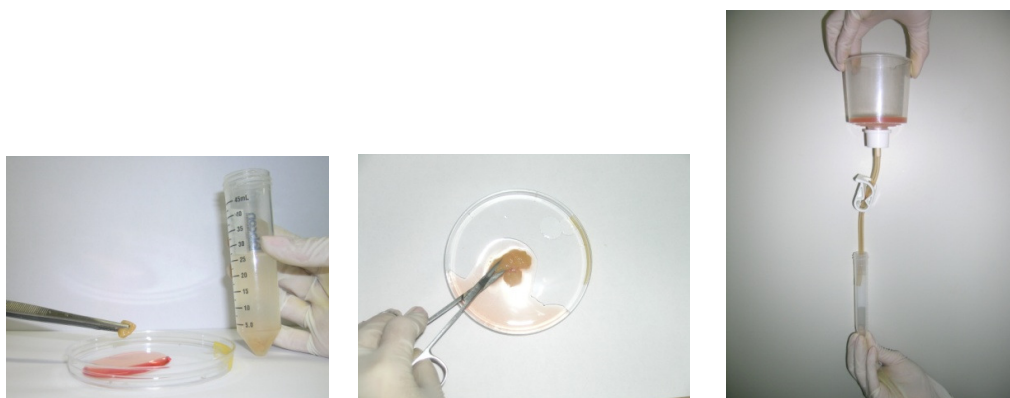
Após a coleta, a solução contendo os espermatozóides do epidídimo foi depositada em gradiente de Percoll 70-40%, contendo 2 ml de cada fração e centrifugada a 700 x g por 30 minutos para a eliminação de possíveis células contaminantes (Lalancette et al., 2008). O pellet foi retirado e lavado com meio LAV, constituído de meio TCM 199 com sais de Hank's (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB-Invitrogen) durante 3 minutos a 200 x g. O sobrenadante foi retirado e o pellet transferido para um tubo de 1,5 ml, onde foi centrifugado rapidamente (*spin*) e o sobrenadante foi retirado. O pellet conservado a -80°C até o momento da extração de DNA.

Para a obtenção dos espermátócitos e espermátides alongadas, utilizou-se a metodologia modificada de Martins (2001). O testículo foi cortado com auxílio de um bisturi para a exposição do parênquima testicular e, então vários fragmentos foram retirados com auxílio de pinça e tesoura (Figura 2.4).



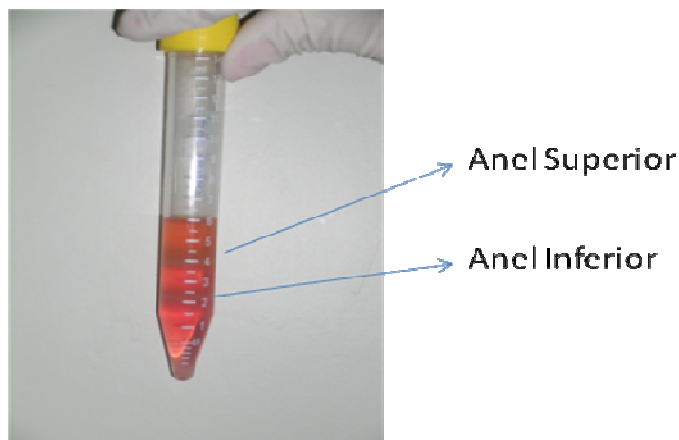
**Figura 2.4** – Parênquima testicular exposto para retirada de fragmentos.

Os fragmentos foram colocados em um tubo com 25 ml de solução salina em tampão fosfato (PBS) acrescido de 6 mM de piruvato de sódio (Sigma). Em seguida, os fragmentos foram colocados em uma placa de petri contendo 10 ml de meio LAV e macerados com tesoura e pinça para a liberação das células espermáticas. A suspensão celular foi filtrada em malha de 80  $\mu\text{m}$ , colocada em um tubo de 15 ml e centrifugada a 200 x g por 1 minuto (Martins, 2001) (Figura 2.5).



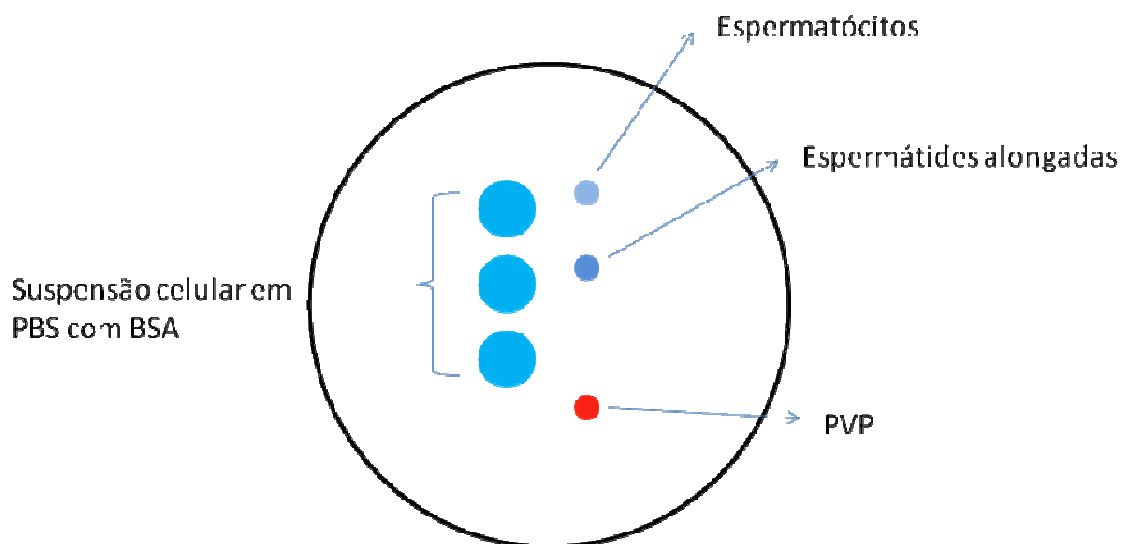
**Figura 2.5** – Maceração dos fragmentos de parênquima testicular e filtragem em malha de 80  $\mu\text{m}$ .

O sobrenadante foi desprezado e o pellet depositado em um gradiente de Percoll 30-20%, sendo em seguida centrifugado por 30 minutos a 700 x g. Após a centrifugação, dois anéis foram formados (Figura 2.6), sendo que o inferior continha as células de interesse (espermátócitos e espermátides alongadas).



