UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"Verificação do padrão de metilação da região MHM de galinhas, por meio do ensaio MHM, utilizando PCR em tempo real"

Fernanda Elisa Arab

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

RIBEIRÃO PRETO – SP
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"Verificação do padrão de metilação da região MHM de galinhas, por meio do ensaio MHM, utilizando PCR em tempo real"

Fernanda Elisa Arab

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa Dra Ester Silveira Ramos

RIBEIRÃO PRETO – SP
2015

Agradecimentos:

Agradeço em primeiro lugar à **Deus**, por estar sempre iluminando e abençoando a mim e minha família e guiando meus passos na jornada da vida.

Aos meus pais, **Arnaldo e Elisa,** meus exemplos de vida e grandes guerreiros que lutaram pela minha educação e por onde cheguei até hoje. Agradeço por todo amor, compreensão e apoio que nunca me faltou.

Aos meus irmãos, **Ignácio e Rodrigo**, que sempre estiveram do meu lado e me aconselhando.

Ao meu namorado, **Fábio**, que sempre esteve me apoiando em cada decisão e me dando forças e incentivo para cada situação que eu enfrentava. Agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos felizes e tristes.

Aos amigos, em especial a **Bio 49** que me proporcionou uma das melhores fases da minha vida e estará sempre em minha memória, por todos os momentos inesquecíveis.

À uma das grandes amizades que a faculdade me deu de presente nesses quatro anos, minha amiga e companheira de ap, **Olívia.** Com certeza ficará em nossas memórias cada dia desses quatro anos, todas as festas, churrascos, noites estudando, desesperos pré e pós prova, conversas inacabáveis, trabalhos e claro todo o carinho e apoio. Obrigada pela amizade.

Aos **professores e funcionários da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto,** por todo o aprendizado, paciência e dedicação. Obrigada pela minha formação.

À minha orientadora, **Ester,** pela oportunidade de estágio e aprendizado no laboratório.

As **professoras da minha banca,** que escolhi com muito carinho. Agradeço por terem aceitado meu convite e estarem presente nessa etapa importante da minha formação.

*Ao pessoal do **Bloco C,** em especial aqueles que me ajudaram muito no meu projeto e me ensinaram, **ao Matheus, Heloíse e Grace.** Agradeço pela paciência.*

Dedicações Especiais

*Dedico este trabalho à minha família, especialmente a minha **mãe**, minha grande lutadora. Apesar de toda a dificuldade que enfrentamos esse ano com a sua doença, sempre esteve me apoiando. Agradeço a Deus por estar do nosso lado nesse momento e nos abençoando. Você mãe, é meu grande exemplo, meu amor eterno. Eu te amo.*

*E também ao nosso anjo **Gabriel**, que está agora junto ao Vô e a Vó como uma estrelinha olhando por todos nós. Saudades!*

Enfim, dedico a todos o meu carinho e muito obrigada.

"Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, pois cada pessoa é única, e nenhuma substitui a outra. Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só e nem nos deixa sós; leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada; há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso."

(O Pequeno Príncipe)

Apoio financeiro:
Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pesquisa (CNPq)
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
C	Nucleotídeo citosina
C_T	*Cycle Threshold*
DMRT1	*Doublesex and Mab-3 Related Factor 1*
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FISH	Hibridização fluorescente *in situ*
G	Nucleotídeo guanina
M	Molaridade
mM	Milimolar
mg	Miligrama
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
MHM	*Male HyperMethylated*
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
ncRNA	RNA não codificante
ng	Nanograma
nm	Nanometro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	Picomol
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOX3	*SRY-related HMG-box 3*
SOX9	*SRY-related HMG-box 9*
Sry	*Sex-determining Region on Y-chromosome*
U	Unidade
W	Cromossomo sexual W
X	Cromossomo sexual X
Y	Cromossomo sexual Y
Z	Cromossomo sexual Z
Zp	Cromossomo Z paterno
µl	Microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado da quantificação das amostras referentes ao animal 1 (fêmea). ... 17

Tabela 2: Resultado da quantificação das amostras referentes ao animal 2 (macho). .. 17

Tabela 3: Resultado da quantificação das amostras referentes ao animal 3 (fêmea). ... 18

Tabela 4: Resultado da quantificação das amostras referentes ao animal 4 (macho). .. 18

Tabela 5: Resultados da análise de metilação das amostras de fêmeas obtidos por meio da PCR em tempo real. 27

Tabela 6: Resultados da análise de metilação das amostras de machos obtidos por meio da PCR em tempo real. 27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Região MHM analisada pelo software MethPrimer com as ilhas CpG. (B) A sequência de DNA utilizada para estudo assim como os primers e os fragmentos amplificados pela PCR. (modificado de CAETANO E RAMOS, 2008). 9

Figura 2: Ensaio MHM por PCR biplex da amostra de penas. (A) DNA não digerido, tanto de fêmeas (F) como machos (M). (B) Após digestão pela enzima HpaII. O fragmento de 756pb engloba a região MHM e possui sítio de restrição da enzima HpaII, sensível à metilação, enquanto o fragmento de 242pb funciona como controle de amplificação (Modificado de CAETANO E RAMOS, 2008)..... 10

Figura 3: Mecanismo de determinação sexual nas galinhas comparado com o de mamíferos. As gônadas têm efeitos limitados sobre o fenótipo sexual. Em contraste, nos mamíferos, o destino gonadal é dependente da expressão transiente do gene testículo-determinante (o gene *SRY*) na gônada indiferente. As gônadas de mamíferos têm uma grande influência sobre o fenótipo sexual (modificado de ZHAO et al., 2010)..... 12

Figura 4: Região MHM em *Gallus gallus domesticus* utilizada para o desenho dos *primers*, que serão disponibilizados após a publicação do trabalho científico..... 19

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% com o produto da PCR para gradiente de temperaturas. O poço 1 inicia-se com a temperatura de 60°C e diminui para 50°C no poço 19. Todas as temperaturas amplificaram, exceto as amostras de brancos (poços 3, 8 e 13). 22

Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com o produto da PCR para gradiente de temperaturas. Amplificação ocorreu em todas as temperaturas..... 22

Figura 7: Curva de amplificação da amostra de cérebro da fêmea. A linha azul corresponde ao material não digerido, a linha vermelha ao DNA digerido com a enzima HpaII e a linha verde o DNA digerido com a enzima MspI. 23

Figura 8: Curva de amplificação da amostra de gônada do macho. A linha azul corresponde ao material não digerido, a linha vermelha ao DNA digerido com a enzima HpaII e a linha verde o DNA digerido com a enzima MspI. 24

Figura 9: Comparação da curva de amplificação da amostra de cérebro da fêmea (A) e da amostra de gônada do macho (B). Amplificação na fêmea do material não digerido e no macho além da amplificação do material não digerido, o DNA digerido com a enzima HpaII também amplificou. 25

Figura 10: Curva de *Melting* da amostra de cérebro da fêmea. A temperatura de dissociação dos *primer*s foi de aproximadamente 87°C..... 26

SUMÁRIO

RESUMO 1

1. INTRODUÇÃO 4
   1.1 Desenvolvimento embrionário de aves 4
   1.2 Determinação do sexo nas aves 4
   1.3 Região MHM 6
   1.4 Gene *DMRT1* 7
   1.5 Eventos epigenéticos 8
   1.6 Ensaio MHM 9
   1.7 Compensação de dose 10
   1.8 Identidade sexual autônoma das células somáticas 11

2. OBJETIVOS 14
   2.1 Objetivos Gerais 14
   2.2 Objetivos Específicos 14

3. MATERIAL E MÉTODOS 16
   3.1 Amostras 16
   3.2 Extração de DNA 16
   3.3 Quantificação 17
   3.4 Diluição 18
   3.5 Digestão 18
   3.6 Análises 19

4. RESULTADOS 22

5. DISCUSSÃO 29

6. CONCLUSÃO 35

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 37

RESUMO

As aves apresentam um sistema de cromossomos sexuais ZW, sendo que as fêmeas são as representantes do sexo heterogamético (ZW) e os machos, do homogamético (ZZ). Embora se saiba bastante a respeito dos cromossomos sexuais de *Gallus gallus domesticus* e outras aves, o processo que determina o sexo nesses animais ainda continua em estudo. No sistema XY de mamíferos, um cromossomo X é inativado nas fêmeas (XX), assegurando a expressão equivalente de genes X-específicos nos dois sexos. Esse processo, conhecido como compensação de dose, aparentemente não ocorre nas aves e, se ocorrer, possui características peculiares, não envolvendo a inativação de um cromossomo sexual inteiro e sim porções específicas do cromossomo Z. A região *Male HyperMethylated*, ou região MHM está presente nos machos ao longo do braço curto do cromossomo Z de *G. domesticus.* Esta é uma região diferencialmente metilada, composta por cópias em *tandem*, codificadora de um ncRNA, e mapeada próxima ao *locus* do gene *Doublesexand Mab-3 RelatedFactor 1* (*DMRT1*), importante para o desenvolvimento testicular em várias espécies. Em embriões machos, a MHM está hipermetilada e não é transcrita. No entanto, ela se encontra hipometilada no Z nas fêmeas. O objetivo deste estudo foi a utilização da PCR em tempo real (semiquantitativa) em substituição à PCR tradicional (qualitativa) no ensaio MHM, e a quantificação da metilação em tecidos de diferentes origens embrionárias (rins, gônadas e cérebro) em quatro animais adultos. Por meio do ensaio MHM modificado, foi possível sexar os animais e verificar que todos os tecidos provenientes dos machos se apresentaram hipermetilados, enquanto nas fêmeas, os tecidos estavam hipometilados. De acordo com as análises foi verificado que não existe associação entre a quantificação da metilação da região MHM com a origem embrionária do tecido estudado. A modificação no ensaio MHM mostrou-se eficaz e poderá ser utilizada em estudos de quantificação da metilação do DNA em larga escala. Espera-se uma contribuição para análises posteriores em aves para determinação sexual e compensação de dose.

