

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Matheus Credendio Eiras

Região MHM de *Gallus gallus domesticus*: padrão de metilação do DNA, número de cópias e sexagem

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Região MHM de *Gallus gallus domesticus*: padrão de metilação do DNA, número de cópias e sexagem

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

**Ribeirão Preto
2017**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Eiras, Matheus Credendio

Região MHM de *Gallus gallus domesticus*: padrão de metilação do DNA, número de cópias e sexagem, 2017. 135p. il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Genética.

Orientadora: Ramos, Ester Silveira

1. Região MHM; 2. Metilação do DNA; 3. Sexagem; 4. Aves; 6. Galinhas; 7. *Gallus gallus domesticus*;

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matheus Credendio Eiras

Região MHM de *Gallus gallus domesticus*: padrão de metilação do DNA, número de cópias e sexagem, 2017.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de
Concentração: Genética

BANCA EXAMINADORA

Data da Defesa: ___/___/___

Profa. Dra. Ester Silveira Ramos

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

**“Cada erro cometido
é uma virtude adquirida”**

(DeRose)

Aos meus pais.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos que tornaram esse trabalho possível, aos meus pais, amigos e mestres. O conhecimento e a experiência são os tesouros do acadêmico, muito além de vaidade, estão ligados ao seu propósito de vida, de tornar o mundo um lugar melhor. Os professores e pesquisadores são os paladinos do conhecimento, obrigado por contribuírem com a minha formação, serei eternamente grato e espero retribuir da melhor forma possível.

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), da Fundação de Amparo ao Ensino Pesquisa e assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA), do Conselho Nacional de Desenvolvimento de Pesquisa (CNPq) e da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO

Eiras, MC. **Região MHM de *Gallus gallus domesticus*: padrão de metilação do DNA, número de cópias e sexagem**, 2017. 135p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

As aves apresentam o sistema de cromossomos sexuais ZZ/ZW (macho e fêmea, respectivamente). Os mecanismos de determinação sexual para esses animais parecem envolver genes Z- e W-específicos. Há evidências de que mecanismos epigenéticos possam estar associados, incluindo neste caso a região hipermetilada no macho (*male hypermethylated* ou MHM), a qual é transcrita em um RNA não codificante que se acumula próximo ao sítio de transcrição, de forma similar ao que ocorre com o RNA *Xist* (*X-inactive specific transcript*). No entanto, não há dados suficientes que demonstrem a existência de um mecanismo de compensação de dose em aves. Os objetivos do presente projeto foram caracterizar, por meio de técnicas de biologia molecular, o padrão de metilação da região MHM em *Gallus gallus domesticus* e criar um teste de sexagem baseado no número de cópias da região MHM, presente no cromossomo Z. O DNA foi extraído de diferentes tecidos (pena, coração, cérebro, gônada, rim, pulmão, fígado, músculo e sangue) de oito animais adultos e vinte filhotes. O padrão de metilação da região MHM foi caracterizado por meio de sequenciamento de DNA pós-modificação com bissulfito de sódio. Identificamos os pontos de metilação da região estudada, que apresentou um padrão hipermetilado (92,3%) nas amostras provenientes de macho e um padrão hipometilado (2,1%) nas amostras de fêmea. O teste de sexagem por PCR tempo real quantitativa (qPCR) baseado no número de cópias da região MHM apresentou um acerto de 100% para todos os tecidos analisados, no entanto, os parâmetros utilizados para o DNA proveniente de fígado devem ser diferentes dos demais tecidos. Não encontramos diferença no número total de cópias da região MHM entre os animais do mesmo sexo, mas identificamos diferenças no número de cópias da região MHM entre os tecidos de um mesmo animal, sendo que o que apresenta o menor número de cópias da região MHM é o fígado, seguido por músculo, rim, coração, pulmão, gônada, cérebro e sangue. Além disso, verificamos uma nítida diferença entre o número de cópias da região MHM no DNA de fígado de filhotes e adultos, sugerindo que os pintinhos iniciam a sua vida com um número menor de cópias da região MHM no DNA do fígado e vão ganhando cópias ao longo da vida, até atingir os valores encontrados nos adultos. Os resultados abrem as portas para a elaboração de novas perguntas e formulação de novas hipóteses, além de esclarecer pontos importantes sobre essa complexa região, envolvida no processo de compensação de dose e determinação sexual das galinhas.

Palavras-chave: Região MHM; Metilação do DNA; Sexagem; Aves; Galinhas; *Gallus gallus domesticus*.

ABSTRACT

Eiras, MC. **MHM region of *Gallus gallus domesticus*: DNA methylation pattern, copy number and sexing**, 2017. 135p Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Birds have the ZZ/ZW sex chromosome system (male and female, respectively). The mechanisms of sexual determination for these animals appear to involve Z- and W-specific genes. There is evidence that epigenetic mechanisms may be associated, including in this case the male hypermethylated region (MHM), which is transcribed into a non-coding RNA that accumulates near the transcription site, similarly to what occurs with *Xist* RNA. However, there is insufficient data to demonstrate the existence of a dose compensation mechanism in birds. The objectives of the present project were to characterize by molecular biology techniques the methylation pattern of the MHM region in *Gallus gallus domesticus* and to create a sexing test based on the number of copies of the MHM region present on the Z chromosome. DNA was extracted from different tissues (feather, heart, brain, gonad, kidney, lung, liver, muscle and blood) from eight adult animals and twenty chicks. The methylation pattern of the MHM region was characterized by bisulfite sequencing. We identified the methylation points of the studied region, which presented a hypermethylated (92.3%) pattern in samples from male and a hypomethylated (2.1%) pattern in female samples. The sexing test using MHM region copie number by qPCR present a 100% accuracy for all analyzed tissues, however, the parameters used for the DNA from the liver should be different from the other tissues. We found no difference in the total number of MHM region copies among the same sex animals, but we identified differences in the number of MHM region copies between the tissues of the same animal. The tissue with the lowest number of MHM region copies is the liver, followed by muscle, kidney, heart, lung, gonad, brain and blood. In addition, we found a clear difference between the number of copies of the MHM region in the liver DNA of chicks and adults, suggesting that the chicks start their life with fewer copies of the MHM region in the liver DNA and are gaining copies at, to reach the values found in adults. The results found open the possibility to the elaboration of new questions and formulation of new hypotheses, besides clarifying important points about this complex region, involved in the process of dose compensation and sexual determination of the birds.

Key-words: MHM region; DNA methylation; Sexing; Birds; Chicken; *Gallus gallus domesticus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - Graus Celsius

A - Adenina

C - Citosina

CHD - *Chromobox Helicase DNA binding gene*

CHD-W - *Chromodomain-helicase-DNA-binding W-linked*

CHD-NW - *Chromodomain-helicase-DNA-binding nonW-linked*

CHD-Z - *Chromodomain-helicase-DNA-binding Z-linked*

CNV - Variação no número de cópias

CpG - Dinucleotídeo Citosina-fosfato-Guanina

Ct - *Quantification cycle* (ciclo de quantificação)

DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfatado

DMRT1 - *Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

EE0.6 - *0.6 kb EcoRI fragment*

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

g - Gramas

G - Guanina

GAPDH - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Kb - Kilo base

KCl - Cloreto de potássio

lncRNA - RNA longo não codificante

M - Molar

Mb - Mega base

MHM - *Male hypermethylated*

mm - Milímetros

mM - Milimolar

mRNA - RNA mensageiro
NaCl - Cloreto de sódio
ng - Nanogramas
pb - Pares de base
PBS - Phosphate buffer saline
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
pH - Potencial hidrogeniônico
pmol - Pico mol
qPCR - PCR quantitativa em tempo real
QUMA - Quantification toll for mehtylation analysis
R - Razão entre MHM e *GAPDH*
RAPD - *Random Amplified Polymorphic DNA*
RNA - *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
RNAi - *RNA interference*
Rox1 - *RNA on the X chromosome 1*
Rox2 - *RNA on the X chromosome 2*
rpm - Rotações por minuto
Rsx - *RNA-on-the-silent X*
SDS - Duodecil sulfato de sódio
Sox3 - *SRY-related HMG-box 3*
Sox9 - *SRY-related HMG-box 9*
Sry - *Sex-determining region Y*
T - Timina
U - Uracila
Xist - *X-inactive specific transcript*
µg - Micrograma
µl - Microlitro
µM - Micromolar
5-Ac - 5-azacytidine

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| I. INTRODUÇÃO..... | 31 |
| 1.1. Cromossomos sexuais | 31 |
| 1.2. A diferença entre carinatas e ratitas..... | 33 |
| 1.3. A compensação de dose nos sistemas XX/XY e ZZ/ZW..... | 36 |
| 1.4. Compensação de dose em aves | 39 |
| 1.5. O gene sexo-determinante das aves | 42 |
| 1.6. A intrigante região MHM (<i>male hypermethylated</i>) | 43 |
| 1.7. Os dois cromossomos Z do macho são iguais?..... | 45 |
| 1.8. Região MHM como marcador para sexagem | 46 |
| | |
| II. HIPÓTESES | 51 |
| | |
| III. OBJETIVOS | 55 |
| 3.1. Objetivo geral..... | 55 |
| 3.2. Objetivos específicos..... | 55 |
| | |
| IV. MATERIAL E MÉTODOS | 59 |
| 4.1. Obtenção dos tecidos e extração do DNA..... | 59 |
| 4.1.1. Amostras..... | 59 |
| 4.1.2. Extração de DNA..... | 59 |
| 4.1.3. Quantificação do DNA..... | 61 |
| 4.2. Análise do padrão de metilação do DNA da região MHM..... | 61 |
| 4.2.1. Modificação do DNA com bissulfito de sódio..... | 61 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2.2. Amplificação do DNA modificado com bissulfito de sódio..... | 62 |
| 4.2.3. Eletroforese das amostras tratadas com bissulfito de sódio..... | 67 |
| 4.2.4. Clonagem..... | 67 |
| 4.2.5. Sequenciamento..... | 68 |
| 4.3. Ensaio de sexagem..... | 68 |
| 4.3.1. Desenho dos <i>primers</i> | 69 |
| 4.3.2. Amplificação do DNA..... | 71 |
| 4.3.3. Obtenção dos resultados e análise estatística..... | 71 |
| V. RESULTADOS | 75 |
| 5.1. Padrão de metilação do DNA da região MHM..... | 75 |
| 5.1.1. Gel obtido após PCR de amostras modificadas com bissulfito de sódio..... | 75 |
| 5.1.2. Géis obtidos após PCR de amostras de DNA das bactérias clonadas..... | 76 |
| 5.1.3. Sequenciamento dos clones..... | 77 |
| 5.2. Ensaio de sexagem..... | 81 |
| 5.2.1. Curva de eficiência e controle..... | 82 |
| 5.2.2. Especificidade da reação..... | 84 |
| 5.2.3. qPCR de DNA dos animais adultos..... | 85 |
| 5.2.4. qPCR dos filhotes (pintinhos)..... | 89 |
| 5.2.5. Comparações entre os adultos e os filhotes..... | 99 |
| 5.2.6. Comparação entre os filhotes..... | 101 |
| 5.2.7. Comparação entre os tecidos..... | 101 |
| 5.2.8. Quantidade mínima de DNA para o teste de sexagem..... | 106 |

| | |
|---|------------|
| VI. DISCUSSÃO | 111 |
| VII. CONCLUSÃO | 121 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 123 |

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

1.1. Cromossomos sexuais

No reino animal existem dois tipos de sistemas de cromossomos sexuais. Em um deles a fêmea é o sexo homogamético, apresentando dois cromossomos sexuais basicamente idênticos, enquanto o macho é o sexo heterogamético, com dois cromossomos sexuais diferentes. No segundo tipo, o macho é o sexo homogamético e a fêmea o heterogamético.

Esses dois sistemas são diferenciados pela sua nomenclatura; os sistemas nos quais as fêmeas são homogaméticas (como por exemplo em humanos, camundongos e *Drosophila*) são representados pelos cromossomos sexuais X e Y, já os sistemas nos quais o macho é o sexo homogamético (como por exemplo em aves, répteis e lepidópteras) temos a representação dos cromossomos sexuais pelas letras Z e W (figura 1).

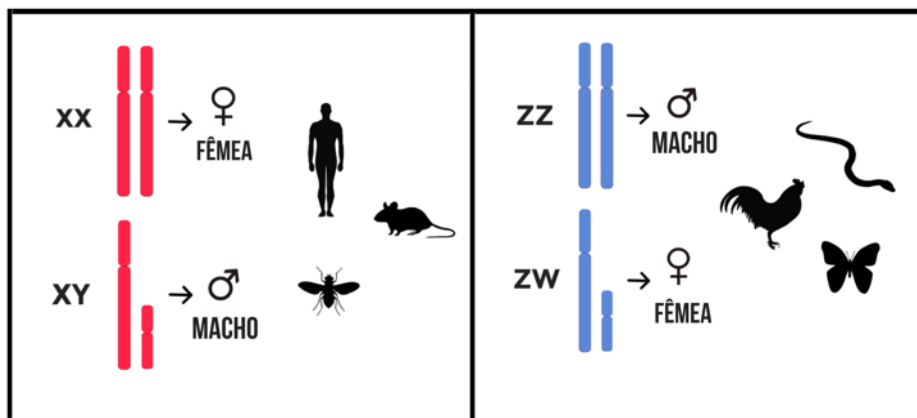


Figura1. Diferença entre o sistema XX/XY (com a fêmea homogamética e o macho heterogamético) e o sistema ZZ/ZW (com a fêmea heterogamética e o macho homogamético) e alguns animais presentes em cada um dos grupos.

Os cromossomos sexuais tem a sua origem a partir de um par de autossomos. A diferenciação dos autossomos nos cromossomos sexuais acontece após o surgimento de um gene sexo-determinante em um membro do par, isso faz com que os genes adjacentes adquiram funções sexo-específicas e exista uma supressão da recombinação entre o par (Ohno, 1967; Bachtrog, 2013), que leva a uma degeneração das regiões de baixa recombinação do cromossomo sexo-limitado Y ou W e culmina em grandes alterações na estrutura do cromossomo, devido à inativação, mutação e perda de vários genes, além do acúmulo de regiões repetitivas (Charlesworth, 1991; Graves, 2006). Assim, Ohno propôs a existência de um cromossomo sexual ancestral (proto-sex-chromosome) que teria evoluído até a formação dos cromossomos sexuais que encontramos nos animais atualmente (Ohno, 1967).

Embora o fato dos cromossomos sexuais serem originados a partir de um par de autossomos seja algo bem estabelecido, isso aconteceu independentemente várias vezes ao longo da evolução das espécies. Por exemplo, os sistemas XX/XY dos mamíferos evoluíram a partir de um par de autossomos diferente do ZZ/ZW das aves. Podemos encontrar muitos genes do cromossomo Z de galinhas nos autossomos 9 e 5 de humanos, enquanto os genes do cromossomo X de humanos são encontrados nos cromossomos 4 e 1 de galinhas (Nanda *et al.*, 1999; Groenen *et al.*, 2000; Bellott *et al.*, 2010; Graves, 2015). Além disso, muitos outros organismos desenvolveram seus cromossomos sexuais de maneira completamente independente, como por exemplo os anfíbios e peixes (Matsubara *et al.*, 2006; Graves, 2016). Mesmo dentro dos grupos, as alterações sofridas nos cromossomos sexuais ao longo da evolução variam de espécie para espécie, enquanto algumas apresentam apenas pequenas diferenças entre o X e o Y (ou Z e W), outras espécies possuem grandes diferenças entre eles (Kamiya *et al.*, 2012), adicionando uma grande complexidade ao tema, tornando um verdadeiro desafio entender o cenário com uma perspectiva mais ampla.

A complexidade aumenta se pensarmos que existem espécies de anfíbios, répteis e peixes, nas quais grupos próximos podem apresentar tanto o sistema XX/XY quanto o sistema ZZ/ZW. Um trabalho com o gênero de tartarugas *Staurotypus* identificou que os cromossomos sexuais desses animais provavelmente tiveram a mesma origem dos cromossomos sexuais das aves, no entanto, esse gênero de

tartarugas é XX/XY enquanto as aves são ZZ/ZW (Kawagoshi *et al.*, 2014), demonstrando que um mesmo par de autossomos tem a capacidade de evoluir para ambos os sistemas de cromossomos sexuais, XX/XY ou ZZ/ZW.

O estilo dos cromossomos sexuais X e Y se parece muito com o Z e W. Tanto o cromossomo X quanto o cromossomo Z são altamente conservados entre as espécies, enquanto o Y e o W podem sofrer grandes degenerações e apresentam uma estrutura de conteúdo gênico bem diferente entre as espécies. Assim, é muito provável que os dois sistemas diferenciem-se por meio do mesmo processo (Graves, 2014).

1.2. A diferença entre carinatas e ratitas

Em aves, o cromossomo Z é grande e bem conservado; genes homólogos podem ser encontrados em grupos derivados e basais de aves (como as carinatas e ratitas, respectivamente), em alguns casos até mesmo em répteis (Nanda *et al.*, 2011; Pokorná *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014). Já o cromossomo W apresenta muita diferença entre as espécies, com diferentes tamanhos e conteúdo gênico. Em aves carinatas o W é pequeno e hetercromático, enquanto no grupo basal das ratitas ele é tão grande quanto o Z, com um alto nível de homologia entre o Z e o W (figura 2), distinguíveis apenas pela região do centrômero (Solari, 1994). Em ratitas os cromossomos Z e W pareiam-se quase completamente enquanto em carinatas o pareamento é menor, começando em uma pequena região terminal do braço curto de Z e se espalhando pelas regiões não homólogas, de forma que o Z enrola-se no W nesse processo, até que os comprimentos sejam equalizados, no entanto, muitas vezes o pareamento é imperfeito ou pode não acontecer (Solari, 1992; Guioli *et al.*, 2012).

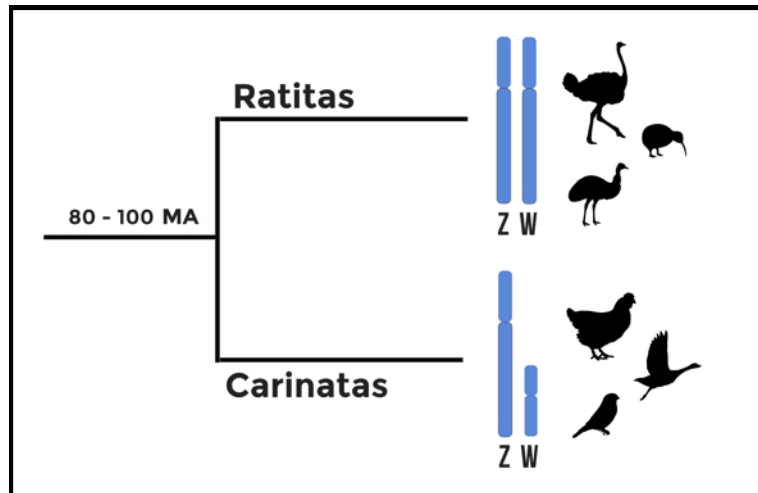


Figura 2. Árvore filogenética mostrando a diferença entre os cromossomos sexuais de ratitas (nas quais o Z e o W são praticamente do mesmo tamanho) e carinatas (nas quais o Z e o W apresentam uma grande diferença de tamanho). Os dois grupos separaram-se há cerca de 80-100 milhões de anos. O grupo das ratitas possui animais como o avestruz, a ema e o kiwi, enquanto o das carinatas pode ser representado por animais como as galinhas, os patos e os passeriformes.

Assim, podemos dizer que o cromossomo W é uma relíquia degenerada do Z, da mesma forma como o Y é do X. Acredita-se que a degeneração do cromossomo W tenha se originado na região centromérica do cromossomo e se espalhado em direção às regiões distais (Tsuda *et al.*, 2007), com exceção do W de tinamou que apresenta degeneração partindo da extremidade do braço longo em direção ao centrômero (Pigozzi, 2011).

Diversos genes encontrados no W possuem alelos no Z, no entanto, esses alelos diferenciam-se bastante, principalmente em relação ao tamanho dos introns e inversão de sequências repetitivas (Suh *et al.*, 2011). Como essas alterações ocorreram em diferentes graus, para diferentes genes ao longo das diversas espécies, podemos dizer que esse processo de degeneração do cromossomo W evoluiu independentemente em várias linhagens de aves. Isso fez com que o cromossomo W apresente um conteúdo gênico diferente entre as espécies (Zhou *et al.*, 2014).

Acredita-se que a rápida degeneração do cromossomo Y pode ser devido à sua presença no testículo, um ambiente mutagênico e de fraco reparo devido ao maior número de replicações nos espermatozoides do que nos óvulos (Aitken & Graves, 2002), no entanto esse não pode ser o cenário completo, pois no caso das aves, o cromossomo degenerado W nunca passa pelos testículos, já que está nas fêmeas. Portanto, deve existir uma outra explicação que justifique a rápida degeneração do Y e do W.

A seleção não funciona muito bem para o cromossomo Y, pois como não existe a recombinação com o cromossomo X, quando um novo alelo favorável surge na população, ele pode ser perdido por estar próximo a mutantes negativos no mesmo Y, ou então, um mutante negativo pode tirar proveito e caminhar para o sucesso junto com um alelo favorável (Graves, 2014). Vários mecanismos de deriva também estão em ação, uma vez que bons alelos do cromossomo Y perdidos não podem ser regenerados por recombinação. O mesmo processo deve funcionar para o W, porém sem a passagem pelo ambiente altamente mutagênico e de fraco reparo dos testículos.

Essa diferença pode ser a explicação do porquê o processo de degeneração sexo-específica parece ser mais avançado nos mamíferos do que nas aves e cobras. Até o momento, nenhum mamífero estudado apresenta a pouca diferenciação encontrada em ratitas e cobras boides (Graves, 2014). No entanto, isso levanta uma outra questão, que é o porquê da degeneração acontecer nas carinatas e não nas ratitas? Uma questão que permanece sem explicação.

O cromossomo W, por ser fêmea específico, deve acumular genes vantajosos para as fêmeas, assim como o Y acumula genes vantajosos para os machos. Talvez essa aquisição de genes com funções específicas para as fêmeas tenha sido atrasada nas ratitas, culminando na pouca diferenciação do W nessas espécies (Graves, 2014). No entanto, essa hipótese explica apenas o que pode ter acontecido e não o porquê disso acontecer.

1.3. A compensação de dose nos sistemas XX/XY e ZZ/ZW

A degeneração e perda dos genes de um dos cromossomos sexuais leva a uma conclusão: o sexo homogamético (XX ou ZZ) possui uma quantidade maior de genes do que o sexo heterogamético (XY ou ZW) (Koerich *et al.*, 2008; Hughes *et al.*, 2012; Moghadam *et al.*, 2012).

A região X-específica de humanos contém mais de 1000 genes, enquanto a região Y-específica contém apenas 27. Essa mesma diferença acontece em várias outras espécies, nas quais um dos cromossomos sexuais tenha sofrido degeneração, tanto para o sistema de cromossomos sexuais XX/XY quanto para o sistema ZZ/ZW (Graves, 2006; Ayers *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014).

Essa diferença na quantidade de genes entre os machos e fêmeas levou à hipótese da compensação de dose, segundo a qual os organismos devem lidar com essa disparidade criando algum tipo de mecanismo que compense a diferença entre os dois sexos e mantenha a proporção entre os cromossomos sexuais e os autossomos (Ohno, 1967). Pensando no fato de que os cromossomos sexuais evoluíram independentemente em diversas espécies, não é surpresa que a compensação de dose tenha evoluído independentemente em diversos grupos e diferentes soluções tenham sido encontradas para resolver o problema.

Por exemplo, os mamíferos placentários lidam com essa diferença entre os sexos inativando quase todos os genes de um dos cromossomos X do sexo homogamético, fazendo com que as fêmeas e os machos fiquem com uma dose dos genes do cromossomo X. Em *Drosophila melanogaster* a estratégia adotada foi a duplicação da transcrição do único cromossomo X presente nos machos, igualando a dose entre os dois sexos. Em *Caenorhabditis elegans* temos ainda uma outra estratégia, nessa espécie os animais XX são hermafroditas e os XO são machos, sendo que a dose gênica entre eles é igualada reduzindo a transcrição pela metade nos dois cromossomos X dos hermafroditas (Ercan *et al.*, 2007; Larschan *et al.*, 2011).

Embora essas estratégias igualem a dose entre os sexos, elas podem causar um desbalanço entre os cromossomos sexuais e os autossomos (Wijchers *et al.*, 2010; Wijchers & Festenstein, 2011), como, por exemplo, no caso dos mamíferos placentários, nos quais temos a inativação de um dos cromossomos X no sexo

homogamético. Para lidar com essa diferença, o único X ativo nos dois sexos sofreria uma hiperexpressão, para igualar-se aos autossomos. No entanto, essa hipertranscrição do único cromossomo X ativo ainda é questão de debate, restando a dúvida se ela ocorre ou não e, em que nível estaria ocorrendo (de forma geral ou gene específica) (Adler *et al.*, 1997; Nguyen & Disteché, 2006; Xiong *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2011; Kharchenko *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011; Julien *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017).

O que as estratégias observadas nesses organismos tem em comum, é que todas elas são baseadas em uma regulação gênica de um cromossomo inteiro, alterando praticamente todos os genes de um cromossomo. Esse tipo de compensação de dose ficou conhecido como compensação de dose completa e durante muitos anos acreditou-se que esse tipo de compensação seria o modelo padrão na natureza (Mank, 2013).

Outra característica dos organismos citados anteriormente é um sistema de cromossomos sexuais com a fêmea homogamética (XX). Quando estudos de compensação de dose começaram a ser feitos com espécies nas quais o sistema de cromossomos sexuais eram macho homogaméticos (ZZ), verificou-se que a compensação de dose não acontece de maneira completa (com a regulação do cromossomo todo) em nenhuma das espécies analisadas até o momento (com exceção de duas espécies de mariposas, *Bombyx mori* e *Manduca sexta*) (Itoh *et al.*, 2007; Mank, 2009; Zha *et al.*, 2009; Vicoso & Bachtrog, 2011; Harrison *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014), sugerindo que a compensação de dose completa é praticamente exclusiva do sistema XX/XY. Com o aumento no número de espécies analisadas, observou-se que mesmo dentro do sistema XX/XY esse tipo de regulação não é uma regra, com um número cada vez maior de espécies fêmea homogamética apresentando compensação de dose incompleta (Mank, 2013).

Nos animais com compensação de dose incompleta (como no caso das aves), ela ocorre pela regulação gene-por-gene, de forma que apenas alguns genes com funções críticas sejam compensados, enquanto os outros permanecem sem compensação, criando um viés de expressão, fazendo com que os níveis de transcrição de alguns genes sejam diferentes entre machos e fêmeas (Mank, 2013).

Isso nos leva à segunda pergunta, do porquê da compensação de dose completa ser muito mais frequente no sistema XX/XY do que no ZZ/ZW.

A idade dos cromossomos sexuais não explica a distribuição da compensação completa *versus* incompleta, já que aves e lepidópteros possuem cromossomos sexuais relativamente velhos e bem conservados, que são amplamente não compensados (Bachtrog *et al.*, 2014).