**Figura 2.6** – Gradiente de percoll 30-20% com suspensão celular após a centrifugação.

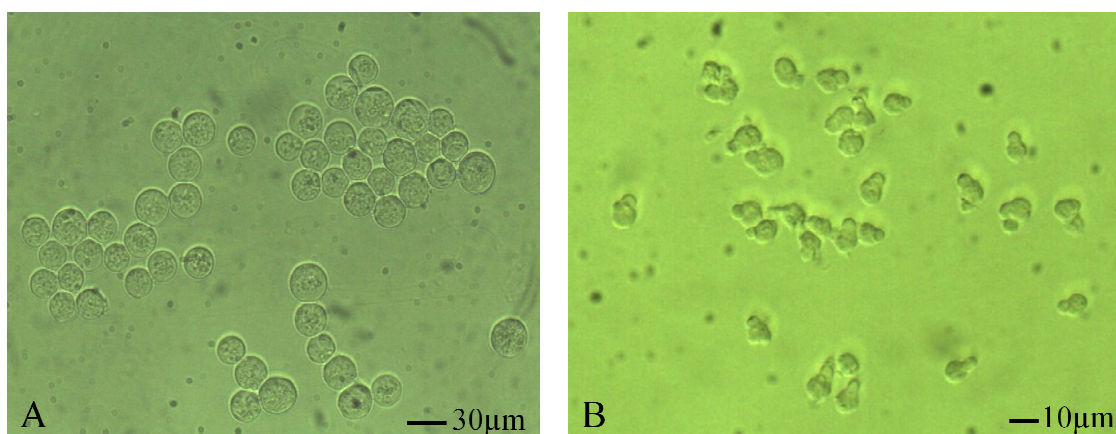
O anel inferior foi retirado com auxílio de pipeta, depositado em 2 ml de meio LAV e centrifugado por 1 minuto a 200 x g. O sobrenadante foi retirado e 10 $\mu$ l do pellet foram diluídos em 1 ml de meio PBS acrescido de 0,6% de Albumina sérica bovina (BSA - Sigma). Para procura e seleção das células, a suspensão celular foi adicionada em uma gota de PBS na placa, e com auxílio de um micromanipulador as células eram transferidas para gotas menores de acordo com sua classificação. A Figura 2.7 mostra o esquema da placa utilizada para a busca e coleta dos espermatozóides e espermátides alongadas. Foram feitas três gotas de 160 $\mu$ l de PBS com BSA onde foram adicionados 5 $\mu$ l da suspensão celular. Foram feitas ainda, duas gotas menores, de 20 $\mu$ l, para colocar as células selecionadas. Além disso, uma gota de PVP (polyvinylpyrrolidona - Sigma) a 10%, para que a pipeta fosse lavada ao longo da coleta, evitando que as células aderissem em sua parede também foi adicionada a placa. As gotas foram cobertas com óleo mineral e a coleta das células foi feita em microscópio invertido (Nikon) e micromanipulador (Nikon Narishige MM188).



**Figura 2.7** – Representação da placa de petri preparada para a coleta de espermátocitos e espermátides alongadas.

A seleção das células foi feita de acordo com a sua morfologia e tamanho (Martins, 2001), onde os espermátocitos apresentavam formato redondo e diâmetro de 20-30 $\mu\text{m}$ , enquanto as espermátides alongadas apresentavam uma protuberância (Figura 2.8). As células foram medidas através do programa Motic Images Plus 2.0 (Motic China Group CO. Ltda, Xiamen, China).

As células após serem identificadas na suspensão eram coletadas uma a uma, e transferidas para suas respectivas gotas, e por fim, transferidas para tubos de 0,2 ml e conservadas a -80°C até a extração do DNA.



**Figura 2.8** – A: Espermátocitos. B: Espermátides alongadas.



Para os espermatozoides da cabeça e da cauda do epidídimo foram feitas três réplicas de cada grupo, sendo que cada uma foi composta por amostras de 4 animais. As amostras foram descongeladas em gelo e então os *pools* foram formados, sendo que cada um continha 50µl de amostra de cada animal. Para os espermátocitos e espermátides alongadas feitas seis réplicas, sendo que cada uma foi composta por 290-310 células, de 3 a 5 animais.

#### **4.2. Extração do DNA dos espermatozoides da cabeça e cauda do epidídimo**

Após a formação dos *pools* as amostras foram lavadas duas vezes com PBS, por centrifugação a 18.320 x g por 30 segundos. O sobrenadante foi retirado, o *pellet* ressuspensionado com 600µl solução de lise de espermatozoide (50 mM de Tris, 5 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 2% de SDS, 0,3% de β-mercaptoetanol, 0,5 mg/ml de proteinase K) e incubado a 55°C *overnight*. Após a incubação, adicionou-se 600µl de solução de lise nuclear (50 mM de Tris com pH 7,8, 25 mM de EDTA, 400 mM de NaCl e 1% de SDS) e a homogeneização foi feita por inversão do tubo. Após este procedimento, a amostra foi incubada em banho maria a 60°C por uma hora. Em seguida, adicionou-se 200µl de NaCl 6M, e a homogeneização foi feita no vórtex por 30 segundos. Então a amostra foi incubada no gelo por 5 minutos e centrifugada a 1.600 x g por 6 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo, onde se adicionou 600µl de isopropanol gelado homogeneizando por inversão. A amostra foi incubada a -20°C por 4,5 horas e centrifugada a 1.600 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1.200 µl de etanol a 70%, centrifugando novamente a 1.600 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi mantido em temperatura ambiente por 10 minutos para secar e, então ressuspensionado em água bidestilada. Ao final, analisou-se a quantidade e qualidade do DNA extraído em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo e por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific).

### **4.3. Extração de DNA dos espermatócitos e espermátides alongadas**

Os espermatócitos e espermátides alongadas foram apenas lisados através de choque térmico, ficando 1 minuto a 95°C e em seguida imersos em nitrogênio líquido. Este procedimento foi repetido 5 vezes (Melo et al., 2005).

### **4.4. Tratamento com bissulfito de sódio**

Para o tratamento do DNA com Bissulfito de sódio utilizou-se 350 ng de DNA genômico (no caso dos espermatozóides do epidídimo) ou o total de DNA das células lisadas (espermatócitos e espermátides alongadas) no Kit EZ DNA Methylation (Zymo Research), de acordo com as recomendações do fabricante. O tratamento com bissulfito de sódio converte as citosinas não metiladas em uracilas enquanto as citosinas metiladas são mantidas. As amostras tratadas foram mantidas a -80°C até que fossem utilizadas para a amplificação através da PCR

### **4.5. Amplificação por PCR e purificação**

O DNA tratado com bissulfito de sódio foi utilizado em reações de PCR *nested*. Os iniciadores utilizados e as condições das reações estão apresentados na tabela 2.1.

**Tabela 2.1** – Descrição dos iniciadores utilizados nas reações de PCR para DNA tratado com bissulfito de sódio.

Gene	Sequência (5'-3')	Acesso Genbank	Localização dos iniciadores	Ilha CpG	Tamanho do amplicon
Xist externo*	F: GGGTGTGTTTTGTTTTAGTGTGTAGTA	AJ421481.1	1127-1252	Éxon 1	482 pb
	R: CTTTAATACCACCCACTAAAATTAATAC		1581-1608		
Xist interno*	F: TTGTTATATAGTAAAAGATGGT	AJ421481.1	1169-1190	Éxon 1	405 pb
	R: ACCAATCCTAACTAACTAAATA		1552-1573		

\*Liu et al. (2008.)

