



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X EM
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

ALLICE RODRIGUES FERREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X EM
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Alice Rodrigues Ferreira

Orientador: Maurício Machaim Franco

Dissertação de Mestrado em Ciências Animais

PUBLICAÇÃO: 023/2009

BRASÍLIA/DF
DEZEMBRO DE 2009

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FERREIRA, A.R. **Estabelecimento do padrão de inativação do cromossomo X em embriões bovinos produzidos *in vitro*** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 51p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

FERREIRA, Allice Rodrigues. **Estabelecimento do padrão de inativação do cromossomo X em embriões bovinos produzidos *in vitro***. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 51p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

1. PIV. 2. Embrião. 3. *Bos taurus*. 4. PCR-RFLP. 5. Epigenética.

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

**ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X EM
EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

ALLICE RODRIGUES FERREIRA

**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:

**MAURÍCIO MACHAIM FRANCO, Doutorado (EMBRAPA RECURSOS
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA)
(ORIENTADOR)**

**JAIRO PEREIRA NEVES, PhD (FAV-UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**MÁRCIO JOSÉ POÇAS FONSECA, Pós Doutorado (INSTITUTO DE CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS / DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E MORFOLOGIA- UnB)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 15 de DEZEMBRO de 2009

Dedico a meus pais Léo e Marina, e a minha irmã Alinne. Alicerce para todas as minhas conquistas.

“Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos as decisões certas, na hora exata, e ficamos surpresos com nossa própria capacidade quando atingimos o nosso objetivo.”

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e combustível diário.

A meus pais, por entenderem minha ausência, e fazer dos meus sonhos os seus.

A minha irmã querida, a quem tenho amor incondicional, só devo gratidão a seu apoio.

Ao meu namorado George, pela paciência e companheirismo.

As minhas amigas Anna Carolina, Isabela Bessa, Marcela Duarte, Robertha Lemes e Tatiana Campos que sempre estiveram presentes e me incentivaram a conquistar meus objetivos.

Ao orientador Maurício Machaim Franco, pela oportunidade concedida e credibilidade. Exemplo de profissional e ser humano de caráter exemplar a quem tenho grande admiração. Despertou-me o gosto pela ciência e me fez entender a importância da ética e do respeito no ambiente de trabalho.

Aos amigos Grazieli Marinheiro, José Carvalho, Juliana Azevedo e Tiago Diesel, foram essenciais para conclusão do meu experimento.

A amiga Ester Caixeta, sempre prestativa e paciente, meu carinho e agradecimento pelo tempo dispensado em me ajudar.

Aos pesquisadores Margot Dode, Eduardo Melo, Roberto Sartori, Rodolfo Rumpf, Ricardo Alamino e ao técnico Regivaldo Vieira de Souza; colaboraram para que fosse possível a realização do meu trabalho.

Agradeço em especial ao Dr. Márcio Poças, Dra. Margot Dode e Dr. Jairo Neves por fazerem parte da banca, e pelas correções e sugestões que engrandeceram este trabalho.

A equipe da Fazenda Sucupira, todos os funcionários e estagiários que participaram deste experimento durante a etapa de produção dos embriões.

Aos colegas de mestrado e estagiários que pude desfrutar da convivência diária, que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste experimento: Ana Cláudia Valeriano, Andrei Fidelis, Angelo, Emivaldo Siqueira, Fernanda Paulini, Fernanda Rodrigues, Flávia Tuany, Gabriela Almeida, Heitor Teixeira, Luis Fernando, Mariana Caixeta, Monique Guardieiro, Nádia Fagundes, Pablo Rua, Rafael (BT), Rosana Nishimura, Valquíria Lacerda, Werner Glanzner.

Aos funcionários da EMBRAPA pelo apoio durante o desenvolvimento do projeto.

À EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia e CNPq pelo suporte e pela bolsa concedida.

Agradeço a bolsa oferecida pelo Programa de Cooperação CAPES/PROCAD Novas Fronteiras 2007, celebrado entre o Programa de Pós Graduação em Ciências Animais (UnB) e o Programa de Pós Graduação em Ciência Animal (UFMG).

Agradeço a Universidade de Brasília pelo curso oferecido.

ÍNDICE

| Capítulos/Subcapítulos | Página |
|--|--------|
| LISTA DE FIGURAS | x |
| LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES | xii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xvi |
| CAPÍTULO 1 | |
| 1 INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1 OBJETIVO | 03 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 04 |
| 2.1 EPIGENÉTICA | 04 |
| 2.2 METILAÇÃO DO DNA | 04 |
| 2.3 <i>IMPRINTING</i> GENÔMICO | 06 |
| 2.4 MODIFICAÇÃO PÓS TRADUCIONAIS DAS HISTONAS | 07 |
| 2.5 INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X | 08 |
| 2.5.1 GENE MAO-A | 13 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 15 |
| CAPÍTULO 2 | 24 |
| 1 RESUMO | 25 |
| 2 ABSTRACT | 27 |
| 3 INTRODUÇÃO | 28 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 31 |
| 4.2 EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DO GENE MAO-A PARA SELEÇÃO DOS ANIMAIS | 32 |
| 4.3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES | 34 |
| 4.3.1 RECUPERAÇÃO DE OVÓCITOS E MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> | 34 |
| 4.3.2 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> E CULTIVO DE EMBRIÕES | 36 |
| 4.4 EXTRAÇÃO DE RNA E TRANSCRIÇÃO REVERSA | 36 |
| 4.5 RT-PCR-RFLP PARA O GENE MAO A | 37 |
| 4.6 SEQUENCIAMENTO DO GENE MAO A | 38 |
| 4.7 ANÁLISE DESCRITIVA | 39 |
| 5 RESULTADO E DISCUSSÃO | 40 |
| 5.1 RESULTADOS | 40 |
| 5.2 DISCUSSÃO | 42 |
| 6. CONCLUSÕES | 47 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 48 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | | Página |
|-------------------|---|---------------|
| Capítulo 2 | | |
| Figura 2.1. | Figura 1. Esquema do delineamento experimental. D=dia; MO= mórula; BI= blastocisto; Bx= blastocisto expandido. | 33 |
| Figura 2.2. | Análise eletroforética em gel de eletroforese 3,0% corado com brometo de etídeo, mostrando os dados da genotipagem para o gene MAO-A. Genótipos: AA- Nelore (106 pb), GG- Holandês (83 pb) e AG- Animal Controle Heterozigoto (106 pb e 83 pb). | 34 |
| Figura 2.3. | Figura 2.3. Foto ilustrativa apresentando a classificação de Complexos Cumulus Ovócitos (COCs). A- Ovócito de grau I, com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas compactas de células do cumulus; B- Ovócito de grau II, citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, cumulus compacto menor que no grau I; C- Ovócito grau III, com citoplasma heterogêneo, e células do cumulus com pequenas áreas desnudas; D- Ovócito grau IV, citoplasma heterogeneamente pigmentado, apresentado vários vacúolos e o cumulus parcialmente ausente. Fonte: Caixeta & Dode (2008). | 36 |
| Figura 2.4. | Embriões em estágio de: A- 4 células (44 horas pi); B- 8-16 células (72 horas pi); C- mórula (144 horas pi); D- blastocisto (156 horas pi); E- blastocisto expandido(168 horas pi). Fonte: Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. | 38 |
| Figura 2.5. | Análise eletroforética em gel de eletroforese 3,0% corado com brometo de etídeo, mostrando os dados da fenotipagem para o gene MAO-A. A – PCR-RFLP utilizando DNA controle mostrando os genótipos: AA (106 pb), GG (83 pb) e AG (106 pb e 83 pb). B – produto de RT-PCR-RFLP de embriões de 4 células (alelos A e G); C - 8-16 células (alelos A e G); D - Mórula (alelo A); E - Blastocisto (alelos A e G); F- Blastocisto Expandido (alelos A e G). Fragmento de 23 pb não é visualizado no gel. | 42 |

- Figura 2.6. Análise eletroforética em gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo mostrando produto de amplificação do gene MAO-A (106pb) por RT-PCR. Linha 1: marcador de 100pb; linha 2: do sêmen sexado para fêmea utilizado na FIV; linha 3: ovócitos maturados. 43
- Figura 2.7. Cromatograma de parte da sequência do gene MAO-A (nucleotídeos 1855 a1862 - *GenBank* número NM_181014.2) em embriões no estágio de mórula, confirmando a presença do alelo A (círculo vermelho), que representa o alelo materno. 43

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

1X- concentração convencional para uso
5X- cinco vezes concentrado
ARTs- técnicas de reprodução assistida
BI- blastocisto
Bx- blastocisto expandido
cDNA- ácido desoxirribonucléico complementar
CO₂ - dióxido de carbono
COCs- complexo cumulus ovócitos
D- dia
DNA- ácido desoxirribonucléico
DNase- enzima que degrada o ácido desoxirribonucléico
DNMT1- DNA metiltransferase 1
DNMT3a- DNA metiltransferase 3a
DNMT3b- DNA metiltransferase 3b
dNTP- desoxirribonucléico trifosfato
FEC- meio de fecundação
FIV- fertilização *in vitro*
FSH- hormônio folículo estimulante
g- força gravitacional
H- histona
IA- inseminação artificial
ICX- inativação do cromossomo X
IETS- Sociedade Internacional de transferência de embriões
IGF2- fator de crescimento insulina- símile tipo 2
IGF2R- receptor do fator de crescimento insulina- símile tipo 2
IMCS- Inativação meiótica do cromossomo sexual
K- lisina
LH- hormônio luteinizante
LOS- Síndrome da cria grande
MCI- massa celular interna
MgCl₂ - cloreto de magnésio
min- minutos
MIV- meio de maturação
MIVt- meio de maturação transporte
mL- mililitro
MO- mórula
MOA-A- monoamina oxidase tipo A
mRNA- ácido ribonucléico mensageiro
ng- nanograma
OPU- ovum pick up
PAR- região pseudoautossômica
pb- pares de base
PBS- solução salina em tampão fosfato
PCR- reação em cadeia de polimerase
pi- pós inseminação

PIV- produção *in vitro*
RFLP- restriction fragment length polymorphism
RNA- ácido ribonucleico
RT- transcrição reversa
RT-PCR- reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase
seg- segundos
SFB- soro fetal bovino
SNP- polimorfismo único de nucleotídeo
SOFaaci- meio de fluido oviduto sintético com aminoácido, citrato de sódio e mio inositol
TALP- tyrode's albumin- lactate- pyruvate
TDM- transtorno depressivo maior
TE- transferência de embriões
TN- transferência nuclear
TSIX- gene atisense ao XIST
UI- unidades internacionais
UV- ultravioleta
Xa- cromossomo X ativo
XCE- elemento controlador de X
Xi- cromossomo X inativo
XIC- centro de inativação do cromossomo X
XIST- transcrito específico do X inativado
Xm- cromossomo X materno
Xp- cromossomo X paterno
µg- micrograma
µL- microlitro
µM- micromolar

RESUMO

ESTABELECIMENTO DO PADRÃO DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

Alice Rodrigues Ferreira¹, Maurício Machaim Franco^{1,2}

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, ²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

O cultivo *in vitro* de embriões afeta mecanismos epigenéticos envolvidos no controle da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário e inativação do cromossomo X. Fêmeas de mamíferos têm dois cromossomos X, e machos somente um. Isto levou à criação de um mecanismo evolutivo de compensação de dose, chamado inativação do cromossomo X. Durante a embriogênese, um dos dois cromossomos X é aleatoriamente inativado em cada célula da massa celular interna, e preferencialmente o paterno no trofoblasto. O objetivo deste estudo foi estabelecer o padrão de inativação do cromossomo X, avaliando a expressão alelo específica do gene MAO-A (monoamina oxidase tipo A) em embriões bovinos produzidos *in vitro* nos estádios de quatro células, oito a dezesseis células, mórula, blastocisto e blastocisto expandido. Um total de 100 embriões foi produzido *in vitro* (PIV), utilizando ovócitos aspirados de nove novilhas da raça Nelore homozigotas para o alelo A, inseminados com sêmen de um touro Holandês homozigoto para o alelo G sexado para fêmea, previamente genotipados para o gene MAO-A. Dois *pools* com 10 embriões cada, dos estágios de 4 células, 8-16 células, mórula, blastocisto e blastocisto expandido foram coletados. Esses *pools* de embriões foram congelados a -80°C para posterior extração de RNA total. Um pool de 15 ovócitos maturados e 5 palhetas de espermatozóides foi utilizado para extração de RNA. Para a fenotipagem do gene MAO-A nos *pools* de embriões foi utilizada a técnica de RT-PCR-RFLP. Para isso foram desenhados dois pares de *primers* flanqueando uma região específica do gene (*GenBank accession number* NM_181014.2) com um polimorfismo, permitindo assim a detecção da expressão alelo específica (*Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*), ou seja, permitindo detectar qual alelo, se paternal ou maternal estava sendo expresso. Um produto de amplificação foi gerado por RT-PCR com os *primers* externos de cada *pool* de embriões de cada estágio de desenvolvimento e purificado.

Posteriormente, os fragmentos foram sequenciados pela metodologia de dideoxy em um sequenciador ABI 3130xl (Applied Biosystem) usando os *primers* internos *forward*. O RNA total extraído das células espermáticas e ovócitos maturados foram utilizados para a detecção da presença do RNA mensageiro do gene MAO-A por RT-PCR. Os resultados mostraram que ambos os alelos estão expressos em embriões de 4-células, 8-16-células, blastocisto e blastocisto expandido, com a expressão do X paterno desaparecendo em mórula. Pode-se especular que ambos os cromossomos X estão ativos nos dois estádios iniciais, sendo inativados posteriormente e reativados em blastocisto.

Palavras chave: PIV; *Bos taurus*; PCR-RFLP; epigenética

ABSTRACT**ESTABLISHMENT OF X CHROMOSOME INACTIVATION IN *IN VITRO*
PRODUCED BOVINE EMBRYOS**

Alice Rodrigues Ferreira¹, Maurício Machaim Franco^{1,2}

¹School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, ² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology

Embryo culture system may affect epigenetic mechanisms involved in controlling gene expression related to embryo development and X chromosome inactivation. Female mammal has two X chromosomes, and male only one. This led to the creation of an evolutionary mechanism of dosage compensation, called X chromosome inactivation. During embryogenesis, one of two X chromosomes is randomly inactivated in each cell of the inner cell mass, and preferably the paternal chromosome in trophoblast cells. The objective of this study was to characterize the allele-specific expression of the Monoamine Oxidase type A (MAO-A) X-linked gene, during preimplantational development of bovine embryos produced *in vitro*. One hundred *in vitro* embryos were produced using oocytes aspirated from nine heifers, homozygous for the MAO-A A allele, which were inseminated using X-semen sexed from a Holstein bull homozygous for the G allele. Two *pools* of 10 embryos each of 4 cell, 8-16 cell, morula, blastocyst and expanded blastocyst stages were collected. Embryos were frozen at -80 °C until total RNA extraction. Total RNA from sperm and oocytes were also isolated. For phenotyping of the MAO-A gene in the *pools* of embryos the RT-PCR-RFLP technique was used. Two pairs of primers, flanking a specific region of the gene (GenBank accession number NM_181014.2) carrying a single nucleotide polymorphism, were designed. Thus, the allele-specific expression was detected, identifying paternal and maternal MAO-A mRNA. Amplicons of each *pool* of embryos were produced by using RT-PCR, and they were sequenced by the dideoxy method using an ABI 3130 xl sequencer (Applied Biosystem). Total RNA isolated from sperm cells was used to detect MAO-A mRNA by using RT-PCR. Results showed the presence of mRNA from both alleles in 4-cell, 8-16-cell, blastocyst and expanded blastocyst embryos, and only from the maternal allele in morula. We can speculate

that both X chromosomes are active in the two earliest stages, being inactivated and subsequently reactivated in blastocyst.