Uma possível resposta pode estar relacionada ao tempo que os cromossomos tiveram para adaptar-se às mudanças no conteúdo gênico. Quando foi proposto que todos os organismos deveriam possuir um sistema de compensação de dose completo, estavam sendo tomados por base, os exemplos de aneuploidias que podem acontecer por conta de defeitos na divisão celular. Por exemplo, deleções de cromossomos inteiros na maioria das vezes fazem com que o desenvolvimento se torne inviável. Pequenas deleções já são suficientes para criar uma aneuploidia grave o bastante para interromper o desenvolvimento de um embrião, provocar alguma síndrome ou simplesmente a perda de *fitness* (Girirajan *et al.*, 2011). Levando isso em consideração, assumiu-se que a diferença entre os cromossomos sexuais, que é uma forma natural de aneuploidia, deveria ser compensada por um mecanismo que igualasse a dose nos dois sexos (Ohno, 1967).

No entanto, existe um fator que deve ser considerado, as aneuploidias geradas por deleções de cromossomos inteiros geralmente acontecem de uma geração para a outra, não dando tempo suficiente para a espécie adaptar-se a essa mudança. No caso dos cromossomos sexuais, as alterações foram acontecendo gradualmente, geração após geração, com a degeneração progressiva de um dos cromossomos, ao longo desse processo, os genes que eram comuns aos cromossomos X e Y (ou Z e W) foram diferenciando-se e adquirindo novas funções e, posteriormente, perdidos em um dos cromossomos sexuais ou translocados para um dos autossomos (Graves, 2015).

A formação gradual dessa aneuploidia natural que encontramos nos cromossomos sexuais pode ter dado tempo suficiente para que os organismos criassem estratégias para lidar com a diferença de dose entre os sexos. Uma possível explicação para o fato de encontramos uma compensação de dose completa nos sistemas XX/XY mas não no ZZ/ZW pode ser justamente um fator relacionado a esse tempo disponível de adaptação. A degeneração do cromossomo Y aparentemente é muito mais rápida do que a degeneração do cromossomo W (Bachtrog *et al.*, 2011), possivelmente pela sua presença nos testículos e por passar

por um maior número de ciclos de replicação, talvez essa degeneração acelerada tenha criado a necessidade de uma forma mais rápida de compensação de dose dos genes do cromossomo X, que não teve tempo suficiente para desenvolver um sistema de compensação gene-por-gene, resultando em um sistema que envolve o cromossomo todo, sem fazer distinção entre os genes que são ou não dose sensíveis.

No caso do cromossomo W, por não estar presente no macho, sua degeneração seria mais lenta, tornando a transição para o estado de aneuploidia mais suave, dando tempo para que o cromossomo Z evoluísse um sistema de compensação de dose gene específico, que compense somente os genes dose-sensíveis por meio de alterações transcricionais e traducionais.

1.4. Compensação de dose em aves

Embora pareça razoável assumir que metade da dose gênica deve levar à metade da expressão, estudos de variação no número de cópias nos dizem que isso está bem longe de ser verdade em muitos casos. Quando existem variações na expressão gênica ou no nível de proteínas, decorrente de alterações no número de cópias, dizemos que esse gene sofre efeito de dose. O que se tem observado é que para alguns genes (dentro ou fora dos cromossomos sexuais), ter metade da dose gênica não produz qualquer mudança observável na expressão, ou seja, esses genes não possuem efeito de dose (Harrison *et al.*, 2012; Julien *et al.*, 2012; Malone *et al.*, 2012).

Isso quer dizer que mesmo em espécies sem um mecanismo ativo de compensação de dose dos cromossomos sexuais, alguns genes não vão diferir na expressão entre os sexos, ou então, podem não apresentar uma redução de 50% na expressão devido a ter metade da dose gênica. Por exemplo, em uma linhagem celular diploide de *Drosophila* com mudanças no número de cópias dos genes, regiões monossômicas apresentam expressão de 0,75 e regiões trissômicas 1,33 em relação ao valor 1 das regiões dissômicas, diferente dos resultados esperados de 0,5 para a monossomia e 1,5 para a trissomia, indicando que as células possuem

mecanismos para lidar com essa diferença, aumentando ou diminuindo a expressão quando necessário (Lee *et al.*, 2014).

Um outro caso digno de nota são os genes que sofrem *imprinting* e são expressos naturalmente por um único alelo (o materno ou o paterno, dependendo do gene). Esses genes geralmente são *up*-regulados, possivelmente para aliviar os efeitos deletérios devido à expressão monoalélica do gene (Zaitoun *et al.*, 2010).

Muitos genes presentes no cromossomo Z de galinhas não são compensados, portanto, existe uma diferença na transcrição entre o macho e a fêmea. Em aves, os níveis de RNA mensageiro (mRNA) dos genes do cromossomo Z são em média 1,5 vezes maiores em machos do que em fêmea, sendo que alguns genes apresentam uma razão entre o macho e a fêmea (M:F) de 1, ou seja, são totalmente compensados, enquanto outros apresentam uma razão M:F de 2, ou seja, são totalmente não compensado (Mank, 2009).

Os genes mais sensíveis, que são totalmente compensados, devem estar envolvidos em processos fundamentais para o desenvolvimento e manutenção da atividade celular, já os genes que são totalmente não compensados devem estar envolvidos com processos relacionados a papéis sexo-específicos (Ellegren *et al.*, 2007). Tanto nos autossomos quanto nos cromossomos sexuais de aves existe viés de expressão gênica entre machos e fêmeas, mas esses genes parecem estar preferencialmente localizados nos cromossomos sexuais, reforçando a ideia de um papel sexo-específico dos genes com viés de expressão (Itoh *et al.*, 2007; Uebbing *et al.*, 2015). Um ponto importante que deve ser levantado é que cada tecido apresenta o seu próprio viés de expressão, com diferentes genes sendo compensados ou não em diferentes tecidos e até mesmo em diferentes fases do desenvolvimento (Uebbing *et al.*, 2013; Uebbing *et al.*, 2015). Em galinhas, verificou-se que a maior compensação acontece no cérebro e a menor nas gônadas (Mank & Ellegren, 2009b).

Em relação à comparação dos níveis de RNA do cromossomo Z com os autossomos, obteve-se uma razão Z:autossomo de 0,8 nos galos e 0,6 nas galinhas. Isso sugere que a principal forma de regulação dos genes ligados ao Z é a redução da expressão no macho e não a hipertranscrição na fêmea (Uebbing *et al.*, 2015).

Um estudo interessante utilizou RNA-FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) em células interfásicas para verificar a transcrição de 11 genes do cromossomo Z

(Livernois *et al.*, 2013). Além de confirmar que os genes de Z são parcialmente compensados, como já mostravam os dados obtidos por PCR tempo real quantitativa (qPCR) e RNA-Seq (*RNA sequencing*), o estudo, com capacidade de observar os transcritos de células individuais, mostrou que essa compensação parcial não ocorre pela diminuição da quantidade de expressão dos loci dos dois cromossomos Z, e sim pela diminuição da probabilidade de expressão. Ou seja, culturas de fibroblastos de machos continham uma mistura de células com dois sinais (os dois Zs ativos) e um sinal (um Z ativo), implicando em um processo estocástico (Livernois *et al.*, 2013). Isso acontece em algum nível também com o cromossomo X de mamíferos (Livernois *et al.*, 2012), indicando que esse controle da probabilidade de transcrição existe tanto nos sistemas XX/XY quanto ZZ/ZW, podendo ser um mecanismo ancestral de controle da quantidade de transcrito.

Durante muito tempo utilizou-se apenas os dados de mRNA para afirmar que a compensação de dose não existia em aves (ou seria incompleta), baseando-se no fato dos níveis de mRNA serem diferentes entre os sexos, assumia-se que o nível de proteínas deveria ser diferente. No entanto, a comparação entre o nível de mRNA e o de proteínas pode ser relativamente grosseira e não refletir a realidade (Lu *et al.*, 2007; Abreu *et al.*, 2009; Ghazalpour *et al.*, 2011), assim, durante algum tempo existiu a possibilidade da compensação de dose de fato existir em aves, porém com uma regulação na tradução, que igualaria os níveis de proteínas entre os dois sexos.

Essa hipótese foi derrubada por um estudo que demonstrou que também no nível funcional das proteínas a compensação de dose completa não acontece em aves, sendo que o macho possui um nível mais alto de proteínas dos genes do cromossomo Z do que as fêmeas (Uebbing *et al.*, 2015). Seguindo o mesmo estilo encontrado nos transcritos, a diferença entre as proteínas segue um padrão gene-por-gene, sendo que algumas proteínas são totalmente compensadas, outras totalmente não compensadas e outras apresentam valores intermediários entre esses dois extremos. Um dado curioso proveniente do trabalho de Uebbing *et al.* (2015) é que os genes que são regulados em nível de proteínas muitas vezes não são os mesmos regulados em nível do mRNA, indicando a presença de dois sistemas de regulação nas aves, um que atua no processo de transcrição do DNA e outro que atua no processo de tradução do mRNA.

1.5. O gene sexo-determinante das aves

O que determina o sexo nas aves?

As aves possuem determinação genética do sexo, a temperatura pode influenciar as taxas de nascimento entre os sexos, mas por conta de uma mortalidade diferencial e não por alterações nas vias de determinação sexual (Göth & Booth, 2005).

Qual é o gene sexo-determinante em aves? Existe um gene W específico que leva ao desenvolvimento da fêmea, ou a dose dupla do Z leva ao desenvolvimento do macho?

Procurou-se muito um gene W específico que determine o sexo feminino, porém, todos os genes investigados até o momento possuem cópias no Z. Embora a presença de uma cópia no Z não desqualifique a cópia do W como sexo-determinante, pois diferenças entre os dois alelos, tanto na sequência quanto na presença de *introns*, pode fazer com que o alelo do W tenha uma função ovário-determinante. Um bom exemplo é o gene testículo-determinante *sex-determining region Y (SRY)* de mamíferos, presente no cromossomo Y, que divergiu do seu parceiro *SRY-related HMG-box 3 (SOX3)*, presente no X (Graves, 2013).

Na busca pelo gene ovário-determinante surgiram vários candidatos, em galinhas, a gônada direita não se desenvolve e a esquerda assume a posição como gônada funcional, avaliando a expressão de genes up-regulados nas gônadas de fêmeas durante o período sexo-determinante chegou-se a alguns genes candidatos, no entanto, esses genes não estavam conservados no W de outras linhagens de aves, desqualificando-os como genes ovários-determinantes.

Uma outra possibilidade seria a presença de um gene no cromossomo Z, que em dose dupla levaria ao desenvolvimento do macho (Itoh *et al.*, 2009).

O principal gene candidato até o momento é o *Doublesex And Mab-3 Related Transcription Factor 1 (DMRT1)*, que está presente no cromossomo Z e ausente no W, além disso, esse gene é conservado em vários grupos de animais, sempre relacionado com o desenvolvimento sexual (Raymond *et al.*, 1999). Em humanos, a deleção de uma pequena região contendo o gene *DMRT1* no cromossomo 9, leva a

reversão do sexo masculino para o feminino, indicando a importância desse gene na via de determinação sexual de humanos. Em medaka e flatfish o gene *DMRT1* é o próprio gene sexo-determinante (Nanda *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2014). Galos com a expressão reduzida do *DMRT1* por RNAi (*RNA interference*) apresentaram uma mistura de tecido ovariano com cordões testiculares e o marcador testicular *SRY-related HMG-box 9* (*Sox9*) foi reduzido, enquanto o marcador feminino (aromatase) foi aumentado (Smith *et al.*, 2009b).

Com o passar dos anos o gene *DMRT1* tem estabelecido-se na literatura como o gene sexo-determinante de aves e vários estudos sugerem que provavelmente seja esse o caso.

1.6. A intrigante região MHM (*male hypermethylated*)

O cromossomo Z de galinhas possui 80Mb e contém cerca de 1000 genes, dentre eles temos muitos genes vantajosos para o macho e apenas alguns genes vantajosos para as fêmeas (Wright *et al.*, 2015).

Existe uma região particularmente interessante no cromossomo Z, chamada de região MHM (*male hypermethylated*), ela está localizada no braço curto do cromossomo Z de galinhas e é conhecida por ser uma região que apresenta compensação de dose, dentro de um cromossomo que é altamente não compensado (Wright *et al.*, 2015). O *locus* MHM está hipermetilado em machos e não é transcrito, nas fêmeas, onde é hipometilado, produz um RNA longo não codificante (lncRNA) (Teranishi *et al.*, 2001), que de forma semelhante ao *X-inactive specific transcript* (*Xist*) de mamíferos placentários (Brown *et al.*, 1991), ao *RNA-on-the-silent X* (*Rsx*) de marsupiais (Grant *et al.*, 2012) e aos *RNA on the X chromosome 1* (*Rox1*) e *RNA on the X chromosome 2* (*Rox2*) em *Drosophila* (Amrein & Axel, 1997), regula a expressão de genes adjacentes. Além disso, a cromatina da região MHM possui um alto nível de acetilação das histonas no sexo feminino, tipicamente associado ao aumento da expressão gênica (Bisoni *et al.*, 2005).

Foi proposto que a região MHM seria uma possível nascente da compensação de dose completa em aves (Melamed & Arnold, 2007), considerando que essa região está situada dentro da parte mais antiga dos cromossomos sexuais de aves ela teria tido tempo para desenvolver a compensação de dose nessa porção do genoma, de maneira similar à compensação de dose mais completa em regiões antigas do cromossomo X de Térios (Carrel & Willard, 2005; Zhou *et al.*, 2014).

As regiões antigas do cromossomo Z mostram elevados níveis de expressão macho-enviesada e, embora a recombinação entre o Z e o W tenha cessado independentemente nas diversas espécies de aves, a expressão macho enviesada do Z é uma constante em todas elas, sugerindo que esse efeito é altamente conservado (Wright *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014).

Assim, podemos perguntar: o que essa região com um viés de expressão feminino está fazendo no meio de uma região antiga do Z, predominantemente dominada por genes macho enviesados? Para deixar o assunto ainda mais intrigante, a região MHM é conservada nas espécies do grupo gallonserae, porém está ausente nos outros grupos. Estudos em zebrafinch, flycatcher, corvo, emu e avestruz não foram capazes de identificar a presença da região MHM (Itoh *et al.*, 2010; Wolf & Bryk, 2011; Uebbing *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

Em uma análise interativa, foram excluídos sequencialmente os genes com o maior viés feminino na região MHM, até que não houvesse diferença significativa no viés sexual entre a região MHM e o cromossomo Z como um todo (Wright *et al.*, 2015), assim, descobriu-se que uma porção muito pequena de genes comandam o distinto padrão observado. Ao remover esses poucos genes a região MHM passou a apresentar uma expressão macho enviesada, em conformidade com o cromossomo Z como um todo. Dessa forma, devemos nos perguntar, como aconteceu a seleção para os genes dessa região e porque ela aconteceu somente no grupo gallonserae?

Um trabalho indicou uma variação regulatória nessa região em plover, uma espécie fora do grupo gallonserae (Moghadam *et al.*, 2013), assim, devemos nos perguntar se o padrão regulatório da região MHM foi perdido secundariamente em aves passeriformes ou ocorreu uma evolução convergente nos dois grupos.

Sendo uma região tão peculiar, seria plausível esperar um enriquecimento em termos de função dos genes nessa região, mas não foi encontrado nenhum enriquecimento significativo, deixando a questão ainda mais intrigante (Wright *et al.*,

2015).

Um possível caminho para responder a questão do porque essa região encontra-se no cromossomo Z pode estar relacionada com o gene que é regulado pelo lncRNA da região MHM, que é justamente o gene sexo-determinante *DMRT1*. Esse gene, desvantajoso para a fêmea, tem a sua expressão regulada pelo acúmulo do lncRNA da região MHM, que encontra-se hipometilada (expressa) na fêmea, impedindo a expressão do *DMRT1* e hipermetilada (não expressa) no macho, permitindo a expressão do *DMRT1* (Yang *et al.*, 2010; Caetano *et al.*, 2014).

1.7. Os dois cromossomos Z do macho são iguais?

Como exposto anteriormente, a região MHM está hipermetilada no macho. Ao tratar as células do macho com o agente demetilante 5-azacytidine (5-Ac) elas passaram a apresentar uma condição na região MHM mais parecida com a encontrada nas fêmeas, na qual a cromatina é menos compactada. Além disso, foi possível identificar a expressão de vários mRNAs relacionados à MHM que são expressos exclusivamente nas fêmeas (Itoh *et al.*, 2011).

O mais interessante foi que o efeito da 5-Ac na abertura da cromatina, que permitiu a expressão do MHM RNA foi geralmente restrita a um único cromossomo Z em células masculinas. Foram propostas duas possibilidades para esses resultados, na primeira foi proposto que a metilação do DNA e acetilação de histonas da região MHM difere normalmente nos dois cromossomos Z e, dessa forma, um cromossomo responderia melhor do que o outro ao tratamento com 5-Ac. Essa diferença pode não estar restrita à região MHM e os dois cromossomos Z podem diferir de maneira geral na quantidade e distribuição de citosinas metiladas. Já a segunda possibilidade levanta a hipótese de que a expressão do lncRNA da MHM nos dois cromossomos Z é letal. Isso faz sentido se levarmos em conta a característica de expressão gênica fêmea enviesada dessa região, que pode indicar um cluster de genes com funções fêmea específica, dessa forma, a alta expressão desses genes, possibilitada pela ativação da região MHM após o tratamento com 5-Ac pode ser incompatível com a sobrevivência de células ZZ de machos. Para testar essa hipótese os autores

testaram um tratamento com 5-Ac por um tempo maior, para verificar se após uma exposição prolongada os dois cromossomos Z passavam a expressar o lncRNA da região MHM, no entanto, mesmo após um longo período de exposição o número de células expressando o lncRNA nos dois cromossomos não aumentou, sugerindo uma letalidade das células masculinas com dose dupla de expressão da MHM (Itoh *et al.*, 2011).

Embora o resultado seja apenas referente à região MHM, isso inevitavelmente nos faz questionar se essa diferença característica entre os dois cromossomos Z de machos se repete em outras partes do cromossomo, ou então, se existe uma diferença global entre esses dois cromossomos.

Porém, levando em consideração apenas a diferença já encontrada na região MHM, podemos nos perguntar se existe algum tipo de preferência em relação a qual cromossomo Z sofre mais a ação do 5-Ac, se o cromossomo Z que foi herdado do macho ou o cromossomo Z herdado da fêmea.

1.8. Região MHM como marcador para sexagem

O gene *Chromobox Helicase DNA binding gene (CHD)* foi descrito por Delmas *et al.* (1993) em camundongo e através da análise de *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* para o *CHD*, Griffiths e Tiwari (1993) verificaram em chapim-real (*Parus major*, Passeriformes:Paridae) que alguns *primers* possuíam a habilidade de amplificar seqüências ligadas ao sexo. O gene em aves foi denominado de *Chromodomain-helicase-DNA-binding W-linked (CHD-W)* (Griffiths *et al.*, 1996). Existe ainda uma seqüência homóloga inicialmente chamada de *Chromodomain-helicase-DNA-binding non-W-linked (CHD-NW ou CHD-Z)*, localizada no cromossomo Z de *Gallus gallus domesticus* (Griffiths & Korn, 1997). A comparação entre os dois genes mostra que eles são similares e altamente conservados (Griffiths *et al.*, 1996).

A sexagem de aves tem sido realizada por diversos autores utilizando-se como marcador este gene. Alguns utilizam enzimas de restrição seguida de

Southern blot para identificar os fragmentos fêmea-específicos, outros fazem uso de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida por *Single-Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) ou ainda utilizam PCR com *primers* flanqueadores de sequências intrônicas, gerando um padrão para *CHD-W* e outro para *CHD-Z* (Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996; Millar *et al.*, 1996; Lesaicherre *et al.*, 2000; Nesje & Roed, 2000; Bermudez-Humarán *et al.*, 2002). Neste último caso, há o inconveniente de haver variações entre as espécies, mas devido à elevada homologia que o gene apresenta, acredita-se que *primers* conservados possam ser encontrados (Ellegren e Sheldon, 1997).

Até o momento o gene *CHD* é considerado um marcador “universal” para a sexagem de aves (Çakmak *et al.*, 2017), no entanto, o mesmo não está diretamente relacionado com a determinação sexual e as variações entre as espécies podem dificultar sua utilização (Ellegren & Sheldon, 1997).

Além do gene *CHD*, outras sequências localizadas em *W* ou em *Z* têm sido estudadas com a finalidade de obter-se melhores marcadores ou marcadores universais. Ogawa *et al.* (1998) descreveu um fragmento gerado por *EcoRI* localizado no *W* e que foi denominado de *0.6 kb EcoRI fragment* (EE0.6). Esta sequência parece ser útil para a sexagem tanto em espécies carinatas quanto em ratitas, porém como o *CHD* tem sua contraparte em *Z* e a similaridade destas sequências entre as diversas espécies pode variar, gerando um padrão um tanto ambíguo nos resultados (Griffiths *et al.*, 1998; Ogawa *et al.*, 1998). Por isso, tem sido constante a busca por novos marcadores ou *primers* diferenciados nestas regiões que possam abranger o maior número possível de espécies (Itoh *et al.*, 2001; Morinha *et al.*, 2012; Çakmak *et al.*, 2017).

A procura por marcadores universais para as técnicas moleculares deve ter como pré-requisito a pesquisa de regiões que, além de diagnosticar o sexo dos animais, ainda estejam relacionadas ao processo de determinação sexual em aves. Este pode ser o primeiro passo para o estudo de genes relacionados ao processo de determinação sexual nestes animais. Em nosso laboratório foi desenvolvido um ensaio utilizando a metilação da região *MHM* para a sexagem de galinhas, com resultados muito animadores quando utilizado em material obtido a partir de penas desses animais (Caetano & Ramos, 2008).

O nosso grupo de pesquisa também criou um teste para identificar o número de cópias do cromossomo X de humanos, utilizando qPCR para uma sequência do gene *AR* (androgen receptor), com o objetivo de identificar o sexo do indivíduo e possíveis aneuploidias envolvendo o cromossomo X (Ramos *et al.*, 2010). O presente trabalho de sexagem de aves por meio da identificação do número de cópias do cromossomo Z segue o mesmo princípio.

HIPÓTESES

II. HIPÓTESES

- É possível diferenciar machos e fêmeas de *Gallus gallus domesticus* devido à diferença de número de cromossomos Zs entre os sexos, por meio da quantificação de números de cópias da região MHM.

- Não existem diferenças no número de cópias da região MHM entre animais do mesmo sexo.

- Não existem diferenças no número de cópias da região MHM entre diferentes tecidos do mesmo animal.

- Não existem diferenças no número de cópias da região MHM entre os animais adultos e filhotes do mesmo sexo.

- A região MHM encontra-se hipermetilada nos animais do sexo masculino e hipometilada nos animais do sexo feminino.

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Criar um ensaio de sexagem baseado na diferença entre os sexos do número de cópias da região MHM e determinar os pontos de metilação diferencial do DNA dessa região em machos e fêmeas de *Gallus gallus domesticus*.

3.2. Objetivos específicos

- Criar um teste de sexagem de galinhas baseado na variação do número de cópias entre machos e fêmeas da região MHM, utilizando qPCR.

- Verificar se existem diferenças no número de cópias da região MHM entre os animais do mesmo sexo.

- Verificar se existem diferenças no número de cópias da região MHM em diferentes tecidos.

- Verificar se existem diferenças no número de cópias da região MHM entre animais adultos e filhotes do mesmo sexo.

- Caracterizar o padrão de metilação do DNA na região MHM por meio de sequenciamento pós-modificação de DNA por bissulfato de sódio.

MATERIAL E MÉTODOS

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DOS TECIDOS E EXTRAÇÃO DO DNA

4.1.1. Amostras

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal e pelo Comitê Interno de Biossegurança (processo CBQ-FMRP: 0030/97-08.49-I), ambos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Selecionamos oito animais adultos da espécie *Gallus gallus domesticus* (galinha), quatro machos e quatro fêmeas (obtidos com um fornecedor de aves local), os quais foram mortos por destroncamento e tiveram suas penas, rins, gônadas, corações, fígados, pulmões e cérebros separados para estudo. Os tecidos foram biopsiados com material estéril, fragmentados e armazenados em um microtubo contendo solução de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) para posterior extração de DNA.

Também utilizamos vinte pintinhos (obtidos com um fornecedor de aves local), dezesseis machos e quatro fêmeas, os quais foram anestesiados com solução inalante de isoflurano 100% (1 mL/mL) (Cristália®) e mortos por decapitação. Em seguida, tiveram suas penas, rins, gônadas, corações, fígados, pulmões, cérebros, músculos do peito e sangue separados para análise. Os tecidos foram fragmentados e armazenados em um microtubo contendo solução de PBS para posterior extração de DNA.

Todos os tubos foram armazenados a -80°C até o momento da extração do DNA.

4.1.2. Extração de DNA

O protocolo utilizado para a extração do DNA foi uma adaptação do protocolo utilizado na extração de DNA (Olerup e Zetterquist, 1992), conforme descrito à seguir. Retiramos as amostras dos tecidos do freezer -80°C e depositamos individualmente em um cadinho limpo e esterilizado. Adicionamos nitrogênio líquido

ao material e em seguida maceramos bem, até obter um pó fino. Adicionamos 450 μL de solução de lise (sacarose 0,32 M, tris-HCl 12 mM, MgCl_2 5 mM, triton-X 1%) ao tecido macerado, que foi transferido para um microtubo e centrifugado à 12000 x g durante 20 segundos. Após retirarmos o microtubo da centrífuga e eliminarmos o sobrenadante, adicionamos 1 mL de solução de lise ao material, que passou novamente pela centrífuga à 12000 x g durante 20 segundos. O tubo foi vertido, seco, e deixado de lado por alguns instantes, enquanto preparamos uma mistura contendo 80 μL de tampão de proteinase K, 0,375 M de NaCl, 0,12 M EDTA, 280 μL de água ultra-pura, 10 μL de SDS 20% e 8 μL de proteinase K 25 mg/mL, perfazendo um total de 378 μL .

Distribuímos o preparado entre os microtubos que estavam secando e estes foram postos em banho-Maria à 55°C *overnight* e, em seguida, 15 minutos à -20°C.

Após retirarmos os tubos da geladeira, adicionamos 120 μL de NaCl 5 M e agitamos durante 8 segundos. Feito isso, centrifugamos as amostras à 12000 x g para a formação de um *pellet* de proteína desnaturada. Transferimos 400 μL do sobrenadante para um novo tubo e adicionamos 1 mL de etanol absoluto. Homogeneizamos o produto por inversão (2 ou 3 vezes) e colocamos no freezer -85°C por 15 minutos. Em seguida centrifugamos as amostras por 10 minutos à 12500 x g (centrífuga refrigerada 0°C) e deixamos repousar no freezer -20°C durante 2 horas, com posterior passagem pela centrífuga (0°C) por 10 minutos à 12500 x g. Na etapa final, descartamos o sobrenadante e eliminamos o restante de etanol no microtubo por uma centrifugação de 20 minutos no Speed Vacum (Eppendorf®) à 45°C. Em seguida, adicionamos 50 μL de água ultra-pura com posterior banho-Maria à 37°C durante uma hora.