Palavras chaves: aves; região MHM; PCR em tempo real; metilação; sexagem

ABSTRACT

Birds have a system of sex chromosomes ZW, wherein the females are heterogametic sex representatives (ZW) and males, the homogametic (ZZ). Although, it is quite known about the sex chromosomes of *Gallus gallus domesticus* and other birds, the process that determines sex in these animals is still being studied. In the XY system of mammals, one X chromosome is inactivated in females (XX), ensuring equivalent expression of X-specific genes in the two sexes. This process, known as dosage compensation, apparently doesn't occur in birds and, if it occurs, has peculiar characteristics: it doesn't involve the inactivation of an entire sex chromosome but specific portions of the chromosome Z. The region *Male hypermethylated* or MHM region is present in males over the short arm of chromosome Z in *G. domesticus*. This is a region differentially methylated, composed of *tandem* copies, encoding a ncRNA and mapped to the next the gene *locus Doublesexand Mab 3-Related Factor 1 (DMRT1),* important for testicular development in various species. In male embryos, the MHM is hypermethylated and isn't transcribed. However, it is hipomethylated in Z in female. The objective of this study was the use of real-time PCR (semi-quantitative) replacing the traditional PCR (qualitative) in the MHM *assay*, and the quantification of methylation in tissues of different embryonic origins (kidney, gonads and brain) in four adult animals. Through modified MHM *assay*, it was possible to sex animals and check that all of the tissue from males were hypermethylateds while in females the tissues were hipomethylateds. According to the analysis, it was verified that there isn´t association between the quantification of methylation MHM region and the embryonic origin of the tissue studied. The modification in MHM *assay* proved to be effective and may be used in quantification of DNA methylation studies on a large scale. It is expected to contribute to further analysis in birds for sex determination and dosage compensation.

Key words: birds; MHM region; Real-time PCR; methylation; sexing

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento embrionário de aves

A clivagem em aves ocorre de modo discoidal. Na clivagem discoidal em um ovo de galinha, os sulcos de clivagem não penetram no vitelo, sendo produzido um blastoderma formado por uma única camada de células. Clivagens equatoriais e verticais dividem o blastoderma em um tecido de cinco e seis camadas celulares. Entre o blastoderma e o vitelo existe uma cavidade subgerminal. O centro do blastodisco é a área pelúcida, enquanto as células da margem da área pelúcida, são conhecidas por área opaca. Enquanto a maioria das células estão na superfície, formando o epiblasto, algumas células migram para a cavidade subgerminativa, formando o hipoblasto primário e posteriormente um hipoblasto secundário é formado. O espaço entre as camadas (epiblasto e hipoblasto) encontra-se a blastocele. O mapa de destino para o embrião de aves é restrito ao epiblasto. As três camadas germinativas do embrião e uma quantidade de membrana extra-embrionária são formadas das células epiblásticas. A formação da linha primitiva é causada pelo ingresso de células do epiblasto para dentro da blastocele , assim como pela migração de células da região lateral do epiblasto posterior em direção ao centro. A linha primitiva marca o eixo ântero-posterior do embrião (GILBERT, 2000; GILBERT, 2003).

O crescente germinativo, células hipoblásticas na região anterior da área pelúcida, contém precursores das células germinativas, que depois migram pelos vasos sanguíneos até as gônadas. A formação do sistema urogenital é de origem mesodérmica intermediária. O coração é de origem mesodérmica da placa lateral, enquanto o cérebro, ectodérmica (GILBERT, 2000; GILBERT, 2003).

1.2 Determinação do sexo nas aves

As Aves apresentam um sistema de cromossomos sexuais ZW, sendo que as fêmeas são as representantes do sexo heterogamético (ZW) e os machos, do homogamético (ZZ). Apesar do sistema não ser totalmente compreendido, a morfologia dos cromossomos sexuais, de um modo geral, assemelha-se à dos cromossomos X e Y dos mamíferos, sendo que os cromossomos Z e o W podem variar de metacêntricos a

telocêntricos nas diferentes espécies (SMITH E SINCLAIR, 2001; CAETANO et al., 2014).

A maneira com que os processos de determinação sexual funcionam pode diferir enormemente, envolvendo tanto mecanismos genéticos, como no caso das aves e mamíferos (SMITH E SINCLAIR, 2004), quanto mecanismos "genético-ambientais", nos quais a temperatura do meio influencia a expressão gênica e determina o sexo, como em tartarugas e crocodilianos (PIEAU, 1996).

Os embriões de *Gallus gallus domesticus* –"galinha"- (Galliformes: Phaisianidae) tem sido considerados como excelentes modelos animais para o estudo do desenvolvimento dos vertebrados, graças ao seu rápido desenvolvimento e grande acessibilidade. Também começaram a receber uma atenção especial após a descoberta do gene testículo-determinante de mamíferos (*Sex-determining Region on Y-chromosome* ou *Sry*), o qual despertou grande interesse na busca de genes aviários com as mesmas características (CLINTON E HAINES, 1999; SMITH E SINCLAIR, 2004).

Embora se saiba bastante a respeito dos cromossomos sexuais de *Gallus gallus domesticus* e outras aves, o processo que determina o sexo nesses animais ainda permanece um mistério. No sistema XY de mamíferos, um cromossomo X é inativado nas fêmeas (XX), assegurando a expressão equivalente de genes X-específicos nos dois sexos (LYON, 1989; MIGEON, 1994). Esse processo, conhecido como compensação de dose, aparentemente não ocorre nas aves e, se ocorrer, possui características peculiares, não envolvendo a inativação de um cromossomo sexual inteiro e sim porções específicas do cromossomo Z.

No estudo de Itoh et al (2011), foi analisada a sequência MHM de galinhas, e através de técnicas como hibridização *in situ* fluorescente (FISH) na intérfase foram encontradas diferenças sexuais na compactação da cromatina, descondensada na fêmea (eucromatina) e condensada no macho (heterocromatina).

A expressão de alguns genes foram descritas pelo grupo (CAETANO et al 2014), antes, durante e após a diferenciação sexual gonadal de galinhas, como o *DMRT1*, *SOX3, SOX9, SCII* e a região MHM.

1.3 Região MHM

Uma região diferencialmente metilada em machos e fêmeas de *Gallus domesticus* foi descrita e mapeada próxima ao *locus* do gene *Doublesex and Mab-3 Related Factor 1* (*DMRT1*), importante para o desenvolvimento testicular em várias espécies. A região, com aproximadamente 460kb, foi denominada de "hipermetilada no macho" (*Male HyperMethylated*, MHM), estando localizada em Zp (braço curto do cromossomo Z). Em embriões machos, a MHM está hipermetilada e não é transcrita. No entanto, se encontra hipometilada no Z de embriões fêmeas sendo transcrita em um RNA não traduzido (ncRNA). O padrão de metilação não é tecido-específico (TERANISHI et al., 2001).

As marcações por metilação nesta região seriam estabelecidas após a fecundação. Em fêmeas, a hipometilação desta região leva à não repressão de genes cujos transcritos são RNAs não codificadores. Estes transcritos acumular-se-iam nas regiões adjacentes causando a repressão de genes importantes à determinação sexual como o gene *DMRT1* (TERANISHI et al., 2001).

A região MHM pode agir no desenvolvimento ovariano ou na supressão no desenvolvimento dos machos. O aumento da expressão da região MHM em fêmeas coincide com a diminuição da expressão de *DMRT1*, que poderia refletir no silenciamento pela MHM. Utilizando a PCR quantitativa, tem sido investigado a expressão da região MHM em diferentes tecidos e diferentes estados de desenvolvimento gonadal, sendo possível identificar correlações na expressão entre genes envolvendo a determinação sexual em vertebrados. Alguns pesquisadores acreditam na existência de mecanismos epigenéticos, talvez envolvendo ncRNAs na regulação do desenvolvimento gonadal e na determinação sexual nas aves (CAETANO et al, 2014).

A região MHM no cromossomo Z das galinhas é hipometilada e transcrita nas fêmeas (no único cromossomo Z das fêmeas), e hipermetilada e reprimida nos machos (nos dois cromossomos Z que eles possuem). Sendo assim, essa região foi denominada MHM - *Male HyperMethylated* (TERANISHI et al. 2001).

1.4 Gene *DMRT1*

Em 2014, outro trabalho do grupo avaliou a expressão da região MHM em relação ao gene *DMRT1*, em gônadas de embriões de galinha, em diferentes estágios do desenvolvimento (CAETANO et al., 2014).

O gene *DMRT1* tem sido alvo de estudos acerca da determinação sexual em seu papel no desenvolvimento dos testículos em aves. Em vários destes estudos é proposto que o gene *DMRT1* seja essencial à determinação do sexo masculino, responsável pelo desenvolvimento dos testículos (NANDA et al., 2000).

Em 2010, Zhao e colaboradores mostraram que as células somáticas possuíam uma identidade sexual autônoma, levando a acreditar que o gene *DMRT1* das aves seria fundamental no desenvolvimento dos testículos, mas não afirmando que ele seja um gene sexo determinante (ZHAO et al, 2010).

O gene *DMRT1* está mapeado no cromossomo Z em galinhas, mas não tem seu homólogo no cromossomo W (NANDA et al., 1999; RAYMOND et al., 1999; CAETANO et al, 2014). Através dos estudos do gene *DMRT1* no desenvolvimento gonadal de embriões de galinhas, foi possível observar sua expressão nos machos indicando devido aos elevados níveis de expressão nos testículos de adultos, a sua função na espermatogênese. Pelo que os estudos indicam, o gene *DMRT1* está envolvido na regulação da diferenciação testicular (CAETANO et al., 2014).

Os ncRNAs da região MHM provavelmente regulam a expressão de genes vizinhos, como o *DMRT1*, baseado nos estudos de Teranishi et al (2001) e Yang et al (2010). Em estudos, como de Zhao et al (2010), o gene foi designado como sendo um gene sexo determinante e baseado também nas análises de Caetano et al (2014), é possível notar a presença de mecanismos epigenéticos na regulação de *DMRT1* pela região MHM que envolvam a determinação sexual em *G. gallus*.

DMRT1 está envolvido com a determinação sexual em outras espécies de vertebrados, sendo sua dosagem importante.

Até mesmo na *Drosophila melanogaster* e no verme *Caenorhabditis elegans* existem genes equivalentes ao *DMRT1* que estejam envolvidos com a determinação sexual, estando relacionado com o comportamento dos machos durante o acasalamento, assim como na regulação da transcrição de certos genes e na diferenciação nos machos dos orgãos do sentido (RAYMOND et al., 2000; GRAVES, 2009).

Em humanos e ratos, o *DMRT1* é expresso no testículo após a expressão de *SOX9* (BAGHERI-FAM et al., 2010).

O fato do gene *DMRT1* ser um gene de determinação sexual nas aves fecha uma lacuna em relação à compreensão da organização assim como da evolução dos cromossomos sexuais em vertebrados, podendo ter este gene um antigo papel na determinação sexual deste grupo. Um exemplo é a sugestão de que *DMRT1* possa ter um papel antigo na determinação sexual de répteis (GRAVES, 2009; KAWAI et al., 2009).

1.5 Eventos epigenéticos

A herança epigenética está relacionada à função gênica que é herdada, mas não é acompanhada por alterações na seqüência do DNA (LI, 2002). Exemplos de eventos epigenéticos incluem a inativação do cromossomo X em mamíferos e o *imprinting* (marcação) genômico. Os mecanismos de epigênese mais bem estudados são a metilação da seqüência de DNA e a modificação das histonas, diferenciando a cromatina ativa da inativa. O acúmulo de RNAs não codificantes (ncRNA) também é considerado um evento epigenético (BIRD, 2002).