Para a primeira amplificação do gene *XIST*, utilizou-se solução tampão 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer (externo), 1,0U da enzima Taq Polimerase Platinum (Invitrogen) e 3 µL de DNA genômico tratado com bissulfito de sódio, sendo o volume final de 20 µL. Na reação foi utilizada uma desnaturação inicial de 94°C por 7 minutos, seguidos de 40 ciclos com 94°C por 45 segundos, 47°C por 1 minuto e 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 15 minutos. A segunda reação foi realizada utilizando 0,5µL de produto amplificado na primeira reação e as mesmas concentrações de reagentes da primeira, também com o volume final de 20 µL. A reação teve uma desnaturação inicial de 94°C por 4 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 40 segundos, 42°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e extensão final de 72°C por 15 minutos.

O volume total das reações foi aplicado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo (10 mg/mL) e as bandas foram recortadas e purificadas com o kit Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.6. Clonagem dos produtos da PCR e sequenciamento

Os produtos purificados foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) e inseridos no vetor TOPO TA (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A transformação foi realizada em células DH-5α através de choque térmico. O produto foi semeado em placas com meio LB Ágar contendo 200µg/mL de ampicilina, 40µL de X-Gal (Sigma) a 20mg/mL e 4µL de IPTG (Sigma) a 100 mM. As placas foram incubadas

em estufa a 37°C por 16 horas. Após o período de incubação, as placas foram mantidas a 4°C por 2 horas. Somente as colônias brancas foram selecionadas e transferidas para crescimento em meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e mantidas sob agitação a 250 rpm, 37°C por 16 horas. O conteúdo dos tubos que apresentaram turbidez foi dividido em dois tubos de 1,5mL. A extração do DNA do vetor foi feita com o kit QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep (Qiagen), segundo as instruções do fabricante. A presença do fragmento no vetor foi confirmada através de PCR. Foram utilizados 400ng de DNA do plasmídeo, tampão 1X, 1,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 100µM de cada dNTP, 0,5µM de iniciadores universais T7 e SP6 e 1,5U da enzima Taq Polimerase (Invitrogen). A desnaturação inicial foi feita a 94°C por 4 minutos, seguida de 35 ciclos com 94°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos. As amostras diluídas a 100 ng/µL contendo o fragmento inserido foram encaminhadas para sequenciamento na empresa Macrogen (Coréia do Sul), utilizando o sequenciador 3730XL (Applied Biosystems).

As sequências foram analisadas utilizando o BiQ Analyser software (Bock et al., 2005). As citosinas não precedidas de guaninas foram avaliadas quanto à taxa de conversão e, apenas as sequências que apresentaram uma eficiência de conversão pelo bissulfito  $\geq 95\%$  foram consideradas. Logo após, essas sequências foram analisadas para o padrão de metilação das CpGs.

#### 4.7. Análise estatística

Para a análise quantitativa da taxa de metilação entre os tratamentos, foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, sendo que as análises foram feitas com o programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996). Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão. O padrão de metilação, nos 17 sítios CpG para o gene *XIST*, também foi comparado quanto à quantidade de clones hipermetilados de acordo com metodologia de Imamura e colaboradores (2005), onde as sequências que apresentam 50% ou mais de metilação são consideradas hipermetiladas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

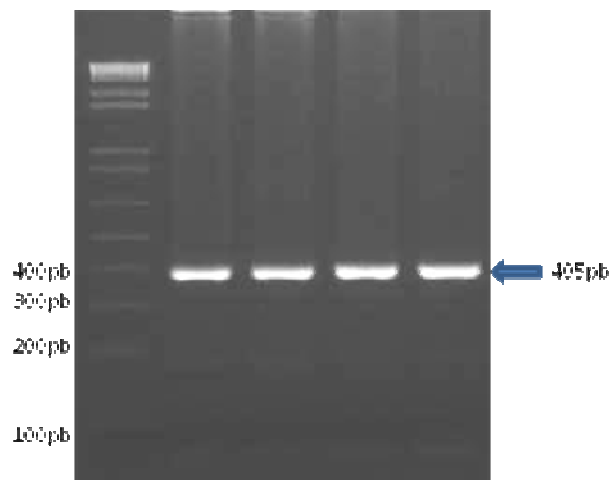
### 5.1 RESULTADOS

#### **Coleta das células**

Foram coletados 1880 espermatócitos de 20 animais, 1847 espermátides alongadas de 23 animais, que foram divididos em 6 réplicas; e espermatozóides de cabeça e cauda de epidídimo de 12 animais, que por sua vez, foram divididos em 3 réplicas.

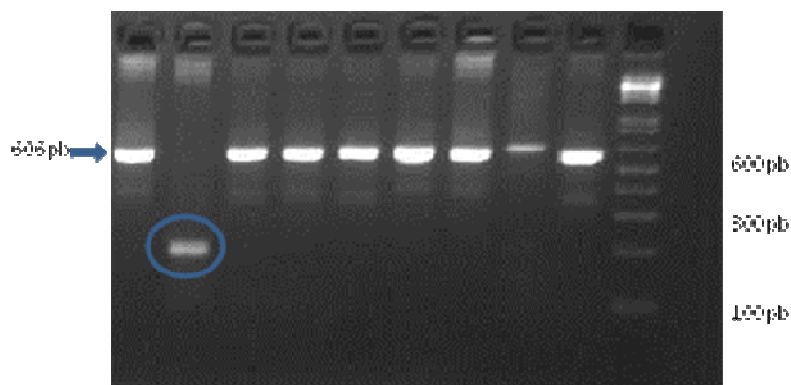
#### **PCR e Clonagem**

Após a realização dos PCR *nested*, foi possível detectar a presença dos fragmentos de interesse (405pb, Figura 2.9), que em seguida foram purificados e utilizados para a clonagem.



**Figura 2.9:** Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. As bandas de 405 pb (seta) do gene *XIST* são os produtos oriundos do PCR interno.

Foram gerados 660 clones, dentre os quais 518 tiveram a presença do fragmento inserido, confirmada através da PCR com os iniciadores universais SP6 e T7 (Figura 2.10).



**Figura 2.10:** Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo. Os fragmentos de 605 pb confirmam a clonagem. A banda circulada em azul possui um tamanho menor, mostrando que a clonagem não aconteceu.