Armazenamos as amostras de DNA obtidas em freezer -20°C até o momento da quantificação da concentração do DNA.

A técnica descrita mostrou-se muito eficiente na extração do DNA de coração, gônada, rim, cérebro, fígado, pulmão, músculo e sangue. No entanto, esse protocolo não atingiu as expectativas com relação à extração do DNA de pena, gerando amostras com baixa concentração de DNA e muitas impurezas. Na tentativa de resolver esse problema, utilizamos uma outra técnica de extração de DNA, na qual adicionamos os cortes dos bulbos das penas em solução de hidróxido de sódio

(NaOH) 0,1 N na proporção de 100 µL de solução para cada 1 mg de bulbo. Em seguida colocamos as soluções em banho-Maria à 94°C durante 40 minutos e centrifugamos à 12000 x g por 10 minutos. Transferimos o sobrenadante para um novo tubo, ao qual adicionamos tampão 10X TE (Tris-EDTA) até obtermos uma concentração final de 1X TE (Duan & Fuerst, 2001). Essa técnica foi considerada satisfatória, pois gerou amostras contendo uma maior quantidade de DNA e poucas impurezas, porém, só pudemos utilizar esse protocolo para as amostras de penas dos adultos, já que as penas dos pintinhos foram todas utilizadas no protocolo anterior.

4.1.3. Quantificação do DNA

As concentrações de DNA das amostras foram obtidas utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000c, da marca ThermoScientific®, segundo as instruções de uso do fabricante. Também foram observadas as razões de absorvância de 260nm/280nm e 260nm/230nm, que servem como indicador da pureza das amostras. Diluímos todas as amostras em água ultra-pura para que apresentassem uma concentração de DNA de 100 ng/µL e armazenamos à -20°C.

4.2. ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA DA REGIÃO MHM

4.2.1. Modificação do DNA com bissulfito de sódio

Para a modificação do DNA utilizando bissulfito de sódio selecionamos dois animais adultos, um macho e uma fêmea. Escolhemos a pena como o tecido que passaria pelo processo de modificação por bissulfito de sódio e sequenciamento.

Essa técnica tem a capacidade de alterar as citosinas do DNA para uracilas. No entanto, as 5-metilcitosinas (citosina na qual um grupo metil está ligado ao carbono 5) não são sensíveis à modificação por bissulfito de sódio, permanecendo como citosinas no genoma. Essa alteração ou manutenção das citosinas pode ser verificada após a amplificação e sequenciamento, informando quais são os pontos de metilação (figura 3).

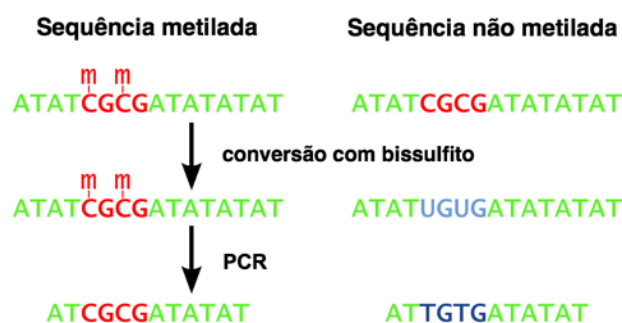


Figura 3. Esquema demonstrando o processo de identificação dos sítios metilados e não metilados. Na coluna da esquerda, na qual o DNA encontra-se metilado (m), o bissulfato de sódio não altera as citosinas (C). Na coluna da direita, na qual o DNA encontra-se não metilado, o bissulfato de sódio troca as citosinas por uracilas (U). Na reação de PCR a uracila é substituída por timina (T). Dessa maneira, com o sequenciamento do fragmento de DNA é possível identificar os pontos de troca e, conseqüentemente, os pontos metilados e não metilados.

Realizamos a conversão do DNA por bissulfato de sódio com o *EpiTect® Bisulfite Kit* da Qiagen®, segundo as instruções do fabricante.

Para a realização da modificação do DNA por bissulfato de sódio utilizamos 2 µg de DNA de cada amostra. Adicionamos o *Bisulfite Mix* ao DNA, que passou pelas seguintes condições no termociclador: denaturação por 5 minutos à 95°C, incubação por 25 minutos à 60°C, denaturação por 5 minutos à 95°C, incubação por 85 minutos à 60°C, denaturação por 5 minutos à 95°C e incubação por 175 minutos à 60°C. Em seguida, realizamos a “limpeza” do DNA utilizando as colunas de purificação presentes no kit. Após o processo de modificação e purificação, armazenamos o DNA no freezer à -20°C até o momento da utilização.

4.2.2. Amplificação do DNA modificado com bissulfato de sódio

Para os ensaios utilizando sequenciamento, o primeiro passo foi o desenho dos *primers*. Optamos pela sequência *Gallus gallus DNA, male hypermethylated (MHM) region on the Z chromosome* (GenBank AB046699.1), representada na figura 4.

Após a escolha da sequência, utilizamos o programa *MethPrimer* (Li & Dahiya, 2002) para a obtenção dos *primers* (figuras 5 e 6). Durante a busca por *primers* que pudessem ser utilizados para amplificar a sequência após a modificação com bissulfito de sódio, encontramos algumas opções. O refinamento da busca e os ajustes realizados por meio do programa *GeneRunner V.3.05* (Hasting Software Inc.), nos levaram a escolher pares de *primers* que, embora com uma temperatura prevista de pareamento muito alta (em torno de 66°C) devido ao grande número de C e G na sequência, pudessem também serem utilizados em temperaturas mais baixas (60-62°C) (figura 7).

```
>gj|10998223|dbj|AB046699.1| Gallus gallus DNA, male hypermethylated (MHM) region on the Z chromosome

CACGGGCAGGGTGAGCAAGCAGCTGTCTGGCGTTAGCTGTCTGCCAGGTGAAACCCCAACAAGAAAGCATTGTGCAGAG
TGCAGAAATCAGACCCGCGCGGATCCTCCTAAAGCACACGTATGGAAGGGATAAGACATTCTGCGGATACCCCTCAGGGCC
TTTGAGCCATGCTGATAGATTGCTGGCTCTGCATTTTTGTGGCTGCTGAAGGCGCGGCGGCAGCAGTGAACCCTGCGTTTT
CAGTAGTGGCTTTGAGCCACAGAAGGCAAGGTTAGCCACTCATGTGTCCCTGCTGAAACACCTGGGGACTTGTACCCACT
CGGAACCATGAAAAAGATGTAAGCACGCACCCGACCCACATAAGCACAGTCACGACGTACAGGTCACTCTTCTCTGCTT
CCCTGCTGAGAGCGAAACCACAGCCTGGGGTCTCCAAAGGAGCAAAGAACTACTCGCCAAACTCTCCGCCTGCCCC
TTTCTGCTCCCGGAATTTACCCTTTCAAGCGCTTTGACTAAGGCTGGTGGAACACAGCGCTCCTTACCCACTGACAGGCC
AAACGCTGACAACTCTGGCATGCAGACGTGACGCTGCTGTGGCTGCAGCTGCTCCACAGACCCGCACCTCTGGCCTGCCG
CTCTGCCCGCTCACCAGCTGGCAAGGCTGCACAGAATGCGGAATGCGTGCCGGGATGGGAAAAGTGCTGCAGGTGAAAAG
AACCGGAACCTGCTGCCGATTGCTATTGCCCGGAAATAGGTGGGGCCATAACCGGAACTCCCTCCCACCTACCTACATAGG
GAGGCGCCATTTTGTGGAGCCTGCGTTCCACTCTGAGGAGCCGCCATTTATGCCACTCCGTACGCCACGTGGTTTTCTA
CTGCTTAGGGCTTGCTCCCTGGCTTTTTCTTTAGCTCCTTCATATCCCAGGCCTCCCTCTGACTGCGTGCCCAATTCCCTT
GCTCCGGGAAGTGCTCACATGACAAAACAGATCCATTCTGCGCAGTCGCACCCGGCAAAGGCGTCCCGGTGCTGGCGCT
GGGGGCTTCTCGTGTCTGGACACGGGGTCTTGGGAGACCAGGCGGTACTTACGGGCGCTTTGGTCCCGAGCTAACCA
GCTCCGCCGGCTCCACTTCTCGGTTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAAGGATCTGATGGGAAATGCCTCGC
CCTTTAAGTGCGCCGCTCTTGCCTTGTGAAAGGCACAGACAACCAAGGGCAGTCCCGCCAGAGGGCTCCACTCATTTC
CATCGTAGCGTTTGATACAGCCGTGAAAAAGCACTCATCACATTGAGGCTCTCGGCAACCGCATCAGTGATGGCAGAG
CACTGCAAGAACAAGGGTCTCTTTGATTTCAACACCTTGTGATGCGGAAGCACGTCTCTTGGGCCAAATACTCAGCTCGG
CACTGCTCTACTTGAGGAAACGACTGACAAAAGGGCATAAAGCAGGCTCTTCTGCTGCACCCCTCTGTCACTCCTCCATCAC
AAGTGGTCTCATCACAAGAGAACCAGCTGTGCAGCAGACTTCAGGCCTGCAAAGGGCCCCCTACAAAAGCTCCCGCGGC
TGTGTTCCCGCTCCCTGAACAGGCCAGCAGCGTGACTTACACTTTGACACGGCCTGTGCAATTCTTCTTTGGGAAAGC
ACGCCACCTTTCTTAGCACACGCAAAGAAAACCTGCTCTCTCATTCCGGCTTTCACGCCGTGGTTTCTGGCAACTCCAG
AATTACCCAGCATCAGCACTGGCCAAAACAAAACACAACCGGAGCTCACCATTCTAAAGGGACTCGTCTCACTACAACAAG
CATCTGTTCCAAGCAGTGGTGGTTGTCCCGGCACATGACTTTGGTACGGCTAGAAGAAGACCATACTCCGTACCGTTTACG
TCATGCACAGCAAGGAAAGAGGGCCTAAGGAAGAAGGAGCTGTTACACCTCGGGAGTGATGGCTTTGTCTTTACCAGCAA
GCTGTTACGCGTGCTAAACCCTGCTCCCCAGAAAGCAGACGAGCGTCTATCTGCCTGCCAGGGGGAGCAGCAAAAAGAATT
CCTGGCTTTGCTCTTTTACGCCTGCAGCTTTTGTCTTACCTCTCGAACACCTTTATCTCACCCCTGGATTCTCACACCGTT
GCCTCACCAGTTCCATCCATAACCCACACGGGCAGGGTGAGCAAGCAGCTGTCTGGCGTTTGTCTGCTGCCAGGTGAAA
CCCCAACAAGAAAGCATTGTGCAGAGTGCAGAAATCAGACCCGCGCGGATCCTCCTAAAGCACACGTATGGAAGGGATAAG
ACATTCTGCGGATACCCCTCAGGG
```

Figura 4. Sequência utilizada como referência para o desenho dos *primers* para sequenciamento pós modificação com bissulfito de sódio, em modo FASTA.

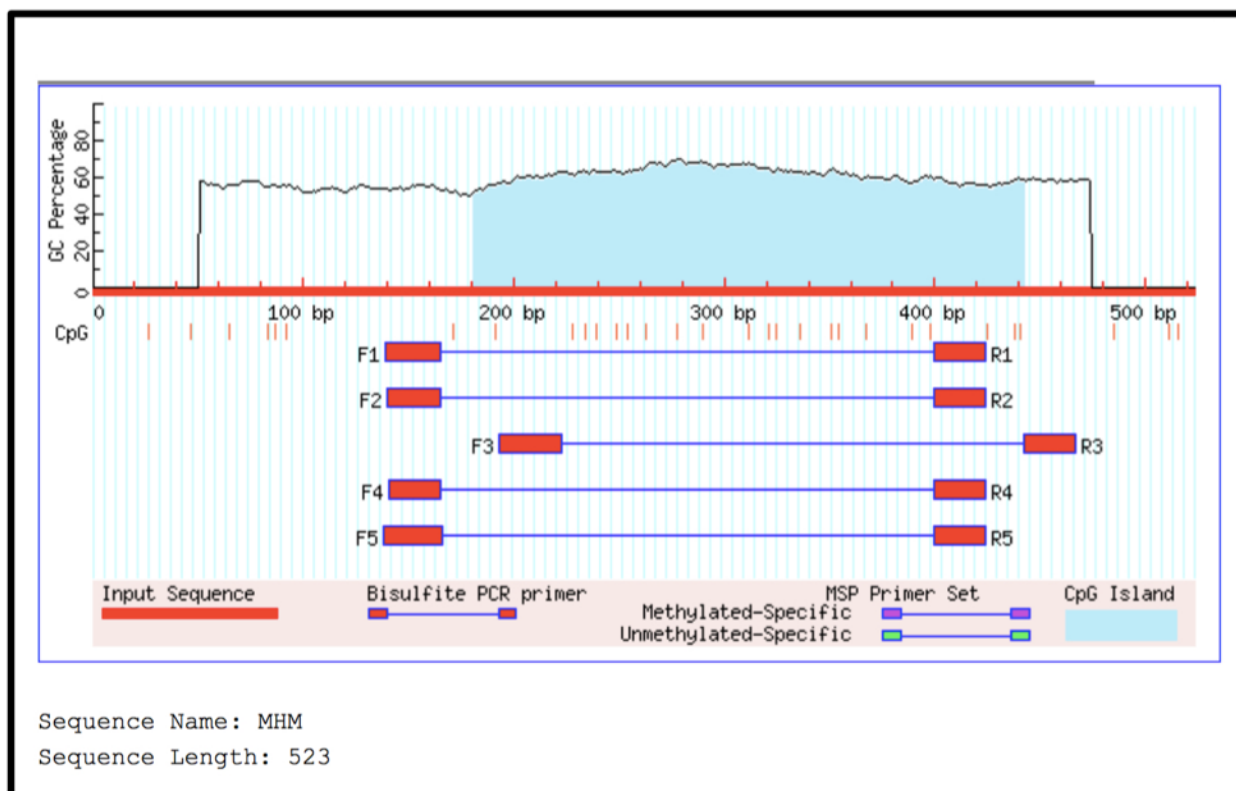


Figura 5. Figura mostrando a presença de ilha CpG (citosina seguida por guanina) (região azul) em sequência utilizada em um trabalho anterior do laboratório para sexagem (Caetano e Ramos, 2008). Os retângulos vermelhos mostram a posição de possíveis *primers* para utilização para análise por sequenciamento após transformação com bissulfito de sódio. Dados gerados pelo programa *MethPrimer* (Li e Dahiya, 2002).


```

1 TCCCTCCCACCTACCTACATAGGGAGGCGCCATTTTGTGGAGCCTGCGTTCCTACTCTGA
|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|
1 TTTTTTTTATTTATTTATATAGGGAGGCGTTATTTTGTGGAGTTTGCCTTTTATTTTGA
61 GGAGCCGCCATTTTCATGCCACTCCGTACGCCACGTGGTTTTCTACTGCTTAGGGCTTGGC
|||:++:|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|
61 GGAGTCGTTATTTTATGTTATTTTCGTACGTTACGTGGTTTTTTTATTGTTTAGGGTTTGGT
121 TCCCTGGCTTTTTCTTTAGCTCCTTCATATTCCCAGGCCTCCCTCTGACTGCGTGCCCAA
|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|
121 TTTTTGGTTTTTTTTTTTAGTTTTTTTATATTTTATAGTTTTTTTTTTGATTGCGTGTAA
181 TTCCCTTGCTCCGGGAAGTGCTCACATGACAAAACAGATCCATTCCTGCGCAGTCGCACC
|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|
181 TTTTTTTGTTTCGGGAAGTGTTTATATGATAAAAATAGATTTATTTTTGCGTAGTCGTATC
241 GGGCAAAGGCGTCCCGGTGCTGGCGCTGGGGGCTTCCTCGTGTCTGGACACGGGGGTTTC
+||:|||||++|:::++|||:||||++:|||||:|:::|++|||:|||||:++||||||:
241 GGGTAAAGGCGTTTTCGGTGTTGGCGTTGGGGGTTTTTTCGTGTTGGATACGGGGGTTTT
301 TGGGAGACCAGGCGGTACTTACGGGCGCTTTGGTCCCAGCTAACCAGCTCCGCCGGCTC
|||||||:|+++|||:|+++|++:||||||:++|||:|:::|:::|:::|:::|:::|:::|
301 TGGGAGATTAGGCGGTATTTACGGGCGTTTTGGTTTTCGAGTTAATTAGTTTTCGTCGGTTT
361 CACTTCTCGGTTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAAGGATCTGATGGGAAA
:|:::|++|||||:|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|
361 TATTTTTTCGGTTGGTAATAGTAATTTATTCGTATTTTTTCGTATAAGGATTTGATGGGAAA
421 TGCCTCGCCCTTTAAGTGCGCCGCTCTTGCCTTGTGGAAAGGCACAGACAACCAAGGGC
|:::|++:|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|
421 TGTTTCGTTTTTTAAGTGCGTCGTTTTTTGTTTTGTGGAAAGGTATAGATAATTAAGGGT
481 AGTCCCGCCAGAGGGCTCCACTCATTTCCATCGTAGCGTTTGA
|||:++:|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|:::|
481 AGTTTCGTTAGAGGGTTTTATTTATTTTTATCGTAGCGTTTGA

```

Figura 6. Sequência referência (superior) e sequência esperada após a modificação do DNA com bissulfato de sódio (inferior), assumindo-se que todos os sítios CpG estejam metilados. Dados gerados pelo programa *MethPrimer* (Li e Dahiya, 2002).

| Primer | Start | Size | Tm | GC% | 'C's | Sequence |
|--|-------|------|-------|-------|------|-------------------------------|
| 1 Left primer | 140 | 26 | 53.38 | 57.69 | 13 | TTTTTTTATATTTTTAGGTTTTTTTT |
| Right primer | 424 | 25 | 58.68 | 48.00 | 4 | AACATTTCCCATCAAATCCTTATAC |
| Product size: 285, Tm: 69.9, CpGs in product: 19 | | | | | | |
| 2 Left primer | 141 | 25 | 52.13 | 56.00 | 12 | TTTTTTTATATTTTTAGGTTTTTTTT |
| Right primer | 424 | 25 | 58.68 | 48.00 | 4 | AACATTTCCCATCAAATCCTTATAC |
| Product size: 284, Tm: 69.9, CpGs in product: 19 | | | | | | |
| 3 Left primer | 193 | 30 | 57.24 | 46.67 | 7 | GGAAGTGTTTATATGATAAAATAGATTTA |
| Right primer | 467 | 25 | 57.81 | 56.00 | 7 | TATACCTTTCCACAAAACAAAAAAC |
| Product size: 275, Tm: 69.8, CpGs in product: 20 | | | | | | |
| 4 Left primer | 139 | 27 | 54.13 | 59.26 | 13 | GTTTTTTTATATTTTTAGGTTTTTTTT |
| Right primer | 424 | 25 | 58.68 | 48.00 | 4 | AACATTTCCCATCAAATCCTTATAC |
| Product size: 286, Tm: 70.0, CpGs in product: 19 | | | | | | |
| 5 Left primer | 138 | 28 | 54.96 | 57.14 | 13 | AGTTTTTTTATATTTTTAGGTTTTTTTT |
| Right primer | 424 | 25 | 58.68 | 48.00 | 4 | AACATTTCCCATCAAATCCTTATAC |
| Product size: 287, Tm: 70.1, CpGs in product: 19 | | | | | | |

Figura 7. Exemplo de *primers* para os testes de amplificação para sequenciamento após modificação do DNA com bissulfito de sódio e clonagem. Dados gerados pelo programa *MethPrimer* (Li e Dahiya, 2002).

Testamos várias reações diferentes para identificar o melhor par de *primers* dentre os sugeridos pelo programa *MethPrimer* (figura 7). Os melhores resultados foram os obtidos pelo par de primers número 3 (sense “MHMBisA-Fw”: GGAAGTGTTTATATGATAAAATAGATTTA; e anti-sense “MHMBisA-Rv”: TATACCTTTCCACAAAACAAAAAAC). As melhores condições foram encontradas em reações que apresentaram um volume total de 25 µl, sendo a mistura constituída por 1X *GeneAmp PCR Buffer* (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 8,3), 15 mM MgCl₂), dNTP (0,1 mM de cada nucleotídeo), *primer* 0,5 µM (de cada), *AmplitaqTaq® Gold DNA Polimerase* (Applied Biosystems®) 1 U e 1 µL de DNA modificado. Passando por um aquecimento inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 50 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 59°C, 45 segundos a 72°C e para finalizar, um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os *primers* geraram uma banda de 231 pares de bases, sendo utilizados tanto para a amplificação do DNA modificado com bissulfito de sódio, como para a amplificação do DNA plasmidial das bactérias.

4.2.3. Eletroforese das amostras tratadas com bissulfito de sódio

Submetemos as amostras obtidas após a PCR à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, utilizando-se TBE 1X (0,045M de Tris-borato e 0,001M de EDTA) como tampão de corrida. Aplicamos 8µL de amostra por poço juntamente com o corante azul de bromofenol. Para a verificação do tamanho dos fragmentos utilizamos um marcador molecular de 100 pares de base. Tratamos o gel com uma solução de nitrato de prata 0,2% para marcação das bandas e revelamos com uma solução de carbonato de sódio 3%.

4.2.4. Clonagem

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, os produtos de PCR foram clonados diretamente utilizando-se o *CloneJET PCR Cloning KIT* (Fermentas®), de acordo com especificações do fabricante.

Em uma primeira etapa preparamos uma reação de ligação com volume final de 18 µL, contendo 10 µL de Tampão 2X, 1 µL de produto de PCR, 6 µL de água ultra-pura e 1 µL de *DNA Blunting Enzyme*. Incubamos a reação à 70°C durante 5 minutos e resfriamos em gelo. Em seguida, adicionamos 1 µL de *pJET1.2/blunt Cloning Vector* (50 ng/µL) e 1 µL de *T4 DNA Ligase* na primeira reação, gerando um volume final de 20 µL. A mistura foi agitada e incubada a temperatura ambiente (22°C) durante 30 minutos e em seguida imediatamente resfriada em gelo.

Para a transformação bacteriana utilizamos 10 µL da reação de ligação para transformar 100 µL de uma linhagem de *E. coli* competente DH5α. Incubamos a reação de transformação em gelo durante 20 minutos e em seguida realizamos o choque térmico à 42°C durante 1,5 minutos. As bactérias transformantes foram regeneradas em meio líquido LB (Luria Bertani) (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl para um litro de solução) por 1 hora à 37°C sob agitação constante de 180 rpm. Após a incubação centrifugamos as amostras à 5000 x g por 2 minutos e resuspendemos o *pellet* em 200 µL de meio LB líquido com Ampicilina (100 µg/mL), os quais foram plaqueados em meio seletivo LB sólido (10 g de triptona, 5 g de extrato de levedura, 10 g de NaCl e 15 g de ágar para um litro de solução) contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas à 37°C *overnight*.

Para a seleção das colônias positivas, adicionamos os clones em 500 µL de meio LB contendo Ampicilina (100 µg/mL) e incubamos à 37°C sob agitação por três horas. Em seguida, para a verificação da presença dos fragmentos de interesse

realizamos uma PCR (com os mesmos *primers* utilizados para amplificar o material modificado com bissulfito de sódio, MHMBisA-Fw e MHMBisA-Rv) utilizando-se 1 µL de cultura e seguindo as mesmas condições de amplificação e ciclagem de temperatura realizadas para a amplificação do material modificado com bissulfito de sódio.

Para a seleção das colônias que teriam o seu DNA sequenciado, utilizamos 5 µL do produto de PCR em uma eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio.

4.2.5. Sequenciamento

Para o sequenciamento, utilizamos oito clones positivos de macho e quatro de fêmea que apresentaram um resultado satisfatório após a PCR de colônia. O produto de PCR foi diretamente sequenciado e para tanto utilizamos o *primer reverse* desenhado para a reação de amplificação do material modificado com bissulfito de sódio (MHMBisA-Rv), visando abranger o máximo possível de sítios CpGs presentes na região analisada. Enviamos o material para o sequenciamento no Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) do Hemocentro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Foi utilizado o *BigDye XTerminator® Kit* (Applied Biosystems®) e o sequenciamento foi realizado no sequenciador automático *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®).

Analizamos os resultados do sequenciamento utilizando o programa *BioEdit sequence alignment editor* (Hall, 1999). As análises de metilação foram realizadas utilizando-se a ferramenta *Quantification tool for methylation analysis* (QUMA) (Kumaki *et al.*, 2008), disponível na internet (<http://quma.cdb.riken.jp>), no qual é possível alinhar as sequências genômica e modificada, além de verificar a qualidade da sequência, quantificar e verificar o padrão de metilação do DNA, fornecendo diferentes gráficos para estudo. O programa permite também, realizar análises estatísticas comparativas entre as amostras.

4.3. ENSAIO DE SEXAGEM

O teste de sexagem foi baseado na diferença do número de cromossomos Z presentes no macho (com dois cromossomos Z) e na fêmea (com apenas um cromossomo Z). Para isso escolhemos uma região específica do Z, a região MHM, já

descrita anteriormente (Teranishi *et al.*, 2001). Utilizamos também o gene *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)*, presente no cromossomo 1 de *Gallus gallus domesticus* como gene referência. Dessa forma, os machos devem apresentar um número maior de cópias da região MHM (duas vezes mais, por possuírem dois cromossomos Z) do que as fêmeas. O mesmo princípio foi utilizado anteriormente com êxito em humanos (Ramos *et al.*, 2010).

4.3.1. Desenho dos *primers*

Desenhamos os *primers* referentes à região MHM com base na sequência de referência *Gallus gallus DNA, male hypermethylated (MHM) region on the Z chromosome* (GenBank AB046699.1), a mesma região utilizada para o sequenciamento. Os *primers* foram desenhados utilizando o software *Beacon Designer Free Edition*, disponível gratuitamente na internet no site www.premierbiosoft.com/netprimer (figura 8).

```
>gi|10998223|dbj|AB046699.1| Gallus gallus DNA, male hypermethylated (MHM) region on the Z chromosome
...
CACGTGGTTTTCTACTGCTTAGGGCTTGGCTCCCTGGCTTTTTCTTTAGCTCCTTCATATTCCCAGG
CCTCCCTCTGACTGCGTGCCCAATTCCCTTGCTCCGGGAAGTGCTCACATGACAAAACAGATCC
ATTCCTGCGCAGTCGCACCGGGCAAAGGCGTCCCGGTGCTGGCGCTGGGGGCTTCCTCGTGTC
TGGACACGGGGTTTTCTGGGAGACCAGGCGGTACTTACGGGCGCTTTGGTCCCGAGCTAACCAG
CTCCGCCGGCTCCACTTCTCGGTTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAAGGATCTGA
TGGGAAATGCCTCGCCCTTTAAGTGCGCGCCTCTTGCCTTGTGGAAAGGCACAGACAACCAAG
GGCAGTCCCGCCAGAGGGCTCCACTCATTTCATCGTAGCGTTTGATACAGC...

Primer sense (MHMs): GACAAAACAGATCCATTCTG
Primer anti-sense (MHMas): GCCAACCGAGAAGTGA
```

Figura 8. Fragmento da região MHM utilizado para o teste de sexagem (com destaque para os pontos de ligação dos *primers*) e sequência dos *primers sense* e *anti-sense*, que geram um fragmento de 168 pares de base.