Key words: IVP; *Bos taurus*; PCR-RFLP; epigenetic

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de várias biotecnologias de reprodução, como inseminação artificial (IA), superovulação, coleta e transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões (PIV) e clonagem por transferência nuclear (TN) tem contribuído enormemente com os programas de melhoramento animal (Franco e Melo 2006) e de conservação de raças naturalizadas em risco de extinção.

De acordo com o Relatório Anual da IETS “International Embryo Transfer Society” 2008, o Brasil detém a maior produção de embriões bovinos produzidos *in vivo* e *in vitro* da América do Sul.

Com a utilização dessas técnicas, consegue-se um incremento muito grande na multiplicação animal quando comparado ao sistema tradicional. A partir da monta natural ou IA, uma vaca poderia produzir um bezerro/ano; com a TE uma vaca tem o potencial de produzir de 10-15 bezerros/ano; e com a PIV de 25-50 bezerros/ano.

Apesar do grande incremento conseguido com essas tecnologias, sua eficiência ainda é muito baixa. Na TE, a taxa de concepção está em torno de 50%. Com relação à PIV, a taxa de blastocisto varia de 25 a 50% e a taxa de concepção de 30 a 50%.

Vários fatores podem afetar a eficiência dessas técnicas. Na TE, principalmente a capacidade de um animal responder à superovulação, a dose de hormônio utilizada, o estado nutricional e a sincronia entre o embrião e a receptora. Com relação à PIV, a manipulação dos ovócitos e embriões e as condições ambientais *in vitro*, principalmente a composição dos meios de cultivo, podem influenciar a eficiência da técnica.

O cultivo *in vitro* de embriões pode afetar mecanismos epigenéticos, como os padrões de metilação no DNA, que estão envolvidos no controle da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário e inativação do cromossomo X (teoria da

compensação de dose). O processo fisiológico de inativação de um dos cromossomos X no embrião fêmea de mamíferos pode ser afetado, conseqüentemente comprometendo a viabilidade das fêmeas no sistema *in vitro*, comparado aos machos. Então, a alteração da expressão de genes localizados no cromossomo X e envolvidos no processo de inativação desse cromossomo, pode contribuir para uma maior proporção de embriões machos na PIV.

O melhor entendimento do mecanismo de inativação do cromossomo X em bovinos, ainda pouco estudado, e o desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular para o monitoramento deste importante evento fisiológico, são de fundamental importância como auxílio no incremento da eficiência da produção *in vitro* de embriões, por ser uma das biotécnicas mais utilizadas hoje no Brasil.

1.1 OBJETIVO

Estabelecer o padrão de inativação do cromossomo X, avaliando a expressão alelo específica do gene MAO-A (monoamina oxidase tipo A) em embriões bovinos nos estádios de quatro células, oito a dezesseis células, mórula, blastocisto e blastocisto expandido produzidos *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epigenética

A epigenética refere-se aos processos que regulam a atividade gênica e que não estão relacionados à sequência primária do DNA, sendo herdáveis ao longo das divisões celulares (Lucifero et al, 2004a). Além do efeito direto da sequência do DNA determinando e controlando o funcionamento do genoma como um todo, outros fatores envolvidos com a sequência do DNA também podem alterar o seu funcionamento. Esses mecanismos epigenéticos podem ser metilação de DNA e metilação, fosforilação, acetilação, glicosilação, SUMOilação, Ubiquitinação, ADPribosilação e Nitrilação das proteínas histonas (Li, 2002; Strahl & Allis, 2000). A metilação do DNA constitui uma das mais estáveis modificações epigenéticas conhecidas e é a principal candidata a coordenar a herança epigenética entre as gerações (Ng & Gurdon, 2005; Tchurikov, 2005).

2.2 Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma das principais modificações epigenéticas do genoma e desempenha função crucial na regulação de inúmeros processos biológicos em animais vertebrados, plantas e fungos (Colot & Rossignol, 1999). Nos mamíferos, a metilação do DNA é essencial para o desenvolvimento embrionário normal tendo importante papel na regulação da expressão gênica, na inativação do cromossomo X, no *imprinting* genômico e na

modificação da cromatina (Surani, 1998; Ng & Bird, 1999; Reik et al., 2001; Simonsson & Gurdon, 2004).

A metilação do DNA é uma marca epigenética herdável e reversível, que pode ser propagada já estabilizada após a replicação do DNA, influenciando a expressão de genes (Lucifero et al., 2004a).

Na maioria dos casos, a inibição da transcrição e o silenciamento gênico estão associados à metilação do DNA. Isto se dá devido à inibição direta da ligação dos fatores de transcrição, em seqüências específicas do DNA, geralmente ricas em CpGs onde encontram-se os sítios de reconhecimento e ligação destes fatores. A maquinaria transcricional requer contato com a citosina para que ocorra sua ligação com a dupla hélice. A ligação de muitos desses fatores é desfavorecida pela metilação das CpGs (Robertson et al. 2004).

Em células de mamíferos, a metilação do DNA ocorre predominantemente em citosinas nos dinucleotídeos CpG sendo catalisada por duas classes importantes de DNA metiltransferases. A DNA metiltransferase 1 (DNMT1) é uma enzima de manutenção que metila dinucleotídeos CpG hemi-metilados na fita nova de DNA após a replicação (Bestor, 1992) e sua função é essencial para a manutenção da metilação do DNA na divisão celular (Li et al., 1992). As DNMT3a e DNMT3b são necessárias para o início da metilação *de novo* *in vivo* na formação dos gametas e para o estabelecimento do padrão de metilação *de novo* do DNA durante o desenvolvimento (Okano et al., 1999; Lyko et al., 1999).

Os padrões de metilação do genoma nas células somáticas diferenciadas são geralmente estáveis e herdáveis. Entretanto, nos mamíferos há, pelo menos, dois períodos do desenvolvimento – na formação das células germinativas e nos embriões durante o período inicial de desenvolvimento – em que os padrões de metilação são reprogramados, gerando células com amplos e distintos potenciais de desenvolvimento (Reik et al., 2001).

O primeiro ciclo de reprogramação nuclear ocorre durante a gametogênese, e neste momento ocorre o estabelecimento do *imprinting* genômico (Chaillet et al., 1991; Stöger et al., 1993; Tremblay et al., 1995). O segundo ciclo de reprogramação nuclear ocorre após a fecundação. O ovócito fecundado passa, inicialmente, por uma onda de desmetilação durante o desenvolvimento inicial, a qual “apaga” quase todo o padrão de metilação herdado dos pais (exceto dos genes *imprinted*); seguida de uma *de novo* metilação durante o desenvolvimento embrionário inicial, determinando os padrões de metilação do embrião (Kafri et al., 1992; Mann & Bartolomei, 2002).

2.3 *Imprinting* Genômico

O *Imprinting* Genômico é um fenômeno controlado epigeneticamente, sendo determinado principalmente por um padrão de metilação do DNA e não propriamente sua sequência, gerando uma expressão gênica monoalélica e dependente da origem parental do alelo. O papel da metilação do DNA no *imprinting* genômico tem sido amplamente investigado (Lucifero et al., 2004b). Muitos estudos têm sugerido existir desordens no padrão normal de *imprinting* em humanos associadas com alterações na metilação de genes *imprinted* em crianças concebidas por técnicas de reprodução assistida (ARTs) (Cox et al., 2002; DeBaun et al., 2003; Gicquel et al., 2003; Maher et al., 2003; Orstavik et al., 2003).

A explicação mais aceita para a existência do *imprinting* genômico é a teoria do “conflito genético” (Haig & Graham, 1991), proposta a partir de observações sobre a participação dos genes *imprinting*, relacionados aos efeitos contrários em suas ações no desenvolvimento e crescimento do feto e da placenta. Exemplo disso é o gene paternalmente expresso, IGF2 que estimula o crescimento fetal, enquanto que o gene maternalmente expresso, IGF2R tende a diminuir o crescimento fetal (Reik & Dean, 2001) participando da regulação do IGF2. As fêmeas, ao restringir o crescimento do feto são capazes de ter vida reprodutiva mais longa, assegurando o sucesso reprodutivo em longo prazo. Em contraste, é interessante para os machos que sua progênie seja maior e mais forte, mesmo que em detrimento da fêmea.

A expressão monoalélica de genes *imprinted* resulta dos dois alelos dos pais mantidos em diferentes perfis epigenéticos, uma vez que a presença de metilação nestes genes resulta em uma estrutura de cromatina mais condensada e resistente à transcrição (Reik et al., 1987). O desenvolvimento e formação das células germinativas e o início da embriogênese são períodos cruciais na determinação, aquisição e manutenção do padrão de *imprinting* genômico. Além disso, a regulação dos genes *imprinted* tem sido mostrada essencial para o crescimento fetal e função placentária (Lucifero et al., 2004).

Diante do intenso uso das biotecnologias de reprodução assistida nos últimos anos, Latham et al (1994); Lucifero et al,(2004); Gosden et al (2003); Winston & Hardy (2002) buscaram um melhor entendimento sobre os mecanismos de estabelecimento do *imprinting* genômico, sua manutenção, bem como dos efeitos adversos que estas tecnologias poderiam causar sobre estes eventos.

O efeito do cultivo *in vitro* afetando os mecanismos de *imprinting* genômico foi observado pela primeira vez em ruminantes em um estudo com ovinos. Young et al. (2001), mostraram uma relação entre a *Large Offspring Syndrome (LOS)* e a alteração da expressão e padrão de metilação aberrante do gene IGF2R em ovinos produzidos *in vitro*. Estudos usando camundongos como modelo têm mostrado uma relação entre o cultivo de embriões e o bloqueio da expressão e metilação de genes *imprinted* (Doherty et al., 2000). Portanto, muito se têm discutido acerca de possíveis alterações epigenéticas em consequência do cultivo e manipulação de embriões em tecnologias de reprodução assistida (De Rycke et al., 2002; Thompson et al., 2002; Gosden et al., 2003).

2.4 Modificações Pós Traducionais das Histonas

As histonas são proteínas nucleares que se associam ao DNA para formar a cromatina, sendo os principais componentes protéicos da mesma. A estrutura básica da cromatina é o nucleossomo, no qual o DNA está associado a um octômero de histonas em duplicata (H2A, H2B, H3 e H4) e a uma molécula de histona H1 que se associa externamente ao DNA que envolve o octômero (Andrade & Jordão, 2000).

As histonas não são somente proteínas estruturais. São também fundamentais, através de modificações por acetilação e fosforilação, para o controle da expressão gênica (McGraw et al., 2006), ativação do genoma, metilação do DNA e inativação do cromossomo X no desenvolvimento embrionário inicial (Fair et al., 2004), relacionados ao silenciamento da cromatina no genoma. Estas modificações estão associadas a uma maior ou menor compactação dos nucleossomos, sendo a cromatina mais compactada chamada de heterocromatina, e a menos compactada eucromatina. Além de tornarem os cromossomos compactos, as histonas podem afetar a regulação gênica (Griffiths et al, 2009) deixando inacessíveis os sítios dos fatores de transcrição.

A metilação do DNA e as modificações das histonas servem como marcas epigenéticas para ativar e desativar a cromatina, e tais marcas epigenéticas são herdáveis (Li, 2002). É sabido que as modificações estão concentradas nas caudas das histonas, e incluem principalmente acetilação e ubiquitinação de lisina, metilação de lisina e arginina e fosforilação de serina (Berger, 2002; Kouzaredes, 2002). Além disso, não só uma modificação em um local específico, mas a quantidade com que ela ocorre como mono, di ou trimetilação

de um aminoácido, pode ter significado biológico diferente (Nishioka et al., 2002; Jeppesen & Turner, 1993).

Um crescente número de modificações das histonas tem sido associado com a inativação do cromossomo X, e muitas destas estão geralmente associadas com o silenciamento da cromatina no genoma. Estas incluem hipoacetilação de histonas H3 e H4 (Boggs et al., 2002), di e tri-metilação da lisina 9 na histona H3 (Heard et al., 2001; Chadwick & Willard, 2004), tri-metilação da lisina 27 da histona H3 (Silva et al., 2003; Plath et al., 2003) e ausência de di e tri-metilação da lisina 4 da histona H3 (Boogs et al., 2002; O'Neil et al., 2003). O acúmulo de Eed/Ezh2, um complexo proteico com atividade enzimática, conhecido por estar associado com o silenciamento gênico e capaz de modificar as histonas nos cromossomos, é um marco no início do processo de inativação do cromossomo X (Rougeulle et al., 2004).

2.5 Inativação do Cromossomo X

As fêmeas de mamíferos possuem dois cromossomos X, enquanto que os machos somente um. Isto levou a um mecanismo de evolução especial conhecido como compensação de dose ou inativação do cromossomo X (ICX). Este é um evento que representa um dos maiores paradigmas da epigenética, sendo herdável ao longo da divisão celular (Lucifero et al., 2004).

Em eucariotos, a inativação do cromossomo X afeta aleatoriamente o cromossomo X, paterno ou materno, durante o início do desenvolvimento, e o estado inativo já estabelecido é então herdado ao longo das divisões celulares. De La Fuente et al., (1999) trabalhando com embriões bovinos produzidos *in vitro* sugerem que a inativação ocorre por volta da fase de blastocisto. Portanto, indivíduos adultos são mosaicos de dois tipos de células, expressando um ou outro cromossomo X (Heard & Disteche, 2006).

Em mamíferos apresentando aneuploidia de X, todos os cromossomos X em excesso são inativados, sugerindo uma marca inicial no único X ativo. No início, estudos relacionados ao cromossomo X identificaram uma região necessária, em *cis*, para a inativação do cromossomo (Russel, 1963). Uma marca *imprinted*, protegendo o cromossomo X materno (Xm) da ICX, é adquirida durante a maturação do ovócito (Goto & Takagi, 2000; Tada et al., 2000). Após a fecundação, o cromossomo X paterno (Xp) é transcricionalmente ativo nos

zigotos, e em estágio de 4 células, o processo de inativação do Xp inicia-se com a transcrição do gene XIST e o revestimento do cromossomo a ser inativado com o RNA XIST (Okamoto et al. 2004, 2005). Por outro lado, outros estudos tem revelado que o Xp começa a a ser inativado pelo estágio de oito células (Huynh & Lee 2003; Mak et al. 2004). Okamoto et al. (2004) constataram que o Xp inativo é mantido neste estado nas células embrionárias isoladas da massa celular interna até a fase de blastocisto inicial. No entanto, no estágio de blastocisto tardio, o Xp inativo é reativado nessas células, permitindo a remodelação da cromatina e finalmente procedendo a inativação aleatória do X nos derivados embrionários.