## Metilação do DNA

Para a avaliação do padrão de metilação do DNA foram sequenciadas 518 amostras. Estas foram comparadas com a sequência do gene *XIST*, depositada no *GenBank* (AJ421481.1), e tiveram a taxa de conversão, homologia e análise do padrão de metilação calculadas pelo programa BiQ Analyser. A figura 2.11 mostra o resultado do alinhamento de uma sequência.

```

Genomic_Sequence      -----
[2]XK81-M13F__      TGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCCG

Genomic_Sequence      -----CGITTTAAGTATTTGTTCGTAGTTTAAAATATGGCGG
[2]XK81-M13F__      CCTTTGTATATAGTAAAAGATGGTTCGITTTAAGTATTTGTTCGTAGTTTAAAATATGGCGG

Genomic_Sequence      GTTTTTGTTTTTGTTCGTGTGTATTTTTTGATAGGTTTTGTGTAGGGATAATATGGTTGA
[2]XK81-M13F__      GTTTTTGTTTTTGTTCGTGTGTATTTTTTGATAGGTTTTGTGTAGGGATAATATGGTTGA

Genomic_Sequence      TTTTGTATGTGGATATTATGGTAGTTTGTTCGTGGATATCGTGGTAGGGGTGTTTGAT
[2]XK81-M13F__      TTTTGTATGTGGATATTATGGTAGTTTGTTCGTGGATATCGTGGTAGGGGTGTTTGAT

Genomic_Sequence      CGTTATATTTTTGGCGGGTTTTGTATTAGGAGGGTTTGTTCGTATTGTTAAAGATGGCGTG
[2]XK81-M13F__      CGTTATATTTTTGGCGGGTTTTGTATTAGGAGGGTTTGTTCGTATTGTTAAAGATGGCGTG

Genomic_Sequence      TTTTGTTCGCGGATAAAGTGAAAGGAGGGATTGGTAATGTTAGATTGTTCGCGTGTTTTATT
[2]XK81-M13F__      TTTTGTTCGCGGATAAAGTGAAAGGAGGGATTGGTAATGTTAGATTGTTCGCGTGTTTTATT

Genomic_Sequence      TAATTAGAAAGGGTGGTAGAATCGGTTATAGTTAGTTAGTGGAGGATGGAATTAGATGAG
[2]XK81-M13F__      TAATTAGAAAGGGTGGTAGAATCGGTTATAGTTAGTTAGTGGAGGATGGAATTAGATGAG

Genomic_Sequence      TTAGTATAGTATTTTCGTTATCGTTTT-----
[2]XK81-M13F__      TTAGTATAGTATTTTCGTTATCGTTTT-----

```

**Figura 2.11:** Análise comparativa feita pelo software BiQ Analyser da sequência do gene *XIST* depositada no *GenBank* e uma sequência gerada no experimento. As sequências somente em alaranjado indicam sítios CpGs em que as citosinas estavam metiladas e por isso, não foram substituídas por timinas; as sequências em alaranjado e roxo, representam os sítios CpGs não metilados, e portanto a citosina foi substituída por uma timina. A figura mostra os 17 sítios CpGs presentes na região genômica avaliada.

Ao analisar as taxas de conversão e de homologia, 39 sequências foram selecionadas, apresentando conversão  $\geq 95\%$  e homologia com a sequência referência  $\geq 97\%$  (Tabelas 2.2 e 2.3).

**Tabela 2.2:** Número de clones utilizados para a análise de metilação de espermatócitos e espermatídes alongadas, por réplica.

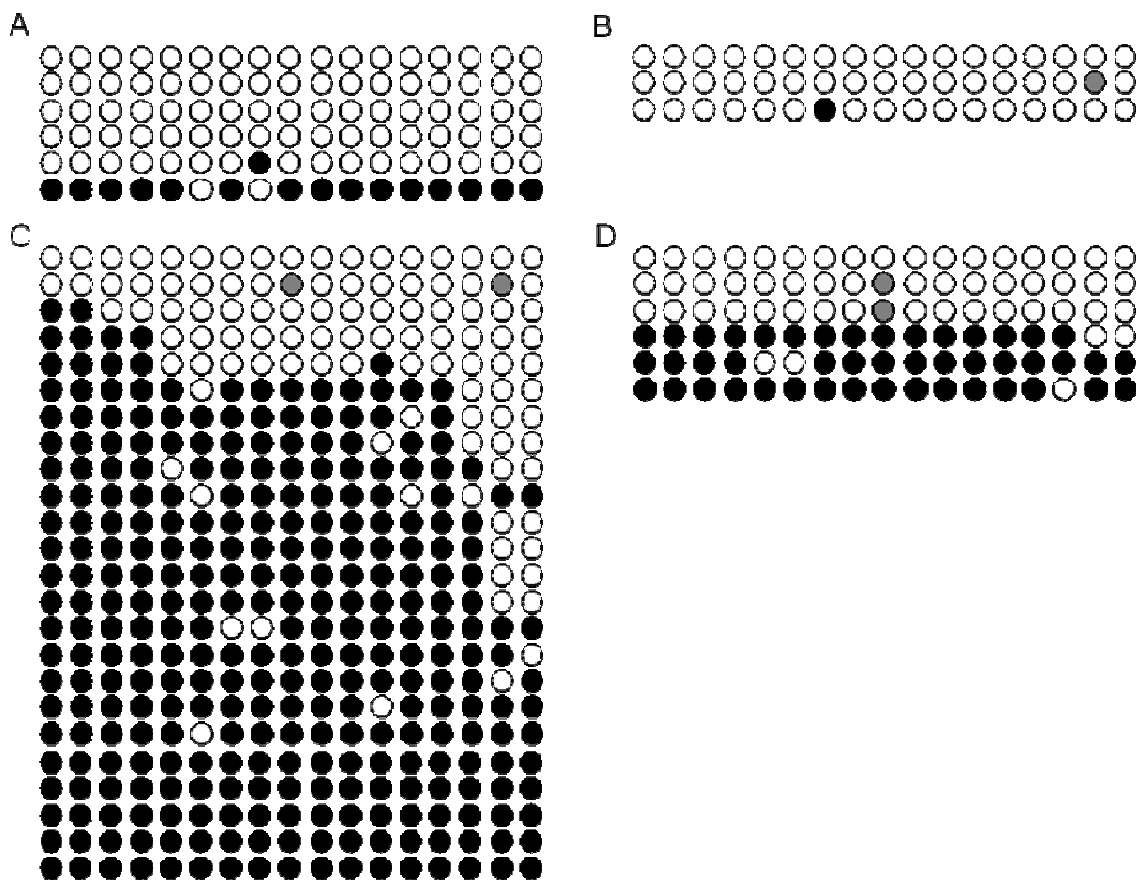
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4	Réplica 5	Réplica 6	Total
<b>Espermatócitos</b>	-	2	3	-	1	-	6
<b>Espermatídes alongadas</b>	-	2	-	-	1	-	3

**Tabela 2.3:** Número de clones utilizados para a análise de metilação de espermatozóides da cabeça e da cauda do epidídimo, por réplica.