Desenhamos os *primers* referentes ao gene *GAPDH* com base na sequência de referência >chromosome:Gallus_gallus-5.0:1:76950264:76957405:1 (*Gallus_gallus-5.0:CM000093.4* do Ensembl). Os primers também foram desenhados utilizando o software *Beacon Designer Free Edition* (figura 9).

```
>chromosome:Gallus_gallus-5.0:1:76950264:76957405:1
...
GAGAGCTGAGATTGTGATGGGAGCACTGCATCTAGGATGCCCTGACCTTTCTCT
CCTCTCTCCCTGCTAGGTTTACATGTTCAAATATGATTCTACACACGGACACTTCA
AGGGCACTGTCAAGGCTGAGAACGGGAAACTTGTGATCAATGGGCACGCCATC
ACTATCTTCCAGGAGTGAGTAGCTTTCTCCTCTTGCCACTCCAGAGGATGAAAGT
AAATGCCCTCCAGAGTAACTCCCCTGGTTTTGTCATTCTCAGGCGTGACCCCA
GCAACATCAAATGGGCGGATGCAGGTGCTGAGTATGTTGTGGAGTCCACTGGTG
TCTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGGGTAAGTAGGCTACTGTGGCCCATGGGAA
AAGGATTGCTGGTGCTTACTTCTGTGGAGCACATCTTTATCTACAGAGCTCTTCA
AGATGGGGAAGGGATTACGTGGTCCGAGGATTGTATTGC...

Primer sense (GAPDHs): CTTTCTCCTCTTGCCACTCCA

Primer anti-sense (GAPDHs): CTCCACAACATACTCAGCACC
```

Figura 9. Fragmento da região do gene *GAPDH* utilizado para o teste de sexagem (com destaque para os pontos de ligação dos *primers*) e sequência dos *primers sense* e *anti-sense*, que geram um fragmento de 131 pares de base.

4.3.2. Amplificação do DNA

Realizamos as qPCRs utilizando o aparelho *StepOnePlus® Real-Time PCR System* (Applied Biosystems®). Como sistema de detecção utilizamos o *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems®) e como método de quantificação utilizamos o Ct comparativo ou quantificação relativa. As qPCRs foram feitas em triplicata tanto para o gene referência quanto para o gene-alvo e o desvio padrão máximo entre as replicatas foi de 0,3.

A técnica de qPCR requer que a eficiência da reação, tanto para o gene-alvo quanto para o gene referência, seja similar e alta. Calculamos a eficiência da reação de acordo com Pfaffl (2001), por meio da construção de uma curva-padrão, gerada a partir da diluição serial do DNA. Assim, antes da quantificação em tempo real, testamos as concentrações de *primer* e de DNA, que permitiram a melhor eficiência de reação tanto para o gene-alvo quanto para o controle endógeno. Testamos seis pontos de diluição (1:2).

As qPCR consistiram de uma mistura contendo 10 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix (2X)*, 0,5 pmol de cada *primer* e 2 µL de DNA (5-10 ng) e as condições de amplificação para todas as amostras foram: 95°C durante 10 minutos para ativação da polimerase; seguidos de 40 ciclos de desnaturação à 95°C durante 15 segundos; pareamento à 60°C durante 1 minuto e extensão à 72°C por 15 segundos. Após 40 ciclos de amplificação submetemos todas as amostras à análise da curva de dissociação, a fim de validar a ausência de produtos não específicos e dímeros de *primers*. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 1 minuto, partindo de 60°C até atingir o limite de 95°C.

4.3.3. Obtenção dos resultados e análise estatística

Comparamos diretamente os resultados de Ct obtidos para a região MHM (alvo) e o gene *GAPDH* (referência) e realizamos a normalização pelo método de Pfaffl (2001), que consiste na seguinte equação:

$$R = \frac{\Delta Ct \text{ alvo (controle - amostra)}}{\Delta Ct \text{ ref. (controle - amostra)}} \cdot \frac{(E \text{ ref.})}{(E \text{ alvo})}$$

Para o cálculo da eficiência utilizamos a equação:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

Onde:

E alvo - Eficiência de amplificação da região alvo (MHM)

E ref. - Eficiência de amplificação do gene referência (*GAPDH*)

Controle - Valor do Ct do controle escolhido

Amostra - Valor do Ct da amostra

Slope - Coeficiente angular da curva de diluição

Realizamos as análises estatísticas dos resultados no programa *Microsoft Excel*®, utilizando o Teste t de Student bicaudal não pareado. O mesmo programa também foi utilizado para a elaboração dos gráficos e tabelas.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

5.1. PADRÃO DE METILAÇÃO DO DNA DA REGIÃO MHM

5.1.1. Gel obtido após PCR de amostras modificadas com bissulfito de sódio

Após selecionarmos amostras de DNA de pena de um macho e de uma fêmea, realizamos a modificação com bissulfito de sódio, conforme descrito anteriormente. Submetemos as amostras, testadas em diferentes condições de amplificação à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% para a escolha do melhor material, que apresentasse bandas nítidas e específicas (figura 10).

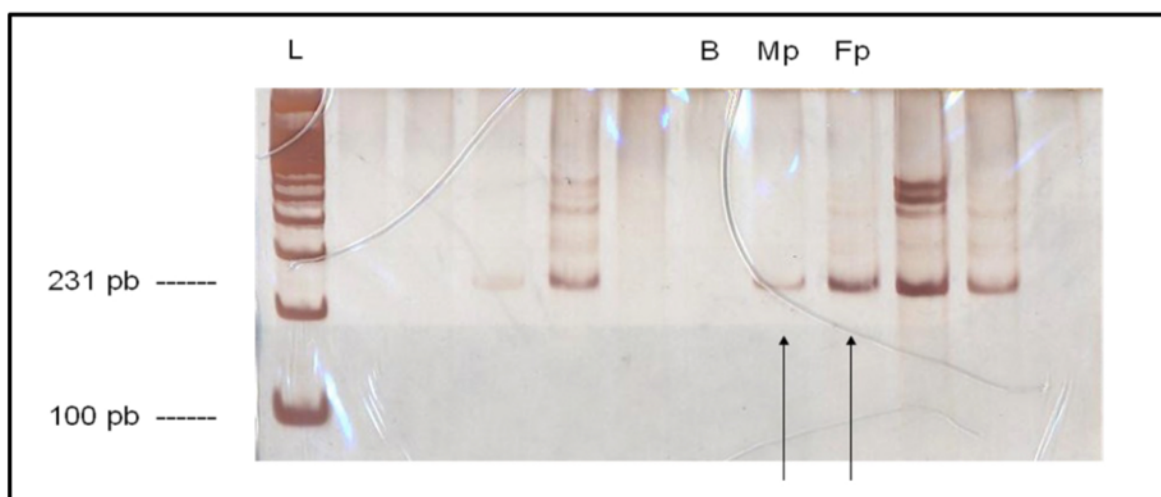


Figura 10. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% das amostras de DNA modificado com bissulfito de sódio submetidas à PCR de sequência da região MHM. (L) *Ladder* (marcador molecular), (M) DNA de macho, (F) DNA de fêmea, (p) Pena, (B) Branco. As setas indicam as amostras que foram selecionadas para a realização das clonagens e as condições utilizadas para a obtenção desse resultado estão descritas em material em métodos.

5.1.2. Géis obtidos após PCR de amostras de DNA das bactérias clonadas

Utilizamos as duas melhores amostras (uma de macho e uma de fêmea) do produto de PCR da região MHM para o procedimento de clonagem em bactéria. Após a transformação e recuperação das bactérias obtivemos um bom número de colônias na placa de Petri, selecionamos 15 colônias que receberam a sequência da região MHM proveniente do macho e 15 colônias que receberam a sequência da região MHM da fêmea. Submetemos as colônias a uma PCR e observamos os resultados em gel de agarose 2,5%. Das 30 amostras amplificadas conseguimos oito colônias passíveis de sequenciamento com DNA de macho e quatro colônias de fêmea para seguirem para a próxima etapa, o sequenciamento (figuras 11 e 12).

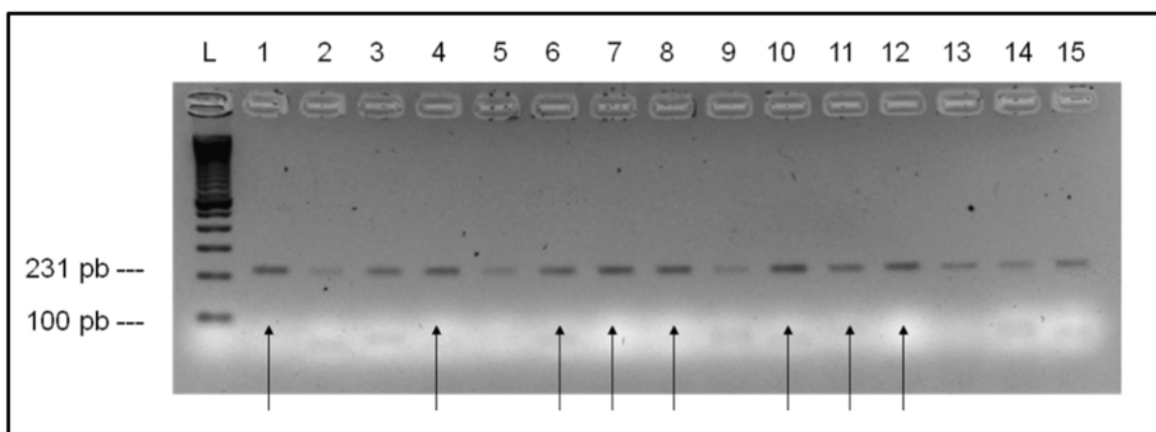


Figura 11. Negativo da imagem de eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de PCR das colônias de bactérias que receberam DNA de pena de macho. (L) Ladder (marcador molecular), (1-15) Colônias de bactérias com DNA de pena de macho. As setas indicam as oito amostras que foram sequenciadas.

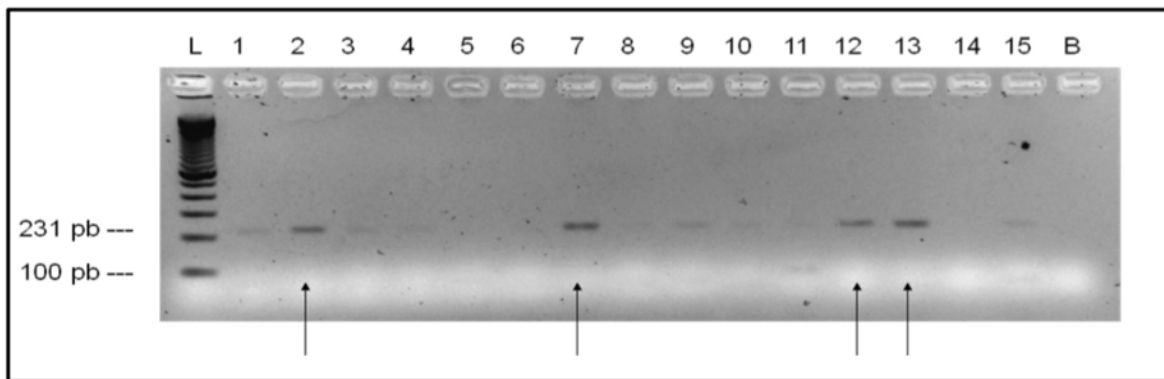


Figura 12. Negativo da imagem de eletroforese em gel de agarose 2,5% dos produtos de PCR das colônias de bactérias que receberam DNA de pena de fêmea. (L) Ladder (marcador molecular), (1-15) Colônias de bactérias com DNA de pena de fêmea, (B) Branco. As setas indicam as quatro amostras que foram sequenciadas.

5.1.3. Sequenciamento dos clones

Das 12 colônias sequenciadas, uma foi perdida por problemas no sequenciamento, enquanto as outras 11 apresentaram resultados satisfatórios e puderam ser aproveitadas (figura 13), assim, obtivemos sete amostra de macho e quatro de fêmea nas quais, de maneira geral, foi possível identificar os sítios CpGs de interesse neste estudo .

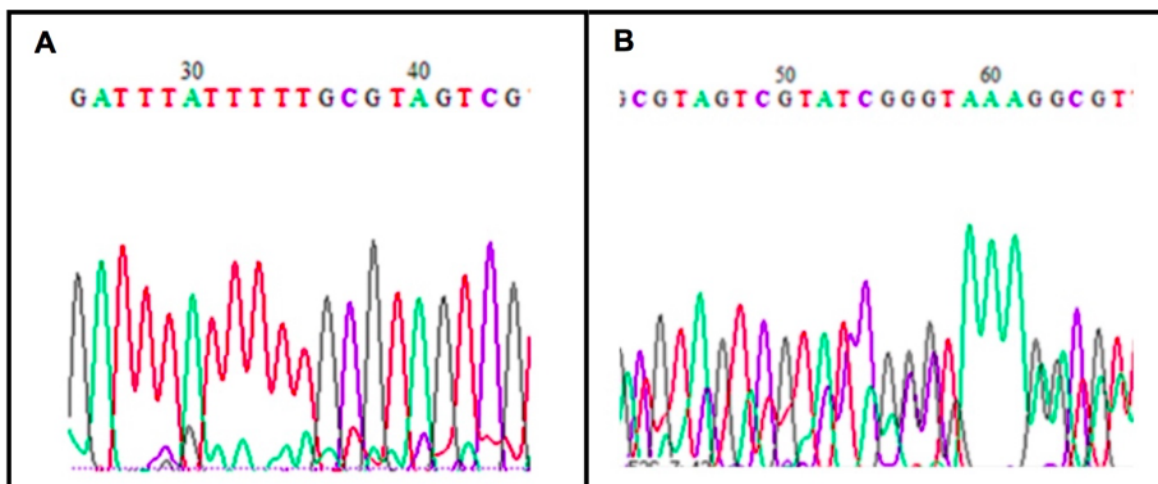


Figura 13. Sequenciamento da região MHM de *Gallus gallus domesticus*. (A) sequenciamento de boa qualidade, (B) sequenciamento não satisfatório.

A região de 231 pares de bases, alvo do sequenciamento, possui 14 sítios CpGs, que tiveram o seu status avaliado (figura 14).

```
>MHM_Genômica
GGAAGTGCTCACATGACAAAACAGATCCATTCTGCGCAGTCCGACCCGGGCAAA
GGCGTCCCGGTGCTGGCGCTGGGGGCTTCTCGTGTCTGGACA CGGGGTTT
CTGGGAGACCAGGCGGTACTTACGGGCGCTTTGGTCCCGAGCTAACAGCTCC
GCCGGCTCCACTTCTCGGTTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAAG
GATCTGATGGGAAATGCC
```

Figura 14. Região MHM sequenciada no estudo, com destaque para os 14 sítios CpGs que tiveram a sua metilação avaliada.

Alinhamos as sequências genômica e modificada (figura 15) para identificação dos sítios CpGs e, em seguida, analisamos os resultados do padrão de metilação da região MHM com o programa QUMA (Kumaki *et al.*, 2008) (figuras 16 e 17).

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 |
| MHM_Gen | GGAAGTCTCACATGACAAAACAGATCCATTCTGCGCAGTCCGACCCGGGCAAA | | | | | | | | | | | | | |
| MHM_Mod | GGCGTCCCGGTGCTGGCGCTGGGGGCTTCTCGTGTCTGGACA CGGGGTTT | | | | | | | | | | | | | |
| Consensus | GGAAGTCTCACATGACAAAACAGATCCATTCTGCGCAGTCCGACCCGGGCAAA | | | | | | | | | | | | | |
| | 131 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 231 | | | |
| MHM_Gen | GGCGCTTTGGTCCGAGCTAACAGCTCCGCGGCTCCACTTCGGTTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAGGATCTGATGGGAATGCC | | | | | | | | | | | | | |
| MHM_Mod | GGCGCTTTGGTCCGAGCTAACAGCTCCGCGGCTCCACTTCGGTTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAGGATCTGATGGGAATGCC | | | | | | | | | | | | | |
| Consensus | GGCGCTTTGGTCCGAGCTAACAGCTCCGCGGCTCCACTTCGGTTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAGGATCTGATGGGAATGCC | | | | | | | | | | | | | |

Figura 15. Resultados obtidos pelo alinhamento das sequências genômica (MHM_Gen) e modificada com bissulfato de sódio (MHM_Mod) de DNA de amostra de pena de macho. Para o alinhamento, utilizamos o programa *MultAlign*, disponível na internet (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

| Summary of information | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------|--|--|--|--|---|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Length of target genome sequence | Number of CpGs | | | | | Number of bisulfite sequences (used / excluded / total) | | | | | | | | |
| 163 | 14 | | | | | 7 / 0 / 7 | | | | | | | | |

| Methylation status of each CpG site | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------------|----------------|
| CpG position | 36 | 42 | 47 | 57 | 62 | 71 | 86 | 98 | 120 | 129 | 133 | 144 | 159 | 162 | Total |
| Me-CpG | 7/7 100 .0% | 7/7 100 .0% | 7/7 100 .0% | 7/7 100 .0% | 7/7 100 .0% | 6/7 85.7% | 7/7 100 .0% | 7/7 100 .0% | 7/7 100 .0% | 6/6 100 .0% | 6/6 100 .0% | 0/6 0.0% | 5/5 100 .0% | 5/5 100 .0% | 84/91 92.3% |

| Bisulfite sequence information | | | | | | | | | | <input checked="" type="checkbox"/> Show options |
|--------------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------|--|------------|-----------------|---|--|--|--|
| No. | order | exclude | Sequence name | mismatch (gap) / alignment length (% identity) | Me-CpG (%) | unconverted (%) | Methylation pattern (or reason for the exclusion) | | | |
| 1 | <input type="checkbox"/> 1 | <input type="checkbox"/> | 4 | 7 (0) / 163 (95.7) | 12 (85.7) | 0/34 (100.0) | ●●●●●●●●●●●●●●●●●● | | | |
| 2 | <input type="checkbox"/> 2 | <input type="checkbox"/> | 2 | 7 (0) / 163 (95.7) | 13 (92.9) | 0/34 (100.0) | ●●●●●●●●●●●●●●●●●● | | | |
| 3 | <input type="checkbox"/> 3 | <input type="checkbox"/> | 3 | 8 (1) / 163 (95.1) | 13 (92.9) | 0/34 (100.0) | ●●●●●●●●●●●●●●●●●● | | | |
| 4 | <input type="checkbox"/> 4 | <input type="checkbox"/> | 5 | 7 (0) / 163 (95.7) | 13 (92.9) | 0/34 (100.0) | ●●●●●●●●●●●●●●●●●● | | | |
| 5 | <input type="checkbox"/> 5 | <input type="checkbox"/> | 6 | 7 (0) / 163 (95.7) | 13 (92.9) | 0/34 (100.0) | ●●●●●●●●●●●●●●●●●● | | | |
| 6 | <input type="checkbox"/> 6 | <input type="checkbox"/> | 8 | 43 (39) / 163 (73.6) | 9 (100.0) | 0/25 (100.0) | ●●●●●●●●●●●●●●●●●● | | | |
| 7 | <input type="checkbox"/> 7 | <input type="checkbox"/> | 7 | 17 (11) / 163 (89.6) | 11 (91.7) | 0/31 (100.0) | ●●●●●●●●●●●●●●●●●● | | | |

Figura 16. Resultado obtido pelo programa QUMA (Kumaki *et al.*, 2008) após o alinhamento das sequências genômica e modificada com bissulfito de sódio. Os círculos pretos e brancos, em *Methylation pattern*, indicam a presença ou ausência, respectivamente, de um radical metil no sítio CpG. O “x” indica a exclusão do sítio por problemas de leitura do sequenciamento.

| Summary of information | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----------------|--|--|--|--|--|--|---|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Length of target genome sequence | Number of CpGs | | | | | | | Number of bisulfite sequences (used / excluded / total) | | | | | | | | |
| 163 | 14 | | | | | | | 4 / 0 / 4 | | | | | | | | |

| Methylation status of each CpG site | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------|--|
| CpG position | 36 | 42 | 47 | 57 | 62 | 71 | 86 | 98 | 120 | 129 | 133 | 144 | 159 | 162 | Total | |
| Me-CpG | 0/4 0.0 % | 0/4 0.0 % | 0/4 0.0 % | 0/4 0.0 % | 1/4 25.0 % | 0/4 0.0 % | 0/4 0.0 % | 0/4 0.0 % | 0/4 0.0 % | 0/4 0.0 % | 0/4 0.0 % | 0/3 0.0 % | 0/0 0.0 % | 0/0 0.0 % | 1/4 7 2.1 % | |

| Bisulfite sequence information <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Show options | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---------------|--|------------|-----------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| No. | order <input checked="" type="checkbox"/> | exclude <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> unselect all <input checked="" type="checkbox"/> | Sequence name | mismatch (gap) / alignment length (% identity) | Me-CpG (%) | unconverted (%) | Methylation pattern (or reason for the exclusion <input checked="" type="checkbox"/>) | | | | | | | | | |
| <u>1</u> | <input type="text" value="1"/> | <input type="checkbox"/> | 9_1-2 | 28 (22) / 163 (82.8) | 0 (0.0) | 1/27 (96.3) | ooooooooooooxx | | | | | | | | | |
| <u>2</u> | <input type="text" value="2"/> | <input type="checkbox"/> | 11_1-12 | 20 (11) / 163 (87.7) | 0 (0.0) | 1/31 (96.8) | ooooooooooooox | | | | | | | | | |
| <u>3</u> | <input type="text" value="3"/> | <input type="checkbox"/> | 12_1-13 | 16 (7) / 163 (90.2) | 0 (0.0) | 2/32 (93.8) | ooooooooooooox | | | | | | | | | |
| <u>4</u> | <input type="text" value="4"/> | <input type="checkbox"/> | 10_1-7 | 24 (15) / 165 (85.5) | 1 (8.3) | 1/29 (96.6) | oooo●ooooooooox | | | | | | | | | |

Figura 17. Resultado obtido pelo programa QUMA (Kumaki *et al.*, 2008) após o alinhamento das seqüências genômica e modificada do DNA de bactérias com a seqüência da fêmea. Os círculos pretos e brancos, em *Methylation pattern*, indicam a presença ou ausência, respectivamente, de um radical metil no sítio CpG. O “x” indica a exclusão do sítio por problemas de leitura do sequenciamento.

Os resultados mostraram um padrão hipermetilado nas amostras provenientes de macho (84/91 ou 92,3%) e um padrão hipometilado nas amostras de fêmea (1/47 ou 2,1%) (figura 18).

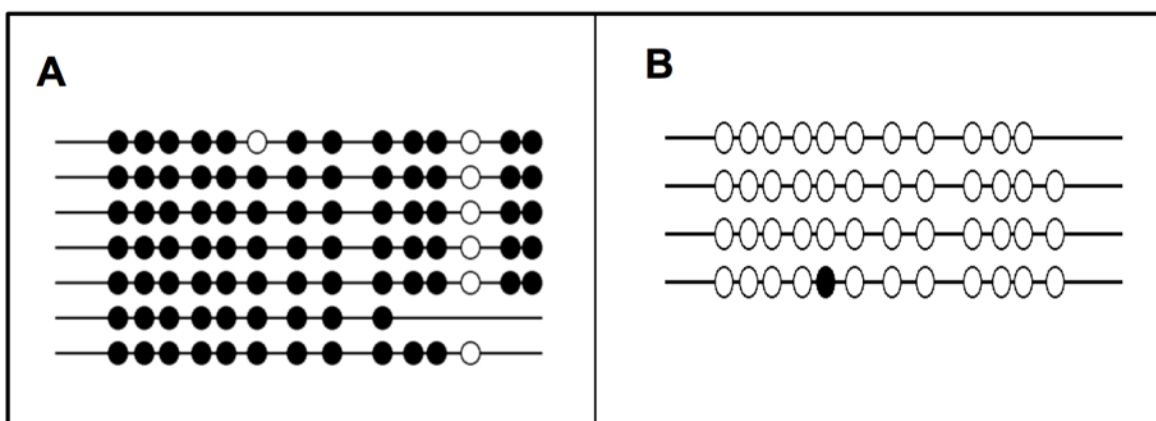


Figura 18. Padrão de metilação da região MHM de *Gallus gallus domesticus*. Os círculos pretos correspondem a CpGs metilados, enquanto os círculos brancos correspondem a CpGs não metilados. Cada linha representa uma das colônias sequenciadas. (A) Padrão hipermetilado no macho. (B) Padrão hipometilado nas fêmeas.

5.2. ENSAIO DE SEXAGEM

Para a realização do ensaio de sexagem utilizamos sequências da região MHM e do gene *GAPDH*. Inicialmente, utilizamos as amostras de DNA dos animais adultos para estabelecer quais valores corresponderiam aos machos e quais corresponderiam às fêmeas. Em seguida, fizemos um teste cego com as amostras de DNA dos pintinhos (filhotes), para verificarmos a quantidade de falsos-positivos e falsos-negativos do ensaio. Além da sexagem, verificamos se existiam diferenças no número de repetições da região MHM nos diferentes tecidos de machos e fêmeas.

5.2.1. Curva de eficiência e controle

Na execução da PCR em tempo real é fundamental que a eficiência de amplificação dos *primers* seja alta, além disso, uma das variáveis utilizadas para o cálculo da razão entre a região MHM e o *GAPDH* é a eficiência de amplificação de cada um deles, portanto, uma curva de diluição (1:2) com seis pontos foi construída utilizando uma amostra de DNA de coração de macho. Essa mesma amostra também foi o controle escolhido (figuras 19 e 20).