O desenvolvimento da embriogênese é controlado por mecanismos genéticos e epigenéticos. A regulação das estruturas da cromatina por metilação do DNA e modificação das histonas é importante para a programação do genoma durante a embriogênese e a gametogênese, assim como para a expressão de genes tecido-específicos e silenciamento de genes. Alterações na modificação da cromatina podem conduzir a desregulação dos processos de desenvolvimento, como a inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico. Compreender o processo de reprogramação epigenética no desenvolvimento é importante para os estudos de clonagem e aplicação clínica da terapia com células-tronco (LI, 2002).

Marcações epigenéticas pela modificação covalente do DNA e das histonas nucleares criam marcos que diferenciam entre cromatina ativa e inativa. Modificação da histona parece ser um mecanismo de regulação universal entre organismos eucarióticos. No entanto, metilação do DNA, apesar de menos conservada, podemos falar em um mecanismo comum e em rápida evolução entre os organismos eucarióticos superiores (LI, 2002).

1.6 Ensaio MHM

A presença de um padrão diferenciado de metilação nos machos e nas fêmeas permitiu o desenvolvimento de um ensaio para a sexagem de *G. domesticus* em nosso laboratório. Foi desenvolvido um teste de metilação, conhecido como ensaio MHM (MHM *assay)*, baseado na metilação diferencial da região MHM (Figuras 1 e 2). A avaliação do padrão de metilação da região MHM do DNA foi realizada com amostras de penas de ambos os sexos e demonstrou eficiência do ensaio com bons resultados, determinando com precisão o sexo dos animais. Para a realização da sexagem utilizou-se a técnica de digestão enzimática sensível a metilação e PCR. Todos os machos apresentaram hipermetilação da região MHM e as fêmeas, hipometilação. Os resultados foram visualizados originalmente em gel. Esse foi o primeiro estudo que utilizou a região MHM para sexagem de aves (CAETANO E RAMOS, 2008).

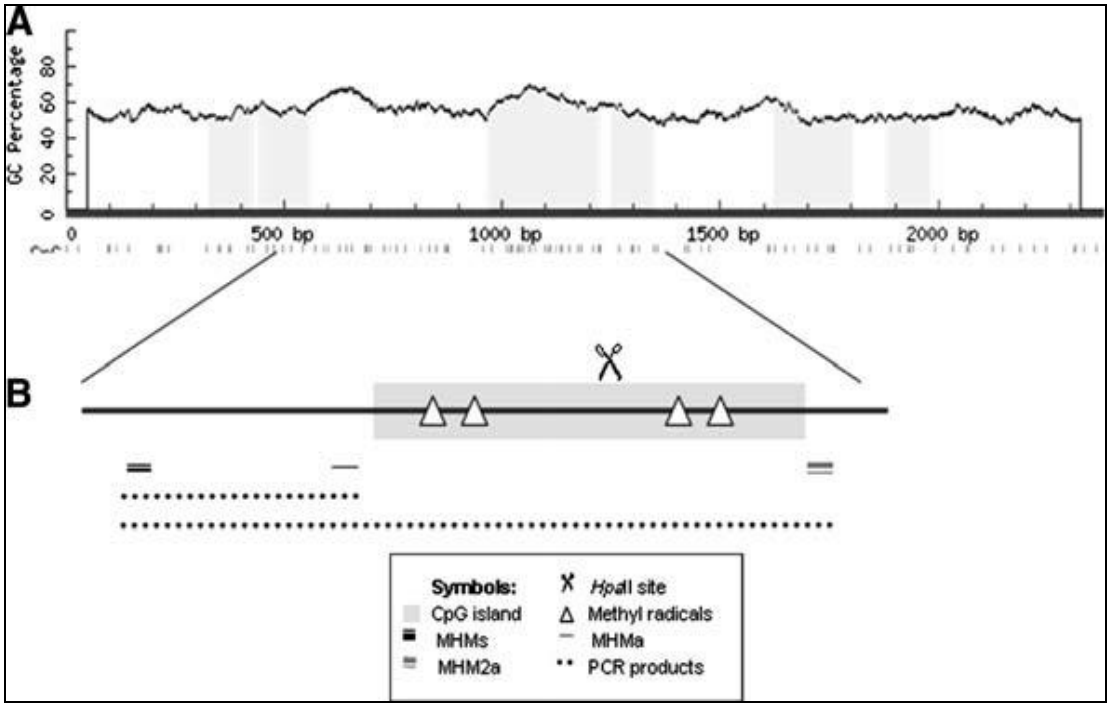

Figura 1: (A) Região MHM analisada pelo software MethPrimer com as ilhas CpG. (B) A sequência de DNA utilizada para estudo assim como os *primers* e os fragmentos amplificados pela PCR. (modificado de CAETANO E RAMOS, 2008).

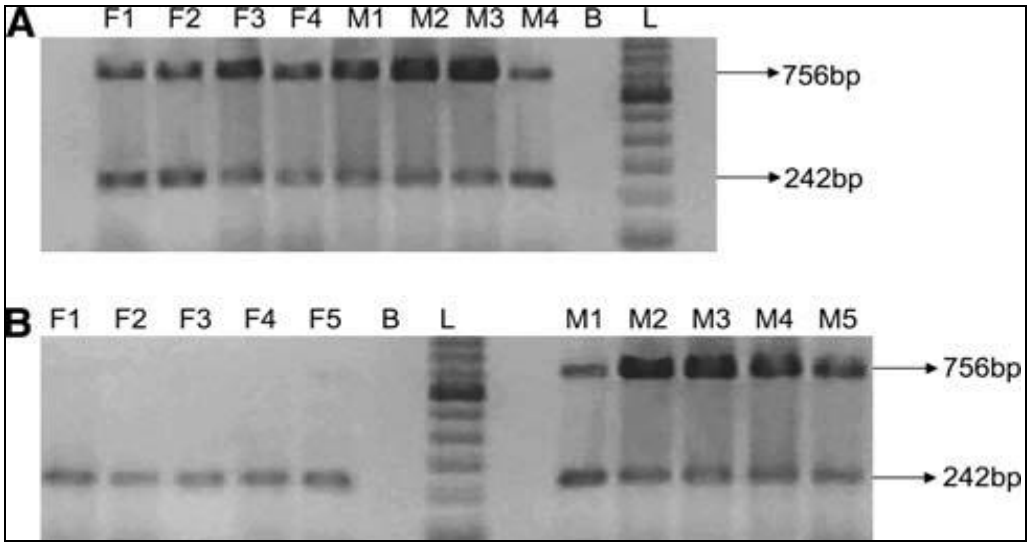

Figura 2: Ensaio MHM por PCR biplex da amostra de penas. (A) DNA não digerido, tanto de fêmeas (F) como machos (M). (B) Após digestão pela enzima HpaII. O fragmento de 756pb engloba a região MHM e possui sítio de restrição da enzima HpaII, sensível à metilação, enquanto o fragmento de 242pb funciona como controle de amplificação (Modificado de CAETANO E RAMOS, 2008).

Os resultados obtidos através do ensaio MHM após a digestão enzimática sensível a metilação e PCR multiplex mostrou que os sítios de restrição para a enzima HpaII nas ilhas CpG são hipometilados nas fêmeas e nos machos as sequências CCGG são hipermetiladas, não permitindo a clivagem do sítio e ocorrendo a amplificação do DNA.

1.7 Compensação de dose

Enquanto em *Drosophila, C. elegans* e mamíferos os processos que levam à compensação de dose envolvem grande parte do cromossomo sexual, em Aves a compensação de dose, se existir realmente, teria um comportamento particular, ocorrendo apenas em uma pequena região de Z (MELAMED E ARNOLD, 2007).

Alguns genes relacionados à compensação de dose em aves estão concentrados em uma região do braço curto do cromossomo Z, perto do *locus* MHM (*Male HyperMethylated*) (MELAMED E ARNOLD, 2007; ARNOLD et al., 2008; MANK E ELLEGREN, 2009; CAETANO et al., 2014).

Nas fêmeas, a expressão de MHM e a concentração do seu RNA próxima à seu *locus* de origem podem ser importantes para o seu desenvolvimento, assim como a presença de um mecanismo regulatório como o RNA *Xist* em mamíferos e o RNA *roX1*

e o RNA *roX2* em *Drosophila*. Estes são considerados exemplos de componentes transcritos de ncRNA como parte de mecanismos para compensação de dosagem de genes (CAETANO et al., 2014).

A expressão de *DMRT1* maior no macho (ZZ) do que na fêmea (ZW), pode refletir na compensação de dose, afetando a determinação sexual nas aves (RAYMOND et al., 1999; TERANISHI et al., 2001).

O gene *Xist* no cromossomo X inativo não é metilado, já quando o cromossomo X é ativo, o gene *Xist* é metilado. O gene *Xist* não metilado é transcrito em RNA *Xist*, que sofre *splicing* e é poliadelinado. A transcrição é ativada por factores expressos em células do sexo masculino durante a embriogênese e RNA *Xist* está em cis cobrindo o cromossomo X inativo (BROWN et al., 1991; BROCKDORFF et al., 1998; PANNING E JAENISCH 1998; WUTZ E JAENISCH, 2000; TERANISHI et al., 2001).

1.8 Identidade sexual autônoma das células somáticas

Na determinação sexual em mamíferos, os embriões são sexualmente indiferentes até a ação transitória de um gene que inicia a diferenciação gonadal (ZHAO et al., 2010). Apesar de já se saber a determinação por sexo gonadal ou morfológico.

No trabalho de Zhao et al. (2010) foram analisados exemplares de galinhas ginandromorfas laterais, evento no qual um lado do animal apresenta fenótipo masculino e o outro feminino. Apesar de ser raro, é natural sua ocorrência. Esse modelo permite a observação do mecanismo de determinação sexual das aves. Por meio de experimentos observou-se que os hormônios apresentam uma influencia mais limitada na determinação sexual das aves, pelo fato de que os lados mesmo sendo expostos pelos mesmos hormônios continuaram distintos. Logo, a identidade sexual das células somáticas de machos e fêmeas não são separadas. Esses autores demonstraram que as células somáticas das aves possuem uma identidade sexual inerente e que as células somáticas apresentam uma identidade sexual autônoma (Figura 3).