	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Total
<b>Cabeça de epidídimo</b>	12	6	6	24
<b>Cauda de epidídimo</b>	2	4	-	6

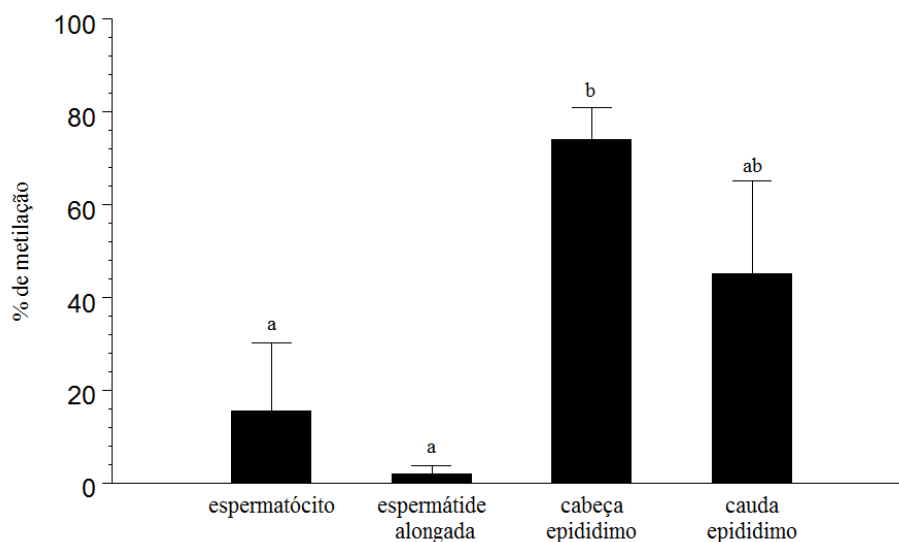
Foi possível a detecção de 21 alelos diferentes, baseando-se no padrão de metilação. De acordo com a metodologia de Imamura (2005), o grupo dos espermatócitos e espermatídes alongadas apresentaram 16,66% (1/6) e 0% (0/3) de sequências hipermetiladas, respectivamente. Enquanto os grupos de cabeça e cauda de epidídimo apresentaram 79,16% (19/24) e 50% (3/6) de sequências hipermetiladas (Figura 2.12).





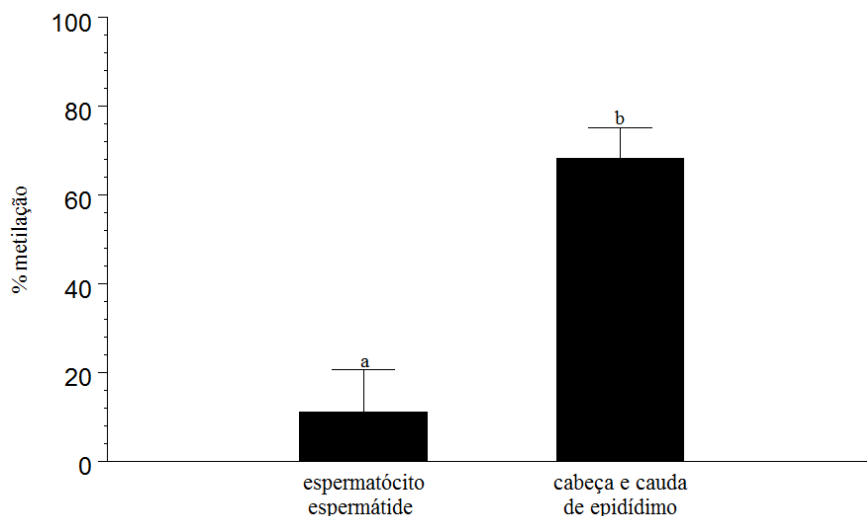
**Figura 2.12:** Padrão de metilação no éxon 1 do gene *XIST*. Cada linha representa um clone. Os círculos brancos representam citosinas não metiladas, os pretos, citosinas metiladas, e os cinzas, onde não foi possível a identificação. A: espermatócitos (16,66% de sequências hipermetiladas), B: espermátides alongadas (0% de sequências hipermetiladas), C: espermatozóides da cabeça do epidídimo (79,16% de sequências hipermetiladas), D: espermatozóides da cauda do epidídimo (50% de sequências hipermetiladas).

O grupo dos espermátocitos, espermátides alongadas, cauda e cabeça de epidídimo apresentaram  $15,70\% \pm 14,54$ ,  $1,96\% \pm 1,96$ ,  $74,09\% \pm 6,78$  e  $45,09\% \pm 20,19$  de metilação, respectivamente, sendo que o grupo cabeça de epidídimo foi diferente dos grupos espermátocitos e espermátides alongadas ( $P=0,0035$ ,  $P=0,00752$  respectivamente) (Figura 2.13).



**Figura 2.13:** Porcentagem de metilação (média±erro padrão) entre os grupos espermátocitos ( $15,7\% \pm 14,54$ ), espermátides alongadas ( $1,96\% \pm 1,96$ ), espermatozoides de cabeça de ( $74,09\% \pm 6,78$ ) e espermatozóides da cauda do epidídimo ( $45,09\% \pm 20,19$ ). O grupo da cabeça de epidídimo apresentou maior metilação do que o grupo espermátocitos ( $P= 0,00335$ ) e o de espermátides alongadas ( $P=0,00752$ ).

Quando dois grupos, formados por espermatócitos e espermatídes alongadas, e cabeça e cauda de epidídimo foram analisados, houve diferença entre eles na porcentagem de metilação ( $P=0,00103$ ) (Figura 2.15).



**Figura 2.14:** Porcentagem de metilação (média ± erro padrão) entre os grupos espermatócitos/espermátides alongadas ( $11,11 \pm 9,67$ ) e espermatozoides de cabeça/cauda de epidídimo ( $68,29 \pm 6,92$ ). <sup>a,b</sup>  $P=0,00103$ .

## 5.2 DISCUSSÃO

Com o avanço do conhecimento na área da epigenética, várias evidências têm surgido de que o uso das tecnologias de reprodução assistida e outros fatores ambientais alteram padrões epigenéticos, induzindo ao desenvolvimento de doenças e alterações na fertilidade dos indivíduos. Portanto, existe uma grande preocupação em identificar quais são estes fatores e como eles provocam essas modificações. Entretanto, para que se possa avaliar as alterações e buscar alternativas para evitá-las é essencial que se conheça qual é o padrão epigenético fisiológico e como e quando ele é estabelecido. Sendo assim, neste trabalho, visando determinar se o padrão de metilação já está estabelecido em machos bovinos antes do início da espermatogênese, foi avaliado o padrão de metilação no éxon 1 do gene *XIST*. Para isto, foram utilizadas diferentes células da linhagem espermática, células que ainda estão em

formação (espermátocitos e espermátides alongadas) e espermatozóides (espermatozóides da cabeça e da cauda do epidídimo). Foi observado um aumento no nível de metilação entre as células em formação e os espermatozóides, demonstrando que a reprogramação ainda está ocorrendo durante a espermatogênese bovina (Figuras 2.14).

Com relação à obtenção das células da linhagem espermática, diferentemente de camundongos, em bovinos não há uma relação da idade do animal com os diferentes tipos celulares presentes nos testículos. Em camundongos, é possível separar as populações de células espermáticas em várias categorias, como espermatogônia A, espermátocitos no início do paquíteno, espermátocitos no paquíteno, espermátides redondas e alongadas. Sendo para isso necessária a coleta de testículos de vários animais, em vários dias diferentes após o nascimento (Oakes et al., 2007; Bellvé et al., 1977). Essa possibilidade de obter populações de células da espermatogênese em seus vários estágios, de acordo com a idade do animal, é a situação ideal para esse tipo de estudo. No entanto, isso não acontece nos bovinos, sendo necessário que se faça a identificação e descrição morfológica das células quando dissociadas do tecido testicular, para poder separá-las. Sendo assim, o procedimento descrito por Martins (2001) foi o utilizado no presente estudo e, para que houvesse segurança na obtenção do material biológico que foi coletado, as células utilizadas foram espermátocitos, espermátides alongadas, espermatozóides de cabeça e cauda do epidídimo. Assim, foi possível garantir que houvesse pelo menos quatro categorias diferentes de células da linhagem espermática que estão em diferentes momentos da espermatogênese. É importante ressaltar que a metodologia utilizada assegura não haver contaminação com células somáticas, o que poderia ser prejudicial à interpretação dos resultados. As células foram coletadas uma a uma com o auxílio de micromanipulador acoplado a um microscópio invertido, semelhante ao realizado por Marques e colaboradores (2011), e Sá e colaboradores (2008). No entanto, estes dois grupos separaram as células em mais categorias, utilizando apenas a morfologia como critério.