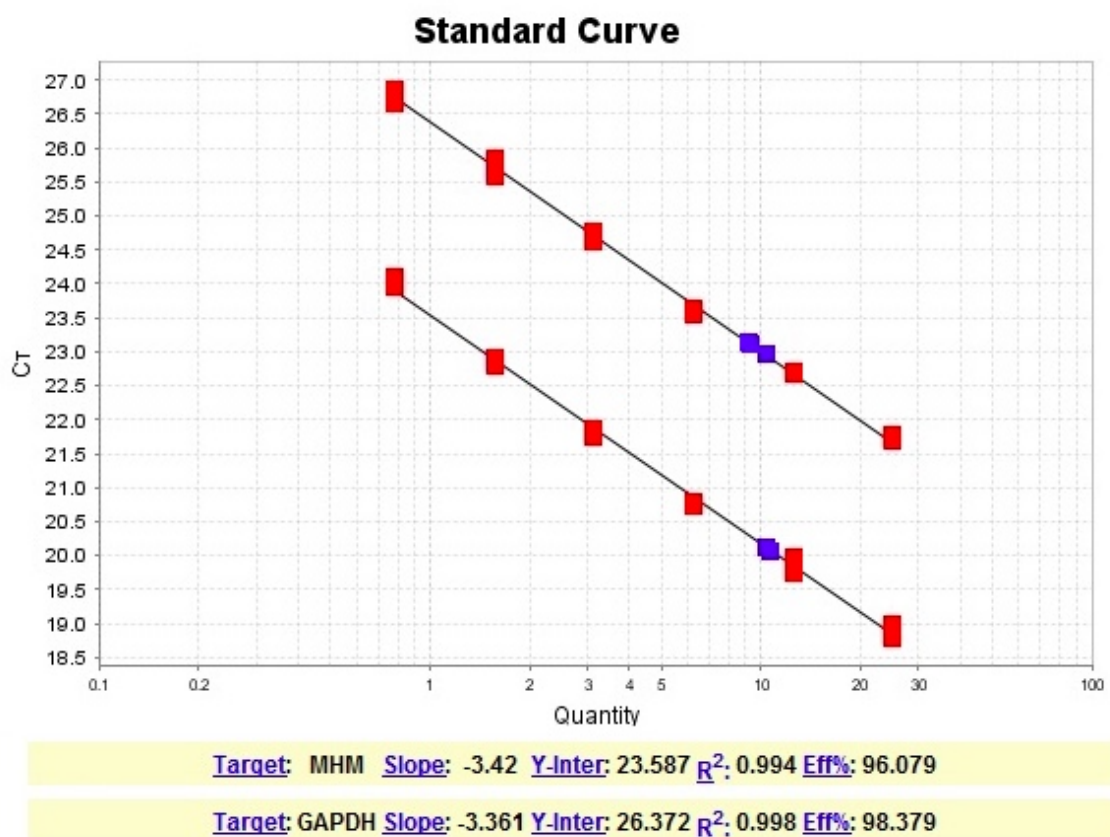


Figura 19. Retas obtidas após a realização da amplificação do DNA diluído serialmente (1:2). A reta superior indica os pontos de amplificação do gene *GAPDH*, a reta inferior os pontos da região MHM. Os pontos vermelhos indicam as diferentes concentrações de DNA utilizadas, sendo elas 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng, 3,12 ng, 1,56 ng e 0,78 ng. Os pontos azuis indicam a amostra controle, da qual utilizamos 10 ng. É possível observar uma eficiência de amplificação de 96% e um slope de -3.42 para a região MHM e uma eficiência de amplificação de 98,3% e um slope de -3.36 para o gene *GAPDH*. Utilizou-se uma amostra de coração de macho para o teste. Essa mesma amostra foi utilizada como controle das reações.

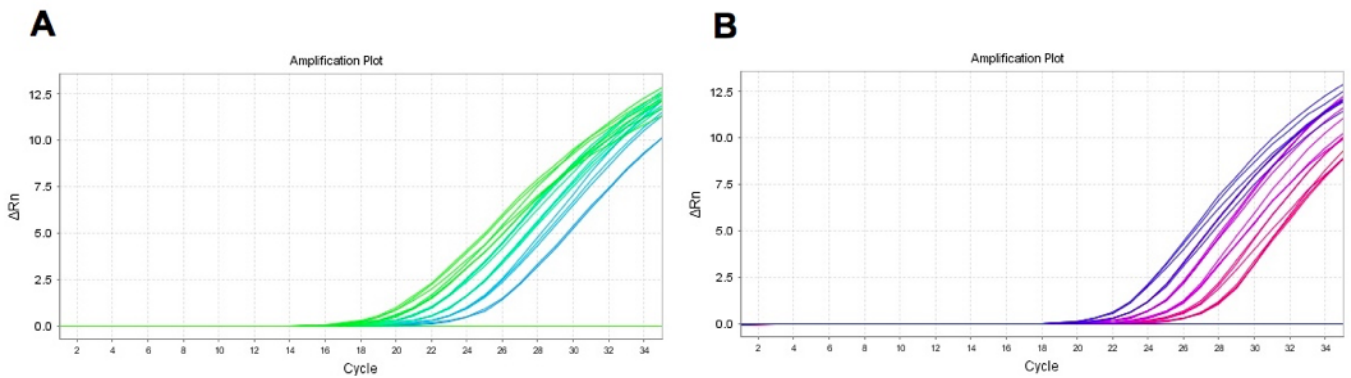


Figura 20. *Amplification plot* da curva de diluição da amostra. (A) Curvas de amplificação de sequência da região MHM. (B) Curvas de amplificação de sequência do gene *GAPDH*.

Com essa curva de diluição podemos obter o slope da reta referente a região MHM e ao *GAPDH* e calcular a eficiência de amplificação para cada um deles segundo a fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})}$$

Assim, temos que:

$$E_{\text{MHM}} = 10^{(-1/-3,42)} \quad E_{\text{MHM}} = 1,96$$

$$E_{\text{GAPDH}} = 10^{(-1/-3,36)} \quad E_{\text{GAPDH}} = 1,98$$

No caso do controle, obtivemos um Ct médio de 20,1 para a região MHM e um Ct médio de 22,95 para o gene *GAPDH*. Portanto, a fórmula final para o cálculo da razão entre MHM e *GAPDH* (R) foi:

$$R = \frac{\Delta Ct \text{ alvo (20,1 - amostra)} (1,96)}{\Delta Ct \text{ ref. (22,95 - amostra)} (1,98)}$$

5.2.2. Especificidade da reação

Para avaliar a especificidade da reação elaboramos uma curva de *melt* com a amostra utilizada para criar a curva de eficiência e o controle, os resultados foram satisfatórios, com um pico único para cada gene, demonstrando uma grande especificidade para a qPCR do estudo (figura 21).

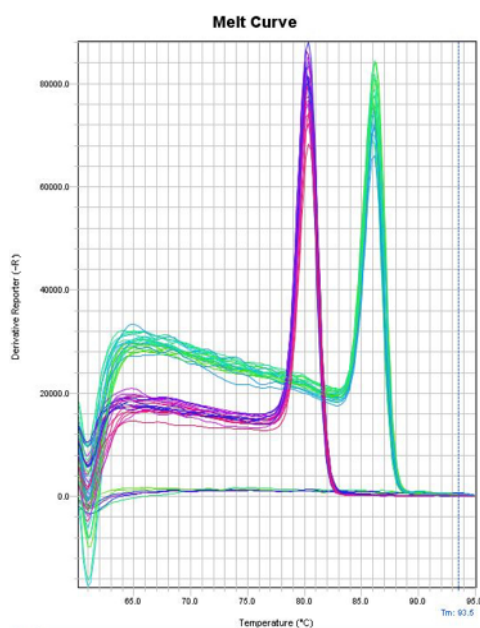


Figura 21. Derivada da curva de *melt* da região MHM e do gene *GAPDH* da amostra de DNA de coração de macho utilizada como controle. As linhas roxas representam o gene *GAPDH* e as linhas verdes a região MHM.

5.2.3 qPCR de DNA dos animais adultos

As qPCRs mostraram-se bastante satisfatórias, sendo possível observar uma nítida diferença entre as amostras de DNA de machos e fêmeas (figuras 22 e 23).

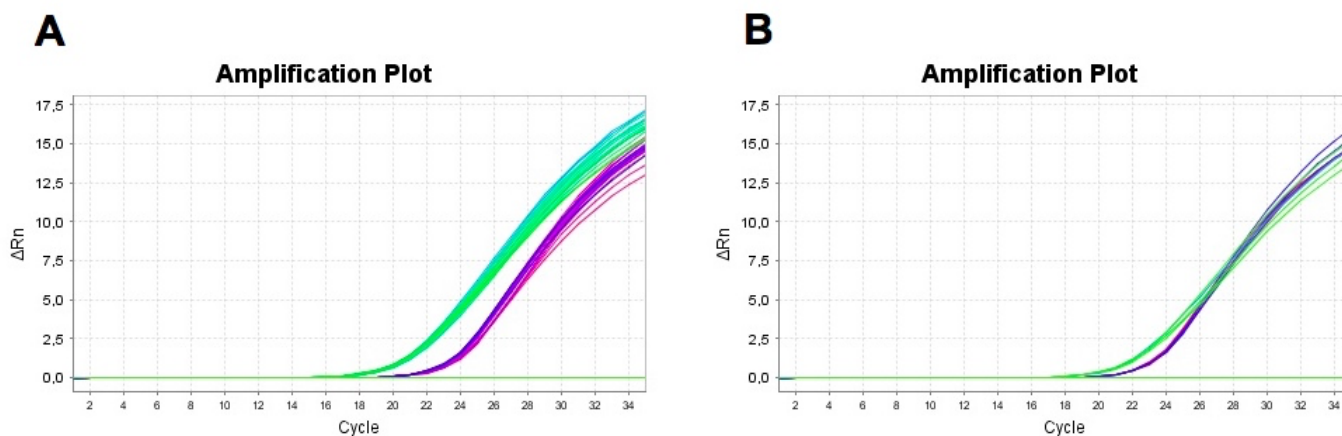


Figura 22. *Amplification plot* das amostras de coração de machos e fêmeas. As curvas verdes representam a sequência da região MHM e as curvas roxas, do gene *GAPDH*. (A) Amplificação das amostras de DNA de machos. (B) Amplificação das amostras de DNA de fêmeas. O ΔRn no eixo Y representa a leitura da fluorescência emitida pela amostra durante a PCR, enquanto o *Cycle* no eixo X representa o número de ciclos de amplificação da reação.

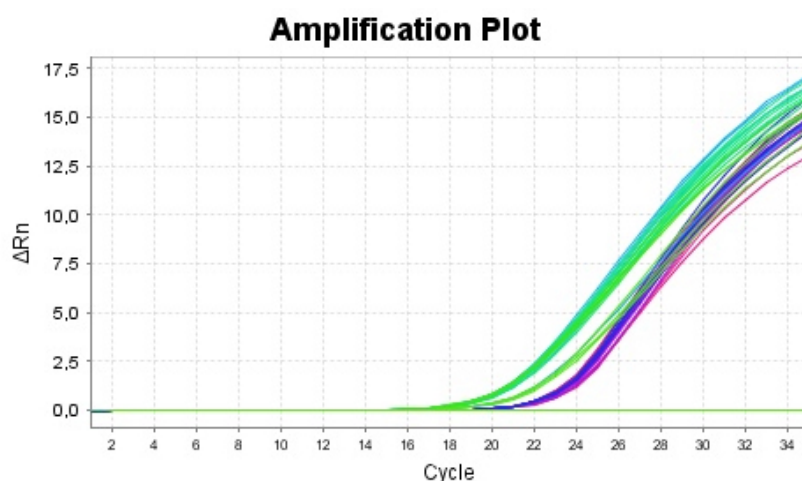


Figura 23. *Amplification plot* da união das curvas da figura 22, demonstrando a nítida diferença entre os machos e as fêmeas. As curvas verdes da esquerda representam a sequência da região MHM dos machos, as curvas verdes da direita representam a sequência da região MHM das fêmeas e as curvas roxas a sequência do gene *GAPDH* de machos e fêmeas.

Após a realização da qPCR nas amostras de DNA dos animais adultos obtivemos os seguintes resultados (tabelas 1 e 2).

| Machos | | | |
|-------------------|--------|----------|------|
| Animais e tecidos | MHM Ct | GAPDH Ct | R |
| A2 Coração | 20,90 | 23,45 | 0,82 |
| A4 Coração | 19,04 | 21,73 | 0,89 |
| A6 Coração | 19,06 | 22,44 | 1,42 |
| A8 Coração | 19,29 | 22,39 | 1,18 |
| A2 Gônada | 18,28 | 21,82 | 1,57 |
| A4 Gônada | 17,86 | 21,24 | 1,40 |
| A6 Gônada | 19,03 | 22,37 | 1,38 |
| A2 Cérebro | 17,99 | 21,76 | 1,83 |
| A4 Cérebro | 18,60 | 21,83 | 1,28 |
| A6 Cérebro | 19,68 | 22,72 | 1,13 |
| A2 Rim | 18,32 | 21,97 | 1,70 |
| A4 Rim | 18,54 | 21,77 | 1,28 |
| A6 Pulmão | 18,27 | 21,55 | 1,32 |
| A8 Pulmão | 16,6 | 19,71 | 1,15 |
| A6 Fígado | 20,20 | 23,15 | 1,07 |
| A8 Fígado | 20,57 | 22,78 | 0,65 |

Tabela 1. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de machos adultos, contendo os valores das médias do Ct de cada tecido para a sequência da região MHM e a sequência do gene *GAPDH*, além da razão (R) entre elas. Os quatro animais estão representados como A2, A4, A6, A8.

| Fêmeas | | | |
|-------------------|--------|----------|------|
| Animais e tecidos | MHM Ct | GAPDH Ct | R |
| A1 Coração | 20,21 | 21,63 | 0,38 |
| A3 Coração | 20,44 | 21,94 | 0,40 |
| A5 Coração | 21,35 | 23,32 | 0,56 |
| A7 Coração | 20,99 | 22,59 | 0,43 |
| A1 Gônada | 20,42 | 21,87 | 0,39 |
| A3 Gônada | 22,10 | 23,59 | 0,40 |
| A1 Cérebro | 19,35 | 21,35 | 0,56 |
| A3 Cérebro | 19,37 | 21,75 | 0,72 |
| A5 Cérebro | 21,28 | 22,90 | 0,44 |
| A1 Rim | 19,88 | 21,70 | 0,49 |
| A3 Rim | 20,77 | 22,13 | 0,36 |
| A5 Pulmão | 20,62 | 22,20 | 0,42 |
| A7 Pulmão | 20,66 | 21,90 | 0,33 |
| A5 Fígado | 22,44 | 23,71 | 0,35 |
| A7 Fígado | 22,20 | 23,5 | 0,35 |

Tabela 2. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de fêmeas adultas, contendo os valores das médias do Ct de cada tecido para a sequência da região MHM e a sequência do gene *GAPDH*, além da razão (R) entre elas. Os quatro animais estão representados como A1, A3, A5, A7.

Com bases nesses resultados, criamos um gráfico para identificar quais seriam os valores de R correspondentes aos machos e quais corresponderiam às fêmeas (gráfico 1).

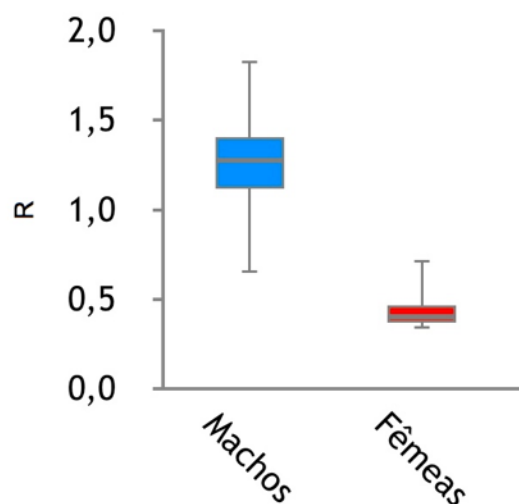


Gráfico 1. Gráfico dos valores de R obtidos para as amostras de machos e fêmeas adultos. O valor R é a razão entre a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH* e corresponde de maneira indireta ao número de repetições da região MHM em cada um dos sexos, demonstrando que os machos possuem um número maior de cópias do que as fêmeas.

Obtivemos uma pequena sobreposição dos resultados dos diferentes sexos, com uma amostra de DNA de fígado de macho apresentando um valor de R de 0,65, muito abaixo da média dos outros tecidos. Desconsiderando esse ponto, obtivemos um valor de R mínimo de 0,82 para as amostras de macho e um valor R máximo de 0,72 para as amostras de fêmea. Assim, estabelecemos os valores base do nosso teste de sexagem como sendo: **R > 0,75 para Macho** e **R < 0,75 para Fêmea**.

5.2.4. qPCR dos filhotes (pintinhos)

Com os parâmetros de sexagem definidos, passamos às qPCRs dos filhotes. Numeramos os animais de forma aleatória, de maneira que não fosse possível identificar pela numeração quais animais eram macho e quais eram fêmea. Os filhotes com um R maior do que 0,75 foram considerados machos, enquanto os com um R menor do que 0,75 foram considerados fêmeas. Em seguida, fizemos a correspondência entre o sexo fenotípico do animal (definido pela presença de testículo ou ovário) e o sexo previsto pelo teste de sexagem. Obtivemos um acerto de 100% (140/140) em todas as amostras de todos os tecidos, com exceção do fígado, que mostrou-se um tecido com características peculiares, discutidas posteriormente. Os resultados para cada um dos tecidos estão apresentados nas tabelas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

| Coração | | | | | |
|---------|--------|----------|------|---------------|-----------|
| Animais | MHM Ct | GAPDH Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 1 | 18,31 | 21,69 | 1,41 | M | M |
| 2 | 20,68 | 22,43 | 0,47 | F | F |
| 3 | 20,20 | 21,92 | 0,46 | F | F |
| 4 | 19,39 | 22,41 | 1,12 | M | M |
| 5 | 19,28 | 22,30 | 1,11 | M | M |
| 6 | 19,41 | 22,34 | 1,05 | M | M |
| 7 | 19,53 | 22,50 | 1,08 | M | M |
| 8 | 20,66 | 22,20 | 0,41 | F | F |
| 9 | 19,23 | 22,26 | 1,12 | M | M |
| 10 | 19,33 | 22,40 | 1,15 | M | M |
| 11 | 19,26 | 22,30 | 1,13 | M | M |
| 12 | 19,21 | 22,43 | 1,28 | M | M |
| 13 | 21,82 | 23,28 | 0,39 | F | F |
| 14 | 19,51 | 22,65 | 1,21 | M | M |
| 15 | 19,03 | 22,22 | 1,25 | M | M |
| 16 | 19,23 | 22,39 | 1,22 | M | M |
| 17 | 19 | 22,18 | 1,24 | M | M |
| 18 | 19,63 | 22,63 | 1,10 | M | M |
| 19 | 20,35 | 23,35 | 1,11 | M | M |
| 20 | 19,58 | 22,46 | 1,02 | M | M |

Tabela 3. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de coração dos 20 pintinhos, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

| Cérebro | | | | | |
|---------|--------|----------|------|---------------|-----------|
| Animais | MHM Ct | GAPDH Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 1 | 19,45 | 22,59 | 1,21 | M | M |
| 2 | 20,43 | 22,37 | 0,54 | F | F |
| 3 | 20,91 | 22,49 | 0,42 | F | F |
| 4 | 18,27 | 21,59 | 1,35 | M | M |
| 5 | 18,93 | 22,27 | 1,38 | M | M |
| 6 | 18,75 | 22,11 | 1,40 | M | M |
| 7 | 19,47 | 22,48 | 1,11 | M | M |
| 8 | 19,80 | 21,38 | 0,42 | F | F |
| 9 | 19,12 | 22,38 | 1,31 | M | M |
| 10 | 19,24 | 22,40 | 1,23 | M | M |
| 11 | 18,53 | 21,88 | 1,38 | M | M |
| 12 | 17,81 | 21,07 | 1,29 | M | M |
| 13 | 19,29 | 21,56 | 0,67 | F | F |
| 14 | 19,15 | 22,40 | 1,30 | M | M |
| 15 | 18,90 | 22,26 | 1,40 | M | M |
| 16 | 19,10 | 22,37 | 1,32 | M | M |
| 17 | 17,82 | 21,33 | 1,53 | M | M |
| 18 | 18,85 | 21,91 | 1,14 | M | M |
| 19 | 18,83 | 22,10 | 1,32 | M | M |
| 20 | 18,89 | 22,04 | 1,21 | M | M |

Tabela 4. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de cérebro dos 20 pintinhos, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

| Sangue | | | | | |
|---------|--------|-----------------|------|---------------|-----------|
| Animais | MHM Ct | <i>GAPDH</i> Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 1 | 17,65 | 20,99 | 1,36 | M | M |
| 2 | 19,77 | 21,68 | 0,52 | F | F |
| 3 | 20,02 | 21,85 | 0,50 | F | F |
| 4 | 19,33 | 22,63 | 1,35 | M | M |
| 5 | 18,65 | 22,22 | 1,61 | M | M |
| 6 | 17,98 | 21,48 | 1,53 | M | M |
| 7 | 18,24 | 21,51 | 1,31 | M | M |
| 8 | 19,37 | 21,57 | 0,64 | F | F |
| 9 | 19,03 | 22,35 | 1,36 | M | M |
| 10 | 19,24 | 22,52 | 1,33 | M | M |
| 11 | 18,26 | 21,67 | 1,44 | M | M |
| 12 | 18,01 | 21,41 | 1,43 | M | M |
| 13 | 19,44 | 21,79 | 0,71 | F | F |
| 14 | 20,19 | 23,37 | 1,25 | M | M |
| 15 | 16,87 | 20,53 | 1,68 | M | M |
| 16 | 18,09 | 21,50 | 1,44 | M | M |
| 17 | 18,29 | 21,68 | 1,42 | M | M |
| 18 | 18,79 | 22,19 | 1,44 | M | M |
| 19 | 18,59 | 22,05 | 1,49 | M | M |
| 20 | 18,80 | 22,21 | 1,45 | M | M |

Tabela 5. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de sangue dos 20 pintinhos, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

| Músculo | | | | | |
|---------|--------|-----------------|------|---------------|-----------|
| Animais | MHM Ct | <i>GAPDH</i> Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 1 | 21,80 | 24,42 | 0,87 | M | M |
| 2 | 21,87 | 23,53 | 0,45 | F | F |
| 3 | 22,83 | 24,15 | 0,36 | F | F |
| 4 | 20,50 | 23,43 | 1,06 | M | M |
| 5 | 21,37 | 24,29 | 1,06 | M | M |
| 6 | 21,09 | 23,78 | 0,91 | M | M |
| 7 | 20,57 | 23,37 | 0,97 | M | M |
| 8 | 21,65 | 23,40 | 0,48 | F | F |
| 9 | 20,50 | 23,56 | 1,16 | M | M |
| 10 | 20,44 | 23,46 | 1,13 | M | M |
| 11 | 21,48 | 24,29 | 0,99 | M | M |
| 12 | 20,76 | 23,75 | 1,11 | M | M |
| 13 | 22,65 | 24,56 | 0,54 | F | F |
| 14 | 21,60 | 24,30 | 0,92 | M | M |
| 15 | 21,63 | 24,34 | 0,92 | M | M |
| 16 | 21,64 | 24,34 | 0,92 | M | M |
| 17 | 21,38 | 24,22 | 1,01 | M | M |
| 18 | 21,39 | 24,03 | 0,88 | M | M |
| 19 | 20,95 | 24,01 | 1,16 | M | M |
| 20 | 21,22 | 23,96 | 0,94 | M | M |

Tabela 6. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de músculo dos 20 pintinhos, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

| Gônada | | | | | |
|---------|--------|-----------------|------|---------------|-----------|
| Animais | MHM Ct | <i>GAPDH</i> Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 1 | 19,99 | 23,04 | 1,15 | M | M |
| 2 | 21,44 | 23,31 | 0,52 | F | F |
| 3 | 20,98 | 22,84 | 0,51 | F | F |
| 4 | 19,50 | 22,78 | 1,33 | M | M |
| 5 | 19,46 | 22,82 | 1,41 | M | M |
| 6 | 19,50 | 22,91 | 1,46 | M | M |
| 7 | 19,69 | 23,05 | 1,41 | M | M |
| 8 | 20,94 | 22,94 | 0,56 | F | F |
| 9 | 19,75 | 22,88 | 1,21 | M | M |
| 10 | 19,53 | 22,92 | 1,44 | M | M |
| 11 | 19,61 | 22,80 | 1,26 | M | M |
| 12 | 20,19 | 23,16 | 1,09 | M | M |
| 13 | 21,31 | 23,07 | 0,48 | F | F |
| 14 | 19,95 | 22,93 | 1,09 | M | M |
| 15 | 19,50 | 22,89 | 1,44 | M | M |
| 16 | 20,12 | 23,27 | 1,23 | M | M |
| 17 | 19,54 | 22,79 | 1,31 | M | M |
| 18 | 19,53 | 22,79 | 1,32 | M | M |
| 19 | 19,62 | 22,93 | 1,36 | M | M |
| 20 | 19,91 | 23,01 | 1,18 | M | M |

Tabela 7. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de gônada dos 20 pintinhos, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

| Rim | | | | | |
|---------|--------|----------|------|---------------|-----------|
| Animais | MHM Ct | GAPDH Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 1 | 20,36 | 23,42 | 1,16 | M | M |
| 2 | 21,81 | 23,44 | 0,44 | F | F |
| 3 | 21,65 | 23,16 | 0,41 | F | F |
| 4 | 20,18 | 23,31 | 1,21 | M | M |
| 5 | 20,21 | 22,97 | 0,94 | M | M |
| 6 | 20,06 | 22,62 | 0,82 | M | M |
| 7 | 20,37 | 23,19 | 0,98 | M | M |
| 8 | 21,58 | 23,35 | 0,49 | F | F |
| 9 | 20,27 | 23,29 | 1,13 | M | M |
| 10 | 20,14 | 22,85 | 0,91 | M | M |
| 11 | 20,33 | 23,32 | 1,10 | M | M |
| 12 | 20,64 | 23,68 | 1,14 | M | M |
| 13 | 21,95 | 23,57 | 0,44 | F | F |
| 14 | 21,18 | 24,01 | 1,00 | M | M |
| 15 | 20,16 | 23,38 | 1,29 | M | M |
| 16 | 20,43 | 23,51 | 1,17 | M | M |
| 17 | 20,00 | 23,19 | 1,26 | M | M |
| 18 | 20,32 | 23,56 | 1,31 | M | M |
| 19 | 20,02 | 23,20 | 1,25 | M | M |
| 20 | 21,70 | 24,30 | 0,86 | M | M |

Tabela 8. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de rim dos 20 pintinhos, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

| Pulmão | | | | | |
|---------|--------|----------|------|---------------|-----------|
| Animais | MHM Ct | GAPDH Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 1 | 19,31 | 22,61 | 1,35 | M | M |
| 2 | 20,48 | 22,54 | 0,59 | F | F |
| 3 | 20,45 | 22,47 | 0,57 | F | F |
| 4 | 19,59 | 22,86 | 1,33 | M | M |
| 5 | 19,41 | 22,71 | 1,35 | M | M |
| 6 | 19,40 | 22,78 | 1,43 | M | M |
| 7 | 19,60 | 22,69 | 1,17 | M | M |
| 8 | 20,19 | 22,04 | 0,51 | F | F |
| 9 | 20,19 | 22,71 | 0,80 | M | M |
| 10 | 19,10 | 22,22 | 1,19 | M | M |
| 11 | 19,60 | 22,55 | 1,07 | M | M |
| 12 | 19,82 | 22,77 | 1,07 | M | M |
| 13 | 20,70 | 22,53 | 0,50 | F | F |
| 14 | 19,64 | 22,30 | 0,87 | M | M |
| 15 | 19,63 | 22,83 | 1,26 | M | M |
| 16 | 19,63 | 22,80 | 1,24 | M | M |
| 17 | 19,60 | 22,88 | 1,33 | M | M |
| 18 | 19,39 | 22,62 | 1,29 | M | M |
| 19 | 20,22 | 23,22 | 1,11 | M | M |
| 20 | 19,23 | 22,42 | 1,25 | M | M |

Tabela 9. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de pulmão dos 20 pintinhos, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

| Fígado | | | | | |
|---------|--------|----------|------|---------------|-----------|
| Animais | MHM Ct | GAPDH Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 1 | 23,21 | 25,24 | 0,59 | F | M |
| 2 | 25,74 | 25,49 | 0,13 | F | F |
| 3 | 26,22 | 25,90 | 0,12 | F | F |
| 4 | 23,47 | 25,59 | 0,63 | F | M |
| 5 | 23,40 | 25,52 | 0,63 | F | M |
| 6 | 22,74 | 24,93 | 0,65 | F | M |
| 7 | 23,71 | 25,47 | 0,49 | F | M |
| 8 | 24,23 | 23,84 | 0,11 | F | F |
| 9 | 22,73 | 24,77 | 0,59 | F | M |
| 10 | 21,86 | 23,99 | 0,62 | F | M |
| 11 | 20,92 | 23,48 | 0,83 | M | M |
| 12 | 21,25 | 23,52 | 0,68 | F | M |
| 13 | 23,76 | 23,93 | 0,17 | F | F |
| 14 | 22,07 | 23,97 | 0,53 | F | M |
| 15 | 22,13 | 24,19 | 0,60 | F | M |
| 16 | 21,09 | 23,61 | 0,81 | M | M |
| 17 | 21,43 | 23,73 | 0,70 | F | M |
| 18 | 21,81 | 23,99 | 0,64 | F | M |
| 19 | 21,60 | 23,97 | 0,73 | F | M |
| 20 | 21,99 | 24,20 | 0,66 | F | M |

Tabela 10. Tabela com os resultados da qPCR das amostras de fígado dos 20 pintinhos, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

Como observado na tabela 10, o fígado não segue o padrão dos demais tecidos e não pode ser utilizado para o teste de sexagem seguindo os parâmetros estabelecidos. Aparentemente, o número de repetições da região MHM é menor no fígado quando comparado com os demais tecidos, tanto para os adultos quanto para os filhotes. Curiosamente, o valor de R para o fígado entre machos adultos e filhotes não divergiu muito, enquanto o valor de R entre as fêmeas adultas e filhotes foi extremamente diferente. É possível perceber essa característica peculiar do fígado comparando as curvas de amplificação desse tecido com um outro tecido qualquer (figuras 24 e 25).