Em marsupiais, o cromossomo X paterno é preferencialmente inativado em todos os tecidos (Cooper et al., 1971), enquanto que em camundongos é observada uma inativação preferencial do Xp somente em tecidos extra embrionários (Takagi & Sasaki, 1975). Em humanos, existem relatos de inativação não aleatória em tecidos extra-embrionários, entretanto já está claro que não é um evento rigorosamente *imprinting* (Looijienja et al., 1999).

Turner et al. (2004), comentam a importância de se compreender os mecanismos que silenciam o cromossomo X paterno no início do desenvolvimento. Durante a espermatogênese ocorre um processo conhecido como inativação meiótica do cromossomo sexual (IMCS). De acordo com Turner et al. (2007), a IMCS ocorre durante a meiose na espermatogênese, silenciando os cromossomos X e Y no momento em que o pareamento dos cromossomos homólogos autossômicos está concluído, sendo mediado por um remodelamento da cromatina em ambos os cromossomos. Este processo é iniciado no DNA por várias proteínas de reparo, mantendo-se por modificações nas histonas que estão associadas com o silenciamento transcricional (Turner et al., 2007).

Alguns estudos questionam se a IMCS é somente restrita à meiose, pois os cromossomos X e Y mantêm um estado reprimido durante todo o desenvolvimento espermático. Resultados abordando o evento de IMCS podem fornecer importantes contribuições para uma melhor compreensão sobre a programação epigenética que ocorre nas células germinativas, na dinâmica meiótica do cromossomo e, mais genericamente, na infertilidade, pois é um evento que acontece na linha germinal masculina de quase todos os organismos que possuam cromossomos sexuais diferenciados (Turner et al., 2007).

A iniciação do processo de inativação do cromossomo X é dependente de um *locus* denominado centro de inativação do cromossomo X (XIC) (Avner & Heard, 2001). O evento inicial que ocorre no XIC é a transcrição do gene XIST (*X Inactivation-Specific Transcript*), com o acúmulo de seu RNA sobre o cromossomo X a ser inativado (Penny et al.,

1996). Segundo Heard & Disteche (2006) o XIC, que transcreve o RNA do gene XIST, é responsável por desencadear o silenciamento agindo em *cis*. A melhor forma de se entender como a inativação do X é regulada virá obviamente da identificação de fatores que estão ligados ao XIC. Muitos modelos evocam a existência de um fator autossômico produzido em quantidade limitada por células diplóides, que estaria ligado ao XIC do cromossomo X não inativado, protegendo-o da inativação (Heard, 2004).

Antes da inativação, a expressão de XIST é detectada em pequenos locais de ambos os cromossomos X ativos, até que os transcritos se acumulem e localizem no futuro cromossomo X inativo (Sheardown et al., 1997; Panning et al., 1997). No entanto, está claro que os componentes do XIC estão envolvidos, e tem sido proposto que os níveis de RNA XIST poderiam influenciar no processo de inativação (Nesterova et al., 2003).

Outro gene importante nesse processo é o TSIX, o qual produz um RNA antisense para o XIST, tendo sido envolvido na inativação aleatória e *imprinting* do X (Debrand et al., 1999). É expresso em células não diferenciadas antes da inativação e parece opor-se à expressão de XIST em *cis* (Heard et al., 2001), inibindo fisicamente a transcrição do XIST pela interferência no recrutamento de RNA polimerase (Luikenhuis et al., 2001; Stavropoulos et al., 2001). Um excesso de transcrição de TSIX inibe o acúmulo de RNA XIST, mas não afeta a escolha do X a ser inativado (Stavropoulos et al., 2001). A transcrição do TSIX é regulada pelo gene XITE, localizado no *locus* XCE (elemento controlador de X) 3' ao TSIX. O gene XITE é um dos responsáveis pela inativação do cromossomo X pelo fato de sua transcrição promover a transcrição do TSIX em *cis*. Ogawa & Lee (2003) citam que, em humanos, o XITE é apontado como um dos principais candidatos na escolha de qual cromossomo X será inativado. Uma física entre as regiões XICs é necessária para uma troca de informações entre os genes XIST e TSIX homólogos que acaba por levar ao estabelecimento de um padrão de regulação monoalélica de TSIX e regulação do XIST em um cromossomo X e não no outro (Heard & Disteche, 2006).

Sun et al. (2006), trabalhando com um mutante TSIX, propuseram o envolvimento do RNA TSIX no bloqueio da metilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27) no *locus* XIST, já que a sua ausência resultava no aparecimento desta marca em todo o *locus* XIST pouco antes da sua transcrição. Este estudo revelou também que durante as fases iniciais de diferenciação de células tronco, a inativação do cromossomo X pode ser revertida “desligando” o gene XIST, mas posteriormente o estado reprimido torna-se irreversível, não sendo mais dependente de XIST.

A cobertura do cromossomo X a ser inativado pelo RNA XIST é seguida pelo acúmulo de um complexo de proteína denominado Eed-Ezh2 e metilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27) (Silva et al., 2003 e Plath et al., 2003). As modificações adicionais nas histonas associadas ao X inativo incluem hipoacetilação de H3 e H4, hipometilação da lisina 4 e metilação da lisina 9 da histona H3 (H3K4; H3K9), além da associação da histona macro H2A (Plath et al., 2002). Em embriões de oito células começa a ocorrer hipometilação de H3K4 e hipoacetilação de H3K9, enquanto que o recrutamento de Eed-Ezh2, metilação da histona H3K27 e associação da macro-histona H2A aparecem depois, no estágio de 16 células, na fase de mórula. A metilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9) ocorre mais tarde, no estágio de 32 células, na fase de blastocisto (Okamoto et al., 2004). No entanto, durante o crescimento do blastocisto, o Xp é reativado na massa celular interna (MCI), com células rapidamente perdendo o seu revestimento de RNA XIST, Eed/Ezh2 e as modificações características das histonas do X inativado (Mak et al. 2004; Okamoto et al. 2004). Mak et al., (2004) e Okamoto et al., (2004) mostraram que o complexo Eed/Ezh2, associado às histonas no Xp, primeiro apareceu na maioria das células no estágio de mórula, e foi desaparecendo nas células que passaram a fazer parte da MCI. A perda destas modificações nas histonas neste momento significa a reativação do Xp, de modo a que a inativação aleatória possa ocorrer na MCI. Jonhson & Ziomek, (1981) acham possível que o resultado de uma divisão polarizada assimétrica de oito blastômeros seria responsável por formar as células internas da MCI. Por outro lado, Huynh & Lee (2003) sugerem que certas células na mórula inicial podem escapar da inativação *imprinting* do Xp, e que estas são as células destinadas a formar a MCI.

A associação do RNA XIST com o futuro X inativo resulta na aquisição de modificações na cromatina. Enquanto o XIST é essencial para a iniciação da inativação do cromossomo, uma vez inativado, o gene XIST trabalha sinergicamente com outras modificações adquiridas na cromatina para manter toda a estabilidade do estado inativo (Csankovszki et al., 2001; De La Fuente et al., 1999). A cromatina do cromossomo X inativo é convertida em heterocromatina, a qual permanece condensada ao longo da maior parte do ciclo celular, e se replica após a maioria da eucromatina. Essa heterocromatina, em uma formação chamada corpúsculo de Barr, é freqüentemente vista sob o envoltório nuclear de células femininas (Barr & Bertram, 1949). Dentro do núcleo, na fase de interfase, é possível localizar o RNA XIST como parte da heterocromatina X inativa do corpúsculo de Barr (Chang et al., 2006).

Elementos adicionais devem ser responsáveis pelo silenciamento do XIST em machos e expressão de apenas um X em fêmeas. A metilação do DNA está envolvida na regulação do XIST em células diferenciadas. A região promotora do alelo ativo, no cromossomo transcricionalmente inativo, não está metilada, enquanto que no alelo inativo, localizado no cromossomo transcricionalmente ativo, está metilada (Hendrich et al., 1993; Norris et al., 1994). A hipermetilação do DNA é observada na região promotora do cromossomo X inativo, mas não é observada no cromossomo X ativo e em genes que escapam da inativação no X inativo. A metilação é um evento tardio no processo de inativação do cromossomo X e parece estar envolvida na manutenção do estado inativo mais do que na iniciação do processo (Lock et al., 1987; Singer-Som et al, 1990). O fato de ser um evento tardio está apoiado por estudos mostrando que células deficientes em *Dnmt1* e *Dnmt3a/Dnmt3b* apresentam expressão adequada do XIST e silenciamento dos genes ligados ao cromossomo X (Sado et al., 2004; Panning & Jaenisch, 1996). Por outro lado, a importância da metilação num momento posterior ao início da inativação do cromossomo X é apoiada por estudos que mostram a reativação de alguns genes depois do tratamento com agentes desmetilantes, conjuntamente a alterações de alguns fatores relacionados a estabilidade do cromossomo X inativo (Chang et al., 2006).

Embora a região XIC afete a maioria do cromossomo X, vários genes ligados a este cromossomo são conhecidos por escaparem ao processo de inativação. Isto mostra, dentro de uma visão epigenômica, como um gene incrustado na heterocromatina pode “resistir” a um estado repressor ao seu redor. Genes que escapam à inativação do X estão ativamente expressos no contexto da cromatina silenciada (Boggs et al., 2002). Além disso, estes genes que escapam à inativação têm um importante papel na determinação das diferenças entre os sexos (Heard & Distèche, 2006). A expressão de genes no X inativo em fêmeas resulta em diferenças de dose entre machos e fêmeas. Utilizando a técnica de *microarray*, Sudbrak et al., (2001) e Craig et al, (2004) identificaram diferenças para alguns genes entre machos e fêmeas. Estudos utilizando *microarray* e com híbridos de células somáticas não são completamente concordantes com relação às diferenças de expressão de genes que escapam ao processo de inativação do X. Isto pode ser devido a vários fatores, como: 1) níveis adicionais de regulação dos genes, como controle transcricional; 2) outras diferenças entre machos e fêmeas que influenciam na expressão de genes ligados ao X, como diferenças hormonais ou regulação por genes ligados ao X que escapam da inativação (Greerkens et al, 1995); 3) variabilidade na inativação tecido-específica, como tem sido observado para o gene SMCX em camundongos (Sherdawn et al., 1996; Carrel et al., 1996);

ou 4) redução na estabilidade da inativação no sistema de hibridização, talvez devido à perda de detecção do XIST (Hansen et al, 1998; Clemson et al, 1998). Existem também genes que fazem parte dos dois cromossomos (X e Y), dentro das regiões homólogas (região pseudoautossômica-PAR). Estes não seriam inativados. Isto se dá devido ao fato de serem expressos nos dois alelos no macho, não podendo ser inativados em nenhum dos alelos da fêmea, equalizando assim a expressão gênica entre os sexos (Chang et al., 2006).

2.5.1 Gene MAO-A

O gene que codifica para a Monoamina oxidase tipo A (MAO-A) está localizado no cromossomo X. É um fator importante na regulação dos níveis de serotonina por estar relacionado à sua degradação (Gaspar et al., 2003). De acordo com Yu et. al (2005), é uma enzima mitocondrial envolvida na degradação de aminas, na patogênese de uma séria desordem depressiva e relacionada a efeitos terapêuticos de antidepressivos. É um gene cuja expressão aumenta durante a fase de gestação em humanos, e estudos evidenciam um aumento acentuado na atividade do MAO-A no endométrio humano durante a fase lútea, sugerindo que esta enzima tenha um papel importante no período de implantação dos embriões (Ryder et al., 1980).

Benjamin et al. (2000) apresentando um novo método para avaliar o estado de inativação do cromossomo X baseado em RT-PCR, também mostraram que o gene a MAO-A está transcricionalmente inativo no Xi. Nordquist & Orelund (2006) estudando fibroblastos de pele, em humanos, observaram que o gene MAO-A estava expresso em apenas um dos dois alelos em cada célula feminina, mas como ambos eram expressos descartou-se a possibilidade de *imprinting*. Por outro lado, Carrel & Willard (2005) usando linhagens de células híbridas para realizar uma avaliação em grande escala do estado de inativação de genes ligados ao X, mostraram que ambos os alelos do gene da MAO-A estavam transcricionalmente ativos.

O gene MAO-A é um gene paternalmente *imprinted* em tecidos extra embrionários, mostrando expressão bialélica em tecidos adultos (Liu et al., 2008). Além disso, Xue et al. (2002) mostraram expressão monoalélica do gene MAO-A em linhagens clonais de fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*, indicando que este gene está sujeito à inativação do cromossomo X (ICX) nesta espécie. Estes autores avaliaram a expressão alelo-específica do gene MAO-A e a expressão de mais nove genes ligados ao cromossomo X em

clones bovinos fêmeas. A análise da expressão do gene MAO-A em placentas bovinas originadas de reprodução natural revelou *imprinting* preferencial para a inativação do cromossomo X paterno. Em contrapartida, encontraram ICX aleatória nas placentas dos clones mortos e padrões alterados nos clones vivos, gerando marcas epigenéticas anormais no cromossomo X de animais clonados, afetando o processo de inativação do cromossomo X (Xue et al., 2002). Hendriks et al. (1992) estudando linfócitos humanos, mostraram que a região promotora do gene MAO-A é totalmente metilada no X inativo (Xi), enquanto que no cromossomo X ativo (Xa) se encontra desmetilada, indicando que o gene é transcricionalmente silenciado no cromossomo X inativo.

Embora existam muitos estudos relacionados à expressão do gene MAO-A, ainda faltam esclarecer aspectos relacionados à expressão deste gene em bovinos produzidos *in vitro*.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C.G.T.; JORDÃO, B.Q. O núcleo da célula. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. , 2000, p.141-197.
- AVNER, P.; HEARD, E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. **Nature Review Genetics**, v. 2, p. 59-67, 2001.
- BARR, M.L.; BERTRAM, E.G. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. **Nature**, v. 163, p. 676, 1949.
- BENJAMIN, D.; VAN BAKEL, I.; CRAIG, I.W. A novel expression based approach for assessing the inactivation status of human X-linked genes. **European Journal of Human Genetics**, v. 8, p. 103–108, 2000.
- BERGER, S.L. Histone modifications in transcriptional regulation. **Current Opinion Genetics Development**, v. 12, p. 142-148, 2002.
- BESTOR, T.H. Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. **EMBO Journal**, v. 11, p. 2611–2617, 1992.
- BOGGS, B.A.; CHEUNG, P.; HEARD, E.; SPECTOR, D.L; CHINAULT, A.C.; ALLIS, C.D. Differentially methylated forms of histone H3 show unique association patterns with inactive human X chromosomes. **Nature Genetics**, v. 30, p.73-76, 2002.
- CARREL, L.; HUNT, P.A.; WILLARD, H.F. Tissue and lineage-specific variation in inactive X chromosome expression of the murine Smcx gene. **Humam Molecular Genetics**, v. 5, p. 1361-1366, 1996.
- CARREL, L.; WILLARD, H.F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. **Nature**, v. 434, p. 400–404, 2005.