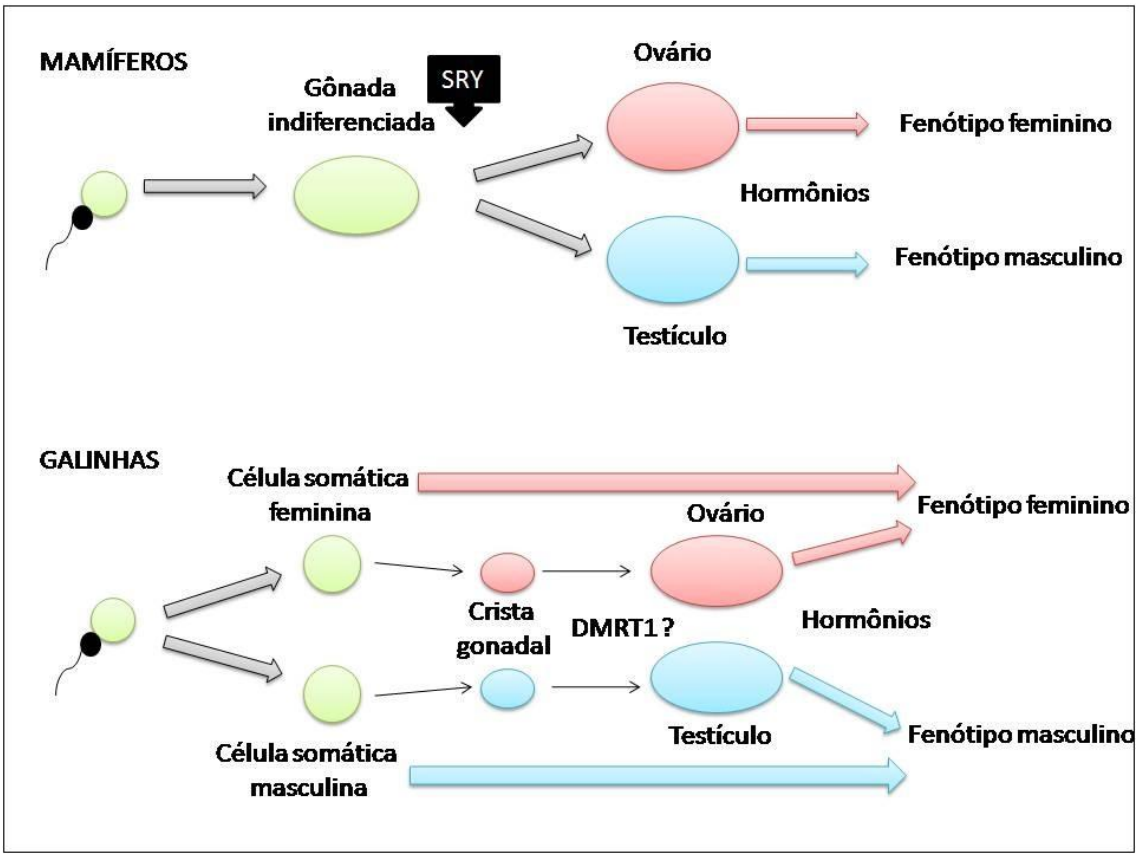

Figura 3: Mecanismo de determinação sexual nas galinhas comparado com o de mamíferos. As gônadas têm efeitos limitados sobre o fenótipo sexual. Em contraste, nos mamíferos, o destino gonadal é dependente da expressão transiente do gene testículo-determinante (o gene *SRY*) na gônada indiferente. As gônadas de mamíferos têm uma grande influência sobre o fenótipo sexual (modificado de ZHAO et al., 2010).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Utilização da PCR em tempo real em substituição à PCR tradicional para quantificação de metilação utilizando o ensaio MHM em diferentes tecidos.

2.2 Objetivos Específicos

Verificar o padrão de metilação da região MHM, de acordo com o sexo de animais adultos, por restrição enzimática sensível à metilação e PCR em tempo real.

Verificar se existe associação entre a quantificação da metilação da região MHM com a origem embrionária do tecido estudado.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (processo 075/2007) e pelo Comitê Interno de Biossegurança (CiBIO), aprovação em julho de 2007.

As amostras foram retiradas de quatro animais adultos, previamente selecionados e mortos por estrangulamento, realizando-se posteriormente a retirada dos órgãos.

Das amostras de tecidos armazenadas a -80°C provenientes de quatro indivíduos adultos, sendo dois machos e duas fêmeas, foram retirados os rins, cérebro e as gônadas. As amostras 1 e 3 correspondem à fêmeas e as amostras 2 e 4, os machos.

3.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA das amostras utilizou-se o protocolo original (OLERUP E ZETTERQUIST, 1992) adaptado para a utilização em tecidos.

As amostras que estavam mantidas a -80°C foram depois da adição de nitrogênio líquido, maceradas. Em um microtubo adicionou-se 450µl de solução de lise (0,32M de sucrose; 12,0 Mm tris HCL ph 7,5; 0,5 Mm $MgCl_{2;}$ 1% 100x Triton) ao tecido macerado e foi centrifugado a 13000 RPM por 20 segundos. Após eliminar o sobrenadante foi adicionado 1ml de solução de lise no microtubo e este foi levado à centrífuga a 13000 RPM por 20 segundos. Eliminou-se o sobrenadante e foi adicionado 1ml de água mili-Q para lavar o microtubo, sem remover o *pellet.* Depois de vertido e seco, adicionou-se a seguinte mistura aos tudos: 80µl de tampão de proteinase K; 0,375 de NaCl; 0,12M EDTA; 280µl de água mili-Q; 10µl de SDS 20%; 8µl de proteinase K 25mg/ml, completando 378µl. Depois de adicionar a mistura, os microtubos permaneceram por 3 horas em banho-Maria à 55°C.

Após 15 minutos na geladeira, foi adicionado 120µl de NaCl 5M, agitando por alguns segundos o tubo. Novamente passaram por centrifugação. Adicionou-se 1ml de etanol absoluto homogeneizando o material, e então foram colocados no freezer -85°C.

Transcorridos 15 minutos no freezer, os tubos foram centrifugados (à 0°C) por 10 minutos à 14000 RPM e colocados no freezer -20°C *overnight.* Depois foram centrifugados (à 0°C) por 10 minutos à 14000 RPM. A solução foi descartada tomando cuidado para não descartar o *pellet* e adicionado 1ml de etanol 70% gelado (-20°C).

Novamente centrifugação (à 0°C) por 10 minutos à 14000 RPM. O sobrenadante foi vertido e o tubo foi colocado aberto e invertido sobre o papel de filtro para secar. Logo, os tubos foram centrifugados a 45°C por 20 minutos no *Speed Vacum* (para secar as amostras). Após acrescentado aos tubos 50µl de água Mili-Q cobaltada e agitados, o *pellet* foi fragmento e dissolvido com auxílio da pipeta. E então foram colocados em banho-maria a 37°C por 1 hora e guardados no freezer a -20°C.

3.3 Quantificação

A quantificação das amostras foi realizada com o auxílio do espectofotômetro Nanodrop 2000. Foram analisadas as razões de absorbância de 260nm/280nm e 260nm/230nm, usadas como indicadoras de pureza das amostras (Tabelas 1-4).

Tabela 1: Resultado da quantificação das amostras referentes ao animal 1 (fêmea).

TECIDOS	DNA(ng/µl)	260/280	260/230
Gônada	409	1,95	2,06
Rim	541,5	1,91	2,21
Cérebro	386,6	1,97	2,06

Tabela 2: Resultado da quantificação das amostras referentes ao animal 2 (macho).

TECIDOS	DNA(ng/µl)	260/280	260/230
Gônada	3606,8	1,99	2,02
Rim	3538,1	1,95	2,04
Cérebro	1861,9	1,94	1,65

Tabela 3: Resultado da quantificação das amostras referentes ao animal 3 (fêmea).

TECIDOS	DNA(ng/µl)	260/280	260/230
Gônada	4357,2	1,96	1,84
Rim	4430,2	1,93	2,08
Cérebro	977,8	2,03	1,99

Tabela 4: Resultado da quantificação das amostras referentes ao animal 4 (macho).

TECIDOS	DNA(ng/µl)	260/280	260/230
Gônada	2289,5	1,94	1,91
Rim	4746,2	1,98	2,06
Cérebro	955,6	1,89	1,88

3.4 Diluição

Todas as amostras foram diluídas para uma concentração de 100ng/µl e então armazenadas em freezer a -20°C.

3.5 Digestão

As amostras com DNA de gônada, rim e cérebro foram submetidas à digestão enzimática pela enzima de restrição HpaII (enzimas New England), enzima sensível a metilação, para serem posteriormente comparadas com o material não digerido (mas com tampão da enzima) e com o digerido com a enzima MspI com o mesmo sítio de restrição da HpaII, mas não sensível a metilação. Para a digestão as concentrações utilizadas foram 1µl de enzima (HpaII- 10.000U/ml e MspI- 20.000U/ml), 2µl de tampão (10x), 15µl de água cobaltada e 2µl (100ng/µl) de DNA. A digestão foi realizada no termociclador BioRad, à 37°C, durante 12 horas (*overnight*).

3.6 Análises

O desenho dos *primers* para utilização na PCR foi realizado a partir da sequência identificada no Trabalho de Conclusão de Curso do aluno do laboratório Matheus Credendio Eiras (Figura 4).

As sequências *sense* e a *antisense* dos *primers* foram desenhados a partir da sequência mostrada na Figura 4. Elas serão disponibilizadas após a publicação do artigo científico.

..ACTGACAGGCCAAACGCTGACAACTCTGGCATGCAGACGTGACGCTGCTGTGGCTGCAGCTGCTCC
ACAGACCCGCACCTCTGGCCTGCCGCTCTGCCCGCTCACCAGCTGGCAAGGCTGCACAGAATGCG
GAATGCGTGCCGGGATGGGAAAAGTGCTGCAGGTGAAAAGAACCGGAACCTGCTGCCGATTGCTAT
TGCCCGGAAATAGGTGGGGCCATAACCGGAACTCCCTCCCACCTACCTACATAGGGAGGCGCCATT
TTGTTGGAGCCTGCGTTCCACTCTGAGGAGCCGCCATTTCATGCCACTCCGTACGCCACGTGGTTTT
CTACTGCTTAGGGCTTGGCTCCCTGGCTTTTTCTTTAGCTCCTTCATATTCCCAGGCCTCCCTCTGAC
TGCGTGCCCAATTCCCTTGCTCCGGGAAGTGCTCACATGACAAAACAGATCCATTCCTGCGCAGTCG
CACCGGGCAAAGGCGTCCCGGTGCTGGCGCTGGGGGCTTCCTCGTGTCTGGACACGGGGGTTTCT
GGGAGACCAGGCGGTACTTACGGGCGCTTTGGTCCCGAGCTAACCAGCTCCGCCGGCTCCACTTCT
CGGTTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAAGGATCTGATGGGAAATGCCTCGCCCTTTA
AGTGCGCCGCCTCTTGCCTTGTGGAAAGGCACAGACAACCAAGGGCAGTCCCGCCAGAGGGCTCC
ACTCATTTCCATCGTAGCGTTTGATACAGCCGTGGAA...