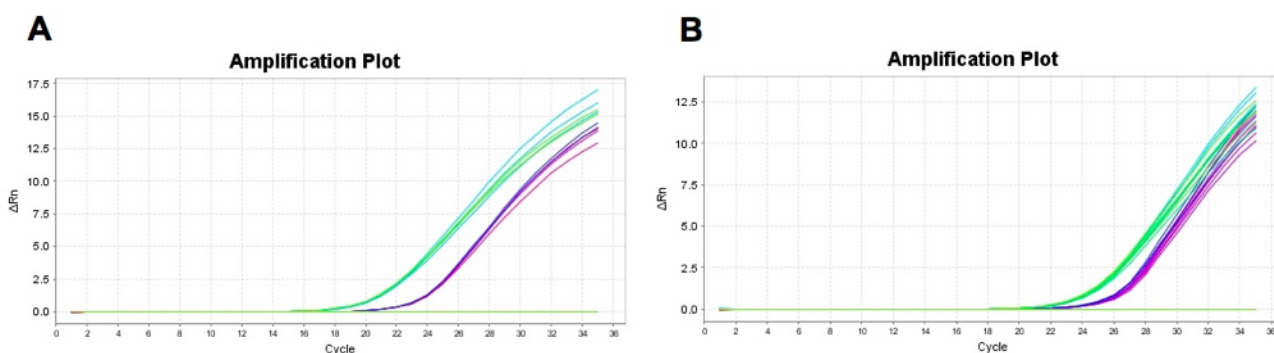


Figura 24. *Amplification plot* das amostras de DNA de machos filhotes. As curvas verdes representam a sequência da região MHM e as curvas roxas a sequência do gene *GAPDH*. (A) Amplificação das amostras de DNA de pulmão de machos. (B) Amplificação das amostras de DNA de fígado de machos.

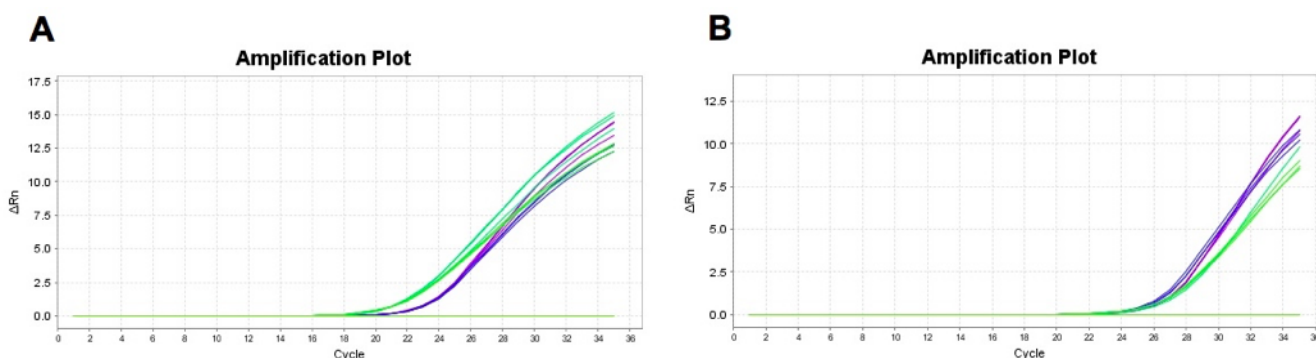


Figura 25. *Amplification plot* das amostras de DNA de fêmeas filhotes. As curvas verdes representam a sequência da região MHM e as curvas roxas a sequência do gene *GAPDH*. (A) Amplificação das amostras de DNA de pulmão de fêmeas. (B) Amplificação das amostras de DNA de fígado de fêmeas.

Podemos observar que, no caso do fígado, os pintinhos machos apresentam praticamente o mesmo número de repetições da região MHM do que os machos adultos, enquanto os pintinhos fêmeas, possuem um número de cópias muito menor quando filhotes e aparentemente vão ganhando repetições da região MHM conforme tornam-se adultos. Podemos observar essa diferença na figura que compara machos e fêmeas, adultos e filhotes (gráfico 2).

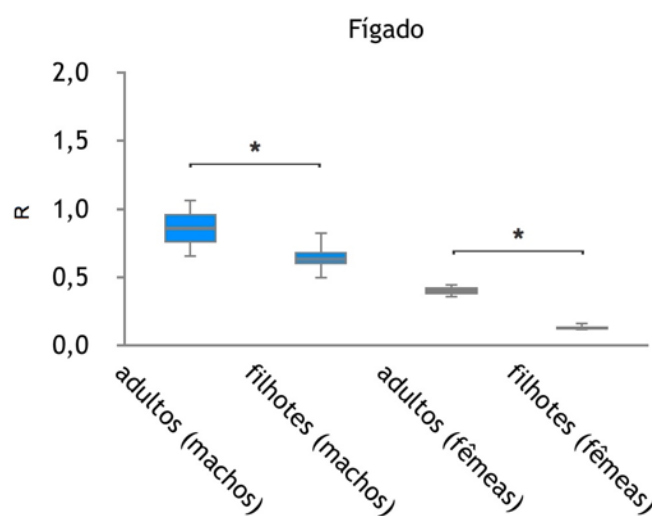


Gráfico 2. Gráfico dos valores de R do fígado de machos e fêmeas, adultos e filhotes. A diferença entre machos adultos e filhotes foi significativa ($p < 0,024$), assim como a diferença entre as fêmeas adultas e filhotes ($p < 0,001$).

5.2.5. Comparações entre os adultos e os filhotes

Utilizando os resultados de R obtidos para os adultos e os filhotes, foram elaborados gráficos comparativos para cada um dos tecidos nos quais as comparações eram possíveis (coração, cérebro, pulmão, rim, gônada, fígado), os resultados estão expostos no conjunto de gráficos representado pela figura 26.

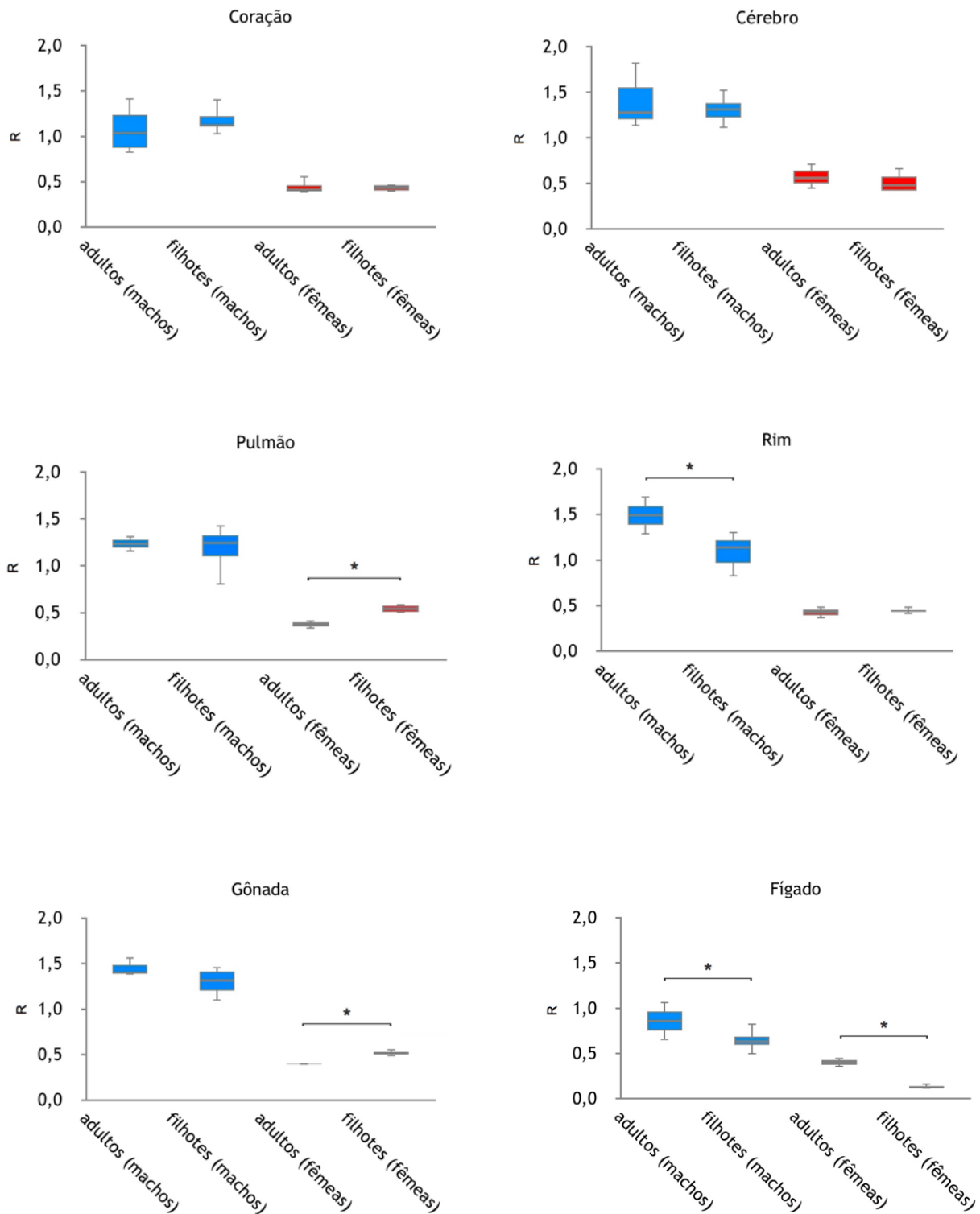


Figura 26. Conjunto de gráficos com os valores de R de diferentes tecidos de machos e fêmeas, adultos e filhotes. As diferenças estatisticamente significativas foram entre: pulmões de fêmeas ($p < 0,017$), rins de machos ($p < 0,0069$), gônadas de fêmeas ($p < 0,008$), fígados de machos ($p < 0,024$) e fígados de fêmeas ($p < 0,001$).

5.2.6. Comparação entre os filhotes

Ao comparar a média do valor de R de todos os tecidos para cada animal, verificamos que não existe diferença entre os animais, como observado no gráfico 3.

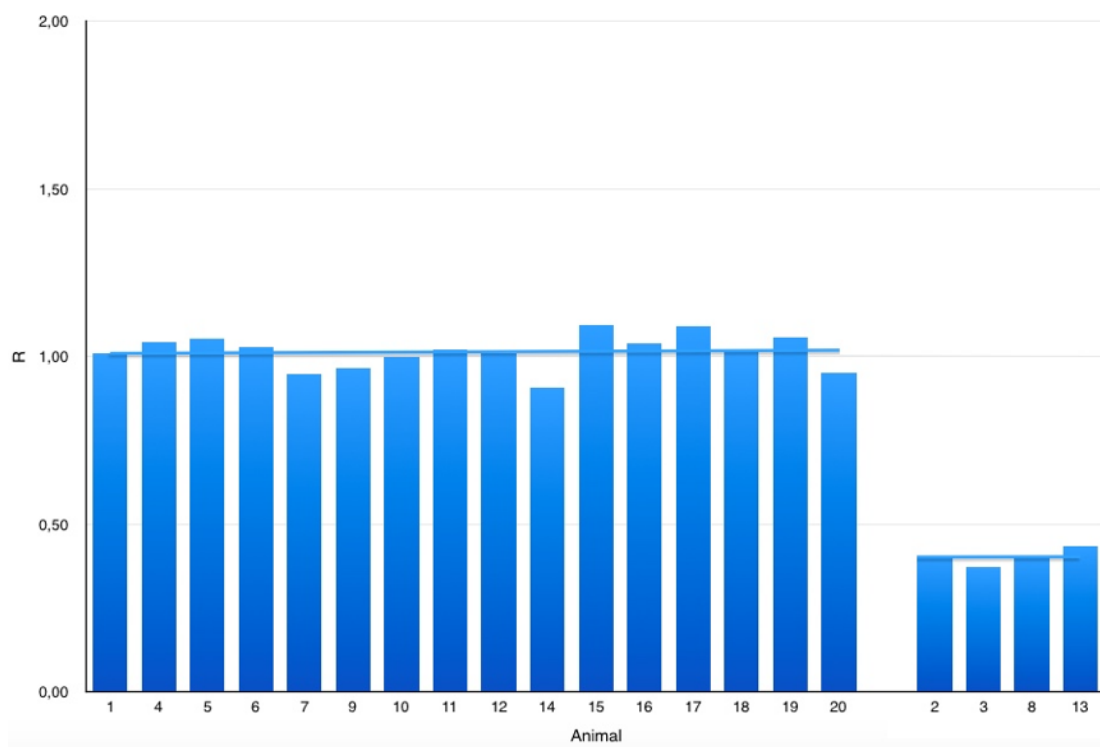
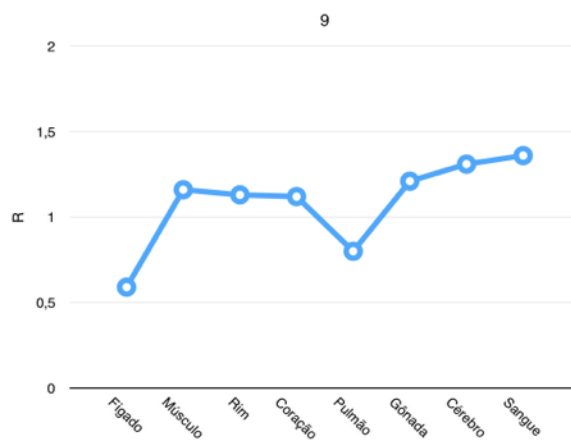
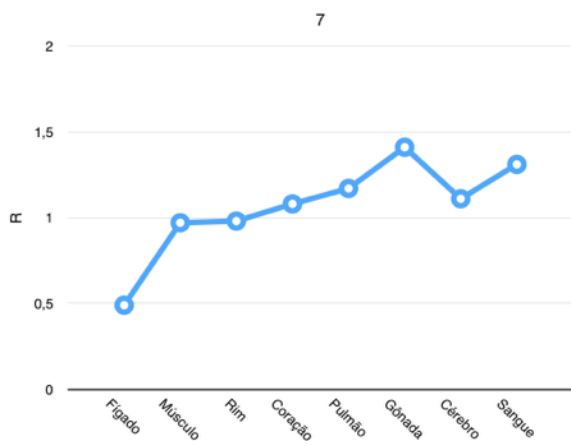
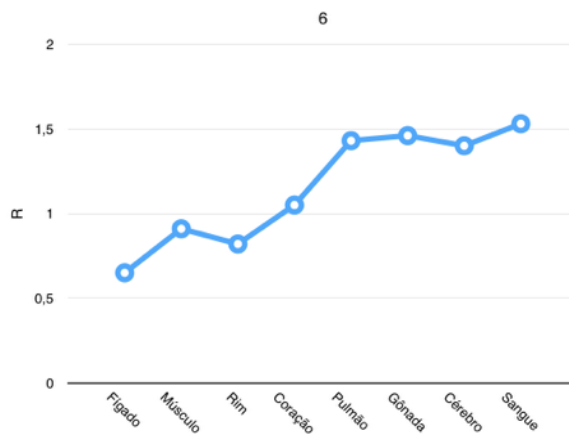
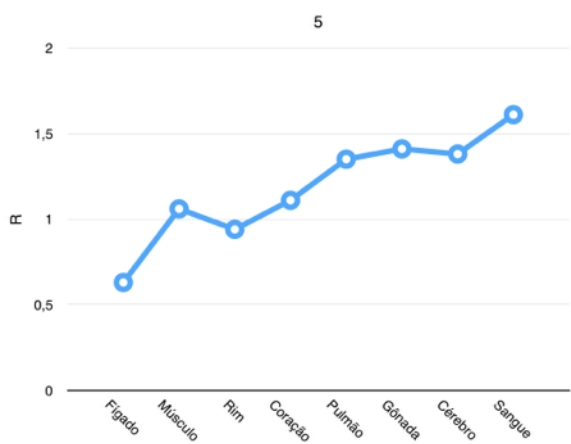
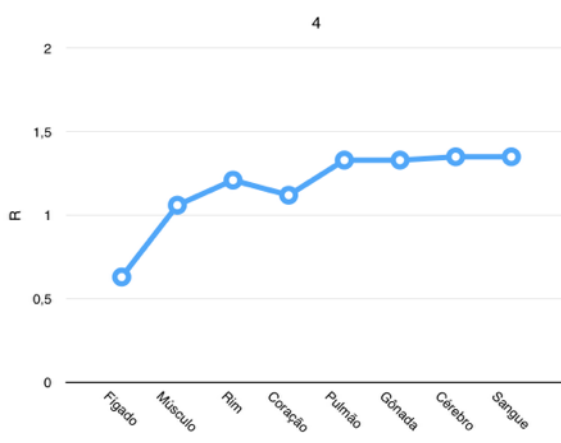
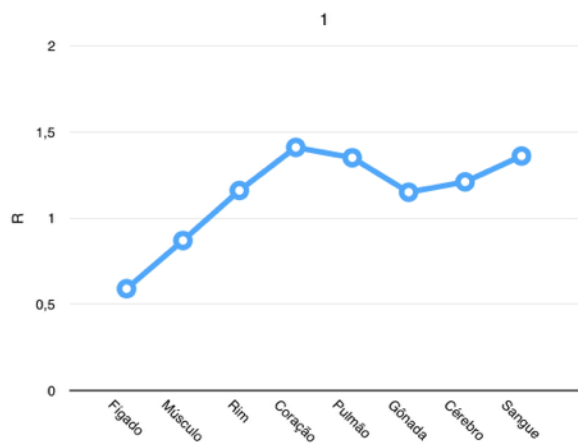
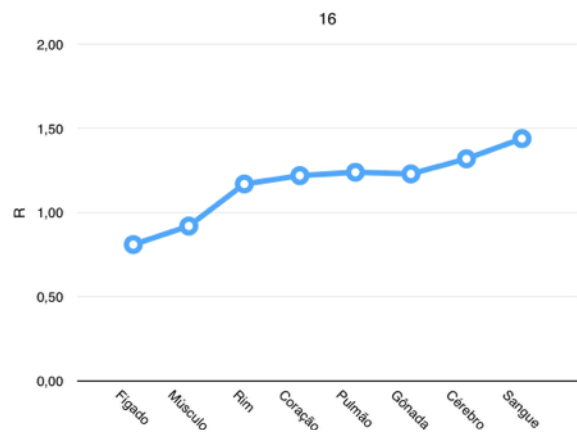
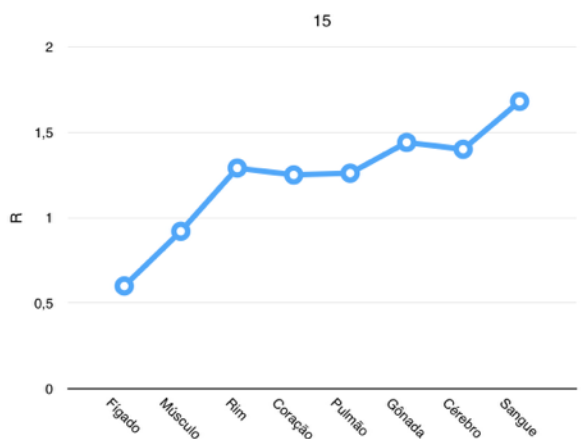
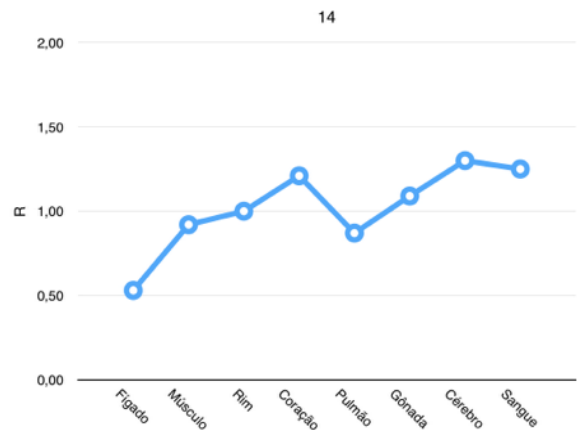
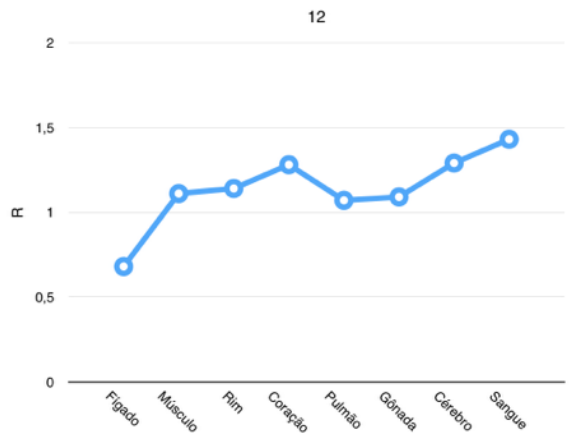
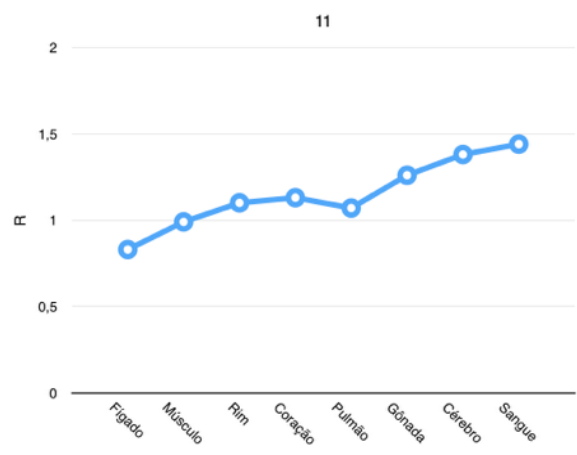
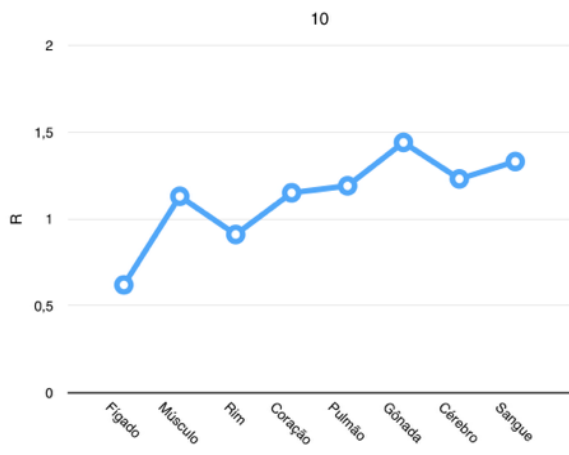


Gráfico 3. Valores da média do R de todos os tecidos em cada um dos animais. A linha de tendência horizontal tanto para os machos quanto para as fêmeas indica que não existem diferenças absolutas no número de repetições da região MHM entre os animais do mesmo sexo. Os animais 1, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 são os machos, enquanto os animais 2, 3, 8, 13 são as fêmeas.