Apesar da dificuldade na coleta uma quantidade considerável de células provenientes de várias réplicas foram utilizadas, mas poucas sequências aproveitáveis foram obtidas ao final do processo. Esse baixo rendimento foi ocasionado, em grande parte, devido à baixa taxa de conversão do bissulfito. Uma possível causa poderia ser de que o protocolo utilizado não fosse o ideal para os tipos celulares estudados, embora várias modificações tenham sido testadas, buscando uma condição mais favorável para que a conversão acontecesse. Entretanto, esse parece não ser o caso, pois a mesma metodologia já havia sido usada com sucesso para a análise da metilação de DNA de espermatozóides no laboratório

(Carvalho et al., 2012). Outro fato, observado durante o experimento foi que as espermátides alongadas, que apresentaram o menor número de sequências utilizadas, também eram as que tinham a menor taxa de ligação do produto de PCR no vetor, apresentando sempre uma baixa quantidade de colônias brancas após a clonagem em bactéria. Apesar de não haver relatos na literatura, não se pode descartar a possibilidade de que a baixa conversão possa ser devido a características específicas dessas células. Embora haja a necessidade de avaliar mais sequências para a confirmação dos resultados, os dados já obtidos indicam um claro aumento no nível de metilação durante a espermatogênese.

Existem dois grandes ciclos de reprogramação epigenética. Um acontece no zigoto, onde os genomas materno e paterno começam a ser desprogramados, e em seguida, programados novamente (Oswald et al., 2000; Wossidlo et al., 2010), permitindo assim a formação de células totipotentes (Surani et al., 2007), que darão origem a todos os tecidos de um novo indivíduo. O outro ciclo de reprogramação acontece nas células germinativas primordiais, onde inclusive as marcas de *imprinted* parentais são apagadas e substituídas por outras, próprias do sexo do indivíduo em formação (Sasaki & Matsui, 2008; Seki et al., 2005). Estas células germinativas primordiais darão origem aos gametas, que serão base para a formação de uma nova geração. São originadas no endoderma e se deslocam até as cristas germinativas. Durante e após a migração inicia-se o ciclo de reprogramação epigenética, onde as marcas de genes *imprinted* e não *imprinted* são retiradas, até que se atinja um nível basal de metilação do DNA (Saitou et al., 2002; Sasaki & Matsui, 2008; Seki et al., 2005; Popp et al., 2010). Este é um momento de extrema importância, pois a partir dele estas células começam a adquirir um novo padrão epigenético, diferente do padrão parental, permitindo que se transformem em espermatogônias e ovogônias dependendo do sexo do embrião (Hajkova, 2011). Este evento está bem caracterizado para camundongos e sabe-se que em fetos machos, a desmetilação global se inicia no 7,25 dias pós-coito (dpc) e se completa no 13,50 dpc (Lees-Murdock & Walsh, 2008). As marcas dos genes *imprinted* começam a ser apagadas entre 10,5 e 12,50 dpc (Hajkova et al., 2002) e estão restabelecidas por volta do 15,50 dpc (Reik et al., 2001; Li et al., 2004; Kota & Feil, 2010; Faulk & Dolinoy, 2011). Portanto, para esses autores, a reprogramação já estaria pronta antes do nascimento em fetos machos, sendo que as espermatogônias já teriam o padrão de metilação estabelecido. Entretanto, outros estudos tem sugerido que isso pode não acontecer e, que a reprogramação ainda não esta pronta nas espermatogônias (Oakes et al., 2007; Marques et al., 2011). Este dado é relevante, pois se a reprogramação ainda precisa ser completada durante a espermatogênese, as células

germinativas estariam muito mais susceptíveis a alterações devido a fatores externos e/ou a manipulações.

Em vista destas informações, decidiu-se então verificar se a reprogramação epigenética realmente estava pronta em bovinos adultos. Foi observada uma alteração no padrão de metilação do gene estudado entre as diferentes células (Figuras 2.13, 2.14). O aumento no padrão de metilação se tornou mais evidente quando se comparou os grupos de células em formação e espermatozóides (Figura 2.14). Oakes e colaboradores (2007) afirmam que, em camundongos, a metilação genômica de sequências *imprinted* começa a ser adquirida ainda nos gonócitos, antes do nascimento, e continua após o nascimento nas células mitóticas e meióticas, se completando ao final do paquíteno. Afirmam ainda que, no período de transição de espermatogônia para espermatócito, pode haver perda ou ganho de metilação, dependendo da região específica do DNA, e concluem que, mesmo que a maior parte da aquisição de metilação ocorra nos gonócitos de camundongos machos ainda antes do nascimento, padrões de metilação continuam a ser alterados durante a espermatogênese em sequências específicas. Marques e colaboradores (2011) afirmam que, embora as marcas de genes *imprinted* de humanos já estejam estabelecidas em espermatogônias, e essas sejam mantidas nos estágios seguintes da espermatogênese, algumas regiões específicas, como de genes *imprinted*, ainda estariam sendo metiladas. Foi detectada a presença de RNAs e as próprias enzimas de metilação de DNA, DNMT1, DNMT3A e DNMT3B em espermatogônias A, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides redondas e espermátides alongadas (Marques et al., 2011). Sendo assim, Marques e colaboradores concluíram que a presença dessas enzimas durante os vários estágios da espermatogênese sugere que eventos de remetilação podem estar acontecendo durante a recombinação meiótica, assim como em espermátides que já estão iniciando a troca de histonas por protaminas.

Os resultados do presente estudo, portanto, corroboram com os de Oakes e colaboradores (2007) e Marques e colaboradores (2011), pois mostram haver uma alteração no padrão de metilação entre as diferentes células. Apesar das diferenças entre os estudos, todos confirmam que durante a espermatogênese existe sim um aumento do nível de metilação e, que a reprogramação epigenética ainda não está estabelecida ao nascimento.