- CHADWICK, B.P.; WILLARD, H.F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 101, p. 17450-17455, 2004.
- CHAILLET, J.R.; VOGT, T.F.; BEIER, D.R.; LEDER, P. Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. **Cell**, v.66, p.77-83, 1991.
- CHANG, S.C.; TUCKER, T.; THOROGOOD, N.P.; BROWN, C.J. Mechanisms of X-Chromosome Inactivation. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 852-866, 2006.
- CLEMSON, C.M.; CHOW, J.C.; BROWN, C.J.; LAWRENCE, J.B. Stabilization and localization of XIST RNA are controlled by separate mechanisms and are not sufficient for X inactivation. **Journal of Cell Biology**, v. 142, p. 13-23, 1998.
- COLOT, V.; ROSSINOL, J.L. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. **BioEssays**, v.21, p.402-411, 1999.
- COOPER, D.W.; VANDEBERG, J.L.; SHARMAN, G.B.; POOLE, W.E. Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. **Nature New Biology**, v. 230, p. 155-157, 1971.
- COX, G.F.; BURGER, J.; LIP, V.; MAU, U.A.; SPERLING, K.; WU, B.L.; HORSTHEMKE, B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of *imprinting* defects. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, p. 162–164, 2002.
- CRAIG, I.W.; MILL, J.; CRAIG, G.M.; LOAT, C.; SCHALKWYK, L.C. Application of microarrays to the analysis of the inactivation status of human X-linked genes expressed in lymphocytes. **European Journal of Human Genetics**, v. 12, p. 639-46, 2004.
- CSANKOVSKI, G.; NAGY, A.; JAENISCH, R. Synergism of XIST RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. **Journal of Cell Biology**, v. 153, p. 773-783, 2001.
- DE BAUN, M.R.; NIEMITZ, E.L.; FEINBERG, A.P. Association of in vitro fertilization with Beckwith–Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 156–160, 2003.
- DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 769-75, 1999.
- DE RYCKE, M.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2487-2494, 2002.
- DEBRAND, E.; CHUREAU, C.; ARNAUD, D.; AVNER, P.; HEARD, E. Functional analysis of the DXPas34 locus, a 3' regulator of XIST expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, p. 8513- 8525, 1999.

- DOHERTY, A.S.; MANN M.R.; TREMBLAY, K.D.; BARTOLOMEI, M.S.; SCHULTZ, R.M. Differential effects of culture on *imprinted* H19 expression in the preimplantation mouse embryo. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 1526-1535, 2000.
- FAIR, T.; MURPHY, M.; RIZOS, D.; MOSS, C.; MARTIN, F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Analysis of differential maternal mRNA expression in developmentally competent and incompetent bovine two-cell embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.67, p.136-144, 2004.
- FRANCO, M.M.; MELO, E.O. Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida. **Documentos Embrapa**, v. 188, 2006.
- GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of Serotonin: news from mouse Molecular genetics. **Nature Reviews**, v. 4, p. 1002-1012, 2003.
- GEERKENS, C.; VETTER, U.; JUST, W.; FEDARKO, N.S.; FISHER, L.W.; YOUNG, M.F.; TERMINE, J.D.; ROBEY, P.G.; WOHRLE, D.; VOGEL, W. The X-chromosomal human biglycan gene BGN is subject to X inactivation but is transcribed like an X-Y homologous gene. **Human Genetics**, v. 96, p. 44-52, 1995.
- GICQUEL, C.; GASTON, V.; MANDELBAUM, J.; SIFFROI, J.P.; FLAHAULT, A.; LE BOUC, Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith–Wiedemann syndrome related to the abnormal *imprinting* of the KCN1OT gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 1338–1341, 2003.
- GOSDEN, R.; TRASLER, J.; LUCIFERO, D.; FADDY, M. Rare congenital disorders, *imprinted* genes, and assisted reproductive technology. **Lancet**, v. 361, p. 1975-1977, 2003.
- GOTO, Y.; TAKAGI, N. Maternally inherited X chromosome is not inactivated in mouse blastocysts due to parental imprinting. **Chromosome Research**, v. 8, p. 101, 2000.
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROLL, S.B. **Introdução à Genética**. 9 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. , 2009, p. 337-339.
- HAIG, D.; GRAHAM, C. Genomic imprinting and the strange case of the insulinlike growth factor II receptor. **Cell**, v.64, p.1045-1046, 1991.
- HANSEN, R.S.; CANFIELD, T.K.; STANEK, A.M.; KEITGES, E.A.; GARTLER, S.M. Reactivation of *XIST* in normal fibroblasts and a somatic cell hybrid: abnormal localization of *XIST* RNA in hybrid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 95, p. 5133-5138, 1998.
- HEARD, E. Recent Advances in X-Chromosome Inactivation. **Current opinion in cell biology**, v. 16, p. 247-255, 2004.
- 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.; ROUGEULLE, 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.
- HENDRICH, B.D.; BROWN, C.J.; WILLARD, H.F. Evolutionary conservation of possible functional domains of the human and murine *XIST* genes. **Human Molecular Genetics**, v. 2, p. 663-672, 1993.
- HENDRIKS, R.W.; CHEN, Z.Y.; HINDS, H.; SCHUURMAN, R.K.; CRAIG, I.W. An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 50 end of the monoamine oxidase A gene. **Human Molecular Genetics**, v. 1, p. 187-194, 1992.
- 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.
- JEPPESEN, P.; TURNER, B. The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. **Cell**, v. 74, p. 281-189, 1993.
- JOHNSON, M.H.; ZIOMEK, C.A. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. **Cell**, v. 24, p. 71-80, 1981.
- KAFRI, T.; ARIEL, M.; BRANDEIS, M.; SHEMER, R.; URVEN, L.; MCCARREY, J.; CEDAR, H.; RAZIN, A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. **Genes Development**, v.6, p.705- 714, 1992.
- KOUZARIDES, T. Histone methylation in transcriptional control. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, p. 198-209, 2002.
- LATHAM, K.E.; DOHERTY, A.S.; SCOTT, C.D.; SCHULTZ, R.M. *Igf2r* and *Igf2* gene expression in androgenetic, gynogenetic, and parthenogenetic preimplantation mouse embryos: absence of regulation by genomic *imprinting*. **Genes & Development**, v. 8, p. 290-229, 1994.
- LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews**, v. 3, p. 662-673, 2002.
- LIU, J.H.; YIN, S.; XIONG, G.B.; HOU, Y.; CHEN, D.Y.; SUN, Q.Y. Aberrant DNA methylation imprints in aborted bovine clones. **Molecular Reproduction Development**, v. 75, p. 598-607, 2008.
- LOCK, L.F.; TAKAGI, N.; MARTIN, G. R. Methylation of the *Hprt* gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. **Cell**, v. 48, p. 39-46, 1987.
- LOOIJENJA, L.; GILLIS, A.; VERKERK, A.; VAN PUTTEN, W.; OOSTERHUIS, J. Heterogeneous X inactivation in trophoblastic cells of human full-term female placentals. **The American Journal of Human Genetics**, v. 64, p. 1445-1452, 1999.

- LUCIFERO D.; CHAILLET, J.R.; TRASLER, J.M. Potential significance of genomic *imprinting* defects for reproduction and assisted reproductive technology. **Human Reproduction Update**, v. 10, p. 3-18, 2004b.
- LUCIFERO, D.; MANN, M.R.W.; BARTOLOMEI, M.S.; TRASLER, J.M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte *imprinting*. **Human Molecular Genetics**, v. 13, p. 839–849, 2004a.
- LUIKENHUIS, S.; WUTZ, A.; JAENISCH, R. Antisense transcription through the XIST locus mediates TSIX function in embryonic stem cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 8512–8520, 2001.
- LYKO, F.; RAMSAHOYE, B.H.; KASHEVSKY, H.; TUDOR, M.; MASTRANGELO, M.-A.; ORR-WEAVER, T.L.; JAENISCH, R. Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*. **Nature Genetics**, v. 23, p. 363–366, 1999.
- MAHER, E.R.; BRUETON, L.A.; BOWDIN, S.C.; LUHARIA, A.; COOPER, W.; COLE, T.R.; MACDONALD, F.; SAMPSON, J.R.; BARRATT, C.L.; REIK, W.; HAWKINS, M.M. Beckwith–Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). **Journal of Medical Genetics**, v. 40, p. 62–64, 2003.
- MAK, W.; NESTEROVA, T.B.; DE NAPOLES, M.; APPANAH, R.; YAMANAKA, S.; OTTE, A.P.; BROCKDORFF, N. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. **Science**, v. 303, p. 666–669, 2004.
- MANN, M.R. W.; BARTOLOMEI, M.S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biol.**, London, v.3, p.1-4, 2002.
- MCGRAW, S.; VIGNEAULT, C.; TREMBLAY, K.; SIRARD, M.A. Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.692-699, 2006.
- NESTEROVA, T.B.; JOHNSTON, C.M.; APPANAH, R.; NEWALL, A.E.; GODWIN, J.; ALEXIOU, M.; BROCKDORFF, N. Skewing X chromosome choice by modulating sense transcription across the XIST locus. **Genes Development**, v. 17, p. 2177-2190, 2003.
- NG, H.H.; BIRD, A. DNA methylation and chromatin modification. **Current Opinion in Genetics & Develolpment**, v.9, p.158-163, 1999.
- NG, R.K.; GURDON, J.B. Maintenance of epigenetic memory in cloned embryos. **Cell Cycle**, v.4, p.760-763, 2005.
- NISHIOKA, K.; CHUIKOV, S.; SARMA, K.; ERDJUMENT- BROMAGE, H.; ALLIS, C.D.; TEMPST, P.; REINBERG, D. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. **Genes Development**, v. 16, p. 479-489, 2002.

- NORDQUIST, N.; ORELAND, L. Monoallelic expression of MAO-A in skin fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, p. 763–767, 2006.
- NORRIS, D.P.; PATEL, D.; KAY, G.F.; PENNY, G.D.; BROCKDORFF, N.; SHEARDOWN, S.A.; RASTAN, S. Evidence that random and *imprinted* XIST expression is controlled by preemptive methylation. **Cell**, v. 77, p. 41–51, 1994.
- OGAWA, Y.; LEE, J.T. XIST, X-inactivation intergenic transcription elements that regulate the probability of choice. **Molecular Cell**, v. 11, p. 731–743, 2003.
- OKAMOTO, I.; ARNAUD, D.; LE BACCON, P.; OTTE, A.P.; DISTECHE, C.M.; AVNER, P.; HEARD, E. Evidence for *de novo imprinted* X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. **Nature**, v. 438, p. 369–373, 2005.
- 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.
- OKANO, M.; BELL, D.W.; HABER, D.A.; LI, E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, p. 247–257, 1999.
- O'NEILL, L.P.; RANDALL, T.E.; LAVENDER, J.; SPOTSWOOD, H.T.; LEE, J.T.; TURNER, B.M. X-linked genes in female embryonic stem cells carry an epigenetic mark prior to the onset of X inactivation. **Human Molecular Genetics**, v. 12, p. 1783–1790, 2003.
- ORSTAVIK, K.H.; EIKLID, K.; VAN DER HAGEN, C.B.; SPETALEN, S.; KIERULF, K.; SKJELDAL, O.; BUITING, K. Another case of *imprinting* defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. **American Journal of Human Genetics**, v. 72, p. 218–219, 2003.
- PANNING, B.; DAUSMAN, J.; JAENISCH, R. X chromosome inactivation is mediated by RNA stabilization. **Cell**, v. 90, p. 907–916, 1997.
- PANNING, B.; JAENISCH, R. DNA hypomethylation can activate XIST expression and silence X-linked genes. **Genes & Development**, v. 10, p. 1991–2002, 1996.
- PENNY, G.D.; KAY, G.F.; SHEARDOWN, S.A.; RASTAN, S.; BROCKDORFF, N. Requirement for XIST in X chromosome inactivation. **Nature**, v. 379, p. 131–137, 1996.
- PLATH, K.; FANG, J.; MLYNARCZYK-EVANS, S.K.; CAO, R.; WORRINGER, K.A.; WANG, H.; DE LA CRUZ, C.C.; OTTE, A.P.; PANNING, B.; ZHANG, Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. **Science**, v. 300, p. 131–135, 2003.
- PLATH, K.; MLYNARCZYK-EVANS, S.; NUSINOW, D.A.; PANNING, B. XIST RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. **Annual Reviews Genetics**, v. 36, p. 233–278, 2002.

- REIK, W.; COLLICK, A.; NORRIS, M.; BARTON, S.; SURANI, M. Genomic *imprinting* determines methylation of parental alleles in transgenic mice. **Nature**, v. 328, p. 248-251, 1987.
- REIK, W.; DEAN, W. DNA methylation and mammalian epigenetics. **Electrophoresis, Weinheim**, v.22, p.2838-2843, 2001.
- REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v.293, p.1089-1093, 2001.
- ROBERTSON, A.K.; GEIMAN, T.M.; SANKPAL, U.T.; HAGER, G.L.; ROBERTSON, K.D. Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3a *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.322, p.110-118, 2004.
- ROUGEULLE, C.; CHAUMEIL, J.; SARMA, K.; ALLIS, C.D.; REINBERG, D.; AVNER, P.; HEARD, E. Differential histone H3 Lys- 9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, p. 5475-5484, 2004.
- RUSSELL, L.B. Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and in region of origin. **Science**, v. 140, p. 976-978, 1963.
- RYDER, T.A.; MACKENZIE, M.L.; LEWINSOHN, R.; PRYSE-DAVIES, J.; SANDLER, M. Amine oxidase histochemistry of the human uterus during the menstrual cycle. **Histochemistry**, v. 67, p.199–204, 1980.
- SADO, T., M. OKANO, E. LI&H. SASAKI: De novo DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. **Development**, v. 131, p. 975-982, 2004.
- SHEARDOWN, S.; NORRIS, D.; FISHER, A.; BROCKDORFF, N. The mouse *Smcx* gene exhibits developmental and tissue specific variation in degree of escape from X inactivation. **Human Molecular Genetics**, v. 5, p. 1355-1360, 1996.
- SHEARDOWN, S.A.; DUTHIE, S.M.; JOHNSTON, C.M.; NEWALL, A.E.T.; FORMSTONE, E.J., ARKELL, R.M.; NESTEROVA, T.B.; ALGHISI, G.C.; RASTAN, S.; BROCKDORFF, N. Stabilisation of XIST RNA mediates initiation of X chromosome inactivation. **Cell**, v. 91, p. 99-107, 1997.
- SILVA, J.; MAK, W.; ZVETKOVA, I.; APPANAH, R.; NESTEROVA, T.B.; WEBSTER, Z.; PETERS, A.H.; JENUWEIN, T.; OTTE, A.P.; BROCKDORFF, N. Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. **Development Cell**, v. 4, p. 481-95, 2003.
- SIMONSSON, S.; GURDON, J. DNA methylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Nature Cell Biology**, v.6, p.984-990, 2004.
- SINGER-SAM, J.; GRANT, M.; LEBON, J.M.; OKUYAMA, K.; CHAPMAN, V.; MONK, M.; RIGGS, A.D. Use of a *HpaII*-polymerase chain reaction assay to study DNA

methylation in the P_{gk}-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. **Molecular Cellular Biology**, v. 10, p. 4987-4989, 1990.

STAVROPOULOS, N.; LU, N.; LEE, J.T. A functional role for TSIX transcription in blocking XIST RNA accumulation but not in X-chromosome choice. **PNAS**, v. 98, p. 10232–10237, 2001.

STÖGER, R.; KUBICKA, P.; LIU, C.G.; KAFRI, T.; RAZIN, A.; CEDAR, H.; BARLOW, D.P. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. **Cell**, v.73, p.61-71, 1993.