5.2.7. Comparação entre os tecidos

Embora não exista diferença entre os animais, pudemos observar uma provável diferença entre os tecidos. O que apresenta o menor número de repetições para a região MHM é o fígado, seguido por músculo, rim, coração, pulmão, gônada, cérebro, sangue. Essa tendência pôde ser observada em todos os animais, tanto machos quanto fêmeas e é ilustrada na série de gráficos a seguir (figuras 27 e 28):





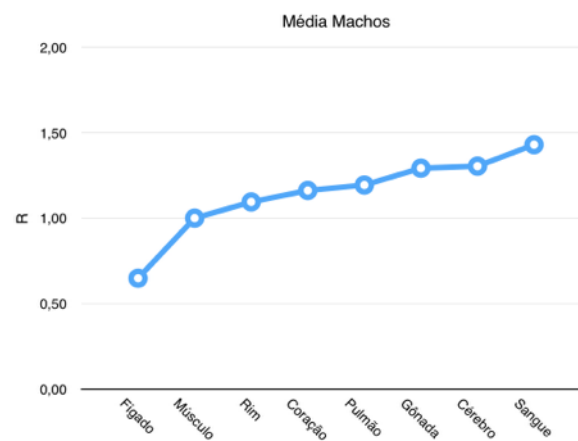
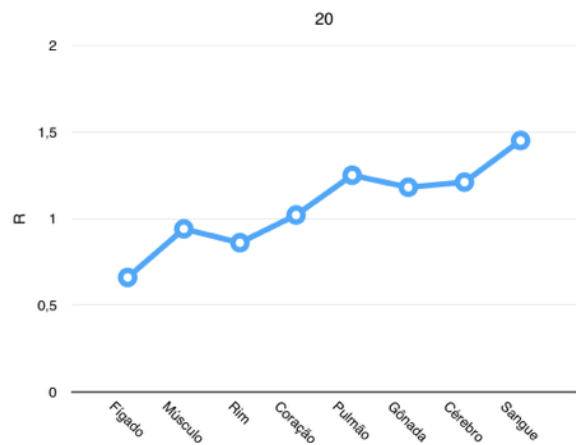
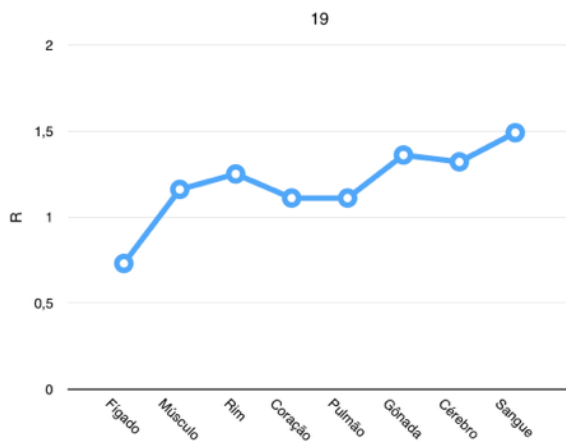
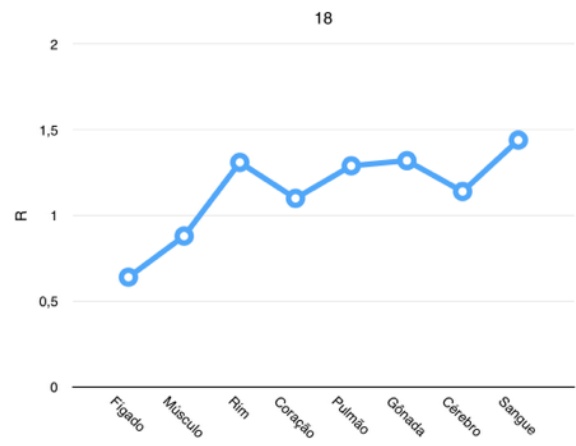
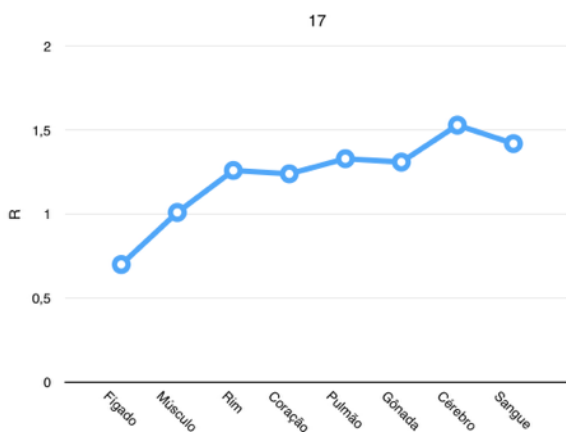


Figura 27. Conjunto de gráficos com os valores de R dos diferentes tecidos para cada um dos machos. Acima de cada gráfico encontra-se o número do animal correspondente. O último gráfico apresenta o valor de R médio de todos os machos, para cada um dos tecidos.

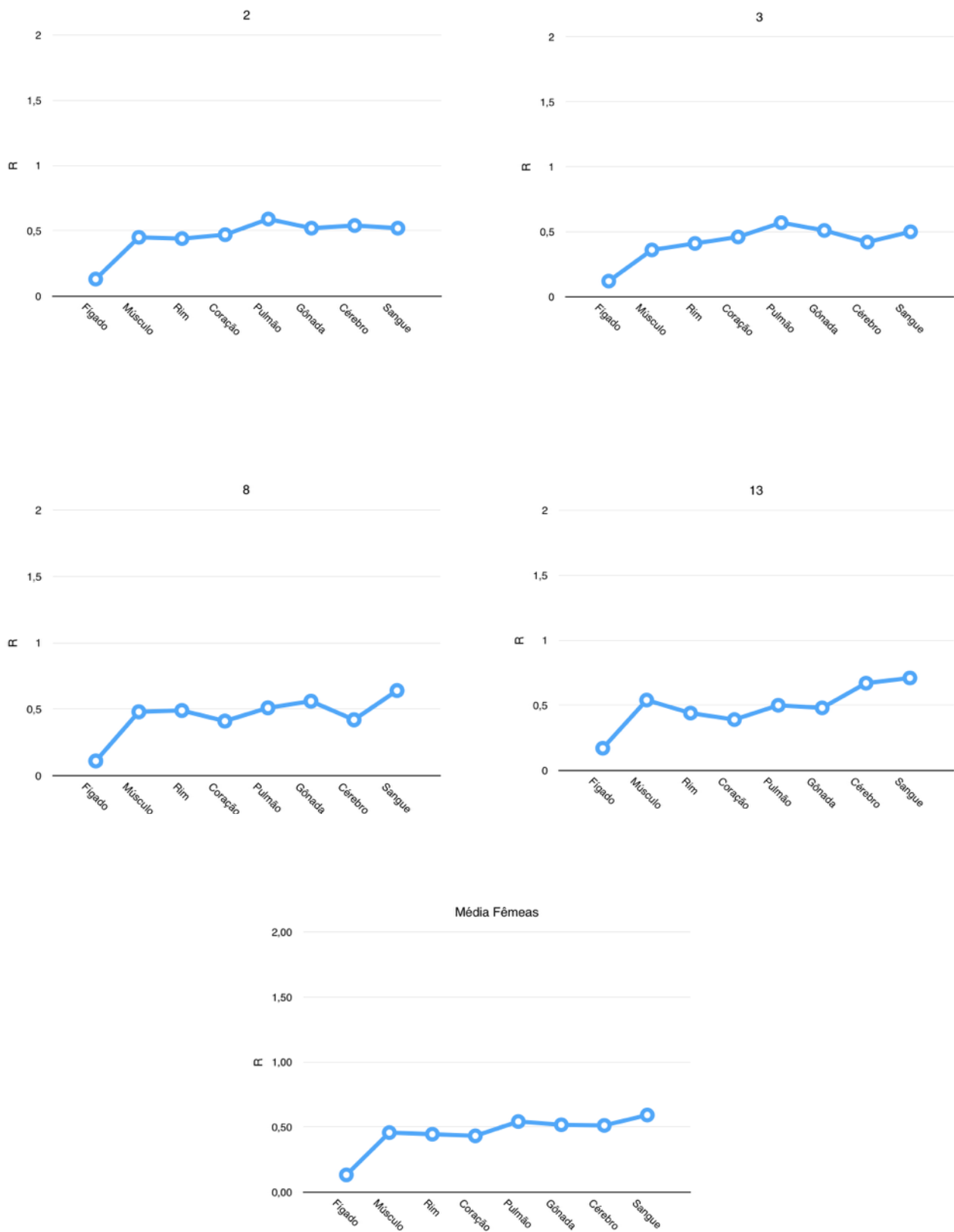


Figura 28. Conjunto de gráficos com os valores de R dos diferentes tecidos para cada uma das fêmeas. Acima de cada gráfico encontra-se o número do animal correspondente. O último gráfico apresenta o valor de R médio de todas as fêmeas, para cada um dos tecidos.

5.2.8. Quantidade mínima de DNA para o teste de sexagem

Para descobrirmos a quantidade mínima de DNA necessária para realizar o teste de sexagem, fizemos uma qPCR utilizando diferentes quantidades de DNA, com o maior valor sendo 12,5 ng de DNA e o menor 0,39 ng. O teste mostrou-se tão eficiente, que até mesmo com a pequena quantidade de 0,39 ng de DNA foi possível distinguir o macho da fêmea (tabelas 11 e 12):

| Macho | | | | | |
|----------|--------|-----------------|------|---------------|-----------|
| DNA (ng) | MHM Ct | <i>GAPDH</i> Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 12,5 | 18,57 | 21,75 | 1,23 | M | M |
| 6,25 | 19,54 | 22,70 | 1,23 | M | M |
| 3,125 | 20,64 | 23,73 | 1,18 | M | M |
| 1,56 | 21,75 | 24,79 | 1,16 | M | M |
| 0,78 | 22,88 | 25,85 | 1,12 | M | M |
| 0,39 | 24,01 | 26,91 | 1,08 | M | M |

Tabela 11. Tabela com os resultados da qPCR utilizando diferentes quantidade de DNA de cérebro de macho, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

| Fêmea | | | | | |
|----------|--------|-----------------|------|---------------|-----------|
| DNA (ng) | MHM Ct | <i>GAPDH</i> Ct | R | Sexo previsto | Sexo real |
| 12,5 | 19,29 | 21,32 | 0,57 | F | F |
| 6,25 | 20,09 | 22,06 | 0,55 | F | F |
| 3,125 | 21,14 | 23,09 | 0,55 | F | F |
| 1,56 | 22,53 | 24,30 | 0,49 | F | F |
| 0,78 | 23,68 | 25,41 | 0,48 | F | F |
| 0,39 | 24,75 | 26,32 | 0,44 | F | F |

Tabela 12. Tabela com os resultados da qPCR utilizando diferentes quantidade de DNA de cérebro de fêmea, apresentando a média do Ct da sequência da região MHM e da sequência do gene *GAPDH*, a razão (R) entre elas, além do sexo previsto e sexo fenotípico dos animais.

Obtivemos um acerto de 100%, sendo possível prever o sexo fenotípico dos animais em todas as diferentes quantidades de DNA utilizadas, demonstrando que o teste é preciso, mesmo com pequenas quantidades de DNA.

DISCUSSÃO

VI. DISCUSSÃO

De acordo com cada uma das hipóteses levantadas faremos a discussão dos resultados, comparação com a literatura e desdobramentos do projeto.

A primeira hipótese refere-se à possível identificação de machos e fêmeas de *Gallus gallus domesticus* pela diferença no número de cromossomos Z, utilizando a região MHM. De acordo com os resultados obtidos no trabalho, podemos afirmar que o teste de sexagem atingiu as expectativas e corroborou a hipótese levantada. Tanto os animais adultos quanto os filhotes tiveram o seu sexo identificado corretamente por meio da variação no número de cópias da região MHM. No entanto, deve-se levar em consideração que os parâmetros utilizados para a realização do teste de sexagem utilizando DNA de fígado devem ser diferentes dos demais tecidos.

O principal teste molecular de sexagem empregado atualmente utiliza os genes *CHD-W* e *CHD-Z*. Ao executar uma PCR *multiplex* com *primers* para esses dois genes, as fêmeas apresentarão duas bandas (uma referente à presença do cromossomo W e outra referente ao cromossomo Z), enquanto os machos apresentarão apenas uma banda (referente aos dois cromossomos Zs); dessa forma, é possível identificar o sexo dos animais (Morinha *et al.*, 2012; Çakmak *et al.*, 2017). O nosso teste de sexagem é diferente, pois não utiliza a presença do cromossomo W como parâmetro e sim a diferença no número de cromossomos Z entre machos e fêmeas.

Um ponto negativo do nosso ensaio de sexagem é o fato da região MHM aparentemente estar confinada nas espécies do grupo gallonserae (Wright *et al.*, 2015) enquanto o gene *CHD* encontra-se relativamente conservado na maioria das espécies de aves (Morinha *et al.*, 2012). No entanto, o gene *CHD* não está relacionado à determinação sexual e compensação de dose, enquanto a região MHM é informativa não somente em relação à questão da identificação do sexo fenotípico dos animais, mas podendo também, trazer informações importantes sobre o processo de compensação de dose e determinação sexual das aves.

Em 2008, o nosso grupo de pesquisas criou um ensaio de sexagem baseado na diferença da metilação do DNA da região MHM entre machos e fêmeas (Caetano *et al.*, 2008). O teste consiste na realização de uma digestão enzimática com uma

enzima sensível à metilação do DNA, que cliva o DNA não metilado, mas não é capaz de clivar o DNA metilado. Com a realização de uma PCR pós digestão enzimática é possível identificar o padrão de bandas que corresponde as fêmeas e aos machos.

Embora o ensaio de sexagem proposto no presente trabalho também utilize a região MHM, ele é bem diferente do ensaio criado pelo nosso grupo em 2008, pois não está baseado na diferença de metilação do DNA entre machos e fêmeas e sim, na diferença no número de cromossomos Z entre eles. As técnicas utilizadas também são distintas, pois o presente trabalho não realiza digestão enzimática, o que facilita o processo (pois elimina uma etapa), no entanto, utiliza qPCR, o que encarece o teste. De maneira geral, podemos dizer que embora ambos sirvam para identificar o sexo fenotípico dos animais, eles possuem objetivos secundários diferentes, pois enquanto um analisa a metilação do DNA da região MHM, o outro identifica o número de cópias dessa região, cabendo ao pesquisador escolher qual adequa-se mais a sua pergunta biológica.

Uma característica importante do teste apresentado no presente trabalho é a pequena quantidade de DNA necessária para se obter um resultado positivo. Apenas 0,39 ng de DNA são suficientes para identificar o sexo dos animais, porém, vale ressaltar que a eficiência da amplificação começa a cair em reações com menos de 2 ng de DNA, portanto, indicamos que o teste seja feito na faixa entre 5 e 10 ng de DNA, onde encontramos uma boa conservação da eficiência de amplificação. Um dos principais objetivos para buscarmos um teste que pudesse ser feito com baixas quantidades de DNA é a possibilidade que isso traz em relação as diferentes fontes das quais o pesquisador pode obter DNA. Esse teste pode ser uma alternativa viável nos casos em que se deseja descobrir o sexo do embrião em estadios iniciais do desenvolvimento (quando não é possível identificar as gônadas visualmente ou não se tem as ferramentas necessárias para isso). Esse tipo de ensaio já é feito com o gene *CHD* e é capaz de identificar o sexo dos animais até mesmo no estadio de blastodisco (o equivalente das aves ao blastocisto dos mamíferos) (Aslam *et al.*, 2012), no entanto, diferente do teste baseado na região MHM ele não é informativo em relação a aspectos relacionados ao desenvolvimento sexual, portanto, uma das perspectivas futuras do nosso trabalho é realizar o teste de sexagem com embriões em diferentes estadios de desenvolvimento, para verificar a equivalência da nossa

técnica em relação à sexagem por *CHD*.

Um dos principais objetivos do teste de sexagem é sua realização utilizando técnicas não invasivas; embora esse objetivo já tenha sido alcançado para os animais pós eclodidos, por meio da sexagem utilizando DNA de pena (Caetano, *et al.*, 2008), DNA de swab bucal (Adam *et al.*, 2014) ou espectroscopia de imagem de infravermelho do bulbo das penas (Steiner *et al.*, 2016), ainda é um desafio realizar a sexagem dos embriões sem que isso prejudique o seu desenvolvimento.

Uma possibilidade, que se abre com a baixa quantidade de DNA necessária no nosso ensaio, é a realização do teste a partir de DNA obtido da membrana interna do ovo, permitindo a identificação do sexo do embrião sem perturbar o seu desenvolvimento. A sexagem não invasiva de embriões pode ser realizada por meio de espectroscopia de fluorescência das artérias dos embriões (Galli *et al.*, 2016; Galli *et al.*, 2017), já que a composição do sangue dos animais do sexo masculino é diferente da do sexo feminino, criando leituras com comprimentos de onda diferentes para machos e fêmeas. No entanto, esse ensaio não possui uma eficiência de 100%, sendo necessária a combinação de duas técnicas diferentes de espectroscopia para atingir um acerto de 93% (Galli *et al.*, 2017). Além disso, é necessário o uso de equipamentos especializados, capazes de emitir e ler luminosidade fluorescente, algo que não é comum nos laboratórios padrões de biologia molecular.

É possível realizar o teste de sexagem dos animais utilizando o gene *CHD* a partir de DNA obtido da membrana interna do ovo, no entanto, após a realização da PCR com *primers* para o gene *CHD* a eletroforese em gel de agarose falhou na detecção do sexo dos animais, sendo necessária a realização de eletroforese capilar para a obtenção de resultados positivos (Bozkaya *et al.*, 2013), o que eleva bastante o custo do ensaio.

O nosso teste de sexagem, baseado na região MHM, pode ter mais chances de sucesso utilizando PCR seguida de eletroforese em gel de agarose de DNA da membrana do ovo, pois, diferente do gene *CHD*, a região MHM é repetitiva e possui muitas cópias em cada um dos cromossomos Z (Teranishi *et al.*, 2001). Isso permite a obtenção de resultados com uma quantidade menor de DNA inicial. Esse teste é uma das perspectivas futuras decorrentes do presente projeto e, caso obtenhamos um resultado positivo, pode se tornar uma importante ferramenta em estudos de conservação e manejo de animais silvestres.

A segunda hipótese afirma que não existem diferenças no número de cópias da região MHM entre os animais do mesmo sexo. De acordo com os resultados obtidos, podemos dizer que essa hipótese foi corroborada. Ao observar o gráfico 3 (página 101) fica claro que não existem diferenças no número de cópias da região MHM entre os animais do mesmo sexo, pelo menos não quando consideramos a média de todos os tecidos de cada animal.

Esse resultado é interessante pois demonstra a importância da presença acurada de um determinado número de repetições da região MHM em cada indivíduo, isso faz com que a diferença encontrada entre os tecidos torne-se mais importante, pois, se todos os animais possuem aproximadamente o mesmo número de repetições da região MHM, isso significa que o organismo deve ser sensível a variações no número de cópias dessa região e as variações encontradas não devem ser provocadas por mero acaso. No nosso trabalho fizemos essa comparação apenas entre os pintinhos, não realizamos o teste com os adultos devido ao número reduzido de animais disponíveis, assim sendo, não podemos afirmar que esse resultado repete-se nos adultos.

Nesse ponto é inevitável traçar comparações com uma característica do genoma que vem chamando bastante atenção nos últimos anos, a variação no número de cópias (CNV) de um gene ou região. As CNVs podem ser encontradas em várias espécies, incluindo humanos, e podem ser descritas como variações no número de cópias de um gene ou região entre os indivíduos, que pode variar de apenas algumas bases nitrogenadas, até regiões grandes do genoma, com mais de 1 kb (Redon *et al.*, 2006). As alterações no número de cópias tem um papel importante em diversos tipos de doenças humanas, como por exemplo distúrbios genômicos, doenças monogênicas, infecções, auto-imunidade, câncer e outros distúrbios complexos (Smith *et al.*, 2009).

Variações entre indivíduos, no número de cópias de genes e regiões genômicas também podem ser encontradas em aves (Skinner *et al.*, 2014; Wang & Byers, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Essas diferenças podem influenciar características fenotípicas como a crista (Wright *et al.*, 2009; Moro *et al.*, 2015), o retardo no desenvolvimento de penas (Elferink *et al.*, 2008), o desenvolvimento de plumagem marrom escuro (Gunnarsson *et al.*, 2011) e a hiperpigmentação dérmica (Dorshorst *et al.*, 2010; Dorshorst *et al.*, 2011). Dessa forma, embora o nosso trabalho não

tenha encontrado diferença no número de repetições da região MHM entre animais do mesmo sexo, a presença dessas diferenças não seria surpresa. Um ponto que deve ser levado em consideração é que no nosso trabalho nós não encontramos diferença entre os animais, mas consideramos apenas a média de todos os tecidos, portanto, existe a possibilidade de diferenças serem encontradas se analisarmos os tecidos individualmente.

De acordo com a terceira hipótese, não existem diferenças no número de cópias da região MHM entre diferentes tecidos do mesmo animal. Com os resultados obtidos, essa hipótese foi refutada; pois, pelo menos no caso dos pintinhos, existe uma diferença no número de cópias da região MHM entre os diferentes tecidos dos animais, isso pode ser demonstrado claramente nas séries de gráficos apresentados nas figuras 27 e 28 (páginas 104 e 105), nas quais é possível notar que o tecido com o menor número de cópias da região MHM é o fígado, seguido por músculo, rim, coração, pulmão, gônada, cérebro e sangue.

Uma característica importante, que pesa a favor dessa diferença, é que tanto em machos quanto em fêmeas encontramos a mesma sequência de tecidos descrita acima. Isso pode significar que existe um motivo fisiológico para essa diferença no número de cópias entre os tecidos.

Durante algum tempo, acreditou-se que as CNVs existiam apenas entre indivíduos, no entanto, hoje sabe-se que diferentes tecidos do mesmo animal podem apresentar variações no número de cópias de genes e regiões genômicas, sendo que essas diferenças podem estar relacionadas aos níveis de expressão gênica (Piotrowski *et al.*, 2008; O'Huallachain *et al.*, 2012). Embora essa diferença de CNVs entre os tecidos tenha sido descrita em humanos, não existem motivos para acreditar que ela não exista em aves, uma vez que os estudos de CNVs em humanos e camundongos estão bem mais adiantados do que em aves.

Uma perspectiva futura, que pode ajudar a desvendar um pouco mais essa ocorrência, é a elaboração de um trabalho que verifique os níveis dos transcritos da região MHM nos diferentes tecidos dos pintinhos, para verificar se o nível de transcrição da região MHM varia de acordo com o número de cópias em cada tecido. Outro ponto importante seria a realização de um estudo com um número maior de animais adultos, para que possamos verificar se essa diferença entre os tecidos está presente nos adultos ou se é uma característica exclusiva dos filhotes.

A quarta hipótese se refere a não existência de diferenças no número de cópias da região MHM entre os animais adultos e os filhotes do mesmo sexo. Pelos nossos resultados, essa hipótese não pôde ser corroborada ou refutada, pois, embora tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significativas entre os adultos e filhotes em pulmões de fêmeas ($p < 0,017$), rins de machos ($p < 0,0069$), gônadas de fêmeas ($p < 0,008$), fígados de machos ($p < 0,024$) e fígados de fêmeas ($p < 0,001$), em alguns casos, utilizamos apenas duas amostras de tecido adulto para a realização dos testes, quantidade insuficiente para que tenhamos um resultado robusto.

No entanto, é importante chamar a atenção para a diferença encontrada entre o fígado de fêmeas adultas e filhotes. Diferente dos outros tecidos, o fígado de fêmea apresentou uma diferença nítida nas curvas de amplificação entre adultos e filhotes, portanto, é provável que quando aumentemos o número de animais adultos, todas as diferenças significativas encontradas entre os animais adultos e filhotes deixem de existir, com exceção do fígado de fêmea, que provavelmente apresenta uma diferença real entre eles. Os filhotes devem iniciar a vida com um determinado número de cópias da região MHM no fígado e, vão ganhando cópias durante o desenvolvimento, até atingirem os valores encontrados nos adultos. Em humanos, variações no número de cópias de genes e regiões ao longo da vida já foram descritas (Smith *et al.*, 2009), no entanto, geralmente estão relacionadas à doenças. No caso das galinhas, se confirmada essa diferença, seria a descrição de um caso fisiologicamente normal de variação no número de cópias durante o desenvolvimento.

Ainda não temos uma explicação para essa diferença entre o fígado de adultos e filhotes ou, porque essa diferença é nitidamente mais pronunciada nas fêmeas. Se a variação tivesse sido encontrada nas gônadas, seria mais fácil criar uma hipótese que pudesse explicá-la, devido às diferenças fisiológicas entre as gônadas de macho e fêmea e também ao papel da região MHM na compensação de dose e determinação sexual. No entanto, não conseguimos explicar essa diferença no fígado e novos trabalhos serão propostos para tentar entender melhor a dinâmica das mudanças no número de cópias da região MHM durante o desenvolvimento.

A quinta e última hipótese do trabalho afirma que a região MHM encontra-se hipermetilada nos animais do sexo masculino e hipometilada nos animais do sexo

feminino. Os resultados do sequenciamento do fragmento de DNA modificado com bissulfito de sódio corroboraram essa hipótese. Embora vários trabalhos, incluindo um do nosso grupo de pesquisa (Caetano & Ramos, 2008), já tenham corroborado essa hipótese, o presente estudo utilizou uma abordagem diferente dos trabalhos anteriores, realizando a modificação do DNA com bissulfito de sódio e sequenciamento, para identificar a metilação em pontos específicos do DNA. No final de 2016 foi publicado um trabalho utilizando essas mesmas técnicas (Yang *et al.*, 2016), porém, com três diferenças principais: (1) utilizou-se embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (o nosso trabalho utilizou animais adultos); (2) utilizou-se a região adjacente à ilha CpG da região MHM (o nosso trabalho utilizou uma região dentro da ilha CpG); (3) utilizou-se DNA de gônada e músculo (o nosso trabalho utilizou DNA de pena).

Curiosamente, os resultados encontrados por Yang *et al.* (2016) não apresentam diferenças no nível de metilação do DNA da região MHM entre machos e fêmeas para o tecido muscular, apenas as gônadas apresentaram o padrão hipermetilado no macho e hipometilado na fêmea e, ainda assim, os níveis de metilação encontrados por eles diferem dos encontrados no nosso trabalho. Os machos apresentaram uma média de aproximadamente 70% dos sítios CpGs metilados (contra 92,3% no nosso trabalho), enquanto as fêmeas apresentaram uma média de aproximadamente 20% dos sítios CpGs metilados (contra 2,1% no nosso trabalho).

Existem três possíveis explicações para essa diferença encontrada entre os trabalhos de Yang *et al.* (2016) e o nosso. (1) a diferença entre os tecidos: talvez o DNA de pena tenha um padrão de metilação diferente do DNA de gônada; (2) a diferença no estádio de desenvolvimento: os embriões podem apresentar níveis diferentes de metilação do DNA da região MHM em relação aos animais adultos; (3) a região escolhida: por terem sido escolhidos pontos diferentes dentro da região MHM, uma variação no padrão de metilação pode ser esperada.

Pelos nossos resultados, além de confirmarmos a hipermetilação do DNA da região MHM dos machos e hipometilação do DNA da região MHM das fêmeas, um ponto chama a atenção. Ao observar a figura 18 (página 81), podemos notar que o décimo segundo ponto CpG dos machos encontra-se hipometilado em todas as amostras testadas, isso é muito curioso, visto que praticamente todos os outros

pontos estão hipermetilados, podendo indicar a importância da manutenção desse ponto não metilado para alguma função relacionada ao controle dessa região. Ou talvez, esse ponto não metilado seja um, dentro de um conjunto maior de pontos não metilados em regiões adjacentes ao fragmento sequenciado e a presença de pontos específicos metilados e não metilados regulam as características únicas dessa região.

O nosso trabalho é importante nesse sentido, pois ao levantar esse questionamento demonstramos que essa região merece mais estudos, até que sua grande complexidade seja desvendada.

CONCLUSÃO

VII. CONCLUSÃO

É possível utilizar as diferenças no número de cópias da região MHM para diferenciar machos e fêmeas de *Gallus gallus domesticus*. O teste de sexagem é eficaz tanto para animais adultos quanto filhotes e pode ser realizado utilizando amostras de DNA de coração, cérebro, rim, pulmão, fígado, gônada, músculo e sangue. Pequenas quantidades de DNA são suficientes para a realização do teste.

Embora o teste de sexagem possa ser realizado com DNA de fígado, os parâmetros utilizados nesse tecido devem ser diferentes dos demais.