Figura 4: Região MHM em *Gallus gallus domesticus* utilizada para o desenho dos *primers*, que serão disponibilizados após a publicação do trabalho científico.

Para a realização dos testes com os *primers* foi utilizado dentro do programa NetPrimer, o software Beacon Designer. Esta análise mostra as temperaturas e possíveis combinações que podem ocorrer entre as sequências como *Hairpin* e *Dimer*. Na análise feita as temperaturas não mostraram diferenças significativas. Para a conversão da sequência em *antisense* foi utilizado o programa Reverse Complement. Depois os *primers* foram blastados no site do NCBI, apresentando uma boa especificidade no cromossomo Z.

Para a padronização da concentração de *primers*, da concentração de DNA e da temperatura foram realizados testes iniciais com a PCR *end Point* (tradicional). Esta padronização consistia em concentrações ideais para otimização da PCR nos diversos tecidos.

Primeiro foi realizada uma PCR *end Point* para a padronização da temperatura com um gradiente de 50°C a 60°C com as amostras de rins das aves 1 (fêmea adulta) e 2

(macho adulto). Para a PCR foi utilizado 18,1µl de água; 2,5µl de tampão (10x); 1µl de $MgCl_2$ (50mM); 0,2µl de dNTP (10Mm); 0,5µl de *primers* (10pmol) e 0,2µl de Taq DNA polimerase (5U/µl). A concentração de DNA utilizada foi 2µl (100ng/µl).

Com o intuito de otimizar a reação, foram realizadas outras PCRs, padronizando a temperatura e a concentração de *primer*, utilizando as mesmas amostras de rins das aves 1 (fêmea adulta) e 2 (macho adulto). A temperatura de 59°C, e as concentrações de *primers* de 0,3µl e 0,2µl foram as melhores.

Logo após, iniciaram os experimentos com a PCR em tempo real. Nos primeiros experimentos foi utilizada a amostra de cérebro do macho (4) para padronizar as concentrações de *primers*. As concentrações utilizadas de *primers* foram de 0,1µl; 0,2µl e 0,3 µl. Para o SYBR Green foi 5µl (2x) e o restante completado com água, um total de 9µl por poço. De amostra de DNA foi utilizado 1µl e depois 2µl quando utilizado com o produto da digestão. A ciclagem ocorreu da seguinte maneira: 10 minutos a 95°C, 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, gradiente de 1°C e 15 segundos a 95°C, sendo que as primeiras três temperaturas realizaram 30 ciclos. Após os experimentos, foi possível observar que a concentração de 0,2µl de *primer* foi melhor.

Para a digestão enzimática, foram utilizadas as enzimas HpaII e MspI, e amostras não digeridas para comparação. A reação de digestão foi 2µl de tampão(10x), 1µl de enzima (HpaII- 10.000U/ml e MspI-20.000U/ml), 15µl de água e 2µl de DNA. Na PCR utilizamos 2µl do produto da digestão, além de 5µl de SYBR Green (2x), 0,2µl de cada *primer* (10pmol) e 2,6 µl de água, totalizando 10µl. Foram realizadas algumas digestões para padronizar o tempo necessário para a reação, como de 5hs e *overnigh* (12hs), pois a enzima MspI necessitava de um tempo maior.

Após vários experimentos para padronização, foi possível prosseguir com os outros tecidos e os demais indivíduos (as duas fêmeas e os dois machos).

A análise foi realizada com a utilização do sistema de detecção de sequência SetpOne Real-Time PCR com SYBR Green PCR Master Mix.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

O resultado obtido na PCR *end point* para a padronização da temperatura pode ser visualizado pela eletroforese realizada (Figura 5).

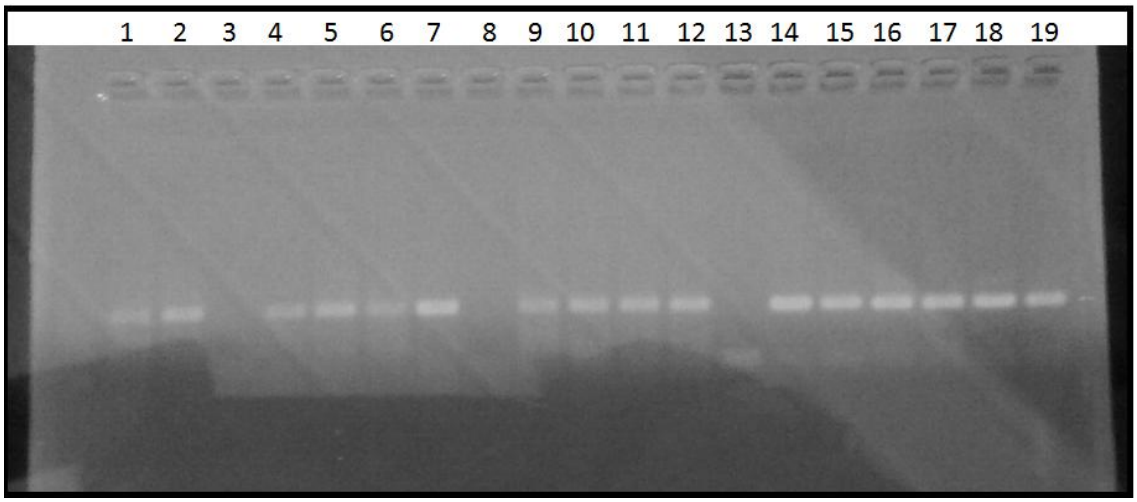

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 2% com o produto da PCR para gradiente de temperaturas. O poço 1 inicia-se com a temperatura de 60°C e diminui para 50°C no poço 19. Todas as temperaturas amplificaram, exceto as amostras de brancos (poços 3, 8 e 13).

Para verificar a especificidade da reação foi feito um gel de poliacrilamida, com o mesmo produto da PCR anterior (Figura 6).

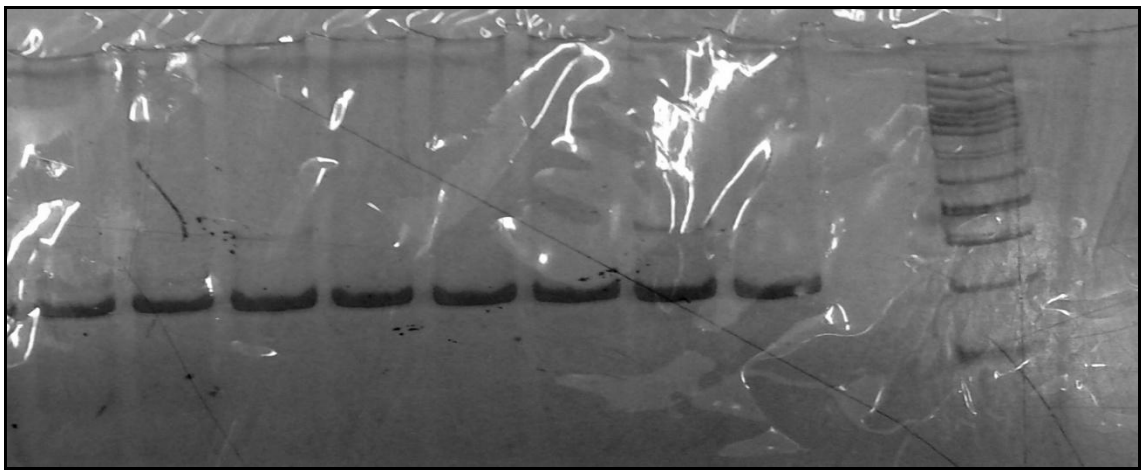

Figura 6: Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% com o produto da PCR para gradiente de temperaturas. Amplificação ocorreu em todas as temperaturas.

Todos os tecidos analisados provenientes do macho apresentaram a região MHM hipermetilada, pois o DNA da região em estudo está protegido contra a clivagem, devido à presença do radical metil ligado a citosinas de sequências CCGG (sítio de reconhecimento e clivagem da enzima HpaII). Enquanto os tecidos provenientes da fêmea apresentaram a região MHM hipometilada, pois o DNA referente à região foi digerido pela enzima de restrição.

Quando comparado os resultados com a enzima MspI (enzima que apresenta o mesmo sítio de restrição), que não é sensível a metilação, verifica-se que tanto o DNA dos tecidos do macho como os da fêmea foram digeridos.

Podemos observar os resultados no macho e na fêmea nos gráficos da curva de amplificação do DNA, gerados na PCR em tempo real (Figuras 7-15).

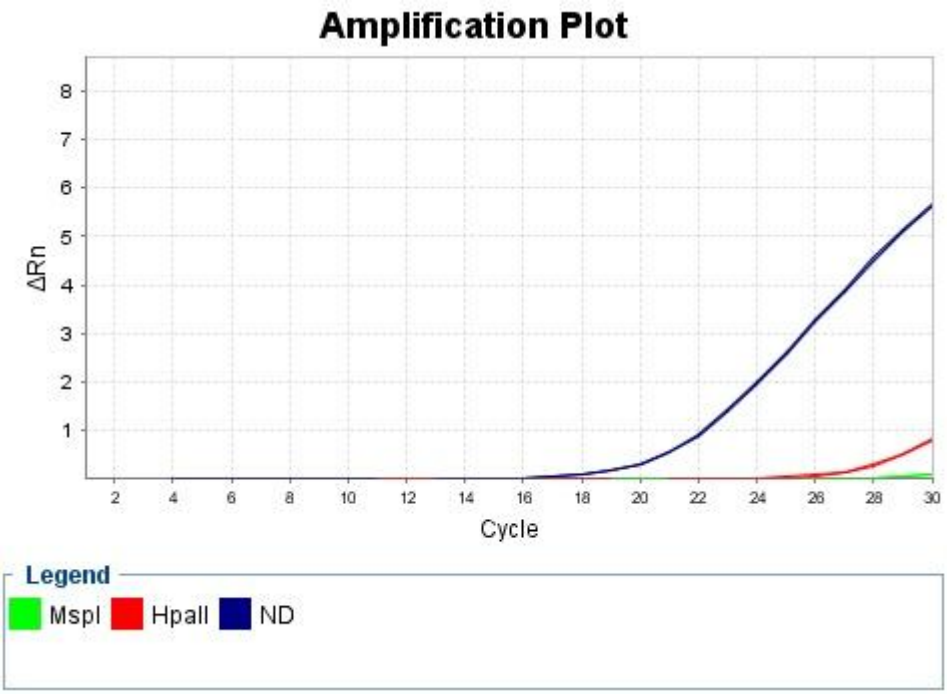

Figura 7: Curva de amplificação da amostra de cérebro da fêmea. A linha azul corresponde ao material não digerido, a linha vermelha ao DNA digerido com a enzima HpaII e a linha verde o DNA digerido com a enzima MspI.