STRAHL, B.; ALLIS, C.D. The language of covalent histone modification. **Nature**, v. 403, p. 41-45, 2000.

SUDBRAK, R.; WIECZOREK, G.; NUBER, U.A.; MANN, W.; KIRCHNER, R.; ERDOGAN, F.; BROWN, C. J.; WOHRLE, D.; STERK, P.; KALSCHUEER, V. M.; BERGER, W.; LEHRACH, H.; ROPERS, H.-H. X chromosome-specific cDNA arrays: identification of genes that escape from X-inactivation and other applications. **Hum. Molecular Genetics**, v. 10, p. 77-83, 2001.

SUN, B.K.; DEATON, A.M.; LEE, J.T. A transient heterochromatic state in XIST preempts X inactivation choice without RNA stabilization. **Molecular Cell**, v.21, p. 617–628, 2006.

SURANI, M. A. Imprinting and the initiation of gene silencing in the germline. **Cell**, v.93, p.309-312, 1998.

TADA, T.; OBATA, Y.; TADA, M.; GOTO, Y.; NAKATSUJI, N.; TAN, S.; KONO, T.; TAKAGI, N. Imprint switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. **Development**, v. 127, p. 3101–3105, 2000.

TAGAKI, N.; SASAKI, M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. **Nature**, v. 256, p. 640-642, 1975.

TCHURIKOV, N.A. Molecular mechanisms of epigenetics. **Biochemistry**, v.70, p.406-423, 2005.

THOMPSON, J.G.; KIND, K.L.; ROBERTS, C.T.; ROBERTSON, S.A.; ROBINSON, J.S. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? **Human Reproduction**, v. 17, p. 2783-2786, 2002.

TREMBLAY, K.D.; SAAM, J.R.; INGRAM, R.S.; TILGHMAN, S.M.; BARTOLOMEI, M.S. A paternal-specific methylation imprint marks the alleles of the mouse H19 gene. **Nature Genetics**, v.9, p407-413, 1995.

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.; BARRETT, J.C.; BURGOYNE, P.S.; DENG, C.X. BRCA1, histone H2AX phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. **Current Biology**, v. 14, p. 2135 -2142, 2004.
- WINSTON, R.M.; HARDY, K. Are we ignoring potential dangers of in vitro fertilization and related treatments? **Nature Cellular Biology**, v. 4, p. 14–18, 2002.
- XUE, F.; TIAN, X.C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L.V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nature Genetics**, v. 31, p. 216–220, 2002.
- YOUNG, L.E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T.G.; BUTTERWITH, S.C.; GUTIERREZ, C.G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P.J.; ROBINSON, J.J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K.D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, p. 153-154, 2001.
- YU, Y.W.; TSAI, S.J.; HONG, C.J.; CHEN, T.J.; CHEN, M.C.; YANG, C.W. Association study of a monoamine oxidase a gene promoter polymorphism with major depressive disorder and antidepressant response. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 1719–1723, 2005.

CAPÍTULO 2

1 RESUMO

O cultivo *in vitro* de embriões afeta mecanismos epigenéticos envolvidos no controle da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento embrionário e inativação do cromossomo X. Fêmeas de mamíferos têm dois cromossomos X, e machos somente um. Isto levou à criação de um mecanismo evolutivo de compensação de dose, chamado inativação do cromossomo X. Durante a embriogênese, um dos dois cromossomos X é aleatoriamente inativado em cada célula da massa celular interna, e preferencialmente o paterno no trofoblasto. O objetivo deste estudo foi estabelecer o padrão de inativação do cromossomo X, avaliando a expressão alelo específica do gene MAO-A (monoamina oxidase tipo A) em embriões bovinos produzidos *in vitro* nos estádios de quatro células, oito a dezesseis células, mórula, blastocisto e blastocisto expandido. Um total de 100 embriões foi produzido *in vitro* (PIV), utilizando ovócitos aspirados de nove novilhas da raça Nelore homozigotas para o alelo A, inseminados com sêmen de um touro Holandês homozigoto para o alelo G sexado para fêmea, previamente genotipados para o gene MAO-A. Dois *pools* com 10 embriões cada, dos estágios de 4 células, 8-16 células, mórula, blastocisto e blastocisto expandido foram coletados. Esses *pools* de embriões foram congelados a -80°C para posterior extração de RNA total. Um pool de 15 ovócitos maturados e 5 palhetas de espermatozóides foi utilizado para extração de RNA. Para a fenotipagem do gene MAO-A nos *pools* de embriões foi utilizada a técnica de RT-PCR-RFLP. Para isso foram desenhados dois pares de *primers* flanqueando uma região específica do gene (*GenBank accession number* NM_181014.2) com um polimorfismo, permitindo assim a detecção da expressão alelo específica (*Bos taurus taurus* X *Bos taurus indicus*), ou seja, permitindo detectar qual alelo, se paternal ou maternal estava sendo expresso. Um produto de amplificação foi gerado por RT-PCR com os *primers* externos de cada *pool* de embriões de cada estágio de desenvolvimento e purificado. Posteriormente, os fragmentos foram sequenciados pela metodologia de dideoxy em um sequenciador ABI 3130xl (Applied Biosystem) usando os *primers* internos *forward*. O RNA total extraído das células espermáticas e ovócitos maturados foram utilizados para a detecção da presença do RNA mensageiro do gene MAO-A por RT-PCR. Os resultados mostraram que ambos os alelos estão expressos em embriões de 4-células, 8-16-células, blastocisto e blastocisto expandido, com a expressão do X paterno desaparecendo em mórula. Pode-se especular que ambos os cromossomos X estão ativos nos dois estádios iniciais, sendo inativados posteriormente e reativados em blastocisto.

Palavras chave: PIV; *Bos taurus*; PCR-RFLP; epigenética

2 ABSTRACT

Embryo culture system may affect epigenetic mechanisms involved in controlling gene expression related to embryo development and X chromosome inactivation. Female mammal has two X chromosomes, and male only one. This led to the creation of an evolutionary mechanism of dosage compensation, called X chromosome inactivation. During embryogenesis, one of two X chromosomes is randomly inactivated in each cell of the inner cell mass, and preferably the paternal chromosome in trophoblast cells. The objective of this study was to characterize the allele-specific expression of the Monoamine Oxidase type A (MAO-A) X-linked gene, during preimplantational development of bovine embryos produced *in vitro*. One hundred *in vitro* embryos were produced using oocytes aspirated from nine heifers, homozygous for the MAO-A A allele, which were inseminated using X-semen sexed from a Holstein bull homozygous for the G allele. Two *pools* of 10 embryos each of 4 cell, 8-16 cell, morula, blastocyst and expanded blastocyst stages were collected. Embryos were frozen at -80 °C until total RNA extraction. Total RNA from sperm and oocytes were also isolated. For phenotyping of the MAO-A gene in the *pools* of embryos the RT-PCR-RFLP technique was used. Two pairs of primers, flanking a specific region of the gene (GenBank accession number NM_181014.2) carrying a single nucleotide polymorphism, were designed. Thus, the allele-specific expression was detected, identifying paternal and maternal MAO-A mRNA. Amplicons of each *pool* of embryos were produced by using RT-PCR, and they were sequenced by the dideoxy method using an ABI 3130 xl sequencer (Applied Biosystem). Total RNA isolated from sperm cells was used to detect MAO-A mRNA by using RT-PCR. Results showed the presence of mRNA from both alleles in 4-cell, 8-16-cell, blastocyst and expanded blastocyst embryos, and only from the maternal allele in morula. We can speculate that both X chromosomes are active in the two earliest stages, being inactivated and subsequently reactivated in blastocyst.

Key words: IVP; *Bos taurus*; PCR-RFLP; epigenetic

3 INTRODUÇÃO

As fêmeas de mamíferos possuem dois cromossomos X e machos somente um. Isto levou a um mecanismo especial de evolução conhecido como compensação de dose. A inativação de um cromossomo X em fêmeas equaliza a expressão gênica entre os sexos. Em mamíferos placentários, a inativação do cromossomo X (ICX) afeta o cromossomo X paterno ou materno de uma maneira aleatória durante o desenvolvimento embrionário, sendo que o estado inativo é herdado de forma estável, gerando adultos mosaicos de dois tipos celulares (Heard & Distèche, 2006).

Uma marca *imprinting*, protegendo o cromossomo X materno (X_m) da ICX, é adquirido durante a maturação do ovócito (Goto & Takagi 1998, 2000; Tada et. al., 2000). Após a fecundação, o cromossomo X paterno (X_p) é transcricionalmente ativo nos zigotos e, em estágio de 4 células o processo de inativação do X_p inicia-se com a transcrição do gene XIST e seu RNA cobrindo o cromossomo (Okamoto et al. 2004, 2005). Por outro lado, outros estudos tem revelado que o X_p começa sua inativação no estágio de oito células (Huynh & Lee 2003; Mak et al. 2004). Okamoto et al. (2004) constataram que o X_p inativo é mantido nas células embrionárias isoladas da massa celular interna até a fase de blastocisto inicial. No entanto, no estágio de blastocisto tardio, o X_p inativado é reativado nessas células, permitindo a remodelação da cromatina e finalmente ocorrendo a inativação aleatória do X nos derivados embrionários.

Turner et al. (2004) comentam a importância de se compreender os mecanismos pelos quais o X_p está especificamente silenciado no início do desenvolvimento. Durante a meiose no macho, no qual o espermatozóide é produzido, ocorre um processo conhecido como inativação meiótica do cromossomo sexual (IMCS). Neste momento, os cromossomos sexuais formam uma estrutura única, o corpúsculo XY e a IMCS ocorre

levando à repressão da transcrição de genes ligados aos cromossomos X e Y. Esta inativação meiótica excepcionalmente afeta os cromossomos sexuais e pode estar associada com a incapacidade dos cromossomos X e Y para se parear durante a meiose no macho (Turner et al., 2004).

Huynh & Lee (2003, 2005) sugerem que quando um ovócito é fecundado, o Xp chega em um estado pré-inativado. Eles sugerem que este estado pode ser uma extensão da IMCS, que persiste durante o estágio embrionário no útero. Por outro lado, Okamoto et al. (2005) mostraram que os dois processos, IMCS e a ICX paterno após a fecundação, podem ser eventos mecanicamente separados, e confirmam que há um período após a fecundação quando o cromossomo X paterno está transcricionalmente ativo. Adicionalmente, sugerem que a posterior inativação do Xp pode ocorrer sem prévia IMCS.

A inativação do cromossomo X, portanto, representa um dos maiores paradigmas da epigenética, a qual é definida por Holliday (1987) como as mudanças na função gênica, não implicando na mudança da seqüência primária do DNA (Wu & Morris, 2001;), sendo herdáveis ao longo das divisões celulares (Lucifero et al, 2004). Ambos, *imprinting* e inativação aleatória do cromossomo X, dependem da expressão de um RNA não-codificante chamado XIST. O gene XIST aumenta a síntese do seu RNA e este acumula no cromossomo que será inativado, revestindo-o e levando-o à aquisição de marcas epigenéticas de repressão, incluindo modificações de histonas e metilação do DNA com conseqüente silenciamento gênico no cromossomo (Brockdorff, 2002).

Metilação e atividade gênica são muitas vezes inversamente proporcionais (Yeivin & Razin, 1993). A importância da metilação no silenciamento transcricional de um gene foi demonstrada pela metilação *in vitro* de seqüências de DNA em regiões promotoras, ou desmetilação artificial de seqüências gênicas, resultando em repressão e ativação da atividade do gene, respectivamente (Bird, 2002).

Muito se tem discutido com relação aos efeitos do cultivo *in vitro* de embriões e outras tecnologias de reprodução assistida sobre possíveis alterações epigenéticas e suas várias conseqüências (Young et al., 2001; De Rycke et al., 2002, Thompson et al., 2002; Gosden et al. 2003). A observação de que o cultivo *in vitro* de embriões possa afetar os padrões de *imprinting* genômico, um fenômeno epigeneticamente controlado distinguindo os alelos parentais, foi proposto. Young et al. (2001), constataram que ovelhas com anomalias de crescimento excessivo, chamada síndrome da cria grande, apresentaram alterações na expressão e no padrão de metilação do gene IGF2R.

Embora a ICX afete quase totalmente o cromossomo, vários genes ligados ao X são conhecidos por escaparem da inativação. Segundo Heard & Disteché (2006) estes genes podem fornecer importantes informações epigenômicas de como um gene incrustado na heterocromatina pode superar ou evitar o efeito repressor ao seu redor. Além disso, este processo pode também ter implicações importantes para as potenciais diferenças entre os sexos.

O gene Monoamina Oxidase tipo A (MAO-A), localizado no cromossomo X, codifica um importante fator envolvido na regulação dos níveis de serotonina durante a gestação (Liu et al, 2008). Segundo Yu et al (2005), é uma enzima mitocondrial envolvida na degradação de aminas biogênicas, na patogênese de transtorno depressivo maior (TDM) e relacionada com os efeitos terapêuticos dos antidepressivos. O gene MAO-A é paternalmente *imprinted* apenas nos tecidos extra embrionários, mostrando expressão bialélica em tecidos adultos (Liu et al, 2008). Além disso, Xue et al. (2002) mostraram expressão monoalélica do gene MAO-A em linhagens clonais de fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*, indicando que este gene está sujeito à inativação do cromossomo X (ICX) nesta espécie. Hendriks et al. (1992) estudando linfócitos humanos, mostraram que a região promotora do gene MAO-A é totalmente metilada no X inativo (Xi), enquanto que no cromossomo X ativo (Xa) se encontra desmetilada, indicando que o gene é transcricionalmente silenciado no cromossomo X inativo. Portanto, este gene é candidato a ser utilizado em estudos que visam estabelecer o processo de inativação do cromossomo X em embriões bovinos. Não há relatos de estudos onde se estabeleceu a expressão alelo-específica de genes relacionados ao cromossomo X nesta espécie.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a expressão alelo-específica do gene da Monoamina Oxidase de tipo A (MAO-A) ligado ao cromossomo X, durante o desenvolvimento *in vitro* de embriões pré-implantação em bovinos, correlacionando-a com a inativação do cromossomo X.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento Experimental

Foram produzidos 100 embriões PIV, utilizando ovócitos aspirados de nove novilhas da raça Nelore homozigotas para o alelo A, inseminados com sêmen de um touro Holandês homozigoto para o alelo G sexado para fêmea, previamente genotipados para o gene MAO-A. Dois *pools* com 10 embriões cada, dos estádios de 4 células (44horas), 8-16 células (72horas), mórula (144horas), blastocisto (156horas) e blastocisto expandido (168horas) foram coletados e congelados para posterior extração de RNA total. O RNA total foi isolado de cinco palhetas de sêmen, sendo utilizadas $2,9 \times 10^6$ espermatozóides, e de um pool de 15 ovócitos maturados. Para a fenotipagem do gene MAO-A nos *pools* de embriões foi utilizada a técnica de RT-PCR-RFLP. Um produto de amplificação foi gerado por RT-PCR com os *primers* externos de cada *pool* de embriões e de cada estágio de desenvolvimento e purificados. Posteriormente, os fragmentos foram sequenciados usando os *primers* internos *forward*. O RNA total extraído das células espermáticas e ovócitos foram utilizados para a detecção da presença do RNA mensageiro do gene MAO-A por RT-PCR (Figura 2.1).