Posto isso, se a reprogramação efetivamente se completar apenas nas fases mais tardias da espermatogênese, significa que esse processo de retirar e adicionar informações que controlam a expressão de genes está constantemente sujeito a alterações após o início da espermatogênese, na puberdade. É muito importante que esses processos ocorram

de maneira correta para que haja um desenvolvimento normal (Lin et al., 2008; Shen et al., 2012). Sabe-se que interferências ambientais como nutrição, comportamento, estresse e exposição a substâncias tóxicas podem alterar o epigenoma de um indivíduo, sendo, por exemplo, causa de alguns tipos de câncer (Weidman et al., 2007). Durante esses períodos de reprogramação, a exposição a esses fatores pode ter efeitos ainda maiores. Acreditava-se que anormalidades epigenéticas não fossem transmitidas às gerações seguintes, já que nos momentos de reprogramação estes “erros” poderiam ser corrigidos. No entanto, Anway e colaboradores (2005) ao exporem ratas prenhes a um fungicida verificaram que alterações no padrão de metilação se mantiveram por pelo menos 3 gerações. Adicionalmente, Stouder e colaboradores (2009) verificaram que a superovulação de camundongos fêmea afetou o estado epigenético dos espermatozoides da geração seguinte. Ademais, Dolinoy e colaboradores (2007) demonstraram que a exposição materna ao bisfenol A diminuiu a metilação em CpGs da prole, além disso Dolinoy e colaboradores (2006) também verificaram que a dieta materna (enquanto prenha) rica em gínesteína (flavonóide abundante na soja) afeta a expressão gênica e altera a susceptibilidade a obesidade alterando permanentemente o epigenoma da prole. Sendo assim, além dos dois momentos na vida fetal mencionados acima, os genes que estabelecem seus padrões de metilação tardiamente também podem ser alterados por fatores externos, durante a vida adulta. Rajender e colaboradores (2011) comentam a importância do estabelecimento correto do *imprinting* genômico para a fertilidade em humanos, já que anormalidades epigenéticas são verificadas em homens inférteis. Padrões alterados de metilação foram encontrados em indivíduos com oligospermia (Kobayashi et al., 2007), com espermatozoides com baixa motilidade (Poplinski et al., 2010), azoospermia (Marques et al., 2004 e 2010), teratozoospermia e oligoastenoteratozoospermia (Boissonnas et al., 2010). Os resultados do presente estudo mostraram que o *XIST* é um gene que estabelece seu padrão de metilação após a puberdade, durante a espermatogênese na espécie bovina. Portanto, o seu padrão de metilação pode vir a servir como um marcador da reprogramação, mostrando as possíveis interferências ambientais que possam acontecer, afetando a fertilidade dos animais.

O gene *XIST* foi selecionado para ser avaliado nesse estudo por possuir grande importância no desenvolvimento embrionário inicial, sendo um elemento indispensável para que se dê o início do processo de inativação do cromossomo X. Embora no presente trabalho não se tenha analisado espermatozoides de ejaculado, pode-se considerar que não haja modificações no nível de metilação durante o trânsito dos espermatozoides pelo epidídimo até a ejaculação. Desta forma, os resultados encontrados diferiram dos resultados de Liu e colaboradores (2008), que analisando a mesma região do gene *XIST*, encontraram apenas

sequências completamente desmetiladas em espermatozoides de bovino. É possível que a diferença dos resultados se deva ao fato de Liu e colaboradores terem analisado espermatozoides de apenas um animal, enquanto neste trabalho foram utilizados 12 animais para espermatozoides do epidídimo, diminuindo a variação individual. Por outro lado, nossos resultados estão de acordo com McDonald e colaboradores (1998). Estes autores encontraram um padrão de metilação para o gene *XIST* em gametas de camundongos condizente com um padrão *imprinted*, com espermatozoides hipermetilados, e ovócitos hipometilados. Para bovinos, esta caracterização ainda não foi realizada. Portanto, se realmente não houver mudanças quanto ao padrão de metilação de espermatozoides do epidídimo para espermatozoides de ejaculado, e em ovócitos for encontrado um padrão hipometilado, será possível dizer que este é um gene *imprinted* em bovinos. No entanto, se o padrão for encontrado hipermetilado em ovócitos, o gene *XIST* em bovinos, assim como em humanos e coelhos, não terá um padrão *imprinted* (Okamoto et al., 2011).

Neste trabalho foi constatado ainda que há um aumento na metilação no éxon 1 do gene *XIST* durante a espermatogênese de bovinos. No entanto, para alguns grupos, foram analisadas poucas sequências, por isso, faz-se necessária a análise de um número maior de sequências. Ficou evidente, entretanto, que ocorre um aumento no nível de metilação, ou seja, o gene ainda está sendo reprogramado e, portanto o padrão não está completo antes do nascimento, sendo completamente adquirido durante a espermatogênese. Sendo assim, a reprogramação deste gene acontece de forma contínua após a puberdade do macho e pode estar sujeita a alterações por fatores externos atuando durante esse período, que podem vir a afetar o padrão final e com isso causar problemas na fertilidade, como já relatado em humanos.



## **6. CONCLUSÃO**

Baseando-se nos resultados obtidos, pode-se concluir que o ciclo de reprogramação epigenética da gametogênese em machos bovinos ainda está ocorrendo durante a formação do espermatozóide.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANWAY, M.D.; CUPP, A.S.; UZUMCU, M.; SKINNER, M.K. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. **Science**, v.308, p.1466-1469, 2005.

BELLVÉ, A.; CAVICCHIA, J.C.; MILLETTE, C.F.; O'BRIEN, D.A.; BHATNAGAR, Y.M.; DYM, M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: Isolation and morphological characterization. **The Journal of Cell Biology**, v.74, p.68-85, 1977.

BOCK, C.; REITHER, S.; MIKESKA, T.; PAULSEN, M.; WALTER, J.; LENGAUER, T. BiQ Analyser: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfate sequencing. **Bioinformatics**, v.21, n.21, p.4067-4068, 2005.

BOISSONNAS, C.C.; ABDALAOU, H.E.; HAELEWYN, V.; FAUQUE, P.; DUPONT, J.M.; GUT, I.; VAIMAN, D.; JOUANNET, P.; TOST, J.; JAMMES, H. Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. **European Journal of Human Genetics**, v.18, p.73-80, 2010.

CARVALHO, J.O.; MICHALCZECHEN-LACERDA, V.A.; SARTORI, R.; RODRIGUES, F.C.; BRAVIM, O.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting. **Molecular Reproduction and Development**, v.79, n.2, p.77-84, 2012.

DOLINOY, D.C.; HUANG, D.; JIRTLE, R.L. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.104, n.32, p.13056-13061, 2007.

DOLINOY, D.C.; WEIDMAN, J.R.; WATERLAND, R.A.; JIRTLE, R.L. Maternal ginestein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. **Enviromental Health Perspectives**, v.114, n.4, p.567-572, 2006.

FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything The when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. **Epigenetics**, v.6, n.7, p.791-797, 2011.

HAJKOVA P. Epigenetic reprogramming in the germline: towards the ground state of the epigenoma. **Philosofical Transactions of the Royal Society B**, v.366, p.2266-2273, 2011.

HAJKOVA, P.; ERHARDT, S.; LANE, N.; HAAF, T.; EL MAARI, O.; REIK, W.; WALTER, J.; SURANI, M.A.; Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. **Mechanisms of Development**, v. 117, p.15-53, 2002.