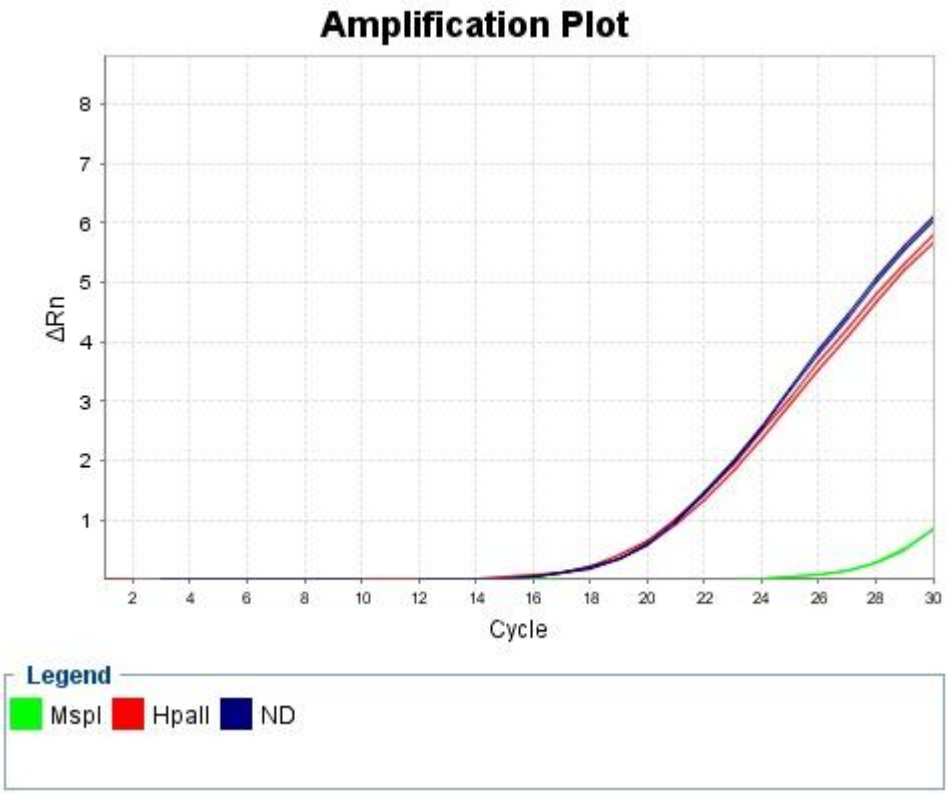

Figura 8: Curva de amplificação da amostra de gônada do macho. A linha azul corresponde ao material não digerido, a linha vermelha ao DNA digerido com a enzima HpaII e a linha verde o DNA digerido com a enzima MspI.

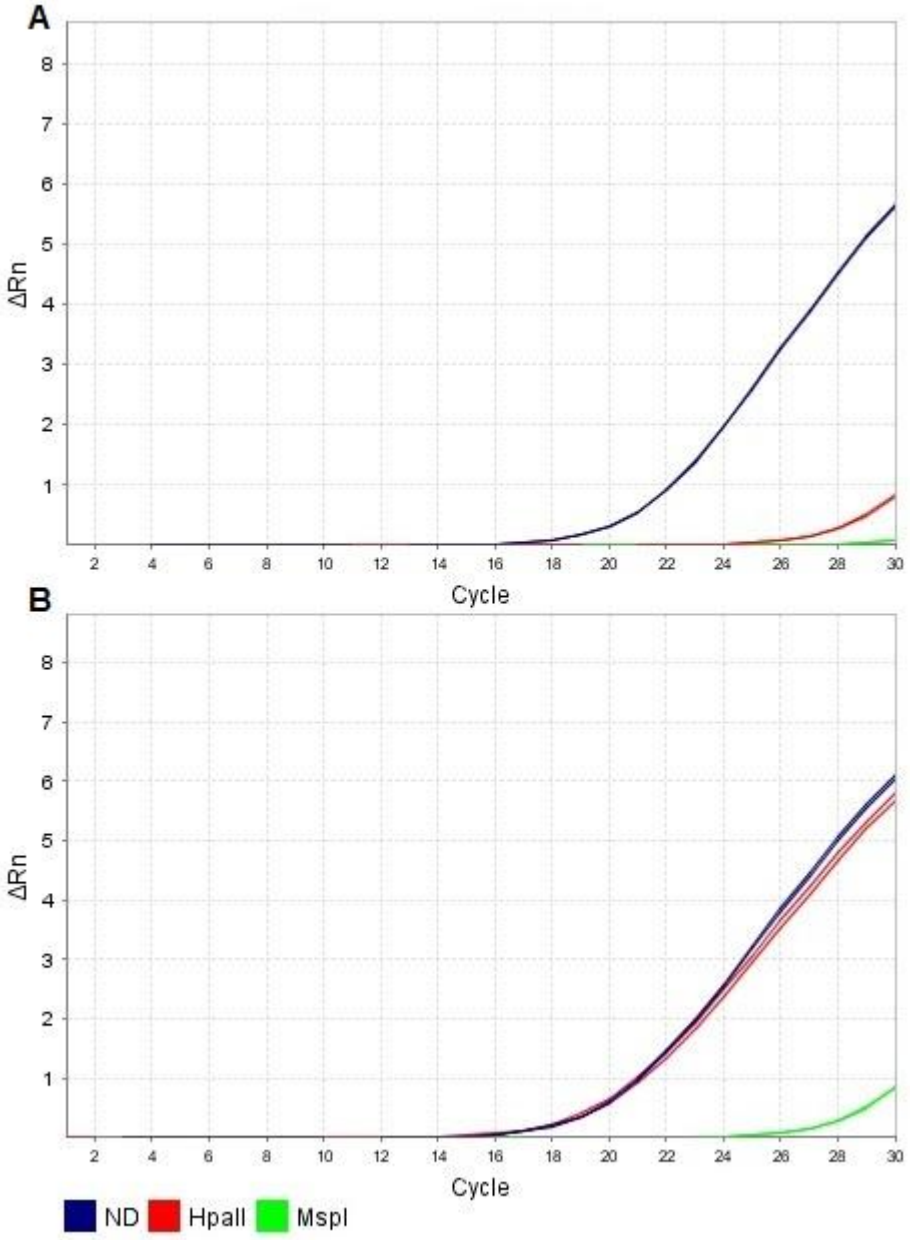

Figura 9: Comparação da curva de amplificação da amostra de cérebro da fêmea (A) e da amostra de gônada do macho (B). Amplificação na fêmea do material não digerido e no macho além da amplificação do material não digerido, o DNA digerido com a enzima HpaII também amplificou.

Através desta comparação, podemos observar de maneira mais nítida a diferença entre as curvas dos machos que apresentaram amplificação das amostras não digeridas e digeridas com HpaII, e das fêmeas que somente houve amplificação das amostras não digeridas.

A curva de *Melting* apresentou bons resultados, mostrando um pico de amplificação do DNA em torno de 87°C (Figura 16). A eficiência do *primer* foi de 94,7% pela curva padrão.

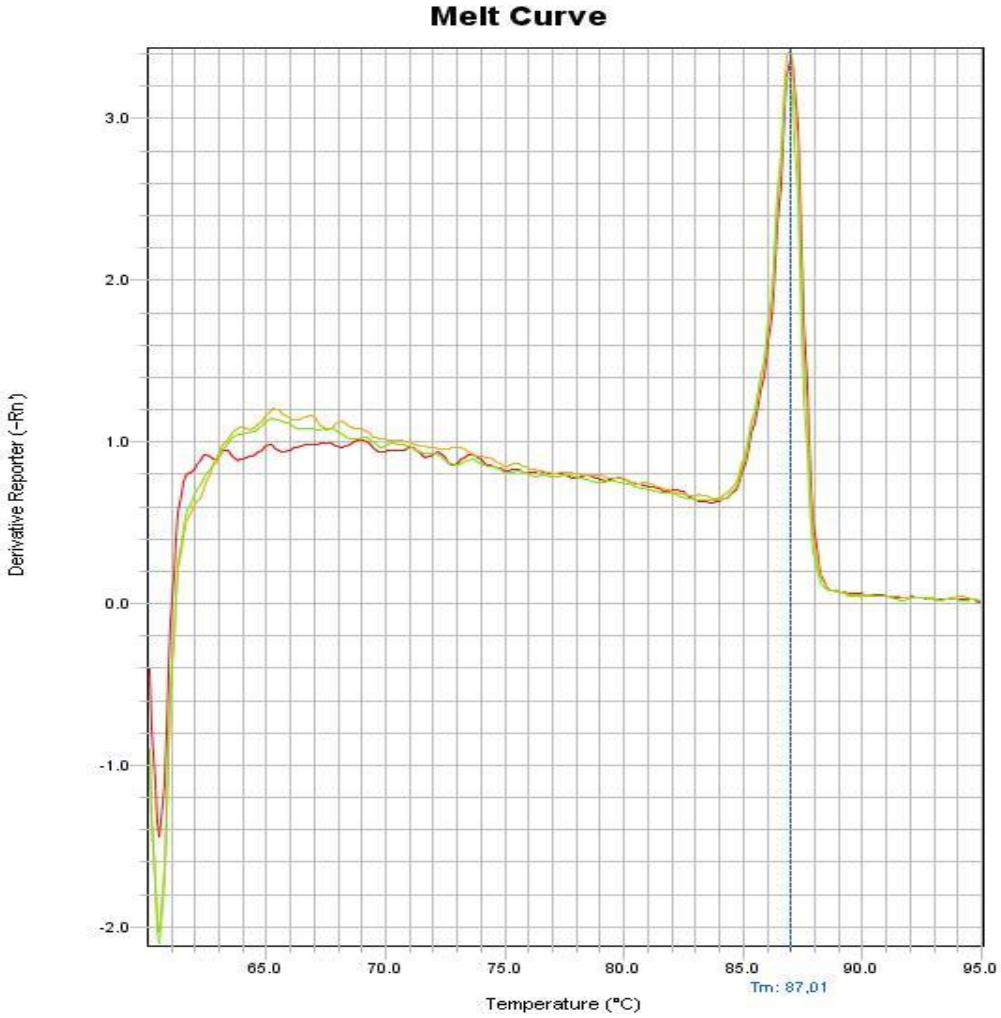

Figura 10: Curva de *Melting* da amostra de cérebro da fêmea. A temperatura de dissociação dos *primers* foi de aproximadamente 87°C.