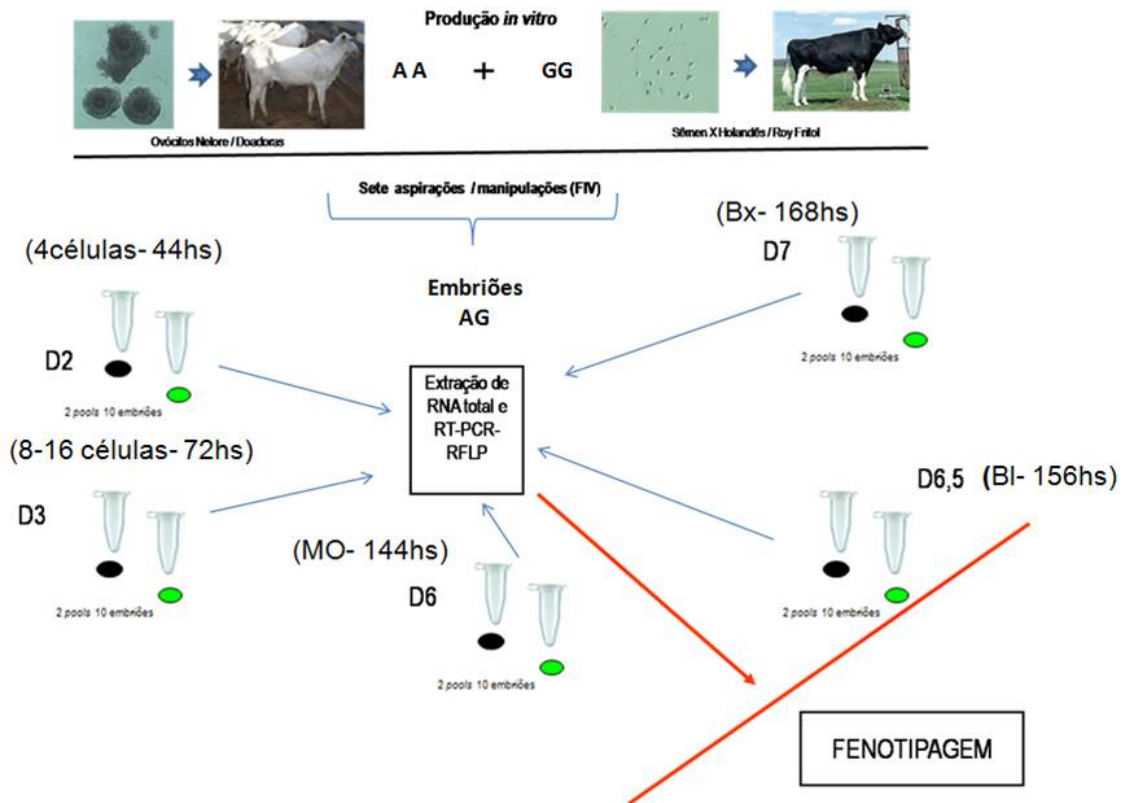


Figura 2.1. Esquema do delineamento experimental. D=dia; MO= mórula; BI= blastocisto; Bx= blastocisto expandido.

4.2 Extração de DNA e Genotipagem do Gene MAO-A

O DNA genômico de leucócitos de nove novilhas Nelore doadoras de ovócitos e sêmen do touro Holândes foi isolado para genotipagem, utilizando um protocolo baseado em *Salting Out* (Biase et al., 2002). Os animais doadores de ovócitos e sêmen foram previamente escolhidos baseado na genotipagem para o gene MAO-A (Xue et al., 2002), sendo as doadoras de ovócitos (*Bos taurus indicus*) de genótipo AA e o touro doador do sêmen (*Bos taurus taurus*) de genótipo GG. Foram desenhados dois pares de *primers* baseados na seqüência do *GenBank* número NM_181014.2 (Tabela 2.1). Com o *primer* internos reverso foi induzida uma mutação que, em combinação com o polimorfismo A/G, criou um sítio de restrição para a enzima *RsaI* (5' GTAC 3').

TABELA 2.1. Sequência dos *primers* e tamanho dos amplicons

| Gene | Sequência dos <i>primers</i> (5' - 3') | Tamanho do amplicon (pb) |
|--------|---|--------------------------|
| bMAO-A | <i>Externo forward</i> : AGG CCT GCT GAA GAT TGT TG | 178 |
| | <i>Externo reverse</i> : GAT GAT CTG ATT GCA CGG CT | |
| | <i>Interno forward</i> : GCT GCT AAG CCG ATC CTG AAG | 106 |
| | <i>Interno reverse</i> : GAT CTG ATT GCA CGG CTG TTG TA | |

Para genotipar os animais foram usados apenas os *primers internos*. Foi realizada PCR usando 50 ng de DNA genômico, tampão 1X de PCR, 1,0 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer interno*, 1,0 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen®), em um volume final de 20 µL. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando as seguintes condições: 94° C por 3 min, 36 ciclos a 94° C por 30 seg, 54° C por 30 seg e 72° C por 40 seg, seguido por uma extensão final de 72° C por 10 min. A amplificação resultou em um produto de PCR de 106 pares de bases (pb). Após a amplificação, 13 µL do amplicon foram digeridos utilizando 10 U da enzima de restrição *RsaI* (Promega®) com a reação sendo incubada *overnight* a 37°C. Os produtos da digestão foram detectados por eletroforese em gel de agarose 3,0%, corado com brometo de etídeo (10 mg mL⁻¹) e fotografado sob luz UV. O alelo A é representado por um fragmento de 106 pb e o alelo G por dois fragmentos, 83 e 23 pb (Figura 2.2).

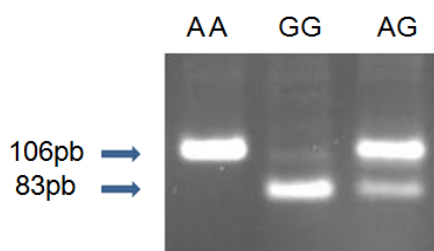


Figura 2.2. Análise eletroforética em gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo, mostrando os dados da genotipagem para o gene MAO-A. Genótipos: AA- Nelore (106 pb), GG- Holandês (83 pb) e AG- Animal Controle Heterozigoto (106 pb e 83 pb).

4.3 Produção *In Vitro* de Embriões

4.3.1 Recuperação de ovócitos e maturação *in vitro*

Foram utilizadas nove novilhas cíclicas da raça Nelore, mantidas em pastejo de *Brachiaria brizantha*, com sal mineral e água *ad libidum*.

Os animais foram submetidos a sete seções semanais, com intervalo de 7 dias, de aspirações foliculares guiadas por ultrassom (OPU). O equipamento utilizado consistiu de um aparelho de ultrassom (Aloka SSD 500® Japão), acoplado a uma sonda com transdutor setorial micro-convexo de 7,5 MHz modelo UST 9125- 7.5(Aloka ®, Japão) e um guia transvaginal WTA® (Brasil), uma bomba de vácuo Cook ® VMAR5100 (Austrália), acoplada a um sistema com uma agulha 18G (0,9 x 70) WTA® (Brasil).

Os animais submetidos ao procedimento de aspiração folicular foram contidos em tronco de contenção bovino, passaram por anti-sepsia local e posterior anestesia epidural baixa com lidocaína 2% (3 a 5 mL - Anestésico L Pearson, Eurofarma, Brasil). O guia foi posicionado transvaginal no fórnix, sendo direcionado para o mesmo lado do ovário a ser aspirado (direita/esquerda). Os ovócitos foram aspirados em meio apropriado que consistiu em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) com 5% de Soro Fetal Bovino (Sigma ®) e adicionado de 1µL/mL de heparina sódica (Liquemine® i.v. Roche, Suíça) à temperatura constante de 39°C. A pressão de aspiração aplicada foi de 13 a 15 mL/min e os ovócitos recuperados foram levados imediatamente ao laboratório para serem submetidos ao processo de PIV.

Somente os Complexos Cumulus Ovócitos (COCs) que apresentavam citoplasma homogêneo e com pelo menos três camadas de células do cumulus foram utilizados, sendo classificados de acordo com o Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Caixeta & Dode, 2008) em graus I, II, III e IV (Figura 2.3). Os COCs selecionados foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e transportados em 1,5 mL de meio de maturação transporte (MIVt) da fazenda ao laboratório. MIVt consiste de TCM – 199 sais de Hank (Invitrogen®, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, CA, USA), 12 UI/mL de hormônio luteinizante (LH), 0,01 UI/mL de hormônio folículo estimulante (FSH) e antibióticos (Amicacina, 0,075 mg/mL). No laboratório, os COCs foram transferidos em número de 30-35 para uma gota de 200 µL de meio de maturação, coberta com óleo de

silicone e incubados por 22 h a 39°C e 5% CO₂ em ar. O meio de maturação consistiu de TCM – 199 sais de Earl (Invitrogen®, CA, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, CA, USA), 12 UI/mL de LH (Sigma ®), 0,01 UI/mL de FSH (Sigma ®), 0,1mg/mL de Glutamina e antibiótico (Amicacina, 0,075 mg/mL).

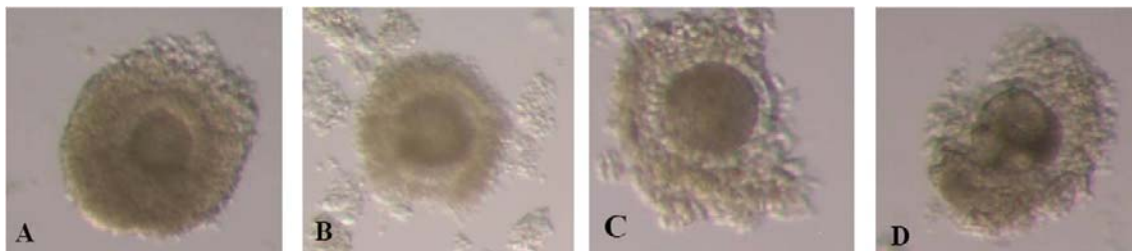


Figura 2.3. Foto ilustrativa apresentando a classificação de Complexos Cumulus Ovócitos (COCs). A- Ovócito de grau I, com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas compactas de células do cumulus; B- Ovócito de grau II, citoplasma homogêneo com pequenas áreas mostrando pigmentações irregulares, cumulus compacto menor que no grau I; C- Ovócito grau III, com citoplasma heterogêneo, e células do cumulus com pequenas áreas desnudas; D- Ovócito grau IV, citoplasma heterogeneamente pigmentado, apresentado vários vacúolos e o cumulus parcialmente ausente. Fonte: Caixeta & Dode (2008).

Após a maturação, os COCs foram transferidos para uma gota de 200 µL de meio de fecundação TALP (Parrish et al., 1995), suplementado com penicilamina (2 mM), hipotaurina (1mM), epinefrina (250 mM) e heparina (10 µg/mL), sendo inseminados com sêmen sexado para fêmea pelo método de citometria de fluxo (ABS Pecplan) de um touro Holandês já testado previamente para a PIV. O sêmen de um touro com fertilidade *in vitro* conhecida, rotineiramente usado no laboratório, foi utilizado como controle da PIV.

O sêmen de cada touro foi descongelado a 37°C por 30 segundos em banho-maria e as células espermáticas selecionadas por centrifugação em gradiente descontínuo de *Percoll* 45 e 90% (touro controle) e 45 e 60% (sêmen sexado).

Para o sêmen controle, foi utilizado o protocolo descrito por Marinheiro et al. (2009). As amostras de sêmen foram colocadas sobre um volume total de 800 µL, sendo 400 µL de gradiente de *Percoll* 45% e 400 µL de gradiente de *Percoll* 90%, colocados em microtubos de 1,7 mL e centrifugados a 5.400 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* centrifugado por 5 minutos em SP-TALP a 5.400 g. O *pellet* resultante foi ressuspensionado com meio de fecundação (FEC).

Para o sêmen sexado, foi utilizado um protocolo de preparação espermática de acordo com Blondin et al. (2009), com modificações. Para isto, as amostras de sêmen foram

colocadas sobre gradiente de *Percoll* constituído de 400 µL de *Percoll* 45% e 400 µL de *Percoll* 60%, colocados em microtubo para centrífuga (1,7 mL), sendo centrifugados a 700 g por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* centrifugado por 2 minutos em 500 µL de meio FEC a 200 g. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* resultante foi homogeneizado, sendo utilizado para FIV.

4.3.2-Fecundação *in vitro* e cultivo dos embriões

Os ovócitos maturados foram transferidos para gotas de 50 µL de meio FEC para os sexados e 200 µL para o controle. Após a centrifugação no gradiente de *Percoll*, foi realizada a contagem dos espermatozóides no hematocítmetro, sendo que a concentração final na gota de fecundação foi de 1×10^6 espermatozóides/mL. Espermatozóides e ovócitos foram co-incubados por 18 horas a 39°C em 5% de CO₂ em ar, sendo o dia da inseminação *in vitro* considerado o dia zero (D0).

Após a co-incubação, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para gotas de 200 µL de meio de fluido de oviduto sintético (SOFaaci) (Holm et al., 1999), suplementado com 2,77 mM de mio-inositol e 5% de SFB e cultivados a 39°C em 5% de CO₂ em ar por 7 dias. Os embriões controles foram avaliados no D2 (48 horas) pós-inseminação (pi) quanto à clivagem e D6 (144 horas) e D7 (168 horas) pi para determinação da taxa de blastocisto.

4.4 Extração de RNA e Transcrição Reversa

Vinte embriões heterozigotos para gene o MAO-A, de cada estágio de desenvolvimento, 4 células (44 horas pi), 8-16 células (72 horas pi), mórula (144 horas pi), blastocisto (156 horas pi) e blastocisto expandido (168 horas pi) (Figura 2.4) foram produzidos e congelados a -80° C em RNAlater (Ambiom®) em dois *pools* de dez embriões para cada estágio até a extração de RNA. O RNA total dos embriões e um pool de 15 ovócitos foi isolado utilizando o kit Invisorb Spin Cell (Invitek®), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA total do sêmen foi isolado de 5 palhetas contendo

aproximadamente $2,9 \times 10^6$ células espermáticas, utilizando Trizol Reagent (Invitrogen®), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. O sêmen foi centrifugado em gradiente de *Percoll* 40% - 70% a 700g por 45 min para evitar a possibilidade de contaminação com células somáticas. Posteriormente foi adicionado Trizol e o material incubado a 60° C durante 30 minutos, agitando a cada dez minutos. Em seguida às extrações, as amostras de RNA total foram tratadas com 1U DNase I (Invitrogen®) a 37° C por 15 minutos, e a transcrição reversa realizada utilizando 200 U de SuperScript III (200U μ L⁻¹; Invitrogen®) e 0,5 μ g de Oligo-DT₁₂₋₁₈ *primer* (0,5 μ g/ μ L; Invitrogen®). As reações foram realizadas utilizando 65° C por 5 min, 42° C por 52 min e 70° C por 15 min para a inativação da enzima.