IMAMURA, T.; KERJEAN, A.; HEAMS, T.; KUPIEC, J.; THENEVIN, C.; PALDI, A. Dynamic CpG and Non-CpG methylation of the Peg1/Mest gene in the mouse oocytes and preimplantation embryo. **Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.20, p.20171-20175, 2005.

KOBAYASHI, H.; SATO, A.; OTSU, E.; HIURA, H.; TOMATSU, C.; UTSUNOMIYA, T. SASAKI, H.; YAEGASHI, N.; ARIMA, T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. **Human Molecular Genetics**, v.16, p.2542-2551, 2007.

KOTA, S.K.; FEIL, R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. **Developmental Cell**, v.19, p.675-686, 2010.

LALANCETTE, C.; THIBAUT, C.; BACHAND, I.; CARON, N.; BISSONNETTE, N. Transcriptome analysis of bull semen with extreme nonreturn rate: use of suppression-subtractive hybridization to identify functional markers for fertility. **Biology of Reproduction**, v.78, p.618-635, 2008.

LEES-MURDOCK, D.J.; WALSH, C.P. DNA methylation reprogramming in the germ line. **Epigenetics**, v3, p.5-13, 2008.

LI, J.Y.; LEES MURDOCK, D.J.; XU, G.L.; WALSH, C.P. Timing of establishment of paternal methylation imprints in the mouse. **Genomics**, v.84, p.952-960, 2004.

LIN, L.; LI, Q.; ZHANG, L.; DAI, Y.; LI, L. Aberrant epigenetic changes and gene expression in cloned cattle dying around birth. **Developmental Biology**, v.8, n.14, p.1-19, 2008.

LIU, J.H.; YIN, S.; XIONG, B.; HOU, Y.; CHEN, D.Y.; SUN, Q.Y. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. **Molecular Reproduction and Development**, v.75, p.598-607, 2008.

MARQUES, C.J.; CARVALHO, SOUZA, M.; BARROS, A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. **Lancet**, v.363, p.1700-1702, 2004.

MARQUES, C.J.; FRANCISCO, T.; SOUSA, S.; CARVALHO, F.; BARROS, A.; SOUZA, M. Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.94, n.2, p.585-594, 2010.

MARQUES, C.J.; PINHO, M.J.; CARVALHO, F.; BIÈCHE, I.; BARROS, A.; SOUSA, M. DNA methylation imprinting marks and DNA methyltransferase expression in human spermatogenic cell stages. **Epigenetics**, v.6, n.11, p.1354-1361, 2011.

MARTINS, C.F. Avaliação do potencial de produção de embriões bovinos pela técnica de injeção intracitoplasmática de células espermáticas (intracitoplasmic sperm injection, ICSI). Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Campus de Botucatu. 2001.

Mc DONALD, L.E.; PATERSON, C.A.; KAY, G.F. Bissultife genomic sequencing derived methylation profile of the Xist gene throughout early mouse development. **Genomics**, v.54, p.379-386, 1998.

MELO, E.O.; SOUZA, R.V.; IGUMA, L.T.; FRANCO, M.M.; RECH, E.L.; RUMPF, R. Isolation os transfected fibroblast clones for use in nuclear and trangene detection in cattle embryos. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.4, p.812-821, 2005.

OAKES, C.C.; LA SALLE, S.; SMIRAGLIA, D.J.; ROBAIRE, B.; TRASLER, J.M. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis germ cells. **Developmental Biology**, v.307, p.368-379, 2007.

OKAMOTO, I.; PATRAT, C.; THÉPOT, D.; PEYNOT, N.; FAUQUE, P.; DANIEL, N.; DIABANGOUAYA, P.; WOLF, J.P.; RENARD, J.P.; DURANTHON, V.; HEARD, E. Eutherian mammals use diverse strategies to iniciate X-chromosome inactivation during development. **Nature**, v.472, p.370-374, 2011.

OSWALD, J.; ENGEMANN, S.; LANE, N.; MAYER, W.; OLEK, A.; FUNDELE, R.; DEAN, W.; REIK, W.; WALTER, J. Active demethylation of the paternal genome on mouse zygote. **Current Biology**, v.10, p.475-478, 2000.

POPLINSKI, A.; TUTTELMANN, F.; KANBER, D.; HORSTHEMKE, B.; GROMOLL, J. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1. **International Journal of Andrology**, v.33, p. 642-649, 2010.

POPP, C.; DEAN, W.; FENG, S.; COKUS, S.J.; ANDREWS, S.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S.E.; REIK, W. Genome-wide erasure of DNA methylation on mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. **Nature**, v.463, p.1101-1105, 2010.

RAJENDER, S.; AVERY, K.; AGARWAL, A. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. **Mutation Research**, v.727, p.62-71, 2011.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v.24, p.425-32, 2007.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v.293, p.1089-1093, 2001.

SA, R.; NEVES, R.; FERNANDES, S.; ALVES, C.; CARVALHO, F.; SILVA, J.; CREMADES, N.; MALHEIRO, I.; BARROS, A.; SOUSA, M. Cytological na expression studies and quantitative analysis of the temporal and stage-specific effects of follicle-stimulationg hormone and testosrerone during cocultures of the normal human seminiferous epithelium. **Biology of Reproduction**, v.79, p.962-975, 2008.

SAITOU, M.; BARTON, S.C.; SURANI, M.A. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. **Nature**, v.418, p.293-300, 2002.

SASAKI, H.; MATSUI, Y. Epigenetics events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. **Nature Reviews Genetics**, v.9, p.120-140, 2008.

SEKI, Y., HAYASHI, K., ITOH, K., MIZUGAKI, M., SAITOU, M., MATSUI, Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. **Developmental Biology**, v.278, p.440-458, 2005.

SHEN, C.J.; CHENG, W.T.; WU, S.C.; CHEN, H.L.; TSAI, T.C.; YANG, S.H.; CHEN, C.M. Differential differences in methylation status of putative imprinted genes among cloned swine genomes. **Plos One**, v.7, n.2, 2012.

STOUDER, C.; DEUTSCH, S.; PAOLONI-GIACOBINO, A. Superovulation in mice alters the methylation pattern of imprinted genes in the sperm of the offspring. **Reproductive Toxicology**, v.28, p.536-541, 2009.

SURANI, M.A.; HAYASHI, K.; HAJKOVA, P. Genitic and epigenetic regulators of pluripotency. **Cell**, v.128, p.747-762, 2007.

WEIDMAN, J.R.; DOLINOY, D.C.; MURPHY, S.K.; JIRTLE, R.L. Cancer susceptibility: epigenetic manifestation of environmental exposures. **The Cancer Journal**, v.13, n.1, p.9-16, 2007.

WHITELAW, N.C.; WHITELAW, E. Transgenerational epigenetic inheritance in health and disease. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.18, p.273-279, 2008.

WOSSIDLO, M.; ARAND, J.; SEBASTIANO, V.; LEOIKOV, K.; BOIANI, M.; REINHARDT, R.; SCHOLER, H.; WALTER, J. Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. **EMBO Journal**, v.29, p.1877-1888, 2010.

WUTZ, A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. **Nature**, v.12, p.542-553, 2011.