De acordo com o princípio da PCR em amplificação exponencial da amostra, a porcentagem de DNA metilado foi quantificada relativamente ao DNA não digerido. A porcentagem de metilação da amostra foi calculada por $\frac{1}{2}^{n}$, onde n= número de ciclos, do qual foi obtido subtraindo à média C_T (média do *Cycle Threshold*) do DNA digerido pela média C_T do DNA não digerido (GOMES et al., 2007).

A porcentagem de metilação do macho deve estar próxima a 100% (hipermetilada), enquanto da fêmea, próxima a 1% (hipometilada). Os resultados dos tecidos analisados estão demonstrados abaixo (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5: Resultados da análise de metilação das amostras de fêmeas obtidos por meio da PCR em tempo real.

Tecido	Fêmeas	Médias do C_T	N	% Metilação
Cérebro	F1	18,67+/- 0,002	6,81	0,8
	F2	18,36+/- 0,28	8,12	0,4
Gônada	F1	20,11+/- 0,06	9,13	0,2
	F2	20,87+/- 0,11	6,63	1,0
Rins	F1	20,06+/- 0,06	6,57	1,0
	F2	20,08+/- 0,13	6,47	1,0

Tabela 6: Resultados da análise de metilação das amostras de machos obtidos por meio da PCR em tempo real.

Tecido	Macho	Médias do C_T	N	% Metilação
Cérebro	M1	17,15+/- 0,007	0,06	95,5
	M2	15,50+/- 0,32	-0,19	100
Gônada	M1	18,02+/- 0,10	-0,08	100
	M2	16,95+/- 0,04	-0,29	100
Rins	M1	18,32+/- 0,02	0,11	92,3
	M2	17,42+/- 0,02	0,06	95,5

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Em 2001 foi publicado o primeiro trabalho que relatou a existência da região MHM e a observação de seu padrão diferencial de metilação nos sexos (TERANISHI et al., 2001). A região MHM está mapeada no braço curto do cromossomo Z das galinhas e codifica um ncRNA que é expresso somente nas fêmeas.

O trabalho desenvolvido em nosso laboratório foi o primeiro estudo a empregar a região MHM para sexagem de aves utilizando PCR (CAETANO E RAMOS, 2008), analisando o DNA proveniente das penas. No entanto, este trabalho original, analisava o padrão de metilação da região MHM de maneira qualitativa através da PCR convencional.

Os resultados do trabalho atual mostraram-se compatíveis com aquele encontrado nas amostras de pena do trabalho anterior (ou seja, fêmea hipometilada e macho hipermetilado), nos tecidos analisados mesmo em tecidos de origens embrionárias diferentes, como rins, gônadas e cérebro. A região MHM é responsável pelo silenciamento do gene *DMRT1* em fêmeas, pois pelo fato de encontrar-se hipometilada permite a transcrição de um ncRNA que acumula-se no sítio de transcrição do gene *DMRT1*(impede a transcrição).

A região hipermetilada em macho (MHM), associada com a metilação do DNA dependente do sexo e da acetilação das histonas, codifica RNAs não-codificantes que são expressos exclusivamente no cromossomo Z nas fêmeas. A função dos ncRNAs em MHM é ainda pouco claro (YANG et al., 2010).

Nos machos, a região MHM encontra-se hipermetilada e desse maneira não tem o gene *DMRT1* silenciado pelo acúmulo de ncRNA em seu sítio de transcrição. Mas, foi demonstrado que esse gene (*DMRT1*) só é expresso em machos adultos, nas gônadas, estando inativo nos demais tecidos deste animal (SMITH et al., 2009). O padrão de metilação da região MHM é estabelecido após a fecundação, regulando a expressão de *DMRT1* nos estágios iniciais de desenvolvimento (TERANISHI et al., 2001). Pelo fato da região MHM encontrar-se hipometilada nas fêmeas, ocorrendo a transcrição de um ncRNA que acumula-se no sítio de transcrição do gene *DMRT1*, impedindo sua transcrição, esta região é vista como responsável pelo silenciamento do gene *DMRT1* nas fêmeas.

A expressão do gene *DMRT1* está presente em todos os tecidos do embrião de machos e em alguns tecidos da fêmea, mas o desenvolvimento da expressão deste gene no sexo feminino diminui, mantendo-se em um nível basal, já nos machos, o gene continua apresentando sua expressão aumentada nos tecidos. Em algum momento, essa expressão deve encerrar, permanecendo apenas nas gônadas dos machos adultos (CAETANO, 2005).

Os níveis elevados da expressão de *DMRT1* no testículo adulto poderiam indicar as funções de *DMRT1* na espermatogênese. Ou seja, *DMRT1* está provavelmente envolvido na regulação da diferenciação testicular. Foi detectado a expressão de MHM quase exclusivamente nos tecidos femininos. Nos tecidos gonadais masculinos não foi detectada a expressão de MHM, contrariando observações por CARÉ et al. (2011). Os tecidos mesonéfricos e cardíacos apresentaram níveis basais de transcrições MHM (CAETANO et al., 2014).

A expressão de MHM no sexo feminino, e seu acúmulo próximo ao seu *locus*, pode ser importante no desenvolvimento da fêmea e proporcionar um mecanismo regulador semelhante ao RNA *Xist* em mamíferos e para *roX1* e *roX2* em *Drosophila*, exemplos de componentes de transcrição de ncRNA como parte de mecanismos de compensação de dose (CAETANO et al., 2014).

Segundo Itoh et al., (2011), a região MHM, assim como a molécula de ncRNA, desempenham um papel importante no mecanismo de compensação de dose que aumenta a expressão de genes próximos a região MHM nas fêmeas.

Um equilíbrio na dosagem do gene é importante para o funcionameno e sobrevivência do organimso. Muitas espécies evoluíram esses mecanimos que equilibra a dose extra de genes no cromossomo X entre machos e fêmeas e entre o cromossomo X e os autossomos (MELAMED E ARNOLD, 2007).

Smith et al (1999), após seus experimentos, apoiam a a hipótese de que *DMRT1* é responsável na determinação sexual de galinhas , assim como de que este gene funciona por diferenças de dosagem entre machos e fêmeas.

Para Graves (2009), em aves, não há a presença do gene *SRY* e nem um gene para determinação de fêmeas no cromossomo W, deixando assim a determinação sexual das aves um pouco desconhecida.

Logo, podemos dizer que se a inativação de *DMRT1* relaciona-se a hipometilação da região MHM, todos os demais tecidos do macho deveriam estar hipometilados. Mas isso não ocorre segundo o estudo. Sendo assim podemos inferir a existência de algum

outro mecanismo que agiria mantendo todos os tecidos dos machos hipermetilados, o que nos instiga para mais questionamentos e investigações da importância da região.

O embrião de galinhas, como modelo *Gallus gallus,* tem sido um modelo clássico para estudo do desenvolvimento embrionário, devido a sua fácil manipulação (CAETANO et al., 2014).

Em *Gallus gallus,* a diferenciação da morfologia gonadal começa entre o dia 5.5 e 6.5 (HAMBURGER AND HAMILTON, 1992). O desenvolvimento gonadal de galinhas forneceu embasamento para a genética molecular da determinação sexual de vertebrados e como tudo tem evoluído (SMITH E SINCLAIR, 2004).

O desenvolvimento das gônadas em galinhas é assimétrico. A expressão gênica, a morfologia e desenvolvimento de células germinativas afetam a assimetria, sendo que apenas o ovário esquerdo se desenvolve em um órgão funcional, enquanto que o ovário direito permanece vestigial. Nos machos, ambas as gônadas são funcionais. A localização das células germinativas na gônada esquerda ou direita, no córtex ou na medula da gônada esquerda, e na parte central ou nas extremidades do córtex esquerdo tem conseqüências diretas para o seu desenvolvimento e participação na reprodução dos adultos (DE MELO BERNARDO et al., 2015).

A expressão dos genes descritos pelo trabalho de Caetano et al (2014) como já foi mencionado trouxeram informações importantes de diferenciação sexual através da análise do desenvolvimento gonadal em embriões de galinhas. O gene *SOX3* mostrou nos estudos de Caetano et al (2014) períodos de expressão no tecido gonadal de fêmeas e níveis basais em machos durante os estágios iniciais de desenvolvimento, sugerindo que a sua expressão nas gônadas de fêmeas pode ser importante para a diferenciação sexual. Esse padrão foi detectado no tecido mesonéfrico, mas não observado no tecido cardíaco.

A transcrição de *SOX9* foi encontrada tanto no tecido gonadal de fêmeas como de machos. O gene *SOX9* é expresso durante o desenvolvimento testicular em aves, anfíbios e peixes. Assim como o *SRY,* este gene tem sido um elemento conservado na determinação sexual de vertebrados, controlando a diferenciação das células de Sertoli (SMITH E SINCLAIR, 2001). Logo a expressão de *SOX9* nas aves pode ser importante para o desenvolvimento testicular (CAETANO et al., 2014).

A expressão de *SCII* sugere que esteja relacionado com o desenvolvimento gonadal na determinação sexual e que não esteja somente relacionado à diferenciação

testicular, mas possivelmente também com o desenvolvimento ovariano (McQUEEN et al., 2001; CAETANO et al., 2014).

Vale ressaltar que mesmo antes da diferenciação gonadal, a expressão média do gene Z, em galinhas, é por volta de 1,4 a 1,6 vezes maiores nos machos do que nas fêmeas (ITOH et al., 2007; ARNOLD et al., 2008; ZHANG et al., 2010; ITOH et al., 2011).

A origem das células germinativas, progenitores das gônadas, é extra-embrionário em galinhas e são encontradas no desenvolvimento de ilhas de sangue em uma região do saco vitelino anterior à cabeça (HAMBURGER E HAMILTON, 1992). Depois migram através da corrente sanguínea, ligando-se ao embrião através das veias vitelinas anteriores (DE MELO BERNARDO et al., 2012). As células germinativas primordiais se transportam através da vasculatura embrionária para chegar as cristas gonadais. Após a colonização de ambas as cristas, esquerda e direita, esta região embrionária sofre diferenciação morfológica sexual, se desenvolvendo em testículo ou ovário. Enquanto nos machos ambas as gônadas se desenvolvem em testículos funcionais, nas fêmeas somente a gônada esquerda se desenvolve em um ovário funcional (ZACCANTI et al., 1990; SMITH E SINCLAIR, 2004; DE MELO BERNARDO et al, 2015).

Antes de sinais de diferenciação sexual, o número das células germinais existentes nas cristas gonadais exibe uma distribuição assimétrica, independente de qual seja o sexo, com preferência para o lado esquerdo. Durante a diferenciação sexual, nas fêmeas pode–se observar diferenças entre as gônadas esquerda e direita (SMITH E SINCLAIR, 2004; DE MELO BERNARDO et al., 2015).