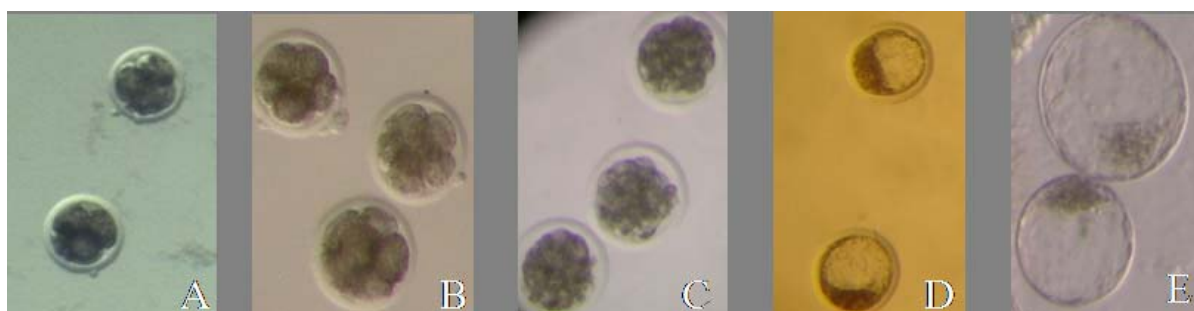


Figura 2.4. Embriões em estágio de: A- 4 células (44 horas pi); B- 8-16 células (72 horas pi); C- mórula (144 horas pi); D- blastocisto (156 horas pi); E- blastocisto expandido(168 horas pi). Fonte: Laboratório de Reprodução Animal, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

4.5 RT-PCR-RFLP para o Gene MAO-A

Para detectar e caracterizar a expressão alelo-específica para o gene MAO-A nos embriões foi usada uma estratégia baseada em uma PCR *nested* utilizando os *primers* descritos na Tabela 2.1. A fenotipagem foi possível pois o alelo G é necessariamente de origem paterna, enquanto o A, materno. Após a transcrição reversa e dois *rounds* de amplificação, os amplicons foram digeridos com a enzima de restrição *RsaI* e a fenotipagem realizada por eletroforese em gel de agarose 3%. Foram realizadas três repetições de amplificação com os *primers* externos (primeiro *round* de amplificação) para cada *pool* de embriões de cada estágio e duas repetições com os *primers* internos (segundo *round* de amplificação) para cada template do primeiro *round*. A primeira rodada de amplificação foi realizada utilizando 1,0 μ L de cDNA de cada *pool* de embriões, tampão 1X de PCR, 1,0 mM

MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer out*, 1,0 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen®), em um volume final de 20 µL. As reações foram corridas em um termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando as seguintes condições: 94° C por 3 min, 40 ciclos a 94° C por 30 seg, 51° C por 30 seg e 72° C por 40 seg, seguido de uma extensão final a 72° C por 10 min. Esta amplificação gera um amplicon de 178 pb. A segunda rodada de amplificação foi realizada utilizando 1,0 µL do primeiro PCR como molde, tampão 1X de PCR, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer internos*, 1,0 U de Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen®), em um volume final de 20 µL. As reações foram corridas em um termociclador PTC-100 (MJ Research) utilizando as seguintes condições: 94° C por 3 min, 40 ciclos a 94° C por 30 seg, 52° C por 30 seg e 72° C por 40 seg, seguido de uma extensão final de 72° C por 10 min. Esta segunda amplificação gera um amplicon de 106 pb. Um volume de 13 µL do amplicon gerado pelo segundo *round* de amplificação foi digerido usando 10 U da enzima de restrição *RsaI* (Promega®) com a reação sendo incubada *overnight* a 37°C. Os produtos da digestão foram detectados por eletroforese em gel de agarose 3.0%, corado com brometo de etídio (10 mg mL⁻¹) e fotografado sob luz UV. O alelo A é representado por um fragmento de 106 pb e o alelo G por dois fragmentos, 83 e 23 pb.

Para detecção da presença de mRNA do MAO-A em sêmen e ovócitos foram utilizadas as mesmas condições de amplificação com os *primers* internos, fazendo apenas um *round* de amplificação, mas com 40 ciclos.

4.6 Sequenciamento do Gene MAO-A

Para a confirmação dos resultados da fenotipagem, um produto de amplificação gerado por RT-PCR utilizando apenas os *primers* externos (Tabela 2.1) foi produzido de um *pool* de embriões no estágio de mórula. Posteriormente, este amplicon foi purificado utilizando um protocolo baseado em Acetato de Amônio (7.5M) e etanol absoluto e sequenciado pela metodologia de dideoxy em um sequenciador ABI 3130xl (Applied Biosystem®) usando o *primer* internos *forward* (Tabela 2.1).

4.7 Análise dos dados

Para a fenotipagem do gene MAO-A nos embriões foi realizada uma análise descritiva dos dados, detectando se houve expressão bialélica ou monoalélica e identificando a origem parental do alelo. Para o sêmen e ovócitos maturados, foi avaliado apenas a presença ou ausência do mRNA MAO-A na amostra. O resultado do sequenciamento do gene MAO-A foi avaliado utilizando os programas Chromas 2.01 (Copyright©, Technelysium Pty Ltd) e DNAMAN (Lynnon BioSoft).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados

Um total de 1013 ovócitos foram aspirados de nove novilhas e classificados de acordo com Caixeta & Dode (2008) em graus I, II, III e IV. A média de ovócitos aspirados por animal, por aspiração foi de 16,07, sendo 5,71 grau I e II. Foram selecionados apenas ovócitos graus I e II para a maturação *in vitro*, e posteriormente fecundados com sêmen sexado para fêmea de um touro da raça Holandesa (Roy Fritol, ABS Pecplan), previamente testado para FIV, que apresentou 29,3% de taxa de blastocisto em D7. Em um estudo prévio realizado em nosso laboratório, determinou-se a taxa de embriões machos produzida por este sêmen, que foi de 16,3% (n = 49 embriões totais), sexados por PCR.

Os embriões foram utilizados para a extração de RNA e a fenotipagem do gene MAO-A foi realizada em cinco fases ou estádios de desenvolvimento embrionário: 4 células (44 horas pi), 8-16 células (72 horas pi), mórula (144 horas pi), blastocisto (156 horas pi) e blastocisto expandido (168 horas pi). Devido à necessidade de se obter embriões em diferentes fases para a de extração de RNA, não foi possível obter a taxa de blastocisto. Mas, para o touro de referência utilizado como controle da PIV, a qual foi realizada simultaneamente às sete repetições do experimento, a taxa de clivagem foi de 81% e a taxa de blastocisto, em D7 (168 horas pi), de 40%.

Para a fenotipagem do gene MAO-A foram usados cDNA de dois *pools* de dez embriões para cada estágio de desenvolvimento. O RNA mensageiro para o gene MAO-A foi detectado em todos os *pools* de embriões, de todas as fases de desenvolvimento. A expressão bialélica (Xm e Xp) ou presença de mRNA MAO-A de ambos os cromossomos X foi detectada em todas as fases de desenvolvimento, exceto em mórula, onde apenas mRNA do cromossomo X materno foi detectado (Figura 2.5).

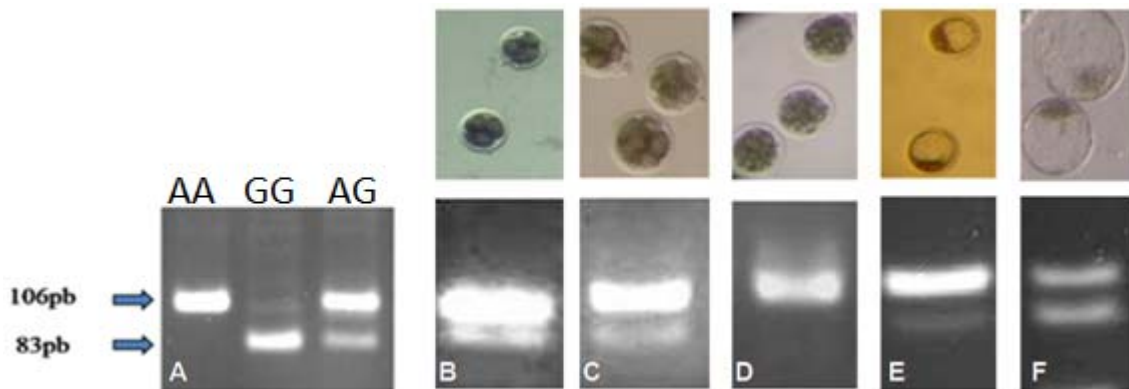


Figura 2.5. Análise eletroforética em gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo, mostrando os dados da fenotipagem para o gene MAO-A. A – PCR-RFLP utilizando DNA controle mostrando os genótipos: AA (106 pb), GG (83 pb) e AG (106 pb e 83 pb). B – produto de RT-PCR-RFLP de embriões de 4 células (alelos A e G); C - 8-16 células (alelos A e G); D - Mórula (alelo A); E - Blastocisto (alelos A e G); F- Blastocisto Expandido (alelos A e G). Fragmento de 23 pb não é visualizado no gel.

Além de detectar a expressão do gene MAO-A, ou a presença do mRNA nos *pools* de embriões em todas as fases de desenvolvimento, foi detectada também sua expressão ou presença no sêmen sexado utilizado para realizar a FIV e no *pool* de 15 ovócitos maturados (Figura 2.6).

Com relação ao sequenciamento (Figura 2.7), os resultados confirmaram os dados da fenotipagem, mostrando que no estágio de mórula a expressão é monoalélica (Xm) (Alelo A- círculo).

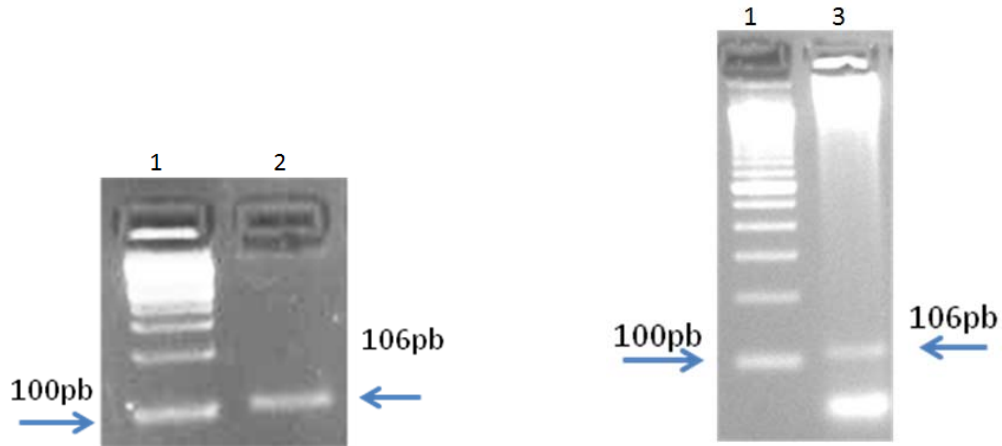


Figura 2.6. Análise eletroforética em gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo mostrando produto de amplificação do gene MAO-A (106pb) por RT-PCR. Linha 1: marcador de 100pb; linha 2: do sêmen sexado para fêmea utilizado na FIV; linha 3: ovócitos maturados.

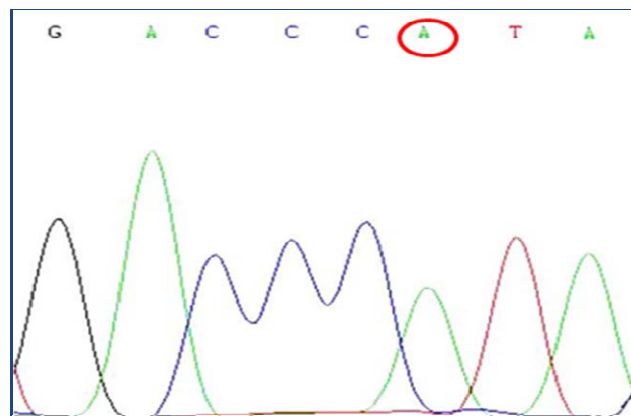


Figura 2.7. Cromatograma de parte da sequência do gene MAO-A (nucleotídeos 1855 a1862 - *GenBank* número NM_181014.2) em embriões no estágio de mórula, confirmando a presença do alelo A (círculo vermelho), que representa o alelo materno.

5.2 Discussão

Expressão bialélica (X_m e X_p), ou presença de mRNA dos dois parentais, do gene MAO-A foi detectada nos estádios de 4 células, 8-16 células, blastocisto e blastocisto expandido, sendo observada expressão de forma monoalélica, ou presença somente do mRNA materno, apenas em mórula. Este resultado foi baseado na fenotipagem do gene MAO-A usando RT-PCR-RFLP (Figura 2.5), e confirmado por sequenciamento de cDNA (Figura 2.7).

Nesta discussão, o uso da expressão “expressão bialélica” se refere à detecção de ambos os alelos no *pool* de células embrionárias e não na mesma célula.

Em mamíferos placentários, a inativação do cromossomo X (ICX) afeta o cromossomo X paterno ou materno aleatoriamente durante o desenvolvimento inicial, e o estado inativo em seguida é herdado de forma estável, gerando adultos mosaicos de dois tipos de células (Heard & Disteché, 2006).

A expressão de um gene a partir de apenas um membro parental de um par de cromossomos é conhecida como *imprinting*, e é causada por uma memória epigenética advinda do ovócito e espermatozóide (Lucchesi et al., 2005). Um *imprinting* materno, protegendo da inativação o cromossomo X materno (X_m) da ICX, é adquirido durante a maturação do ovócito (Goto & Takagi 1998, 2000; Tada et.al., 2000). Portanto, espera-se a expressão de alelos do cromossomo X materno após a fecundação. Isso provavelmente evoluiu para garantir a atividade gênica na única cópia de um cromossomo X em machos.

Durante o processo meiótico no macho, em que o espermatozóide é produzido, um processo conhecido como inativação meiótica do cromossomo sexual (IMCS) ocorre. Huynh & Lee (2003, 2005) mostraram que, quando um ovócito é fecundado, o cromossomo X paterno chega em um estado pré-inativado. Estes autores sugerem que este estado pode ser uma extensão da MSCI, que persiste durante o estágio embrionário no útero. Okamoto et al. (2004), por outro lado, alegam que o X paterno herdado é inicialmente ativo após a fecundação e se torna inativo após o início do acúmulo de RNA XIST no estágio de quatro células de desenvolvimento. Todos os estudos citados acima foram realizados utilizando embriões de camundongos em estádios de pré-implantação, por isso tem que se ter cautela ao comparar com embriões bovinos.

O sêmen utilizado neste experimento para a produção *in vitro* dos embriões mostrou, em um estudo prévio, uma taxa de produção de embriões machos de 16,3% (n=49). Baseado neste resultado, há a possibilidade de se ter embriões machos nos *pools* utilizados no experimento. Como há um consenso de que o cromossomo X materno tem que permanecer ativo (Goto & Takagi 1998, 2000; Tada et.al, 2000) independente do sexo do embrião, até o estágio de blastocisto, momento em que há uma inativação aleatória nas células da massa celular interna, a possível presença de embriões machos nos *pools* não interferiu nos resultados. Isso porque foi detectada a presença do mRNA materno em todos os *pools* de todas as fases de desenvolvimento. O que possibilitou a caracterização do padrão de expressão alelo específica do gene MAO-A durante esse período do desenvolvimento foi o

padrão de expressão ou presença do mRNA paterno, obviamente advindo dos embriões fêmeas.