Os filhotes do mesmo sexo não apresentam diferenças no número de cópias da região MHM como um todo, no entanto, os tecidos apresentam diferenças entre eles. O fígado é o tecido com o menor número de cópias, seguido por músculo, rim, coração, pulmão, gônada, cérebro e sangue. Esse padrão é encontrado nos animais do sexo masculino e feminino.

Encontramos diferenças no número de cópias da região MHM entre os animais adultos e os filhotes, no entanto, essa diferença não deve ser considerada devido ao baixo número amostral de alguns tecidos dos animais adultos, portanto, mantemos essa informação como inconclusiva.

A região MHM, conforme o esperado, encontra-se hipermetilada nos animais do sexo masculino (92,3%) e hipometilada nos animais do sexo feminino (2,1%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, R.; PENALVA, L.; MARCOTTE, E.; VOGEL, C.. 2009. **Global signatures of protein and mRNA expression levels.** Mol BioSyst. 5:1512–1526.

ADAM, I.; SCHARFF, C.; HONARMAND, M.. 2014. **Who is Who? Non-invasive Methods to Individually Sex and Mark Altricial Chicks.** J Vis Exp. (87): 51429.

ADLER, D.; RUGARLI, E.; LINGENFELTER, P.; TSUCHIYA, K.; POSLINSKI, D.; LIGGITT, H.; CHAPMAN, V.; ELLIOTT, R.; BALLABIO, A.; DISTECHE, C..1997. **Evidence of evolutionary up-regulation of the single active X chromosome in mammals based on Clc4 expression levels in *Mus spretus* and *Mus musculus*.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94, 9244–9248.

AITKEN, R.; GRAVES, J. 2002. **The future of sex.** Nature 415:963.

AMREIN, H.; AXEL, R. 1997. **Genes expressed in neurons of adult male *Drosophila*.** Cell 21;88(4):459-69.

ASLAM, M.; HULST, M.; HOVING-BOLINK, R.; DE WIT, A.; SMITS, M.; WOELDERS, H.. 2012. **A reliable method for sexing unincubated bird eggs for studying primary sex ratio.** Mol Ecol Resour. 2012 May;12(3):421-7.

AYERS, K.; DAVIDSON, N.; DEMIYAH, D.; ROESZLER, K.; GRÜTZNER, F.; SINCLAIR, A.; OSHLACK, A.; SMITH, C.. 2013. **RNA sequencing reveals sexually dimorphic gene expression before gonadal differentiation in chicken and allows comprehensive annotation of the W-chromosome.** Genome Biol 14:R26.

BACHTROG, D.; KIRKPATRICK, M.; MANK, J.; MCDANIEL, S.; PIRES, J.; RICE, W.; VALENZUELA, N.. 2011. **Are all sex chromosomes created equal?** Trends Genet 27:350-7.

BACHTROG, D. 2013. **Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration.** Nat. Rev. Genet. 14, 113–124.

BACHTROG, D. *et al.* 2014. **Sex determination: why so many ways of doing it?** PLoS Biol. 12, e1001899.

BELLOTT, D.; SKALETSKY, H.; PYNTIKOVA, T.; MARDIS, E.; GRAVES, T.; KREMITZKI, C.; BROWN, L.; ROZEN, S.; WARREN, W.; WILSON, R.; PAGE, D.. 2010. **Convergent evolution of chicken Z and human X chromosomes by expansion and gene acquisition.** Nature 466:612–616.

BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.; CHÁVEZ-ZAMARRIPA, P.; GUZMÁN-VELASCO, A.; LEAL-GARZA, C.; MONTES DE OCA-LUNA, R.. 2002. **Loss of restriction site *Ddel*, used for Avian molecular sexing, in *Oreophasis derbianus*.** Reprod Dom Anim 37: 321-23.

BISONI, L.; BATLLE-MORERA, L.; BIRD, A.; SUZUKI, M.; MCQUEEN, H.. 2005. **Female-specific hyperacetylation of histone H4 in the chicken Z chromosome.** Chromosome Res 13(2):205–214.

BOZKAYA, F.; GURLER, S.; YERTURK, M.; AYDILEK, N.. 2013. **Isolation of DNA from embryo and chorio-allantoic membranes and sexing by PCR in Japanese quail.** Br Poult Sci. 2013;54(1):106-11.

BROWN, C.; BALLABIO, A.; RUPERT, J.; LAFRENIERE, R.; GROMPE, M.; TONLORENZI, R.; WILLARD, H.. 1991. **A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome.** Nature 349:38–44.

CAETANO, L.; RAMOS, S.. 2008. **MHM assay: molecular sexing based on the sex-specific methylation pattern of the MHM region in chickens.** Conservation Genetics 9:985-987.

CAETANO, L.; GENNARO, F.; COELHO, K.; ARAÚJO, F.; VILA, R.; ARAÚJO, A.; DE MELO, A.; MARCONDES, C.; CHUVA DE SOUSA, S.; RAMOS, E.. 2014. **Differential expression of the MHM region and of sex-determining-related genes during gonadal development in chicken embryos.** Genet. Mol. Res. 13: 838–849.

ÇAKMAK, E.; AKIN PEKSEN, Ç.; BILGIN, C.. 2017. **Comparison of three different primer sets for sexing birds.** J Vet Diagn Invest. 29(1):59-63.

CARREL, L.; WILLARD, H. 2005. **X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females.** Nature 434: 400–404.

CHARLESWORTH, B. 1991. **The evolution of sex chromosomes.** Science 251:1030–1033.

CHEN, S. *et al.* 2014. **Whole-genome sequence of a flatfish provides insights into ZW sex chromosome evolution and adaptation to a benthic lifestyle.** Nature Genetics 46(3):253-60.

DELMAS, V.; STOKES, D.; PERRY, R.. 1993. **A mammalian DNA binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/ SWI2-like helicase domain.** Proc Natl Acad Sci USA 90, 2414-2418.

DENG, X. *et al.* 2011. **Evidence for compensatory upregulation of expressed X-linked genes in mammals, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*.** Nat. Genet. 43, 1179–1188.

DORSHORST, B.; OKIMOTO, R.; ASHWELL, C.. 2010. **Genomic regions associated with dermal hyperpigmentation, polydactyly and other morphological traits in the Silkie chicken.** J. Hered. 101, 339–350.

DORSHORST, B.; MOLIN, A.; RUBIN, C.; JOHANSSON, A.; STROMSTEDT, L.; PHAM, M.; CHEN, C.; HALLBOOK, F.; ASHWELL, C.; ANDERSSON, L.. 2011. **A complex genomic rearrangement involving the endothelin 3 locus causes dermal hyperpigmentation in the chicken.** PLoS Genet. 7, e1002412.

DUAN, W.; FUEREST, P. 2001. **Isolation of a sex-linked DNA sequence in cranes.** J Hered 92:392–397.

EFERINK, M.; VALLEE, A.; JUNGERIUS, A.; CROOIJMANS, R.; GROENEN, M.. 2008. **Partial duplication of the PRLR and SPEF2 genes at the late feathering locus in chicken.** BMC Genomics 2008, 9, 391.

ELLEGREN, H. 1996. **First gene on the avian W chromosome (*CHD*) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds.** Proc R Soc Lond B Biol Sci 263:1635-41.

ELLEGREN, H.; SHELDON, B. C. 1997. **New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds.** *Tree* 12:255-59.

ELLEGREN, H.; HULTIN-ROSENBERG, L.; BRUNSTRÖM, B.; DENCKER, L.; KULTIMA, K.; SCHOLZ, B.. 2007. **Faced with inequality: chicken do not have a general dosage compensation of sex-linked genes.** *BMC Biology* 20075:40.

ERCAN, S.; GIRESI, P.; WHITTLE, C.; ZHANG, X.; GREEN, R.; LIEB, J.. 2007. **X chromosome repression by localization of the *C. elegans* dosage compensation machinery to sites of transcription initiation.** *Nat. Genet.* 39, 403–408.

GALLI, R.; PREUSSE, G.; UCKERMANN, O.; BARTELS, T.; KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.; KOCH, E.; STEINER, G.. 2016. **In Ovo Sexing of Domestic Chicken Eggs by Raman Spectroscopy.** *Anal Chem.* 88(17):8657-63.

GALLI, R.; PREUSSE, G.; UCKERMANN, O.; BARTELS, T.; KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.; KOCH, E.; STEINER, G.. 2017. **In ovo sexing of chicken eggs by fluorescence spectroscopy.** *Anal Bioanal Chem.* 409(5):1185-1194.

GHAZALPOUR, A. *et al.* 2011. **Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse.** *PLoS Genet.* 7:e1001393.

GIRIRAJAN, S.; CAMPBELL, C.; EICHLER, E.. 2011. **Human copy number variation and complex genetic disease.** *Annu Rev Genet* 45:203-26.

GOTH, A.; BOOTH, D. 2005. **Temperature-dependent sex ratio in a bird.** *Biol Lett* 1:31–33.

GRANT, J.; MAHADEVAIAH, S.; KHIL, P.; SANGRITHI, M.; ROYO, H.; DUCKWORTH, J.. 2012. **Rsx is a metatherian RNA with Xist-like properties in X-chromosome inactivation.** *Nature* 487, 254–258.

GRAVES, J. 2006. **Sex chromosome specialization and degeneration in mammals.** *Cell* 124:901–914.

GRAVES, J. 2013. **How to evolve new vertebrate sex determining genes.** *Dev Dyn* 242:354–359.

GRAVES, J. 2014. **Avian sex, sex chromosomes, and dosage compensation in the age of genomics.** *Chromosome Res* 22:45–57.

GRAVES, J. 2015. **Weird mammals provide insights into the evolution of mammalian sex chromosomes and dosage compensation.** *J Genet.* 94(4): 567-74.

GRAVES, J. 2016. **Evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation.** *Nat Rev Genet* 17:33-46.

GRIFFITHS, R.; TIWARI, B. 1993. **The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex.** *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8324–8326.

GRIFFITHS, R.; DAAN, S.; DIJKSTRA, C.. 1996. **Sex identification in birds using two *CHD* genes.** *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263:1251-56.

GRIFFITHS, R.; KORN, R. M. 1997. **A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken (*Gallus domesticus*).** *Gene* 197:225–229.

GROENEN, M. *et al.* 2000. **A consensus linkage map of the chicken genome.** *Genome Res* 10:137– 147.

GUIOLI, S. LOVELL-BADGE, R.; TURNER, J.. 2012. **Error-prone ZW pairing and no evidence for meiotic sex chromosome inactivation in the chicken germ line.** *PLoS Genet* 8(3):e1002560.

GUNNARSSON, U.; KERJE, S.; BED'HOM, B.; SAHLQVIST, A.; EKWALL, O.; TIXIER-BOICHARD, M.; KAMPE, O.; ANDERSSON, L.. 2011 **The Dark brown plumage color in chickens is caused by an 8.3-kb deletion upstream of *SOX10*.** *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 268–274.

HARRISON, P.; MANK, J.; WEDELL, N.. 2012. **Incomplete sex chromosome dosage compensation in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, based on de novo transcriptome assembly.** *Genome Biol. Evol.* 4, 1118–1126.

HUALLACHAIN, M.; KARCZEWSKI, K.; WEISSMAN, S.; URBAN, A.; SNYDER, M.. 2012. **Extensive genetic variation in somatic human tissues**. PNAS vol. 109 no. 44, 18018–18023.

HUGHES, J. *et al.* 2012. **Strict evolutionary conservation followed rapid gene loss on human and rhesus Y chromosomes**. Nature 483, 82–86.

ITOH, Y.; SUZUKI, M.; OGAWA, A.; MUNECHIKA, I.; MURATA, K.; MIZUNO, S.. 2001. **Identification of the sex of a wide range of Carinatae Birds by PCR using primer sets selected from chicken EE0.6 and its related sequences**. Am Genetic Assoc 92:315-21.

ITOH, Y. *et al.* 2007. **Dosage compensation is less effective in birds than in mammals**. J. Biol. 6, 2.

ITOH, Y.; Kampf, K.; Ap, A.. 2009. **Disruption of FEM1C-W gene in zebra finch: evolutionary insights on avian ZW genes**. Chromosoma 118:323–334.

ITOH, Y.; REPLOGLE, K.; KIM, Y.; WADE, J.; CLAYTON, D.; ARNOLD, A.. 2010. **Sex bias and dosage compensation in the zebra finch vs. chicken genomes: general and specialized patterns among birds**. Genome Res. 20: 512–518.

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

JULIEN, P.; BRAWAND, D.; SOUMILLON, M.; NECSULEA, A.; LIECHTI, A.; SCHÜTZ, F.; DAISH, T.; GRÜTZNER, F.; KAESSMANN, H.. 2012. **Mechanisms and evolutionary patterns of mammalian and avian dosage compensation**. PLoS Biol. 10, e1001328.

KAMIYA, T. *et al.* 2012. **A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in the tiger pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu)**. PLoS Genet. 8, e1002798.

KAWAGOSHI, T.; UNO, Y.; NISHIDA, C.; MATSUDA, Y.. 2014. **The staurotypus turtles and aves share the same origin of sex chromosomes but evolved different types of heterogametic sex determination**. PLoS ONE 9(8): e105315.

KHARCHENKO, P.; XI, R.; PARK, P.. 2011. **Evidence for dosage compensation between the X chromosome and autosomes in mammals.** *Nat. Genet.* 43, 1167–1169.

KOERICH, L.; WANG, X.; CLARK, A.; CARVALHO, A.. 2008. **Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome.** *Nature* 456, 949–951.

KUMAKI, Y.; ODA, M.; OKANO, M.. 2008. **QUMA: quantification tool for methylation analysis.** *Nucleic Acids Res* 36:W170-5.

LARSCHAN, E.; BISHOP, E.; KHARCHENKO, P.; CORE, L.; LIS, J.; PARK, P.; KURODA, M.. 2011. **X chromosome dosage compensation via enhanced transcriptional elongation in *Drosophila*.** *Nature* 471, 115–139.

LEE, H. *et al.* 2014. **DNA copy number evolution in *Drosophila* cell lines.** *Genome Biol* 2014;15:R70.

LESAICHERRE, M.; LI, S.; LEE, H.. 2000. **Separation of polymerase chain reaction amplified bird genes by capillary electrophoresis.** *Electrophoresis* 21:1336-40.

LI, L. C.; DAHIYA, R. 2002. **MethPrimer: designing primers for methylation PCRs.** *Bioinformatics* 18:1427–1431.

LIN, F.; XING, K.; ZHANG, J.; HE, X.. 2012. **Expression reduction in mammalian X chromosome evolution refutes Ohno's hypothesis of dosage compensation.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(29):11752–7.

LIN, H.; HALSALL, J.; ANTCZAK, P.; O'NEILL, L.; FALCIANI, F.; TURNER, B.. 2011. **Relative overexpression of X-linked genes in mouse embryonic stem cells is consistent with Ohno's hypothesis.** *Nat. Genet.* 43, 1169–1170.

LIVERNOIS, A.; GRAVES, J.; WATERS, P.. 2012. **The origin and evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation.** *Heredity* 108:50–58.

LIVERNOIS, A.; AL NADAF, S.; DEAKIN, J.; GRAVES, J.; WATERS, P.. 2013. **Independent evolution of transcriptional inactivation on sex chromosomes in birds and mammals.** *PLoS Genet* 9: e1003635.

LU, P.; VOGEL, C.; WANG, R.; YAO, X.; MARCOTTE, E.. 2007. **Absolute protein expression profiling estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation.** Nature Biotechnol. 25:117–124.

MALONE, J. *et al.* 2012. **Mediation of *Drosophila* autosomal dosage effects and compensation by network interactions.** Genome Biol. 13, R28.

MANK, J. 2009. **The W, X, Y and Z of sex chromosome dosage compensation.** Trends Genet. 25, 226–233.

MANK, J.; ELLEGREN, H. 2009b. **All dosage compensation is local: gene-by-gene regulation of sex-biased expression on the chicken Z chromosome.** Heredity 102:312–320.

MANK, J. 2013. **Sex chromosome dosage compensation: definitely not for everyone.** Trends Genet. 29(12):677-83.

MATSUBARA, K.; TARUI, H.; TORIBA, M.; YAMADA, K.; NISHIDA-UMEHARA, C.; AGATA, K.; MATSUDA, Y.. 2006. **Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and stepwise differentiation of snake sex chromosomes.** Proc Natl Acad Sci U S A 103:18190–18195.

MELAMED, E.; ARNOLD, A. 2007. **Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome.** Genome Biol. 8: R202.

MILLAR, C.; LAMBERT, D.; ANDERSON, S.; HALVERSON, J.. 1996. **Molecular sexing of the communally breeding pukeko: an important ecological tool.** Mol Ecol 5:289-93.

MOGHADAM, H.; POINTER, M.; WRIGHT, A.; BERLIC, S.; MANK, J.. 2012. **W chromosome expression responds to female-specific selection.** Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 8207–8211.

MOGHADAM, H.; HARRISON, P.; ZACHAR, G.; SZEKELY, T.; MANK, J.. 2013. **The plover neurotranscriptome assembly: transcriptomic analysis in an ecological model species without a reference genome.** Mol. Ecol. Resour. 13: 696–705.

MORINHA, F.; CABRAL, J.; BASTOS, E.. 2012. **Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods.** *Theriogenology*. 78(4):703-14.

MORO, C.; CORNETTE, R.; VIEAUD, A.; BRUNEAU, N.; GOURICHON, D.; BED'HOM, B.; TIXIER-BOICHARD, M.. 2015. **Quantitative Effect of a CNV on a Morphological Trait in Chickens.** *PLOS ONE* 10(3): e0118706.

NANDA, I. *et al.* 1999. **300 million years of conserved synteny between chicken Z and human chromosome 9.** *Nat Genet* 21:258–259.

NANDA, I.; KONDO, M.; HORNUNG, U.; ASAKAWA, S.; WINKLER, C.; SHIMIZU, A.; SHAN, Z.; HAAF, T.; SHIMIZU, N.; SHIMA, A.; SCHMID, M.; SCHARTL, M.. 2002. **A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome of the medaka, *Oryzias latipes*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99,11778–11783.

NANDA, I.; BENISCH, P.; FETTING, D.; HAAF, T.; SCHMID, M.. 2011. **Syntenic conservation of chicken macrochromosomes 1–10 in different avian lineages revealed by cross-species chromosome painting.** *Cytogenet Genom Res* 132:165–181.

NESJE M, ROED KH. 2000. **Sex identification in falcons using microsatellite DNA markers.** *Hereditas* 132:261-63.

NGUYEN, D.; DISTECHE, C. 2006. **Dosage compensation of the active X chromosome in mammals.** *Nat. Genet.* 38, 47–53.

OGAWA, A.; MURATA, K.; MIZUNO, S.. 1998. **The location of Z- and W-linked marker genes and sequence on the homomorphic sex chromosomes of the ostrich and the emu.** *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4415-18.

OHNO, S. 1967. **Sex chromosomes and sex-linked genes.** Springer, New York.

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

PFAFFL, M. 2001. **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Research* vol. 29 No. 900.

PIGOZZI, M. 2011. **Diverse stages of sex-chromosome differentiation in tinamid birds: evidence from crossover analysis in *Eudromia elegans* and *Crypturellus tataupa*.** *Genetica* 139: 771–777.

PIOTROWSKI, A. *et al.* 2008. **Somatic mosaicism for copy number variation in differentiated human tissues.** *Hum Mutat.* 29:1118–1124.

POKORNÁ, M.; GIOVANNOTTI, M.; KRATOCHVÍL, L.; KASAI, F.; TRIFONOV, V.; O'BRIEN, P.; CAPUTO, V.; OLMO, E.; FERGUSON-SMITH, M.; RENS, W.. 2011. **Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence.** *Chromosoma* 120:455–468.

RAMOS, E.; SERAFIM, J.; TAKEUCHI, P.; MARCONDES, C.; ARAÚJO, A.. 2010. **Identification of X chromosome copies by quantitative real-time polymerase chain reaction for population screening tests.** *Fertility and Sterility*, v. 94, p. 2476-2478.

RAYMOND, C.; KETTLEWELL, J.; HIRSCH, B.; BARDWELL, V.; ZARKOWER, D.. 1999. **Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development.** *Dev Biol* 215:208–220.

REDON, R.. 2006. **Global variation in copy number in the human genome.** *Nature* 23;444(7118):444-54.

SKINNER, B.; AL MUTERY, A.; SMITH, D.; VOLKER, M.; HOJJAT, N.; RAJA, S.; TRIM, S.; HOUDE, P.; BOECKLEN, W.; GRIFFIN, D.. 2014. **Global patterns of apparent copy number variation in birds revealed by cross-species comparative genomic hybridization.** *Chromosome Res.* 22(1):59-70.

SMITH, A.; WALTERS, R.; FROGUEL, P.; BLAKEMORE, A.. 2009. **Human genes involved in copy number variation: mechanisms of origin, functional effects and implications for disease.** *Cytogenet Genome Res.* 123(1-4): 17–26.

SMITH, C.; ROESZLER, K.; OHNESORG, T.; CUMMINS, D.; FARLIE, P.; DORAN, T.; SINCLAIR, A.. 2009b. **The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken.** *Nature* 10;461(7261):267-71.

SMITH, G.; CHEN, Y.; BLISSARD, G.; BRISCOE, A.. 2014. **Complete dosage compensation and sex-biased gene expression in the moth *Manduca sexta***. *Genome Biol. Evol.* 6, 526–537.

SOLARI, A. 1992. **Equalization of Z and W axes in chicken and quail oocytes**. *Cytogenet Cell Genet* 59:52–56.

SOLARI, A. 1994. **Sex chromosomes and sex determination in vertebrates**. CRC Press, Boca Raton.

STEINER, G.; PREUSSE, G.; ZIMMERER, C.; KRAUTWALD-JUNGHANNS, M.; SABLINSKAS, V.; FUHRMANN, H.; KOCH, E.; BARTELS, T.. 2016. **Label free molecular sexing of monomorphic birds using infrared spectroscopic imaging**. *Talanta*. 150:155-61.

SUH, A.; KRIEGS, J.; BROSIUS, J.; SCHMITZ, J.. 2011. **Retroposon insertions and the chronology of avian sex chromosome evolution**. *Mol Biol Evol* 28:2993–2997.

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

TSUDA, Y.; NISHIDA-UMEHARA, C.; ISHIJIMA, J.; YAMADA, K.; MATSUDA, Y.. 2007. **Comparison of the Z and W sex chromosomal architectures in elegant crested tinamou (*Eudromia elegans*) and ostrich (*Struthio camelus*) and the process of sex chromosome differentiation in palaeognathous birds**. *Chromosoma* 116:159–173.

UEBBING, S.; KUNSTNER, A.; MAKINEN, H.; ELLEGREN, H.. 2013. **Transcriptome sequencing reveals the character of incomplete dosage compensation across multiple tissues in flycatchers**. *Genome biology and evolution* 5:1555-66.

UEBBING, S.; KONZER, A.; XU, L.; BACKSTROM, N.; BRUNSTRON, B.; BERGGUIST, J.; ELLEGREN, H.. 2015. **Quantitative Mass Spectrometry Reveals Partial Translational Regulation for Dosage Compensation in Chicken.** *Molecular biology and evolution* 32:2716-25.

VICOSO, B.; BACHTROG, D. 2011. **Lack of global dosage compensation in *Schistosoma mansoni*, a female-heterogametic parasite.** *Genome Biol. Evol.* 3, 230–235.

WANG, M.; LIN, F.; XING, K.; LIU, L.. 2017. **Random X-chromosome inactivation dynamics *in vivo* by single-cell RNA sequencing.** *BMC Genomics.* 18: 90.

WANG, X.; BYERS, S.. 2014. **Copy Number Variation in Chickens: A Review and Future Prospects.** *Microarrays* 2014, 3, 24-38.

WANG, Z.; ZHANG, J.; YANG, W.; AN, N.; ZHANG, P.; ZHANG, G.; ZHOU, Q.. 2014. **Temporal genomic evolution of bird sex chromosomes.** *BMC Evol. Biol.* 14: 250.

WIJCHERS, P.; YANDIM, C.; PANOUSOPOULOU, E.; AHMAD, M.; HARKER, N.; SAVELIEV, A.; BURGOYNE, P.; FESTENSTEIN, R.. 2010. **Sexual dimorphism in mammalian autosomal gene regulation is determined not only by Sry but by sex chromosome complement as well.** *Dev. Cell* 19, 477–484.

WIJCHERS, P.; FESTENSTEIN, R. 2011. **Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes.** *Trends Genet.* 27,132–140.

WOLF, J.; BRYK, J. 2011. **General lack of global dosage compensation in ZZ/ZW systems? Broadening the perspective with RNA-seq.** *BMC Genomics* 12: 91.

WRIGHT, A.; MOGHADAM, H.; MANK, J.. 2012. **Trade-off between selection for dosage compensation and masculinization on the avian Z chromosome.** *Genetics* 192: 1433–1445.

WRIGHT, A.; ZIMMER, F.; HARRISON, P.; MANK, J.. 2015. **Conservation of Regional Variation in Sex-Specific Sex Chromosome Regulation.** *Genetics* 201(2):587-98.

WRIGHT, D. *et al.* 2009. **Copy number variation in intron 1 of SOX5 causes the Pea-comb phenotype in chickens.** PLoS Genet. 5,e1000512.

XIONG, Y.; CHEN, X.; CHEN, Z.; WANG, X.; SHI, S.; WANG, X.; ZHANG, J.; HE, X.. 2010. **RNA sequencing shows no dosage compensation of the active X-chromosome.** Nat. Genet. 42, 1043–1049.

YANG, X.; ZHENG, J.; XU, G.; QU, L.; CHEN, S.; LI, J.; YANG, N.. 2010. **Exogenous cMHM regulates the expression of DMRT1 and ERa in avian testes.** Mol. Biol. Rep. 37: 1841–1847.

YANG, X.; DENG, J.; ZHENG, J.; XIA, L.; YANG, Z.; QU, L.; CHEN, S.; XU, G.; JIANG, H.; CLINTON, M.; YANG, N.. 2016. **A Window of MHM Demethylation Correlates with Key Events in Gonadal Differentiation in the Chicken.** Sex Dev. 10(3):152-8.

ZAITOUN, I.; DOWNS, K.; ROSA, G.; KHATIB, H.. 2010. **Upregulation of imprinted genes in mice: an insight into the intensity of gene expression and the evolution of genomic imprinting.** Epigenetics 5:149-58.

ZHA, X.; XIA, Q.; DUAN, J.; WANG, C.; HE, N.; XIANG, Z.. 2009. **Dosage analysis of Z chromosome genes using microarray in silkworm, *Bombyx mori*.** Insect Biochem. Mol. Biol. 35, 315–321.

ZHANG, H.; DU, Z.; DONG, J.; WANG, H.; SHI, H.; WANG, N.; WANG, S.; LI, H.. 2014. **Detection of genome-wide copy number variations in two chicken lines divergently selected for abdominal fat content.** BMC Genomics. 2014;15: 517.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; BACHTROG, D.; AN, N.; HUANG, Q.; JARVIS, E.; GILBERT, M.; ZHANG, G.. 2014. **Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa.** Science 346:1246338.