Desde que Aristóteles "descobriu" o embrião de galinha como o ideal objeto de estudos embriológicos, os embriões foram descrito em termos da duração do tempo de incubação, e este método é ainda arbitrário em uso geral, exceto para o primeiros três dias de incubação, durante o qual mais detalhada características, tais como os números de somitos são aplicados (HAMBURGER E HAMILTON, 1992).

Em embriões de galinha, diferenças iniciais entre os sexos têm sido encontradas. Nas fêmeas as células germinativas foram maiores e aumentou em número mais cedo do que nos machos. A observação da diferenciação das células germinativas em fêmeas sugere diferenças morfo-funcionais precoces entre as células germinativas de machos e fêmeas (ZACCANTI et al., 1990).

A gonadogênese é um processo que pode ser considerado como conservado e o caminho da determinação sexual é pensado para ser compartilhado entre mamíferos, aves, e outros grupos (GRAVES, 1998; CAETANO et al., 2014).

Como pode-se observar nos resultados, a origem embrionária dos tecidos estudados para análise do padrão de metilação, não demonstrou interferência nos resultados. A origem embrionária das gônadas, rins e cérebro, mesmo sendo distintas, os tecidos mantiveram um padrão igual. O sistema urogenital, de origem mesodérmica intermediária, apresentou o mesmo resultado do tecido de cérebro. Através disso, talvez podemos inferir que o padrão diferencial de metilação esteja realmente associado ao sexo dos embriões. As diferenças na formação das gônadas, a expressão de genes não equivalentes nos sexos, como exemplo o gene *DMRT1*, assim como outros que devam existir, fazem parte da determinação sexual de alguma forma. Assim como afirma Teranishi et al (2001), padrão de metilação não é tecido-específico. Caetano et al. (2014) acreditam na existência de mecanismos epigenéticos, talvez envolvendo ncRNAs, na regulação do desenvolvimento gonadal e na determinação sexual nas aves.

No trabalho atual, foi possível uma avaliação semi-quantitativa da metilação do DNA, de forma rápida e relativamente barata, o que pode facilitar pesquisa em maior escala de animais, tecidos e embriões de galinha.

Com base nas descobertas anteriores citadas assim como nos resultados do presente trabalho, espera-se uma contribuição para análises posteriores na determinação sexual de aves, compensação de dose e estudos para sexagem. Devido à importância da região MHM nos mecanismos de compensação de dose, podemos falar na possibilidade dela estar conservada entre as espécies dos diferentes grupos de aves.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÃO

A utilização de PCR em tempo real pode substituir com êxito a PCR convencional no ensaio de MHM, possibilitando, adicionalmente, a quantificação da metilação do DNA.

Foi verificado o padrão de metilação da região MHM, ao qual correspondeu ao sexo de animais adultos (hipermetilado em machos e hipometilado em fêmeas), por meio de restrição enzimática sensível à metilação e PCR em tempo real.

Foi verificado que não havia diferença entre a quantificação da metilação do DNA da região MHM em tecidos com diferentes origens embrionárias em um mesmo animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNOLD AP; ITOH Y; MELAMED E. A bird's-eye view of sex chromosome dosage compensation. Annu Rev Genomics Hum Genet (2008) 9:109–127.

BAGHERI-FAM S; SINCLAIR AH; KOOPMAN P; HARLEY VR. Conserved regulatory modules in the Sox9 testis-specific enhancer predict roles for SOX, TCF/LEF, Forkhead, DMRT, and GATA proteins in vertebrate sex determination. Int. J. Biochem. Cell Biol (2010) 42: 472-477.

BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. Genes Dev. (2002) 16:6-21.

BROCKDORFF N; ASHWORTH A; KAY GF; MCCABE VM; NORRIS DP; COOPER PJ; SWIFT S; RASTAN S. The product of themouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specifc transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. Cell (1992) 71: 515-526.

BROWN CJ; BALLABIO A; RUPERT JL; LAFRENIERE RG; GROMPE M; TONLORENZI R; WILLARD HF. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. Nature (1991) 349: 38-44.

CAETANO LC. Epigenética e sexagem: Padrão de metilação da região MHM em *Gallus gallus domesticus.* Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências (2005).

CAETANO LC; RAMOS ES. MHM assay: molecular sexing based on the sex-specific methylation pattern of the MHM region in chickens. Conservation Genetics (2008) 9:985-987.

CAETANO LC; GENNARO FG; COELHO K; ARAÚJO FM; VILA RA; ARAÚJO A; DE MELO BERNARDO A; MARCONDES CR; CHUVA DE SOUSA LOPES SM; RAMOS ES. Differential expression of de MHM region and of sex-determining-related genes during gonadal development in chicken embryos. Genet Mol Res (2014) 13(1):838-49.

CARRÉ GA; COUTY I; HENNEQUET-ANTIER C; GOVOROUN MS. Gene expression profiling reveals new potential players of gonad differentiation in the chicken embryo. PLoS One (2011) 6: e23959.

CLINTON M; HAINES LC. An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. Cell Mol Life Sci (1999) 55:876-86.

DE MELO BERNARDO A; SPRENKELS K; RODRIGUES G; NOCE T; CHUVA DE SOUSA LOPES SM. Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation. Biol Open (2012) 1:1146-1152.

DE MELLO BERNADO A; HEEREN AM; VAN IPEREN L; FERNANDES MG; HE N; ANJIE S; NOCE T; RAMOS ES; DE SOUSA LOPES SM. Meiotic wave adds extra asymmetry to the development of female chicken gonads. Mol Reprod Dev (2015) 9999: 1-13.

GOMES MV; GOMES CC; PINTO W JR; RAMOS ES. Methylation pattern at the KvDMR in a child with beckwith-wiedemann syndrome conceived by ICSI. American Journal of Medical Genetics Part A (2007) 143A: 625-629.

GRAVES JA. Interactions between SRY and SOX genes in mammalian sex determination. Bioessays (1998) 20: 264-269.

GRAVES JA. Sex determination: Birds do it with a Z gene. Nature (2009) 461: 177-178.

HAMBURGER V, HAMILTON HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. Dev Dyn (1992) 195:231-272.

ITOH Y; KAMPF K; ARNOLD AP. Possible differences in the two Z chromosomes in male chickens and evolution of MHM sequences in Galliformes. Chromosoma (2011) 120:587–598.

ITOH Y; MELAMED E; YANG X; KAMPF K; WANG S; YEHYA N; VAN NAS A; REPLOGLE K; BAND MR; CLAYTON DF; SCHADT EE; LUSIS AJ; ARNOLD AP. Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. J Biol (2007) 6:2.

KAWAI A; ISHIJIMA J; NISHIDA C; KOSAKA A; OTA H; KOHNO S; MATSUDA Y. The ZW sex chromosomes of Gekko hokouensis (Gekkonidae, Squamata) represent highly conserved homology with those of avian species. Chromosoma (2009) 118:43–51.

LI E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nature Reviews in Genetics (2002) 3:662–673.

LYON MF. X-chromosome inactivation as a system of gene dosage compensation to regulate gene-expression. Prog Nucleic Acid Res MolBiol (1989) 36:119-30.

MANK JE; ELLEGREN H. All dosage compensation is local: gene-by-gene regulation of sex-biased expression on the chicken Z chromosome. Heredity (2009) 102(3):312–320.

McQUEEN H; McBRIDE D; MIELE G; BIRD AP; CLINTON M. Dosage compensation in birds. Curr Biol (2001) 11:253–257.

MELAMED E; ARNOLD PA. Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome. Genome Biology (2007) 8:R202.

MIGEON BR. X-chromosome inactivation - molecular and genetic consequences. Trends Genet (1994) 10:230-235.

NANDA I; SHAN Z; SCHARTL M; BURT DW; KOEHLER M; NOTHWANG H; GRÜTZNER F; PATON IR; WINDSOR D; DUNN I; ENGEL W; STAEHELI P; MIZUNO S; HAAF T; SCHMID M. 300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9. Nature Genet (1999) 21:258–259.

NANDA I; ZEND-AJUSCH E; SHAN Z; GRÜTZNER F; SCHARTL M; BURT DW; KOEHLER M; FOWLER VM; GOODWIN G; SCHNEIDER WJ; MIZUNO S; DECHANT G; HAAF T; SCHMID M. Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. Cytogenet Cell Genet (2000) 89:67-78.

OLERUP O; ZETTERQUIST H. 1992. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. Tissue Antigens. (1992) 39(5), p. 225-35.

PANNING B; JAENISCH R. RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. Cell (1998) 93: 305-308.

PIEAU C. Temperature variation and sex determination in reptiles. Bioessays (1996) 18:19- 26.

RAYMOND CS; KETTLEWELL JR; HIRSCH B; BARDWELL VJ; ZARKOWER D. Expression of Dmrt1 in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. Dev Biol (1999) 215:208–220.

RAYMOND CS; MURPHY MW; O'SULLIVAN MG; BARDWELL VJ; ZARKOWER D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. Genes Dev (2000) 14: 2587–2595.

SMITH CA; MCCLIVE PJ; WESTERN PS; REED KJ; SINCLAIR AH. Conservation of a sex-determining gene. Nature (1999) 402:601-602.

SMITH CA; SINCLAIR AH. Sex determination in the chicken embryo. J. Exp. Zool (2001) 290:691–699.

SMITH CA; SINCLAIR AH. Sex determination: insights from the chicken. BioEssays (2004) 26:12032.

SMITH CA; ROESZLER KN; OHNESORG T; CUMMINS DM; FARLIE PG; DORAN TJ; SINCLAIR AH. The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. Nature (2009) 461:267–271.

TERANISHI M; SHIMADA Y; HORI T; NAKABAYASHI O; KIKUCHI T; MACLEOD T; PYM R; SHELDON B; SOLOVEI I; MACGREGOR H; MIZUNO S. Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the DMRT1 locus. Chromosome Res (2001) 9:147-165.

WUTZ A; JAENISCH R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. Mol Cell (2000) 5: 695-705.

ZACCANTI F, VALLISNERI M, QUAGLIA A. Early aspects of sex differentiation in the gonads of chick embryos. Differentiation (1990) 43:71-80.

ZHAO D; McBRIDE D. Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. Nature (2010) 464:237-243.

ZHANG SO; MATHUR S; HATTEM G; TASSY O; POURGUIE O. Sexdimorphic gene expression and ineffective dosage compensation of Z-linked genes in gastrulating chicken embryos. BMC Genomics (2010) 11:13.

YANG X; ZHENG J; XU G; QU L; CHEN S; LI J; YANG N. Exogenous cMHM regulates the expression of DMRT1 an ER α in avian teste. Molecular Biology Reports (2010) 37:1841-1847.