Nossos resultados indicam uma cinética de inativação diferente dos encontrados por Huynh & Lee (2003, 2005), porque eles alegam que um cromossomo X já está silenciado em fase de duas células, quando a ativação gênica zigótica ocorre em camundongos, o que sugere que os cromossomos X já sofreram compensação de dose desde a concepção. Nós mostramos uma possível expressão bialélica do gene MAO-A em estágio de 4 células, antes da ativação do genoma embrionário ocorrer em bovinos, que, segundo Park et al. (1999) ocorre de 4-8 células e, segundo Frei et al. (1989) ocorre na fase de 8-16 células Xue et al. (2002), mostraram que o gene MAO-A, ligado ao X, está sujeito à XCI. Portanto, a expressão bialélica do MAO-A, detectada neste experimento, sugere que a compensação de dose ainda não aconteceu. De qualquer forma, não podemos afirmar definitivamente se está havendo atividade gênica em ambos cromossomos X nesta fase de 4 células, pois detectamos a presença do mRNA MAO-A em espermatozóides e ovócitos maturados. Portanto, o mRNA detectado nos embriões pode ter vindo do espermatozóide e/ou ovócitos.

Pelo menos até o estágio de 8-16 células, não se pode afirmar que há expressão gênica advinda dos cromossomos X do embrião, pois o mRNA detectado pode ter vindo do ovócito e/ou espermatozóide. Mas, após o estágio de mórula, momento em que o genoma embrionário já está ativado e também pelo desaparecimento do mRNA paterno em mórula e seu reaparecimento em blastocisto, pode-se afirmar que ambos os cromossomos estão ativos, mas provavelmente não na mesma célula.

Existe uma inconsistência entre os resultados de Huynh & Lee (2003, 2005) e Okamoto et al. (2004) em estudos feitos com camundongos. Os primeiros comentam que um alelo Xp entra no ovócito em um estado inativo. Por outro lado, Okamoto et al. (2004) sugerem que o Xp está ativo e, depois é gradativamente inativado, o que ocorre em torno do estágio de 4 células. Nossos resultados estão de acordo com Okamoto et al. (2004), porque detectamos expressão bialélica do MAO-A nos estádios de 4 e 8-16 células, com expressão monoalélica em mórula. Por outro lado, fomos capazes de detectar a presença do mRNA MAO-A nos espermatozóides e ovócitos maturados, como já citado anteriormente. Com base neste resultado, é possível que o alelo paterno detectado nos embriões de 4 células possa ser proveniente do espermatozóide e isto pode ser reforçado pelas informações da literatura, que apesar de controversas, mostram que a ativação genômica do embrião ocorre em momento posterior, de 4-8 células (Park et al., 1999) e 8-16 células (Frei et al., 1989). De qualquer forma, apesar de não ter sido quantificada a expressão do gene MAO-A nos embriões,

espermatozóides e ovócitos, a detecção do amplicon por eletroforese (Figura 2.6) sugere uma quantidade pequena de mRNA nos espermatozóides e ovócitos. Somado a isso, se considerarmos que o mRNA detectado nos embriões de 4 células e 8-16 células é advindo do espermatozóide, tem-se que considerar que é oriundo de apenas dez células espermáticas por *pool*, o que pode parecer improvável, pois foram utilizadas aproximadamente $2,9 \times 10^6$ células espermáticas para a extração do RNA total. Assim, existe a possibilidade de que o cromossomo X paterno esteja ativo nesta fase de 4 células, o que contraria a teoria de que não há atividade do genoma embrionário nesta fase do desenvolvimento em bovinos. Mas, uma outra questão que deve ser considerada é que este estudo foi realizado com embriões produzidos *in vitro*, o que pode influenciar no processo de inativação do cromossomo X e na expressão gênica de uma maneira geral (Rizos et al., 2002).

Quando se considera as fases de blastocisto e blastocisto expandido, encontramos expressão de ambos os alelos (Xp e Xm), mostrando que já houve um processo de inativação, em mórula, e reativação do Xp em blastocisto. Estes resultados não estão de acordo com os resultados de Okamoto et al. (2004). Estes autores, estudando células isoladas da massa celular interna, mostraram que o Xp é mantido inativo até a fase de blastocisto. No estágio de blastocisto tardio, no entanto, encontraram que o Xp é reativado na massa celular interna, permitindo a remodelação da cromatina e inativação aleatória do X nessas células. Resultados similares *in vivo* foram independentemente obtidos por Mak et al. (2004). Essa diferença encontrada por nós em relação aos estudos de Okamoto et al. (2004) e Mak et al. (2004) provavelmente pode ser explicada pelas diferenças na cinética de desenvolvimento de embriões bovinos comparados aos de camundongos e/ou alterações provocadas pelo sistema de produção *in vitro*.

Até a fase de mórula, o embrião é constituído por um único tipo celular, só acontecendo a primeira diferenciação a partir de blastocisto. De acordo com Huynh & Lee (2003), na fase de mórula certas células podem escapar da marcação *imprinting* relacionada à inativação do cromossomo X, contribuindo para a formação da massa celular interna. Em blastocistos de mamíferos, a inativação do cromossomo X no trofoblasto é preferencialmente paterna e na massa celular interna ocorrendo de forma aleatória, tanto o paterno quanto o materno podendo sofrer inativação (Heard & Disteche, 2006). Portanto, como neste experimento foram utilizados embriões inteiros, não havendo a separação entre células da massa celular interna e trofoblasto, não foi possível afirmar se o mRNA paterno e materno detectados nos blastocistos, eram oriundos da massa celular interna ou trofoblasto. De qualquer forma este não foi o objetivo do trabalho.

Com relação aos mecanismos bioquímicos relacionados à inativação do cromossomo X, um complexo de proteínas Eed começa a ser acumulado sobre o cromossomo X que será inativado, após a cobertura desse cromossomo com o RNA XIST, que parece ser o evento inicial para ocorrer a inativação (De La Fuente et al., 1999). Plath et al. (2002, 2003) citam que o acúmulo dessas proteínas são um dos eventos responsáveis pela manutenção da inativação do X. Rougeulle et al. (2004), citam que o acúmulo do complexo Eed/Ezh2, um complexo de proteínas conhecido por estar associado com silenciamento gênico e atividade enzimática sendo capaz de modificar histonas intimamente associadas ao DNA nos cromossomos, é um marco no início da inativação do X. A presença de Eed sobre o Xi, em embriões XX, foi detectada a partir de mórula (Silva et al. 2003). Isto está de acordo com nossos resultados, pois o acúmulo de Eed está relacionado à inativação do X e neste trabalho mostramos expressão monoalélica do MAO-A nesta fase, confirmando que o Xp está inativo neste momento.

Finalmente, este estudo caracterizou, pela primeira vez, a expressão alelo-específica de um gene ligado ao X e à inativação do cromossomo X em embriões bovinos de 4 células a blastocisto expandido produzidos *in vitro*. O cromossomo paterno está inativado em mórula, sendo imediatamente reativado em blastocisto.

6 CONCLUSÕES

- Foi determinada a expressão alelo-específica do gene MAO-A, podendo-se usar esse resultado para especular sobre o padrão de inativação do cromossomo X em embriões bovinos;
- Caracterizar o padrão de inativação do cromossomo X em embriões bovinos produzidos *in vivo* é importante para determinar se realmente existe uma influência do sistema *in vitro* sobre este importante evento epigenético;
- Elucidamos o padrão de inativação do cromossomo X em nosso sistema de produção *in vitro* de embriões, e isto pode ser uma ferramenta útil como um marcador para apoiar o desenvolvimento de novos protocolos de produção de embriões *in vitro*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIASE, F.H.; FRANCO, M.M.; GOULART, L.R.; ANTUNES, R.C. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, p. 313-315, 2002.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, p. 6-21, 2002.
- BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, p. 30-38, 2009.
- BROCKDORFF, N. X-chromosome inactivation: closing in on proteins that bind XIST RNA. **Trends in Genetics**, v. 18, p. 352–358, 2002.
- CAIXETA, S.E.; DODE, A.N.M. Dissecção folicular: Um método eficiente para estudos de competência ovocitária. **Documentos Empraba**, v. 260, 2008.
- DE LA FUENTE, R.; HAHNEL, A.; BASRUR, P.K.; KING, W.A. X inactive-specific transcript (Xist) expression and X chromosome inactivation in the preattachment bovine embryo. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 769-75, 1999.
- DE RYCKE, M.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: risk analysis and epigenetic inheritance. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2487-2494, 2002.
- FREI, R.E.; SCHULTZ, G.A.; CHURCH, R.B. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8–16-cell-stage of embryogenesis in the cow. **Journal of Reproduction Fertility**, v.86, p. 637–641, 1989.
- GOSDEN, R.; TRASLER, J.; LUCIFERO, D.; FADDY, M. Rare congenital disorders, *imprinted* genes, and assisted reproductive technology. **Lancet**, v. 361, p. 1975-1977, 2003.

- GOTO, Y.; TAKAGI, N. Maternally inherited X chromosome is not inactivated in mouse blastocysts due to parental imprinting. **Chromosome Research**, v. 8, p. 101, 2000.
- GOTO, Y.; TAKAGI, N. Tetraploid embryos rescue embryonic lethality caused by an additional maternally inherited X chromosome in the mouse. **Development**, v. 125 p. 3353–3363, 1998.
- 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.
- HENDRIKS, R.W.; CHEN, Z.Y.; HINDS, H.; SCHUURMAN, R.K.; CRAIG, I.W. An X chromosome inactivation assay based on differential methylation of a CpG island coupled to a VNTR polymorphism at the 5' end of the monoamine oxidase A gene. **Human Molecular Genetics**, v. 1, p. 187–194, 1992.
- HOLLIDAY, R. The inheritance of epigenetic defects. **Science**, v. 238, p. 163–170, 1987.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v.52, n.683-700, 1999.
- 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.
- HUYNH, K.D.; LEE, J.T. X-chromosome inactivation: a hypothesis linking ontogeny and phylogeny. **Nature**, v. 10, p.8-16, 2005.
- LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in-vitro. **Journal Animal Science**, v. 48, p. 76–86, 1979.
- 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 Development**, v. 75, p. 598-607, 2008.
- LUCCHESI, J.C., KELLY, W.G.; PANNING, B. Chromatin remodeling in dosage compensation. **Annual Review of Genetics**, v. 39, p. 615–651, 2005.
- LUCIFERO, D.; MANN, M.R.W.; BARTOLOMEI, M.S.; TRASLER, J.M. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte *imprinting*. **Human Molecular Genetics**, v. 13, p. 839–849, 2004.
- MAK, W.; NESTEROVA, T.B.; DE NAPOLES, M.; APPANAH, R.; YAMANAKA, S.; OTTE, A.P.; BROCKDORFF, N. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. **Science**, v. 303, p. 666–669, 2004.
- MARINHEIRO, G.M.; CARVALHO, J.O.; FILHO, E.S.; CAIXETA, E.S.; FRANCO, M.M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation on sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, p. 1289-1297, 2009.

- OKAMOTO, I.; ARNAUD, D.; LE BACCON, P.; OTTE, A.P.; DISTECHE, C.M.; AVNER, P.; HEARD, E. Evidence for de novo *imprinted* X-chromosome inactivation independent of meiotic inactivation in mice. **Nature**, v. 438, p. 369–373, 2005.
- 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.
- PARRISH, J.J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.
- PARK, E-H.; CHIAN, R-C.; CHUNG, H-M.; LIM, J-G.; KO, J-J.; CHA, K-Y. The stage of embryonic genome activation in bovine embryos following in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 51, p. 188, 1999.
- PLATH, K.; FANG, J.; MLYNARCZYK-EVANS, S.K.; CAO, R.; WORRINGER, K.A.; WANG, H.; DE LA CRUZ, C.C.; OTTE, A.P.; PANNING, B.; ZHANG, Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. **Science**, v. 300, p. 131-135, 2003.
- PLATH, K.; MLYNARCZYK-EVANS, S.; NUSINOW, D.A.; PANNING, B. XIST RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. **Annual Reviews Genetics**, v. 36, p. 233–278, 2002.
- RIZOS, D.; LONERGAN, P.; BOLAND, M.P.; ARROYO-GARCÍA, R.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems: Implications for Blastocyst Quality. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 589–595, 2002.
- ROUGEULLE, C.; CHAUMEIL, J.; SARMA, K.; ALLIS, C.D.; REINBERG, D.; AVNER, P.; HEARD, E. Differential histone H3 Lys- 9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, p. 5475-5484, 2004.
- SILVA, J.; MAK, W.; ZVETKOVA, I.; APPANAH, R.; NESTEROVA, T.B.; WEBSTER, Z.; PETERS, A.H.; JENUWEIN, T.; OTTE, A.P.; BROCKDORFF, N. Establishment of histone h3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. **Developmental Cell**, v. 4, p. 481-95, 2003.
- TADA, T.; OBATA, Y.; TADA, M.; GOTO, Y.; NAKATSUJI, N.; TAN, S.; KONO, T.; TAKAGI, N. Imprint switching for non-random X-chromosome inactivation during mouse oocyte growth. **Development**, v. 127, p. 3101–3105, 2000.
- THOMPSON, J.G.; KIND, K.L.; ROBERTS, C.T.; ROBERTSON, S.A.; ROBINSON, J.S. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: more reason for caution? **Human Reproduction**, v. 17, p. 2783-2786, 2002.
- TURNER, J.M.; APRELIKOVA, O.; XU, X.; WANG, R.; KIM, S.; CHANDRAMOULI, G.V.; BARRETT, J.C.; BURGOYNE, P.S.; DENG, C.X. BRCA1, histone H2AX

- phosphorylation, and male meiotic sex chromosome inactivation. **Current Biology**, v. 14, p. 2135 -2142, 2004.
- TURNER, J.M.A. Meiotic Sex Chromosome Inactivation. **Development**, v. 134, p. 1823-1831, 2007.
- WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; LUCAS-HAHN, A.; GEBERT, C.; KORSAWE, K.; LEMME, E.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Epigenetic reprogramming throughout preimplantation development and consequences for assisted reproductive technologies. **Birth Defects Research**, v. 75, p. 1-9, 2005.
- WU, C.T.; MORRIS, J.R. Genes, genetics and epigenetics: a correspondence. **Science**, v. 293, p. 1103-1105, 2001.
- XUE, F.; TIAN, X.C.; DU, F.; KUBOTA, C.; TANEJA, M.; DINNYES, A.; DAI, Y.; LEVINE, H.; PEREIRA, L.V.; YANG, X. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in bovine clones. **Nature Genetics**, v. 31, p. 216–220, 2002.
- YEIVIN, A.; RAZIN, A. Gene methylation patterns and expression. **EXS Journal**, v. 64, p. 523-68, 1993.
- YOUNG, L.E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T.G.; BUTTERWITH, S.C.; GUTIERREZ, C.G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P.J.; ROBINSON, J.J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K.D. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, p. 153-154, 2001.
- YU, Y.W.; TSAI, S.J.; HONG, C.J.; CHEN, T.J.; CHEN, M.C.; YANG, C.W. Association study of a monoamine oxidase a gene promoter polymorphism with major depressive disorder and antidepressant response. **Neuropsychopharmacology**, v. 30, p. 1719–1723, 2005.